Određivanje polifenola male molekulske mase u sjemenkama bobica grožđa nekih međuvrsnih križanaca vinove loze

Brusek, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:657548

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

ODREĐIVANJE POLIFENOLA MALE MOLEKULSKE MASE U SJEMENKAMA BOBICA GROŽĐA NEKIH MEĐUVRSNIH KRIŽANACA VINOVE LOZE

DIPLOMSKI RAD

Kristina Brusek

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Vinogradarstvo i vinarstvo

ODREĐIVANJE POLIFENOLA MALE MOLEKULSKE MASE U SJEMENKAMA BOBICA GROŽĐA NEKIH MEĐUVRSNIH KRIŽANACA

DIPLOMSKI RAD

Kristina Brusek

Mentor: Prof.dr.sc. Jasminka Karoglan Kontić

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Kristina Brusek**, JMBAG 0178088517, rođena 05.12.1992. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

ODREĐIVANJE POLIFENOLA MALE MOLEKULSKE MASE U SJEMENKAMA BOBICA GROŽDA NEKIH MEĐUVRSNIH KRIŽANACA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Kristine Brusek**, JMBAG 0178088517, naslova
ODREĐIVANJE POLIFENOLA MALE MOLEKULSKE MASE U SJEMENKAMA BOBICA GROŽĐA NEKIH MEĐUVRSNIH KRIŽANACA VINOVE LOZE
obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	Prof.dr.sc. Jasminka Karoglan Kontić	mentor	_____
2.	Izv. prof.dr.sc. Marija Bujan	član	_____
3.	Doc.dr.sc. Darko Preiner	član	_____

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Jasminki Karoglan Kontić na podršci, savjetima i stručnom vođenju tijekom izrade diplomskog rada.

Iskreno se zahvaljujem Ivani Tomaz, dr.sc. na nesebičnoj pomoći, korisnim uputama te neposrednom nadzoru tijekom cjelokupnog rada u laboratoriju i izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem također svim profesorima, asistentima i ostalim djelatnicima Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na pruženom znanju i iskustvu učenja u vinogradarsko-vinarskoj struci.

Hvala svim kolegama i prijateljima na uzajamnoj podršci, suradnji i lijepim zajedničkim trenucima.

Najveća hvala mojim roditeljima, bratu, sestri, dečku i ostatku rodbine koji su me uvijek neizmjerno motivirali i poticali da dajem više od sebe, od samih početka.

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Literaturni pregled 2
3. Sastav i sadržaj polifenola sjemenke bobica grožđa 2
   3.1. Sjemenka 2
   3.2. Polifenolni spojevi 4
4. Karakteristike sorata 7
   4.1. Bijele sorte međuvrsnih križanaca 7
   4.2. Crne sorte međuvrsnih križanaca 9
5. Cilj rada 12
6. Materijali i metode 13
   6.1. Uzorkovanje 13
   6.2. Ekstrakcija polifenola iz sjemenki bobica grožđa 13
   6.3. Tekućinsko-kromatografska metoda 16
   6.4. Statistička obrada podataka 16
7. Rezultati i rasprava 17
8. Zaključak 27
9. Popis literature 28
Životopis autora 30

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Kristine Brusek**, naslova

ODREĐIVANJE POLIFENOLA MALE MOLEKULSKE MASE U SJEMENKAMA BOBICA GROŽĐA NEKIH MEĐUVRSNIH KRIŽANACA

Sastav i sadržaj fenolnih spojeva bobice grožđa uvelike ovisi o genotipu vinove loze, okolišnim uvjetima te uvjetima samog uzgoja. U ovom radu, istraživanje je provedeno na 19 sorata nastalih međuvrsnim križanjem sorata vrste *Vitis vinifera* s drugim vrstama roda *Vitis* te na dvije sorte *Vitis vinifera* sa ciljem utvrđivanja sastava i sadržaja polifenola male molekulske mase u sjemenkama bobica grožđa. Detaljnom statističkom obradom podataka utvrđene su značajne razlike u sastavu i sadržaju polifenola sjemenki bobica grožđa različitih sorata. Dobiveni rezultati mogu pomoći pri odabiru sorte za izdvajanje određenih polifenola te njihovoj primjeni u različitim granama industrije zbog njihovih, već dokazanih, protuupalnih, antimikrobnih i antitumorskih svojstava.

Ključne riječi: polifenoli, sorta, međuvrsni križanci, *Vitis vinifera*, sjemenke, genotip

Summary

Of the master's thesis – student **Kristina Brusek,** entitled

DETERMINATION OF POLYFENOLS OF LOW MOLECULAR MASS IN GRAPE SEEDS OF SOME INTERMEDIATE CROSSBREEDS

The composition and content of polyphenolic compounds of grape berries are largely dependent on the genotype of grapevine, environmental conditions, and agricultural practice, as well. In this paper, the research was conducted on 19 varieties created by the interspecific crossing of the *Vitis vinifera* varieties with other *Vitis* species and on two varieties of *Vitis vinifera*. The aim of present study was a determination of the composition and content of small molecular mass polyphenols in grape berry seeds. Detailed statistical data analysis was revealed significant differences among the composition and content of polyphenols of grape berry seeds of different varieties. The obtained results could help in the selection of varieties for the isolation of certain polyphenols and their application in different branches of the industry due to their already proven, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-tumor properties.

Keywords: polyphenols, intermediate crossbreeds, *Vitis vinifera*, seeds, genotype

1. Uvod

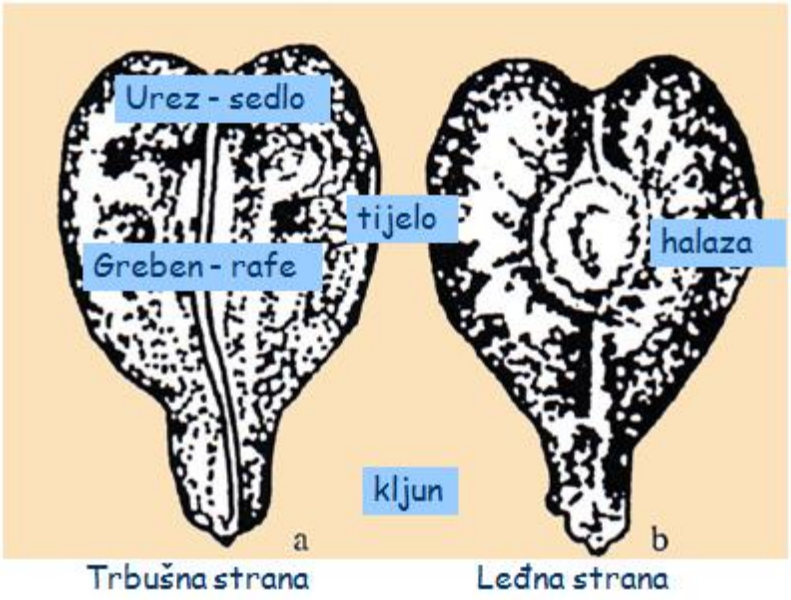
Vinova je loza (*Vitis vinifera* L) izrazito podložna oboljenju od različitih gljivičnih bolesti pa je nužno primjenjivati velike količine različitih fungicida što u konačnici dovodi do velikih troškova uzgoja i zagađenja okoliša. U novije vrijeme, povećanjem svijesti o problemu zagađenja okoliša sve se više uzgajaju sorte nastale međuvrsnim križanjima vinove loze s drugim vrstama roda *Vitis* jer one posjeduju određeni stupanj otpornosti prema plamenjači i pepelnici, gospodarski najvažnijim bolestima vinove loze. Sastav polifenola u grožđu značajno varira između sorata različitog genetskog profila i geografskog podrijetla. Upravo ta različitost u polifenolnim karakteristikama sorata zadnjih je godina predmet proučavanja, a osobito su zanimljivi međuvrsni križanci zbog njihove ranije spomenute otpornosti na neke bolesti. Da bi neka sorta ušla u komercijalni uzgoj mora imati određene karakteristike. Sastav i sadržaj polifenola grožđa ima važnu ulogu u kvaliteti pojedine sorte grožđa. Tijekom vinifikacije, polifenoli sadržani u sjemenkama grožđa manjim se dijelom ekstrahiraju u vino pri čemu utječu na njegova organoleptička svojstva, a posebno na gorčinu i astrigenciju. Antocijani i flavonoli su najzastupljeniji fenolni spojevi u kožici grožđa, dok su sjemenke grožđa bogate flavan-3-olima. Sadržaj fenolnih spojeva u grožđu ovisi o sorti vinove loze, vinogradarskoj praksi te okolišnim uvjetima. Fenolnim spojevima pridaje se dosta pažnje zbog njihovih antioksidativnih, protuupalnih, antimikrobnih te antimikotičkih svojstava što vrlo pozitivno utječe na ljudsko zdravlje. Zbog navedenih svojstava, ali i otpornosti međuvrsnih križanaca prema gljivičnim bolestima, njihovo je grožđe, ali i komina preostala nakon vinifikacije vrlo vrijedna sirovina za proizvodnju farmaceutskih i drugih pripravaka. Pojedine sorte vinove loze kao i sjemenke komine sadrže izrazito velike sadržaje pojedinih fenola pa potencijalno mogu biti dobra sirovina za ekstrakciju fenola u komercijalne svrhe. (Karoglan Kontić i sur. 2016.)

