

# Promjene sastava i sadržaja fenolnih spojeva u listovima crnih sorata vinove loze tijekom pojedinih fenofaza

---

**Jakobović, Filip**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:311963>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



# **PROMJENE SASTAVA I SADRŽAJA FENOLNIH SPOJEVA U LISTOVIMA CRNIH SORATA VINOVE LOZE TIJEKOM POJEDINIH FENOFAZA**

DIPLOMSKI RAD

Filip Jakobović

Zagreb, rujan 2019.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Vinogradarstvo i vinarstvo

# **PROMJENE SASTAVA I SADRŽAJA FENOLNIH SPOJEVA U LISTOVIMA CRNIH SORATA VINOVE LOZE TIJEKOM POJEDINIH FENOFAZA**

DIPLOMSKI RAD

Filip Jakobović

Mentor: doc. dr. sc. Željko Andabaka

Zagreb, rujan, 2019.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



## **IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Filip Jakobović**, JMBAG 0253042021, rođen 23.09.1995. u Požegi, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

### **PROMJENE SASTAVA I SADRŽAJA FENOLNIH SPOJEVA U LISTOVIMA CRNIH SORATA**

#### **VINOVE LOZE TIJEKOM POJEDINIH FENOFAZA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor 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 upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta / studentice*



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



## IZVJEŠĆE

### O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Filipa Jakobovića**, JMBAG 0253042021, naslova

#### PROMJENE SASTAVA I SADRŽAJA FENOLNIH SPOJEVA U LISTOVIMA CRNIH SORATA

#### VINOVE LOZE TIJEKOM POJEDINIH FENOFAZA

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. doc. dr. sc. Željko Andabaka mentor \_\_\_\_\_

2. izv. prof. dr. sc. Marko Karoglan član \_\_\_\_\_

3. doc. dr. sc. Zvezdana Marković član \_\_\_\_\_



## Sadržaj

### Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Cilj rada .....	3
3. Pregled literature .....	4
3.1. Godišnji biološki ciklus vinove loze .....	4
3.1.1. Podjela godišnjeg biološkog ciklusa vinove loze .....	4
3.2. List vinove loze .....	5
3.3. Fenoli .....	7
3.3.1. Fenolne kiseline .....	8
3.3.2. Flavonoidi .....	10
3.3.3. Važnost i primjena fenola .....	12
4. Materijali i metode .....	13
4.1. Vinogradarsko vinarsko pokušalište „Jazbina“ .....	13
4.2. Meteorološki podaci .....	14
4.3. Prikupljanje uzoraka .....	15
4.4. Postupak liofilizacije .....	16
4.5. Postupak ekstrakcije .....	17
4.6. HPLC analiza .....	17
4.7. Statistička obrada podataka .....	18
5. Rezultati i rasprava .....	19
5.1. Promjena u sadržaju fenolnih spojeva u listovima ispitanih sorata prema terminima uzorkovanja .....	19
5.1.1. Prvi termin uzorkovanja (20. lipnja) .....	19
5.1.2. Drugi termin uzorkovanja (10. srpnja) .....	21
5.1.3. Treći termin uzorkovanja (1. kolovoz) .....	22
5.1.4. Četvrti termin uzorkovanja (23. kolovoz) .....	23
5.1.5. Peti termin uzorkovanja (13. rujna) .....	25
5.2. Promjene sadržaja fenolnih spojeva u listovima ispitanih sorata po terminima uzorkovanja .....	26
5.2.1. Promjene sadržaja flavonola .....	26
5.2.2. Promjene sadržaja hidroksicimetnih kiselina .....	28
5.2.3. Promjene sadržaja hidroksibenzojevih kiselina .....	29
5.2.4. Promjene sadržaja flavan-3-ola .....	30
6. Zaključak .....	32