2. Literaturni pregled

3. Sastav i sadržaj polifenola sjemenke bobica grožđa

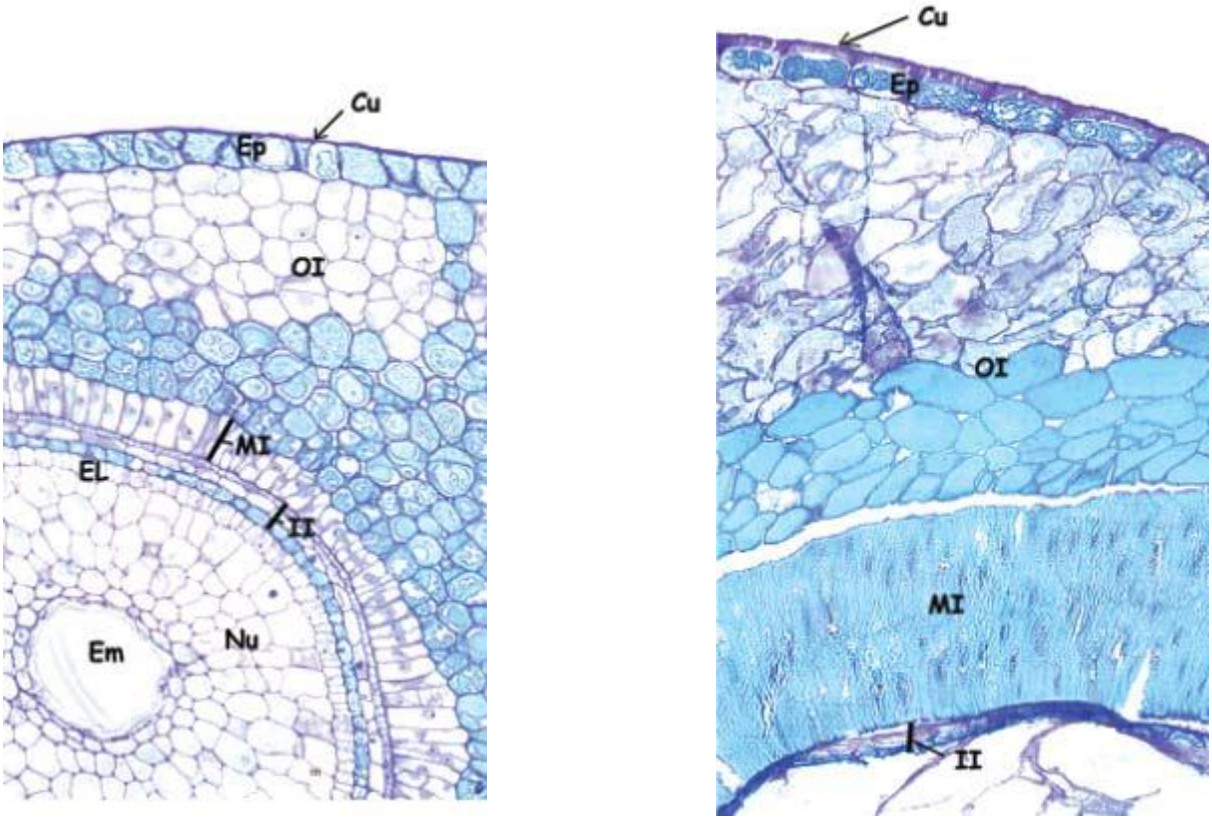
3.1. Sjemenka

Sjemenka se razvija iz sjemenog zametka. U plodnici su smještena četiri zametka. Međutim, svi zameci se ne oplode pa se u bobici nalazi 1 do 3 sjemenke. U vanjskoj građi sjemenke razlikuju se tijelo i kljun (Slika 3.1.1.). Sjemenka ima leđnu (dorzalnu) i trbušnu (ventralnu) stranu. Trbušna strana je okrenuta prema unutrašnjosti bobice, a leđna prema kožici. Leđna strana sjemenke je ispupčena i zaobljena. Na vrhu sjemenke nalazi se udubljenje koje se naziva urez, a koji dijeli sjemenku na dvije uzdužne polovine. Na leđnoj strani nalazi se i okruglasti ožiljak, halaza. Kroz halazu ulaze provodni snopovi u sjemenku. Sjemenka ima tri ljuske: vanjsku meku, srednje tvrdu i unutrašnju. Na poprečnom presjeku zrele sjemenke vide se klica (embrio) i endosperm. Klica se nalazi u kljunu sjemenke. Oko klice je endosperm koji sadrži rezervne hranjive tvari potrebne za klijanje sjemenke. (Maleš, 1987.)



Slika 3.1.1. Vanjska građa sjemenke grožđa
Izvor: Mirošević i Karoglan Kontić, 2008.

Na poprečnom presjeku središnjeg dijela sjemenke vidljivo je pet zona (Slika 3.1.2. A i B): (1) kutikula i epiderma; (2) vanjski integument ili meka sjemena ljuska koja se sastoji od velikih parenhimskih stanica; (3) središnji integument ili čvrsta sjemena ljuska koja se sastoji od dva sloja stanica; (4) unutarnji integument sa tri sloja stanica te (5) endosperm koji služi kao rezerva hrane i embrij koji se razvija u mladicu nakon nicanja.



A B

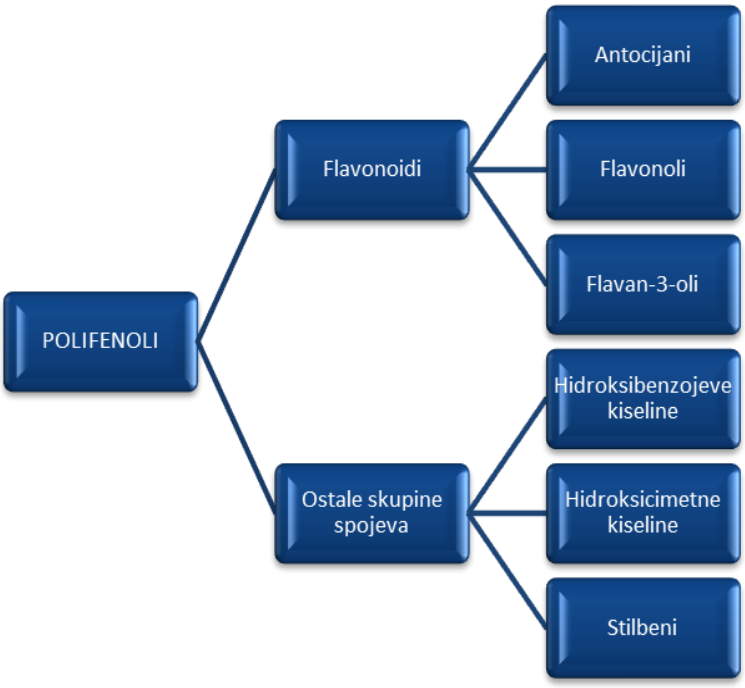
Slika 3.1.2. Unutarnja građa sjemenke 11 dana nakon cvatnje (A) i u trenutku berbe (B); Cu – kutikula, Ep – epiderma, OI – vanjski integument, MI – središnji integument, II – untranji integument, Nu – nucelus, Em – embrij

Izvor: Cadot i sur., 2006.

3.2. Polifenolni spojevi

Do danas, brojni su polifenoli identificirani u vinovoj lozi, grožđu i proizvodima od grožđa. Oni imaju važnu ulogu u senzornim karakteristikama vina te ne doprinose samo boji već i taktilnoj senzaciji, kao što su astrigencija, gorčina, baršunast okus i iako manje izraženo, hlapljivim svojstvima vina. (König H. i sur., 2009.) U današnje vrijeme pridaje im se velika pažnja jer je zahvaljujući brojnim istraživanjima ustanovljeno kako osim što utječu na kvalitetu grožđa i vina, također imaju antikancerogena, antioksidativna, antimikrobna, protuupalna pa čak i kardioprotektivna svojstva. Riječ 'polifenol' potječe iz starogrčke riječi poli-, što znači "mnogo“, i riječi fenol- što je kemijska molekula izgrađena od fenilne skupine ($-C_6H_5$) koja je povezana na hidroksilnu skupinu (-OH). Općenito, polifenoli sadržani u grožđu mogu se podijeliti u dvije velike skupine: flavonoide koji se zatim dijele na antocijane, flavonole i flavanole (tj. flavan-3-ole) te na ostale skupine spojeva koji uključuju hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline i stilbene (Slika 3.2.1.).

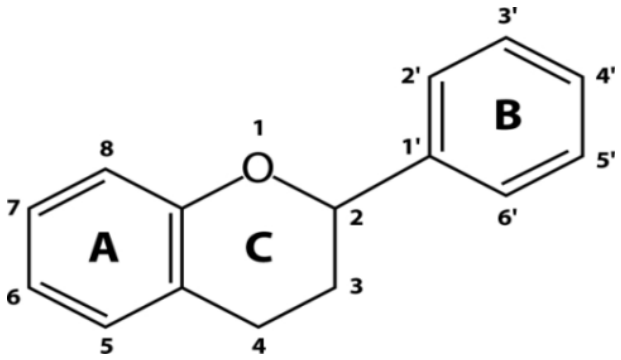
Polifenolni spojevi pripadaju molekulama velike strukturne raznolikosti koje karakteriziraju jedan ili više aromatskih prstenova, a na njih su izravno povezane jedna ili više hidroksilnih skupina, te oni mogu biti u rasponu od jednostavnih monomernih molekula do velikih polimernih molekula. (Kennedy i sur., 2000.; Shi i sur., 2004.)



Slika 3.2.1. Osnovna podjela polifenola

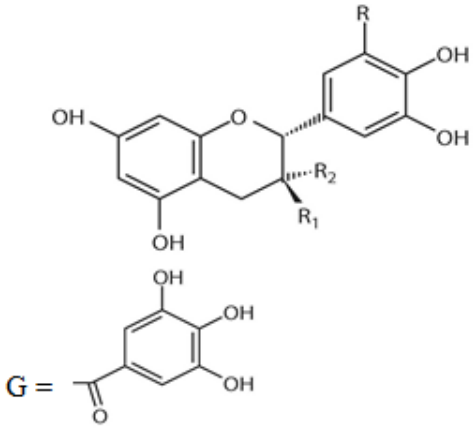
U sjemenkama bobica grožđa prevladavaju flavonoidi, točnije flavan-3-oli. Na slici 3.2.2. prikazana je osnovna struktura flavonoida. Flavonoidi su polifenolni spojevi čiju osnovnu strukturu čini difenilpropanska jedinica ($C_6–C_3–C_6$) u kojoj se nalaze dva hidroksilirana

benzenska prstena, A i B, koji su međusobno povezani lancem izgrađenim od tri atoma ugljika, a on je ujedno dio heterocikličkog prstena C. (Tomaz, 2016.)



Slika 3.2.2. Osnovna struktura flavonoida
Izvor: Teixeira i sur., 2013

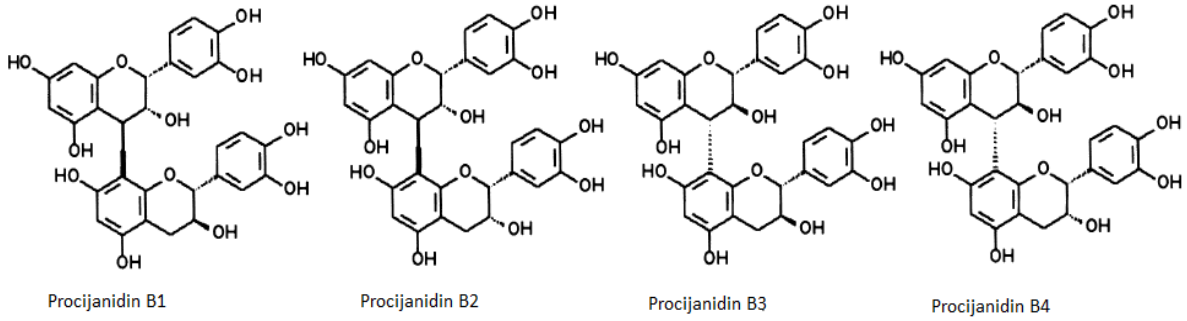
Ovisno o oksidacijskom stanju prstena C, flavonoidi grožđa mogu se podijeliti u tri skupine: flavonole, flavan-3-ole te antocijane. Flavan-3-oli predstavljaju najbrojniju skupinu flavonoida u grožđu značajnu za organoleptička svojstva vina kao što su astringencija, gorčina i struktura vina. Flavan-3-oli sadrže hidroksilnu skupinu na položaju 3 prstena C. U grožđu, ova skupina spojeva zastupljena je u obliku monomera, oligomera te polimera. Monomeri grožđa, ujedno prikazani na slici 3.2.3., su: (+)-katehin, (−)-epikatehin, (+)-galokatehin, (−)-epigalokatehin te njihovi esteri s galnom kiselinom kao što su (−)-epikatehin-3-*O*-galat, (−)-epigalokatehin-3-*O*-galat te (+)-galokatehin-3-*O*-galat. (Tomaz, 2016.)



(+)-Katehin R = H; R_1 = OH; R_2 = H
(−)-Epikatehin R = H; R_1 = H; R_2 = OH
(+)-Galokatehin R = OH; R_1 = OH; R_2 =H
(−)-Epigalokatehin R = OH; R_1 = H; R_2 =OH
(−)-Epikatehin-3-*O*-galat R = H; R_1 = H; R_2 = O-G
(+)-Galokatehin-3-*O*-galat R = OH; R_1 = H; R_2 = O-G
(−)-Epigalokatehin-3-*O*-galat R = OH; R_1 = H; R_2 = O-G

Slika 3.2.3. Strukturne formule monomera flavan-3-ola
Izvor: Tomaz, 2016.

Proantocijanidini i kondenzirani tanini su oligomerni i polimerni oblici flavan-3-ola. Struktura im ovisi o prirodi (stereokemiji i načinu hidroksilacije) terminalnih i građevnih jedinica monomera, položaju i stereokemiji veze s ″donjom″ jedinicom, stupnju polimerizacije, prisutnošću ili odsutnošću modifikacija kao što je esterifikacija 3-hidroksilne skupine galnom kiselinom. Procijanidini B1, B2, B3 i B4 najzastupljeniji su dimeri koji se međusobno razlikuju po uređenju (+) -katehina i (−) -epikatehina kao terminalnih jedinica (Slika 3.2.4.). (R. A. Dixon i sur., 2005.)



Slika 3.2.4. Strukturne formule procijanidina B1, B2, B3, B4
Izvor: R. A. Dixon i sur., 2005.

4. Karakteristike sorata

Većina sorata vinove loze koje se danas uzgajaju nastale su spontanim križanjem, no ima i onih koje su stvorene utjecajem čovjeka, odnosno odgovarajućim oplemenjivačkim postupcima. Kod stvaranja novih sorata postavljaju se različiti oplemenjivački ciljevi (rodnost, kakvoća grožđa, dob dozrijevanja i dr.), a u novije vrijeme veliki se trud ulaže u stvaranje sorata s određenim stupnjem otpornosti na bolesti (plamenjača, pepelnica).
U ovome radu istraživanje je provedeno na 14 bijelih sorata od kojih su sve međuvrsni križanci osim jedne čiste *V. vinifera* te na 7 crnih sorata koji su isto tako međuvrsni križanci osim jedne *V. vinifera.* Naglasak je stavljen na podjelu međuvrsnih križanaca s obzirom na podrijetlo te na rodoslovlje.

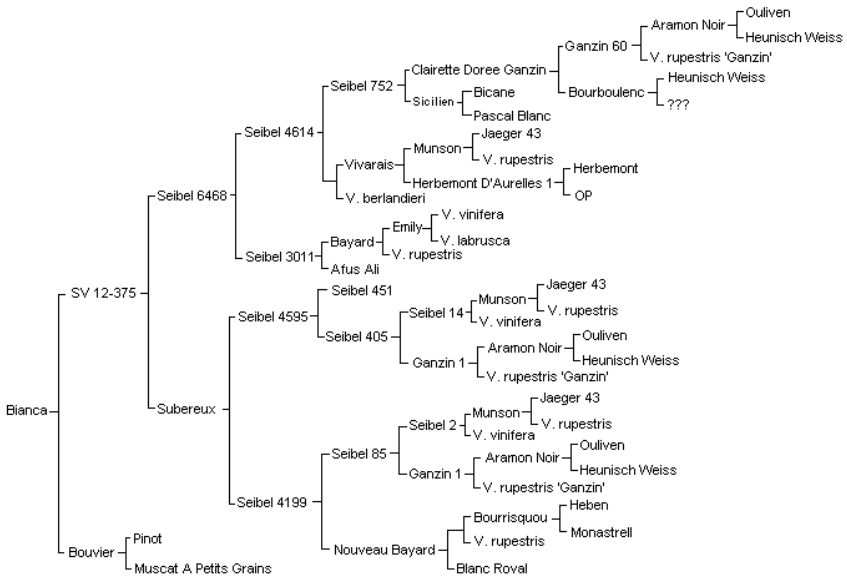
4.1. Bijele sorte međuvrsnih križanaca

4.1.1. 'Bačka'

Ova bijela sorta priznata je 2002. godine. Stvorena je u Sremskim Karlovcima križanjem iz sorata 'Petra' x 'Bianca'. Njezini autori su P. Cindrić, N. Korać i V. Kovač. (Bugarčić S., 2013.)

4.1.2. 'Bianca'

Ovu bijelu sortu stvorili su mađarski oplemenjivači Józsev Czismazija i Lásló Bereznai u istraživačkom centru Egeru križanjem 'Eger 2' x 'Bouvier'. (Karoglan Kontić, 2014.) Cijelo rodoslovlje 'Biance' prikazano je na slici 4.1.2.1.



Slika 4.1.2.1. Rodoslovlje sorte 'Bianca'
Izvor: Parentage Diagrams Chateau Stripmine

4.1.3. 'Johanniter'

Ova bijela sorta nastala je u Njemačkom institutu Staatliches Weinbauinstitut u Freiburgu križanjem 'Rizlinga rajnskog' i križanca ('Seyve Villard 12-481' x ('Pinot sivi' x 'Plemenka')).

4.1.4. 'Kozmopolita'

'Kozmopolita' je bijela sorta koja je nastala križanjem 'Cserszegi fueszeres' i 'Krisztaly' u Mađarskoj, a njezin autor je P. Pavlousek.

4.1.5. 'Lisa'

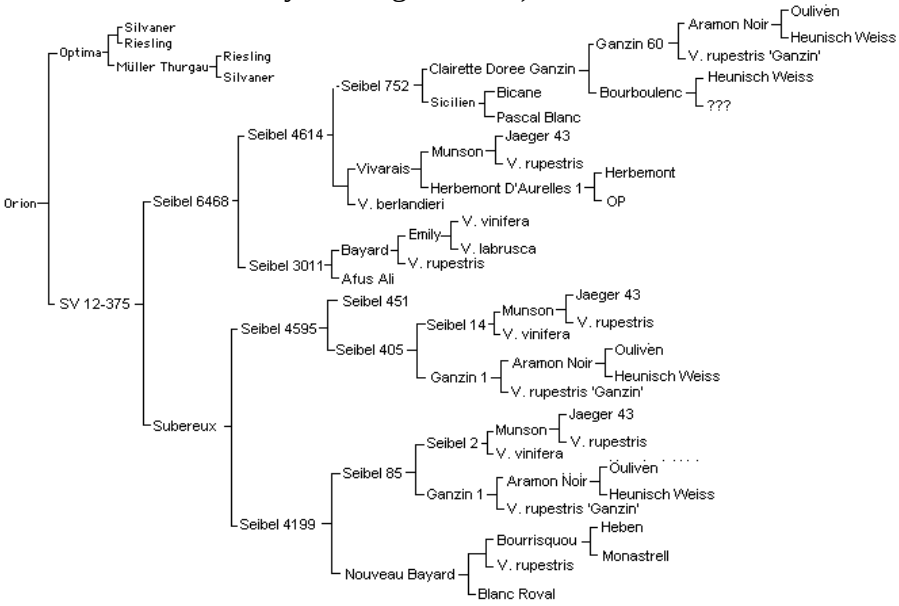
Ova bijela sorta priznata je 1991. godine i stvorena je križanjem 'Kunleany' x 'Pinot gris' u Sremskim Karlovcima. Autori ove sorte su P. Cindrić i V. Kovač.