# Sažetak

Diplomskog rada studenta **Filipa Jakobovića**, naslova

## **PROMJENE SASTAVA I SADRŽAJA FENOLNIH SPOJEVA U LISTOVIMA CRNIH SORATA VINOVE LOZE TIJEKOM POJEDINIH FENOFAZA**

Fenolni spojevi predstavljaju sekundarne biljne metabolite koji imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu u rastu i reprodukciji biljke te joj pružaju zaštitu protiv patogena i predatora. Brojni su istraživači ukazali na blagodati fenolnih spojeva na temelju čega je prepoznata njihova važnost u zaštiti biljke od abiotičkih i biotičkih stresova, te u antikancerogenom, antialergijskom, protuupalnom, antimikrobnom i neuroprotektivnom djelovanju. Ujedno, zbog svoga djelovanja koji utječe pozitivno na ljudsko zdravlje, fenolni spojevi su korišteni u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Samim time, glavni cilj ovoga istraživanja je dobiti pregled i bolje shvaćanje promjena u sastavu i sadržaju fenolnih spojeva, točnije flavonola, flavan-3-ola, hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina prisutnih u listovima 12 različitih sorata vinove loze. Istraživanje se odvijalo na vinogradarsko vinarskom pokušalištu „Jazbina“ tijekom 2018. godine. Uzorci su sakupljeni periodično, počevši sa završetkom cvatnje vinove loze do tehnološke zrelosti pojedinih sorata, točnije od 22.06. do 13.09. Listovi su potom adekvatno pohranjeni, podvrgnuti procesima liofilizacije i ekstrakcije. Ekstrakti su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Dobiveni rezultati su obrađeni pomoću jednosmjerne analize varijance i Duncan Multiple Range testa. Temeljem dobivenih rezultata utvrđena je značajna varijabilnost u masenim udjelima fenolnih spojeva između sorata po pojedinim terminima uzorkovanja, kao i značajna varijabilnost u sadržaju fenolnih spojeva unutar iste sorte tijekom različitih termina uzorkovanja.

**Ključne riječi:** vinova loza, list, fenolni spojevi, crne sorte, tekućinska kromatografija

## Summary

Of the master's thesis – student **Filip Jakobović**, entitled

### **CHANGES IN COMPOSITION AND CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN LEAVES OF RED GRAPEVINE VARIETIES DURING CERTAIN PHENOPHASES**

Phenolic compounds represent secondary plant metabolites which play an important physiological and morphological role in plant growth and reproduction. They also provide a protection against pathogens and predators. Numerous researches have pointed to the benefits of phenolic compounds, which served as a basis for the recognition of their importance. They protect the plant from abiotic and biotic stress and contain anticancer, anti-allergic, anti-inflammatory, antimicrobial and neuroprotective positive properties. Moreover, because of their composition which positively affects human health, phenolic compounds are used in pharmaceutical, food and cosmetic industry. Therefore, the main aim of this research is to gain a review and a better understanding of the changes in the composition and the content of the following phenolic compounds: flavonoid, flavan-3-ol, hydroxycyclic acid and hydroxybenzoic acid present in the leaves of twelve different grapevine varieties. The research was conducted in the Jazbina Experimental Station during 2018. The samples were periodically collected, starting with the end of the flowering of the grapevine up to technological maturity of individual grapevine varieties. The research was conducted in the period from 6/22 to 9/13 to be exact. The leaves were then adequately stored and subjected to processes of lilyolysis and extraction. The extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography. The results were processed with the help of one-way analysis of variance and Duncan Multiple Range test. Based on the obtained data, a significant variability in the mass shares of phenolic compounds between different grapevine varieties during individual sampling periods was found. Moreover, a significant variability in the content of phenolic compounds within the same grapevine variety during different sampling periods was found as well.

**Keywords:** vine grapes, leaf, phenols, red varieties, liquid chromatography

# 1. Uvod

Smatra se kako je vino staro koliko i čovječanstvo. Mnogi istraživači prapovijesti pretpostavljaju da je sama kultura njegovanja vinove loze stara više od 12.000 godina (Mirošević i Turković 2003.). Od davnina, vino predstavlja omiljeni napitak, a kao dokaz o istome govore brojno poznati citati i mudre izreke. „*Vino je stvar, na čudesan način namijenjena ljudima, da se primjenjuje kod dobrog i lošeg zdravlja u pravilnim količinama.*” – poznata je Hipokratova rečenica prema kojoj su još stari Grci prepoznali dobrobiti i kvalitete korištenja vina, a može se zaključiti da je tako ostalo i do danas.