4.1.6. 'Merzling'

'Merzling' je bijela sorta koja je nastala 1960. godine u Njemačkom institutu Staatliches Weinbauinstitut u Freiburgu križanjem sorata 'Seyval x Freiburg 379 – 52' ('Rizling rajnski' x 'Pinot sivi'). Njezin autor je Johannes Zimmerman. (*Vitis* Internacional Variety Catalogue *V*IVC)

4.1.7. 'Orion'

Sorta 'Orion' nastala je 1964. godine križanjem sorata 'Optima' x 'Villard blanc'. Ova sorta ima službeno rodoslovlje (Slika 4.1.7.1.). Stvaranje ove sorte odvijalo se u Njemačkom institutu. (*Vitis* Internacional Variety Catalogue *V*IVC)



Slika 4.1.7.1. Rodoslovlje sorte 'Orion'
Izvor: Parentage Diagrams Chateau Stripmine

4.1.8. 'Panonia'

Ova sorta nastala je u Srbiji u Sremskim Karlovcima križanjem 'Rizlinga rajnskog' i domaćeg genotipa visoke otpornosti na gljivične bolesti i niske temperature. Priznata je 2003. godine, a njeni autori su P. Cindrić, N. Korać i V. Kovač. (Bugarčić S., 2013.)

4.1.9. 'Phoenix'

Sorta 'Phoenix' nastala je križanjem 'Bacchus' (('Silvanac' x 'Rizling rajnski') x 'Müller Thurgau') x 'Seyve Villard 12-375' u Njemačkoj. (Karoglan Kontić, 2014.)

4.1.10. 'Sirius'

Sorta 'Sirius' nastala je križanjem 'Bacchus' x 'Villard' u Njemačkom institutu Julius Kühn. (*Vitis* Internacional Variety Catalogue *V*IVC)

4.1.11. 'Solaris'

Ova sorta nastala je u Njemačkoj u Staatliches Weinbauinstitut u Freiburgu križanjem sorata 'Merzling' x 'Gm 6493' ('Zarya severa' x 'Muscat Ottonel').

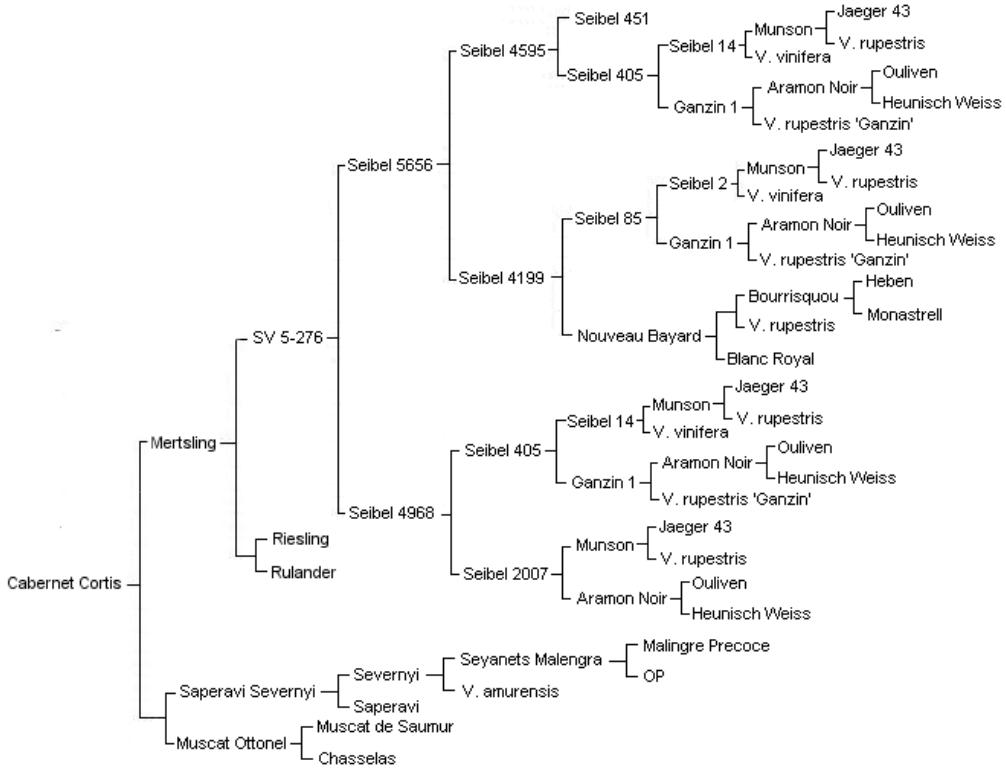
4.1.12. 'Staufer'

Sorta 'Staufer' stvorena je u institutu Julius Kühn putem križanja 'Bacchus' x 'Seyval blanc'. (Karoglan Kontić, 2014.)

4.2. Crne sorte međuvrsnih križanaca

4.2.1. 'Cabernet Cortis'

Sorta 'Cabernet Cortis' stvorena je u Njemačkoj križanjem 'Cabernet sauvignon' x 'Solaris'. Autor ove sorte je Norbert Becker iz Freiburga. Ova sorta ima vrlo složeno rodoslovlje (Slika 4.2.1.1.). (*Vitis* Internacional Variety Catalogue *V*IVC)



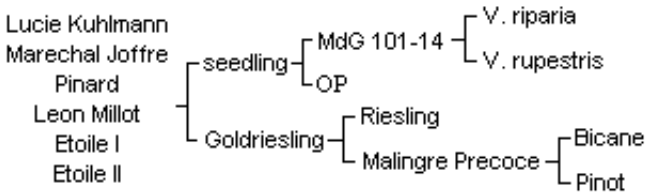
Slika 4.2.1.1. Rodoslovlje sorte 'Cabernet Cortis'
Izvor: Parentage Diagrams Chateau Stripmine

4.2.2. 'Chancellor'

Sorta 'Chancellor' nastala je u Francuskoj križanjem 'Seibel 5163' x 'Seibel 880'. Autor sorte je Albert Seibel. (*Vitis* Internacional Variety Catalogue *V*IVC)

4.2.3. 'Leon Millot'

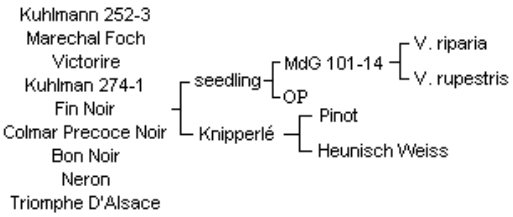
Sorta 'Leon Millot' nastala je u Francuskoj križanjem 'Millardet Et Grasset 01-14 O.P.' x 'Goldriesling', a njezino čitavo rodoslovlje prikazano je na slici 4.2.3.1. Autor sorte je Eugene Kuhlmann 1886.godine. (*Vitis* Internacional Variety Catalogue *V*IVC)



Slika 3.3.3.1. Rodoslovlje sorte 'Leon Millot'
Izvor: Parentage Diagrams Chateau Stripmine

4.2.4. 'Marechal Foch'

Sorta 'Marechal Foch' nastala je 1886. godine u Francuskoj križanjem 'Millardet Et Grasset 101- 14 O.P'. x 'Goldriesling' (Slika 4.2.4.1.). Autor sorte je Eugene Kuhlmann.



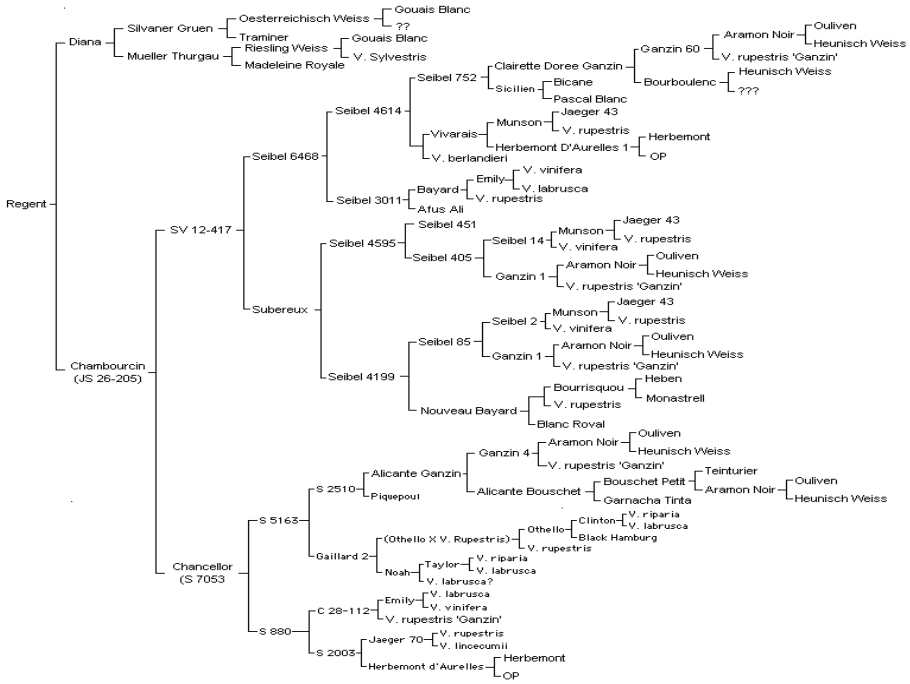
Slika 4.2.4.1. Rodoslovlje sorte 'Marechal Foch'
Izvor: Parentage Diagrams Chateau Stripmine

4.2.5. 'Monarch'

Sorta 'Monarch' nastala je u Njemačkoj 1988.godine križanjem 'Solaris' x 'Dornfelder'. Autor sorte je Norbert Becker iz Freiburga. (*Vitis* Internacional Variety Catalogue *V*IVC)

4.2.6. 'Regent'

Sorta 'Regent' nastala je u Njemačkoj 1967.godine križanjem 'Diana' x 'Chambourcin' (Slika 4.2.6.1.). Autor sorte je Gerhardt Alleweldt. (*Vitis* Internacional Variety Catalogue *V*IVC)



Slika 4.2.6.1. Rodoslovlje sorte 'Regent'
Izvor: Parentage Diagrams Chateau Stripmine

5. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je utvrditi sastav i sadržaj polifenola male molekulske mase u sjemenkama bobica grožđa sorata 'Bačka', 'Bianca', 'Cabernet Cortis', 'Chancellor', 'Johanniter', 'Kozmopolita', 'Leon Millot', 'Lisa', 'Marechal Foch', 'Merzling', 'Monarch', 'Orion', 'Panonia', 'Phoenix', 'Regent', 'Sirius', 'Solaris', 'Staufer' te 'SK 90 2/19' nastalih međuvrsnim križanjem sorata vrste *Vitis vinifera* s drugim vrstama roda *Vitis* kao i sorata *Vitis vinifera* 'Babić' i 'Traminac', te na temelju dobivenih rezultata usporediti razlike u sastavu i sadržaju polifenolnih spojeva među navedenim sortama.

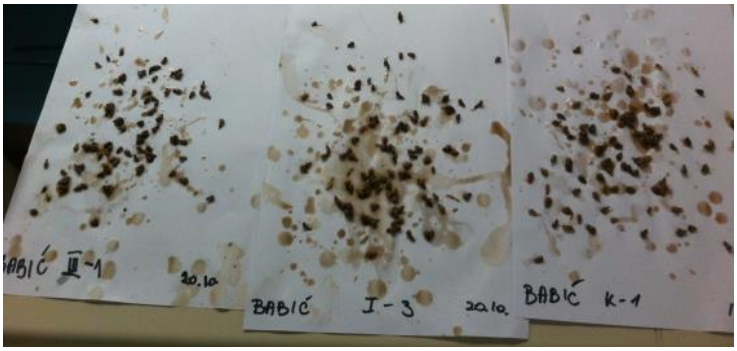
6. Materijali i metode

6.1. Uzorkovanje

Uzorci crnih ('Babić', 'Cabernet Cortis', 'Chancellor', 'Leon Millot' 'Monarch', 'Marechal Foch' i 'Regent') kao i bijelih sorata ('Bačka', 'Bianca', 'Johanniter', 'Kozmopolita', 'Lisa', ' Merzlin', 'Orion', 'Panonia', 'Phoenix', 'Sirius', 'SK 90 2/19', 'Solaris', 'Staufer' i 'Traminac') uzeti su u fazi pune zrelosti iz vinograda na Znanstveno-nastavnom pokušalištu Jazbina Agronomskog fakulteta u Zagrebu 2015. godine. Vinograd je smješten na južnim obroncima Medvednice, a ubraja se u Zagrebačko vinogorje, podregiju Prigorje-Bilogora regije Zapadna kontinentalna Hrvatska. Uzorci sorte 'Babić' uzeti su u fazi pune zrelosti iz vinograda smještenog u Donjem Polju kod Jadrtovca, a koji se ubraja u vinogorje Šibenik podregije Sjeverna Dalmacija regije Primorska Hrvatska.

6.2. Ekstrakcija polifenola iz sjemenki bobica grožđa

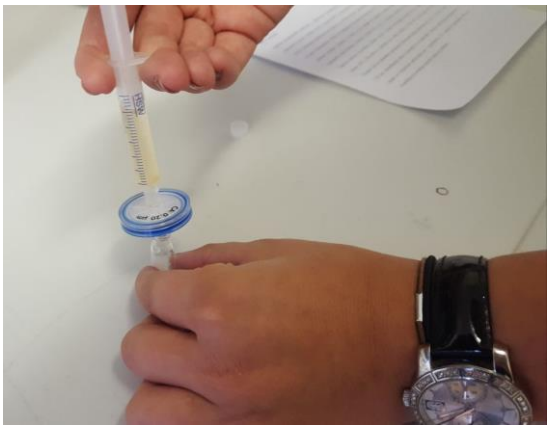
Prije početka same ekstrakcije, sjemenka je odvojena od mesa i kožice dok je bobica bila u smrznutom stanju (Slika 6.2.1.). Odmrznute sjemenke su sušene na zraku te su potom usitnjene (Slika 6.2.2.). Na uzorak mase 125 mg dodano je 10 mL ekstrakcijskog otapala sačinjenog iz 20 % acetonitrila, 1 % mravlje kiseline te 79 % vode. Ekstrakcijska je smjesa ostavljena na magnetskoj miješalici pri temperaturi 50 °C u trajanju od dva sata (Slika 6.2.3.). Ona je potom centrifugirana, a dobiveni supernatant je odvojen te prenesen u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunjen otapalom A do oznake. Dobivena otopina prije HPLC analize filtrirana je preko PTFE membranskog filtera (Slike 6.2.4. i 6.2.5.).



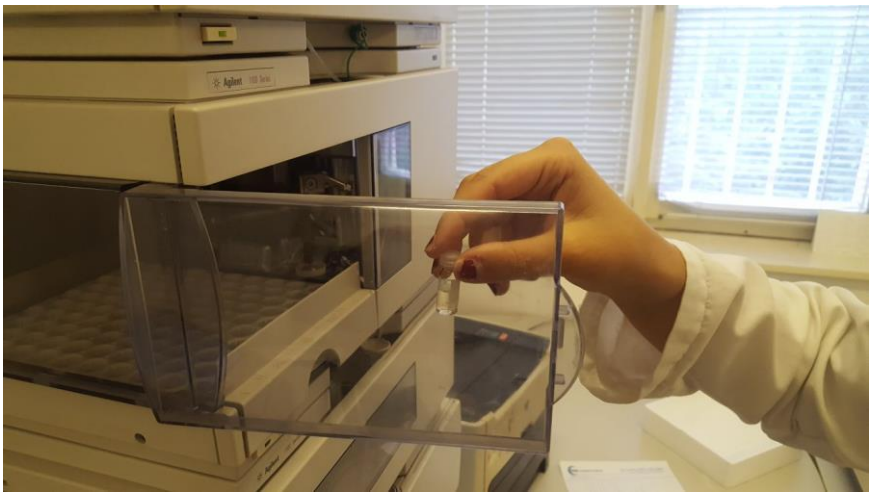
Slika 6.2.1. Sjemenke odvojene od mesa ostavljene da se suše na zraku
Foto: Kristina Brusek

Slika 6.2.2. Vaganje osušenih sjemenki mase 125 mg
Foto. Kristina Brusek

Slika 6.2.3. Ekstrakcijska smjesa ostavljena na magnetskoj mješalici pri temperaturi 50 °C
Foto: Kristina Brusek



Slika 6.2.4. Dobivena otopina prije HPLC analize filtrirana je preko PTFE membranskog filtra
Foto: Kristina Brusek



Slika 6.2.5. Stavljanje dobivene otopine na HPLC analizu
Foto: Kristina Brusek

6.3. Tekućinsko-kromatografska metoda

Sadržaj pojedinačnih polifenola u dobivenim ekstraktima iz sjemenke određen je RP-HPLC metodom (Tomaz i Maslov, 2015.) pomoću HPLC instrumenta Agilent 1100 Series (Agilent, SAD). Odvajanje polifenola provedeno je na Phenomenex Luna Phenyl-hexyl koloni (250 x 4,6 mm, Phenomenex, SAD) uz gradijentno eluiranje korištenjem 0,5 % (*v/v*) vodene otopine fosforne kiseline (otapalo A) dok se kao otapalo B koristila otopina koja je sadržavala acetonitril:vodu:forfornu kiselinu (50:49,5:0,5; *v/v/v*) s brzinom protoka od 0,9 mL/min. Tijekom analize su korišteni slijedeći uvjeti: volumen ubrizganog uzorka 20 µL, temperatura kolone 50 °C. Flavan-3-oli su određeni primjenom flurescencijskog detektora pri λ_{ex} = 225 nm i λ_{em} = 320 nm, dok je galna kiselina određena primjenom detektora s nizom dioda pri valnoj duljini od 280 nm. Identifikacija pikova temeljila se je na usporedbi vremena zadržavanja komponenti iz uzorka sa vremenima zadržavanja, dok je za kvantifikaciju korištena metoda vanjskog standarda.