Vinova loza (*Vitis vinifera*, L.) je vrsta koja se razvila na području Europe i zapadne Azije (Tomaz 2016.). Prema porijeklu pripada rodu *Vitis*, jedinom gospodarski važnom od deset rodova porodice *Vitaceae*. Plodovi vinove loze koriste se za ljudsku ishranu, kao voće ili za preradu u vino. Također koriste se za sušenje ili proizvodnju nekih drugih prehrambenih proizvoda, pa i farmaceutskih pripravaka. Uz to, u manjem se dijelu plod vinove loze prerađuje u bezalkoholne sokove te destilira u jaka alkoholna pića. Samim time, vinova loza predstavlja gospodarski najvažniju vrstu spomenutog roda. Danas se vinova loza uzgaja gotovo na svim kontinentima, odnosno u Europi, Sjevernoj i Južnoj Americi, Australiji, Africi i Aziji, točnije na područjima umjerene klime gdje se pravilno izmjenjuju godišnja doba (Maletić i sur. 2015.).

Bobice grožđa, odnosno primarni produkti proizvodnje vina, sastoje se od brojnih skupina spojeva kao šećeri, organske kiseline, minerali, hlapljivi aromatski spojevi, aminokiseline i fenoli (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, stilbena i flavonoida kao što su antocijanini, flavonoli i flavan-3-oli) (Tomaz 2016.). Važno je spomenuti kako se uz grožđe u određenim granama proizvodnje mogu koristiti i listovi vinove loze, unutar kojih se također nalaze određene količine fenola značajne za biljku. Fenoli su jedan od najvažnijih spojeva sadržanih u vinovoj lozi (Bravo 1998.). Fenoli su skupina spojeva koji se sastoje od hidroksilne skupine (-OH) vezane izravno na aromatski ugljikovodik. Najjednostavniji takav spoj je fenol ( $C_6H_5OH$ ). U biljkama oni imaju ulogu u rastu, oplodnji i razmnožavanju te sudjeluju u brojnim obrambenim reakcijama kako bi biljku zaštitili od abiotičkog (npr. UV zračenje) ili biotičkog stresa (npr. napadi patogena) (Tomaz 2016.). Fenolni spojevi su u novije vrijeme privukli povećanu pažnju u području prehrane, zdravlja i lijekova, uglavnom zbog njihovog antikarcinogenog, antiulceričnog, antialergijskog, protuupalnog, antiartritičkog, antimikrobnog i antioksidacijskog djelovanja (Amellai i sur. 1985., prema Doshi, Adsule i Banerjee, 2006.). Također, fenolni spojevi se mogu koristiti u prehrambenoj industriji kao prirodno bojilo i dodatak prehrani (Bravo 1998.).

U vinu, fenoli imaju važnu ulogu u senzornim svojstvima jer utječu na gorčinu, boju i okus vina, a posebno su značajni u proizvodnji crnih vina. S obzirom na veliki značaj fenolnog sastava grožđa za kvalitetu vina i činjenicu da fenolni sastav može značajno varirati kod iste sorte, brojna su istraživanja nastojala definirati ovisnost fenolnog sastava o različitim okolišnim uvjetima, tehnologijama uzgoja, kao i postojanje unutar sorte varijabilnost (Tomaz 2016.). Odnosno, postoje mnogi faktori koji utječu na stvaranje fenola u listovima, uključujući

svjetlost, temperaturu, nadmorsku visinu, vrstu tla, vodu, starost lista i slično. Ujedno, jedan od važnih čimbenika za stvaranje određene količine fenola u listovima je i genotip sorte (Downey, Dokoozlian i Krstić 2006.). Odnosno istraživanja su pokazala kako su crvena vina bogatija fenolnim kiselinama u odnosu na bijela (Zoričić 1998.). Važno je istaknuti kako ne postoji samo jedan čimbenik za određivanje sadržaja fenola u listovima, već su uzroci mnogobrojni. Da bi se ostvarila njegova maksimalna količina, nije važno pažnju usmjeriti samo na određene okolinske ili vremenske prilike, već i na sam genotip sorte.

## **2. Cilj rada**

Za pokus su odabrane autohtone hrvatske sorte i internacionalna sorta 'Merlot'. Tijekom različitih fenofaza, počevši od fenofaze cvatnja i oplodnja, skupit će se uzorci listova u pet termina, te se pomoću analiza metodom tekućinske kromatografije odrediti polifenolni profil listova. Statističkom obradom podataka dobiveni rezultati će se usporediti te se utvrditi promjene sastava i sadržaja fenolnih spojeva kod odabranih sorata vinove loze.