6.4. Statistička obrada podataka

Provedena je analiza varijance kojom je ustanovljena signifikantnost razlika između pokusnih varijanata, a usporedba srednjih vrijednosti odnosno aritmetičkih sredina je provedena korištenjem Duncan Multiple Range testa.
Statistička obrada podataka provedena je korištenjem SAS v 9.3 statističkog softvera (2012, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

7. Rezultati i rasprava

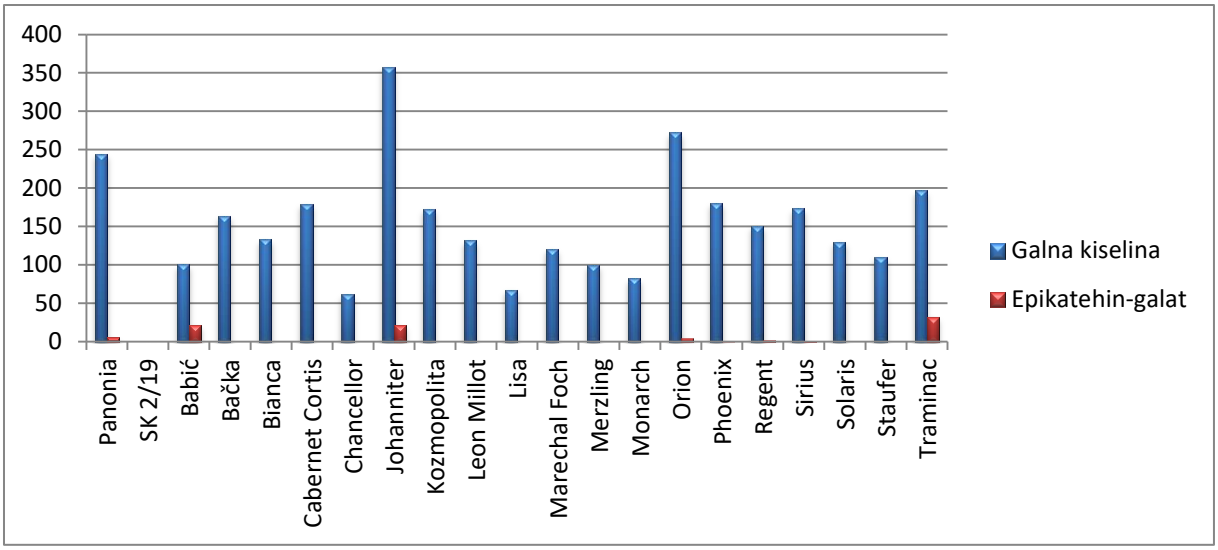
U ovome je radu provedeno istraživanje na sjemenkama grožđa sorata 'Bačka', 'Bianca', 'Cabernet cortis', 'Chancellor', 'Johanniter', 'Kozmopolita', 'Leon Millot', 'Lisa', 'Marechal Foch', 'Merzling', 'Monarch', 'Orion', 'Panonia', 'Phoenix', 'Regent', 'Sirius', 'Solaris', 'Staufer' te 'SK 90 2/19' nastalih međuvrsnim križanjem sorata vrste *Vitis vinifera* s drugim vrstama roda *Vitis* kao i soratama *Vitis vinifera* 'Babić' i 'Traminac'. U uzorcima sjemenki navedenih sorata određeni su maseni udjeli sljedećih polifenola: galne kiseline, epikatehin-3-*O*-galata, epigalokatehina, galokatehina, epikatehina, katehina te procijanidina B1, B2 i B4.

U tablici 7.1. prikazani su maseni udjeli galne kiseline i epikatehin-3-*O*-galata u sjemenka grožđa 21 analizirane sorte.

Tablica 7.1. Maseni udjeli galne kiseline i epikatehin-3-*O*-galata u sjemenkama. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

Sorta	Galna kiselina	Epikatehin-3-*O*-galat
Panonia	244,47 bc	5,94 b
SK 90 2/19	170,15 def	0,00 b
Babić	100,59 ghij	22,05 a
Bačka	163,70 defg	0
Bianca	133,34 defgh	0
Cabernet cortis	179,59 de	0,00 b
Chancellor	61,89 j	0
Johanniter	357,24 a	22,00 a
Kozmopolita	172,98 def	0
Leon Millot	131,62 defghi	0
Lisa	67,31 ij	0
Marechal Foch	120,56 efghij	0,00 b
Merzling	99,67 ghij	0
Monarch	81,74 hij	0,00 b
Orion	272,23 b	4,24 b
Phoenix	180,91 de	0,89 b
Regent	150,83 defg	1,68 b
Sirius	173,20 def	0,28 b
Solaris	129,69 efghi	0,00 b
Staufer	110,20 fghij	0
Traminac	197,49 cd	32,11 a

*srednje vrijednosti označene različitim slovima između sorata razlikuju se na razini $p<0,05$ korištenjem *Duncan multiple-range* testa



Slika 7.1. Grafički prikaz masenih udjela galne kiseline i epikatehin-3-*O*-galata. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

Iz prikazanih rezultata jasno je vidljivo da postoje statistički značajne razlike u masenim udjelima galne kiseline između pojedinih analiziranih sorata. Najveći maseni udio ove kiseline određen je u sjemenkama sorte 'Johanniter' dok je najniži određen u sjemenkama sorte 'Chancellor'. Isto tako vidljivo je kako je najveći maseni udio epikatehin-3-*O*-galata određen u sorti 'Traminac' dok kod sorata 'Bačka', 'Bianca', 'Chancellor', 'Kozmopolita', 'Leon Millot', 'Lisa', 'Merzling' i 'Staufer' epikatehin-3-*O*-galat nije ni određen (Slika 7.1.).

Tablica 7.2. Rezultati ANOVA-e za galnu kiselinu i epikatehin-3-*O*-galat

	Galna kiselina	Epikatehin-3-*O*-galat
Sorta	***	***
Vinifera/križanci	n.s.	***
Crno/bijela sorta	**	n.s.

***:- p<0,0001; **: p<0,001; *:p<0,05; n.s.: p>0,05

Tablica 7.3. Odnos prosječnih masenih udjela galne kiseline i epikatehin-3-*O*-galata. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

	Galna kiselna	Epikatehin-3-*O*-galat
Crne sorte	118,12 b	4.74 a
Bijele sorte	177,76 a	10.91 a
Vinifera	149.04 a	27.08 a
Križanci	158.47 a	3.62 b

*srednje vrijednosti označene različitim slovima između sorata razlikuju se na razini p<0,05 korištenjem *Duncan multiple-range* test

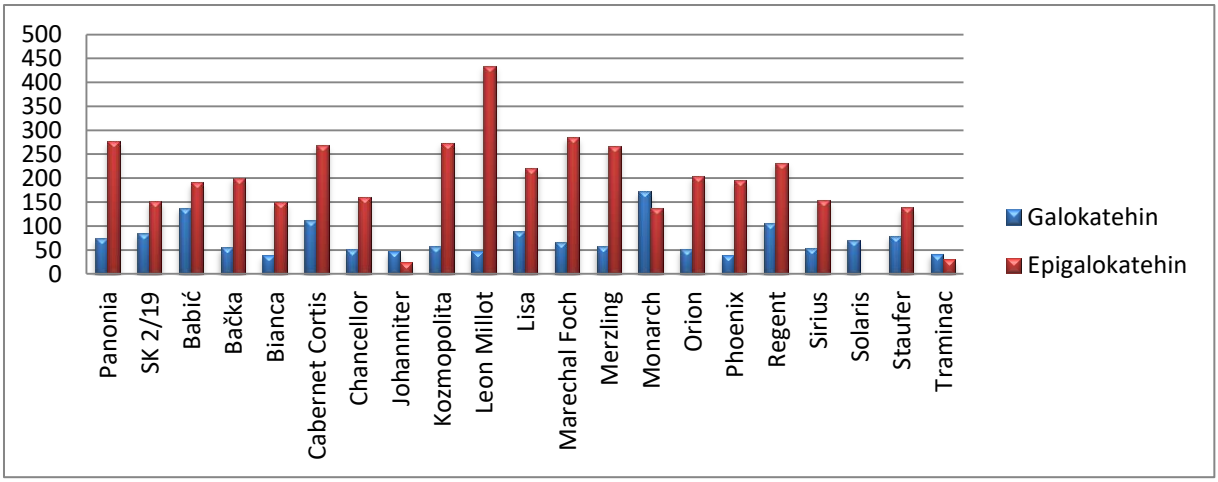
Prosječni maseni udio galne kiseline prikazan je u tablici 7.2., a dobiven je zbrajanjem masenih udjela ovoga spoja određenih u sjemenkama međuvrsnih križanaca odnosno sortama čiste *Vitis vinifera* te dijeljenjem s njihovim ukupnim brojem. Uočeno je da ne postoji statističke značajne razlike između sorata međuvrsnih križanaca i onih *V. vinifera*, dok je u slučaju epikatehin-3-*O*-galata jasno vidljiva statistički značajna razlika. Uzimajući u obzir prosječne vrijednosti masenih udjela crnih i bijelih sorata, koje su dobivene na ranije opisan način, nije uočena statistički značajna razlika u masenim udjelima epikatehin-3-*O*-galata (Tablica 7.3.). Kada se na isti način iskažu vrijednosti galne kiseline za sjemenke crnih odnosno bijelih sorata može se opaziti statistička značajna razlika.

Maseni udjeli galokatehina i epigalokatehina određeni u 21 sorti prikazani su u tablici 7.4. Iz prikazanih rezultata jasno je vidljivo da postoje statistički značajne razlike u masenim udjelima navedenih spojeva između pojedinih analiziranih sorata.

Tablica 7.4. Maseni udjeli galokatehina i epigalokatehina u sjemenkama. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

Sorta	Galokatehin	Epigalokatehin
Panonia	74,68 efg	276,93 ab
SK 90 2/19	84,06 de	151,18 bc
Babić	137,90 b	190,62 bc
Bačka	55,17 hi	200,29 bc
Bianca	39,02 k	149,71 bc
Cabernet cortis	111,60 c	268,18 ab
Chancellor	51,49 ijk	160,24 bc
Johanniter	46,61 ijk	24,21 c
Kozmopolita	57,79 hi	273,85 ab
Leon Millot	46,62 ijk	434,39 a
Lisa	88,88 d	219,83 b
Marechal Foch	66,85 gh	285,15 ab
Merzling	57,02 hi	266,11 ab
Monarch	172,40 a	137,92 bc
Orion	52,05 ijk	203,34 bc
Phoenix	38,97 k	194,85 bc
Regent	106,26 c	232,33 b
Sirius	53,51 ij	153,02 bc
Solaris	70,55 fg	
Staufer	79,75 def	139,38 bc
Traminac	41,83 jk	30,28 c

*srednje vrijednosti označene različitim slovima između sorata razlikuju se na razini $p<0,05$ korištenjem *Duncan multiple-range* testa



Slika 7.2. Grafički prikaz masenih udjela galokatehina i epigalokatehina. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

Najveći maseni udio galokatehina određen je u sjemenkama sorte 'Monarch' dok je najniži određen u sjemenkama sorte 'Phoenix' koji se statistički značajno ne razlikuje u masenom udjelu galokatehina određenog u slučaju sorte 'Bianca' (Tablica 6.4.). Isto tako vidljivo je kako je najveći maseni udio epigalokatehina određen u sorti 'Leon Millot', a najmanji u 'Johanniteru', a čiji se rezultat statistički značajno ne razlikuje od rezultata sorte 'Traminac' (Slika 7.2.).

Tablica 7.5. Rezultati ANOVA-e za galokatehin i epigalokatehin

	Galokatehin	Epigalokatehin
Sorta	n.s.	**
Vinifera/križanci	n.s.	n.s.
Crno/bijela sorta	***	*

***:- p<0,0001; **: p<0,001; *:p<0,05; n.s.: p>0,05

Tablica 7.6. Odnos prosječnih masenih udjela galokatehina i epigalokatehina. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

	Galokatehin	Epigalokatehin
Crne sorte	99.02 a	244.12 a
Bijele sorte	59.73 b	183.47 b
Vinifera	89.87 a	150.53 a
Križanci	71.24 a	209.49 a

*srednje vrijednosti označene različitim slovima između sorata razlikuju se na razini p<0,05 korištenjem *Duncan multiple-range* test

Uzimajući u obzir prosječan maseni udio galokatehina dobiven u sjemenkama međuvrsnih križanaca odnosno sortama čiste *Vitis vinifera*, uočeno je da ne postoji statističke značajne razlike. Isto je opaženo i u slučaju epigalokatehina (Tablica 7.5.). Kada se na isti način iskažu vrijednosti galokatehina za sjemenke crnih odnosno bijelih sorata može se opaziti statistička značajna razlika kao i u slučaju epigalokatehina, dok u odnosu Vinifera/križanci iskazane vrijednosti galokatehina i epigalokatehina ne pokazuju statistički značajnu razliku (Tablica 7.6.).

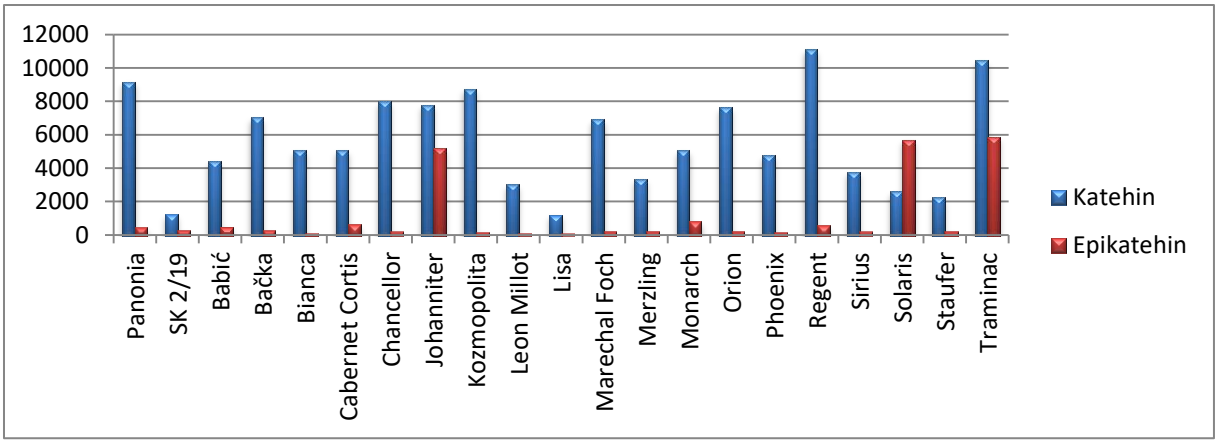
U tablici 7.7. prikazani su maseni udjeli katehina i epikatehina određeni u sjemenkama bobica grožđa analiziranih sorata. Iz prikazanih rezultata jasno je vidljivo da postoje statistički značajne razlike u masenim udjelima navedenih spojeva između pojedinih sorata. Najveći maseni udio katehina određen je u sjemenkama sorte 'Regent' dok je najniži određen u sjemenkama sorte 'Lisa' koja se statistički značajno ne razlikuje u masenom udjelu katehina određenog u sortama 'SK 90 2/19', 'Solaris' i 'Staufer'.

Tablica 7.7. Maseni udjeli galokatehina i epigalokatehina u sjemenkama. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

Sorta	Katehin	Epikatehin
Panonia	9178 ab	466,77 f
SK 90 2/19	1220 g	296,00 g
Babić	4420 defg	490,04 ef
Bačka	7036 bcdef	296,69 g
Bianca	5088 cdefg	128,97 h
Cabernet cortis	5050 cdefg	636,19 e
Chancellor	7984 abcd	197,13 gh
Johanniter	7801 abcde	5156,43 c
Kozmopolita	8746 abc	186,34 gh
Leon Millot	3013 fg	105,88 h
Lisa	1207 g	96,39 h
Marechal Foch	6925 bcdef	208,98 gh
Merzling	3354 fg	214,82 gh
Monarch	5079 cdefg	816,08 d
Orion	7636 abcde	208,40 gh
Phoenix	4784 cdefg	158,44 gh
Regent	11106 a	571,13 ef
Sirius	3771 efg	197,03 gh
Solaris	2592 g	5686,74 b
Staufer	2238 g	209,95 gh
Traminac	10462 ab	5866,55 a

*srednje vrijednosti označene različitim slovima između sorata razlikuju se na razini $p<0,05$ korištenjem *Duncan multiple-range* testa

Vidljivo je kako je najveći maseni udio epikatehina određen u sjemenkama 'Traminaca', a najniži u slučaju sjemenki sorte 'Lisa'. Bez obzira na nešto veće vrijednosti masenog udjela epikatehina u sjemenkama sorata 'Leon Millot' i 'Bianca' te razlike nisu statistički značajne (Slika 7.3.).



Slika 7.3. Grafički prikaz masenih udjela katehina i epikatehina.
Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

Tablica 7.8. Rezultati ANOVA-e za katehin i epikatehin

	Katehin	Epikatehin
Sorta	***	***
Vinifera/križanci	n.s.	**
Crno/bijela sorta	n.s.	n.s.

***:- p<0,0001; **: p<0,001; *:p<0,05; n.s.: p>0,05

Tablica 7.9. Odnos prosječnih masenih udjela katehina i epikatehina. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

	Katehin	Epikatehin
Crne sorte	6225.22 a	432.22 a
Bijele sorte	5432.84 a	1292.34 a
Vinifera	7441 a	3178.3 a
Križanci	551556 a	758.25 b

*srednje vrijednosti označene različitim slovima između sorata razlikuju se na razini p<0,05 korištenjem *Duncan multiple-range* test

Ukupni maseni udjeli katehina i epikatehina prikazani su u tablici 7.9. Statistički značajna razlika uočena je jedino u određenih epikatehina među sortama međuvrsnih križanaca i sortama *V. vinifera* (Tablica 7.8.).

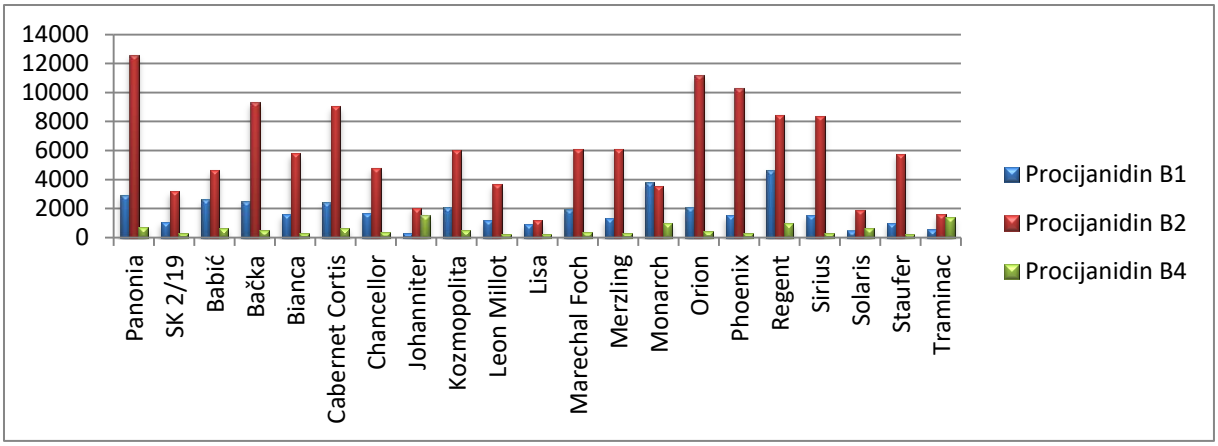
Maseni udjeli procijanidina B1, B2, B4 određenih u 21 sorti prikazani su u tablici 7.10. Iz prikazanih rezultata jasno je vidljivo da postoje statistički značajne razlike u masenim udjelima navedenih spojeva između pojedinih analiziranih sorata.

Tablica 7.10. Maseni udjeli procijanidina B1, B2 i B4 u sjemenkama. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

Sorta	Procijanidin B1	Procijanidin B2	Procijanidin B4
Panonia	2957,9 c	12606,8 a	725,54 d
SK 2/19	1085,6 hi	3181,9 h	297,07 j
Babić	2615,8 d	4655,1 g	651,92 de
Bačka	2507,2 d	9333,0 d	504,61 fg
Bianca	1600,7 f	5812,7 f	302,29 j
Cabernet Cortis	2445,2 d	9056,8 de	628,47 e
Chancellor	1676,7 f	4800,9 g	385,68 hi
Johanniter	335,4 k	2031,5 i	1566,21 a
Kozmopolita	2075,5 e	6025,8 f	523,24 f
Leon Millot	1202,4 hi	3672,9 h	234,74 j
Lisa	944,1 i	1176,4 i	244,46 j
Marechal Foch	1972,7 e	6074,4 f	395,52 h
Merzling	1335,8 gh	6120,3 f	308,32 ij
Monarch	3801,5 b	3523,3 h	1019,53 c
Orion	2113,5 e	11190,4 b	436,96 gh
Phoenix	1537,8 fg	10311,9 c	302,81 j
Regent	4683,6 a	8479,9 de	982,68 c
Sirius	1536,3 fg	8344,9 e	310,39 ij
Solaris	480,6 jk	1925,5 i	684,62 de
Staufer	1017,5 j	5771,0 f	246,98 j
Traminac	592,3 j	1604,7 i	1380,62 b

*srednje vrijednosti označene različitim slovima između sorata razlikuju se na razini $p<0,05$ korištenjem *Duncan multiple-range* testa

Najveći maseni udio procijanidina B1 određen je u sjemenkama sorte 'Regent', procijanidina B2 određen je u sorti 'Panonia', dok je najveći maseni udio procijanidina B4 određen u sjemenkama sorte 'Johanniter'. Na grafičkom prikazu (Slika 7.4.) vidljivo je da je najmanji maseni udio procijanidina B1 određen u sorti 'Traminac', a određena vrijednost masenog udjela ovoga procijanidina statistički se znatno ne razlikuje od vrijednosti opažene u slučaju sorte 'Staufer'. U sorti 'Lisa' određen je najmanji maseni udio procijanidina B2, no ona se isto tako znatno ne razlikuje po rezultatima od sorata 'Johanniter', 'Solaris' i 'Traminac'. Najmanji maseni udio procijanidina B4 određen je u sjemenkama sorte 'Leon Millot', dok su nešto veće vrijednosti opažene kod 'SK 90 2/19', 'Bianca', 'Lisa', 'Phoenix' i 'Staufer', ali te razlike nisu dovoljno velike da bi bile statistički značajne.



Slika 7.4. Grafički prikaz masenih udjela procijanidina B1, B2 i B4. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

Tablica 7.11. Rezultati ANOVA-e za procijanidin B1, B2 i B4

	Procijanidin B1	Procijanidin B2	Procijanidin B4
Sorta	***	***	***
Vinifera/križanci	n.s.	*	**
Crno/bijela sorta	***	n.s.	n.s.

***:- p<0,0001; **: p<0,001; *:p<0,05; n.s.: p>0,05

Tablica 7.12. Odnos prosječnih masenih udjela procijanidina B1, B2 i B4. Rezultati su izraženi u mg/kg suhe sjemenke

	Procijanidin B1	Procijanidin B2	Procijanidin B4
Crne sorte	2628.32 a	5751.92 a	614.12 a
Bijele sorte	1460.54 b	6204.54 a	556.54 a
Vinifera	1604.1 a	3130 b	1016.3 a
Križanci	1883.05 a	6364 a	528.95 b

*srednje vrijednosti označene različitim slovima između sorata razlikuju se na razini p<0,05 korištenjem *Duncan multiple-range* test

U tablici 7.12. prikazani su ukupni maseni udjeli za sva tri analizirana procijanidina. Kada se usporede ukupni maseni udjeli procijanidina B1 određeni za sve crne i sve bijele sorte moguće je opaziti statističke značajne razlike. Dobivene vrijednosti procijandina B2 i B4 za sjemenke crnih odnosno bijeli sorti jasno prikazuju kako ne postoji statistički značajne razlike, dok statistički značajna razlika postoji kod dobivenih vrijednosti za sjemenke čiste *vinifera* odnosno križanaca (Tablica 7.11.).

8. Zaključak

Prema provedenom istraživanju određivanja polifenola male molekulske mase kod međuvrsnih križanaca vinove loze ustanovljene su bitne različitosti u polifenolnom sastavu ispitivanih križanaca. Iz prikazanih rezultata jasno je vidljivo da postoje statistički značajne razlike u masenim udjelima galne kiseline između pojedinih analiziranih sorata. Uzimajući u obzir prosječne vrijednosti masenih udjela crnih i bijelih sorata nije uočena statistički značajna razlika u masenim udjelima epikatehin-3-*O*-galata. Najveći maseni udio galokatehina određen je u sjemenkama sorte 'Monarch' dok je najniži određen u sjemenkama sorte 'Phoenix' koji se statistički značajno ne razlikuje u masenom udjelu galokatehina određenog u slučaju sorte 'Bianca'. Uzimajući u obzir prosječan maseni udio galokatehina za sjemenke crnih odnosno bijelih sorata može se opaziti statistička značajna razlika kao i kod rezultata dobivenih za epigalokatehin. Najveći maseni udio epikatehina određen je u sjemenkama 'Traminca', a najniži u slučaju sjemenki sorte 'Lisa'. Bez obzira na nešto veće vrijednosti masenog udjela epikatehina u sjemenkama sorata 'Leon Millot' i 'Bianca' te razlike nisu statistički značajne. Kada se usporede ukupni maseni udjeli procijanidina B1 određeni za sve crne i sve bijele sorte moguće je opaziti statističke značajne razlike. Dobivene vrijednosti procijandina B2 i B4 za sjemenke crnih odnosno bijeli sorti jasno prikazuju kako ne postoji statistički značajne razlike, dok statistički značajna razlika postoji kod dobivenih vrijednosti za sjemenke čiste *vinifera* odnosno križanaca.

Konačno, s obzirom da se u današnje vrijeme pridaje velika pažnja istraživanjima o polifenolima, ustanovljeno je kako osim što utječu na kvalitetu grožđa i vina, također mogu imati antikancerogena, antioksidativna, antimikrobna, protuupalna pa čak i kardioprotektivna svojstva pa stoga dobiveni rezultati mogu pomoći pri odabiru sorti kao primjeni u određenoj grani industrije.

9. Popis literature

1. Cadot Y., Miñana-Castelló M. T., Chevalier M. (2006). Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during Fruit Development. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(24): 9206 – 9215.

2. Chateau Stripmine, Selected Parentage Diagrams < http://www.chateaustripmine.info/Parentage.htm>. Pristupljeno 14. kolovoza 2017.

3. Karoglan Kontić J. (2014), Sorte vinove loze otporne na gljivične bolesti, <http://www.gospodarski.hr/Publication/2014/17/prilog-broja-sorte-vinove-loze-otporne-na-gljivine-bolesti/8065#.Wbc2iMhJbIU>. Pristupljeno 20. kolovoza 2017.

4. Karoglan Kontić J., Rendulić Jelušić I., Tomaz I., Preiner D., Marković Z., Stupić D., Andabaka Ž., Maletić E. (2016). Polyphenolic composition of the berry skin of six fungus-resistant red grapevine varieties. International. Journal of Food Properties. **19:** 1809-1824.

5. Kennedy A. J., Matthews A. M., Waterhouse L. A., (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. Phytochemistry. 55(1): 77 – 85.

6. Kennedy A. J., Troup J. G., Pilbrow R. J., Hutton R. D., Hewitt D., Hunter R. C., Ristic R., Iland G. P., Jones P. G., (2000). Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. Australian Journal of Grape and Wine Research. 6(3): 244 – 254.

7. König H., Fröhlich J., Unden G (2009). Influence of Phenolic Compounds and Tannins on Wine-Related Microorganisms. U: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 307-333.

8. Maleš P. (1987). Vinogradarstvo i vina Dalmacije, Institut za Jadransku kulturu i melioraciju krša, Split.

9. Milan (2016). Vinova loza- Interspecies sorte, Poljosfera <http://www.poljosfera.rs/agrosfera/agro-teme/vocarstvo-i-vinogradarstvo/vinova-loza-interspecies-sorte/>. Pristupljeno 25. kolovoza 2017.

10. Mirošević N., Karoglan Kontić J. (2008). Vinogradarstvo. Nakladni zavod Globus d.o.o. Zagreb.

11. R. A. Dixon, D. -Y. Xie, S. B. Sharma (2005). Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?.New Phytoogist. 165**:** 9-28.

12. Sara Bugarčić, „Interspecies“ vinske i stone sorte (2013.) <http://www.zdravasrbija.com/lat/Zemlja/Vinogradarstvo/552ldquoINTERSPECIESrdquo.php > Pristupljeno 13. kolovoza 2017.

13. Shi J., Yu J., Pohorly, J. E., Kakuda Y., (2004). Polyphenolics in Grape Seeds-Biochemistry and Functionality. Journal of Medical Food. 6(4): 291 – 299.

14. Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., Gerós, H. (2013). Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. International Journal of Molecular Sciences 14:18711-18739.

15. Tomaz I., (2016). Optimiranje priprave uzoraka za analizu polifenolnih spojeva u kožici grožđa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

16. Tomaz I., Maslov L. (2015). Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Different Matrices using Phenyl-Hexyl Stationary Phase. Food Analytical Methods. 9(2): 401 – 410.

17. *Vitis* Internacional Variety Catalogue *V*IVC, Julius- Küln Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Federal Research Centre for Cultivated Plants <http://www.vivc.de/index.php?r=passport%2Fview&id=8802>. Pristupljeno 15. kolovoza 2017.

Životopis autora

Kristina Brusek rođena je 05.12.1992. godine u Zagrebu. U Zagrebu upisuje Osnovnu školu Vugrovec-Kašina gdje završava svoje osnovnoškolsko obrazovanje. Nakon osnovne škole upisuje Srednju školu Sesvete, usmjerenje Opća gimnazija, a zatim 2011. godine, upisuje prvu godinu preddiplomskog studija na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Hortikultura. U 2014. godini stječe akademski naziv Sveučilišne prvostupnice inženjerke hortikulture obranom završnog rada na temu *Primjena bentonita u vinarstvu* te se potom odlučuje upisati diplomski studij, smjer: Vinogradarstvo i vinarstvo.