### **3. Pregled literature**

#### **3.1. Godišnji biološki ciklus vinove loze**

Biti upoznat s godišnjim biološkim ciklusom vinove loze, točnije fenologijom, znači u pravo vrijeme provoditi različite ampelotehničke zahvate kojima možemo bitno utjecati na uspješnost vinogradarske proizvodnje. Također, poznavati godišnji biološki ciklus vinove loze važno je i za provođenje ostalih zahvata u vinogradu kao što su zaštita i gnojidba. Kako se sorte bitno razlikuju u trajanju pojedinih fenofaza, kao i okolinskih uvjeta potrebnih za njihov početak i optimalno odvijanje, izbor sorte prikladne za određeno područje, prvenstveno se bazira na njenoj fenologiji (Preiner 2013.).

##### **3.1.1. Podjela godišnjeg biološkog ciklusa vinove loze**

Godišnji biološki ciklus vinove loze odnosi se na promjene na trsu koje su vidljive tijekom jedne godine. Znanstvena disciplina fenologija bavi se proučavanjem svih vidljivih promjena na trsu, ali i okolinskih uvjeta o kojima one i ovise. Cijeli se godišnji ciklus može podijeliti na dva osnovna dijela; (1) razdoblje vegetacije i (2) razdoblje zimskoga mirovanja. No, detaljnijim pogledom na razdoblja vegetacije ukupni se godišnji biološki ciklus vinove loze dijeli na sedam fenofaza; (1) sušenje ili plač, (2) pupanje, rast i razvoj vegetacije, (3) cvatnja i oplodnja, (4) rast bobica, (5) dozrijevanje grožđa, (6) priprema za zimsko mirovanje i (7) zimsko mirovanje (Preiner 2013.).

Uz takvu podjelu, postoje i mnogo detaljnije podjele vegetacijskog ciklusa, koje su ujedno i manje korištene, te se sastoje od bročanog označavanja pojedinih faza razvoja, a jedna takva najpoznatija i najčešće korištena je takozvana BBCH skala koja se koristi i za druge kulture, a Lorenz i sur. 1994. (prema Preiner, 2013.) su je modificirali isključivo za vinovu lozu. Također korištene su i druge skale za praćenje godišnjeg biološkog ciklusa, a među njima su najčešće korištene Baggioolini skala (1952., prema Preiner, 2013.), Eichhorn i Lorenz (E-L) skala (1977., prema Preiner, 2013.) te modificirana E-L skala (Coombe, 1995., prema Preiner, 2013.).

Prva faza ili sušenje ili plač loze, pojavljuje se nakon zimskog mirovanja te predstavlja prvi vidljivi znak početka razdoblja vegetacije, a odlikuje se početkom aktivnosti korijena koji počinje usvajati vodu iz tla i slati je prema nadzemnom djelu biljke. Na mjestima rana koje nastaju tijekom zimskog mirovanja pojavljuju se kapljice vode, da bi nakon toga došlo do rehidracije tkiva. Ova fenofaza može trajati različito ovisno o vremenskim uvjetima, a može biti i prekinuta uslijed pada temperature, no otprilike traje 15 do 30 dana. Uvjet za početak ove faze jest da se tlo na dubini od 25-30 cm zagrije na 7-10°C, a to se u pravilu poklapa sa srednjom dnevnom temperaturom zraka od oko 10°C (Preiner 2013.).

Druga faza je faza pupanja, rasta i razvoja vegetacije. Početak ove faze razvoja čini pojava listića iz pupa što se naziva i „faza mišjih ušiju“. Ovaj razvoj u početku se odvija uz korištenje rezervnih tvari iz drvenastih dijelova pohranjenih u prethodnoj vegetaciji, jer listovi tek nakon postizanja 2/3 svoje konačne veličine počinju proizvoditi više asimilata nego što sami troše. Nakon toga slijedi razvoj zelene mase, odnosno mladica, listova i cvjetova. Tijekom te faze vinova loza započinje proces fotosinteze. Za početak ove faze srednja dnevna temperatura mora biti od 7-12°C, a traje 40 do 60 dana te završava početkom cvatnje (Preiner 2013.).

Treću fazu čine cvatnja i oplodnja. U tjednima prije cvatnje cvjetovi dovršavaju svoj razvoj, a 2-3 dana prije odbacivanja cvjetne kapice polen postane klijav. Samim time, sama se oplodnja može dogoditi i ispod cvjetne kapice jer je većina sorata vinove loze samooplodna. Prilikom oplodnje polen pada na njušku tučka i klija do plodnice gdje se spajaju muške i ženske gamete i nastaje embrio. Cvatnja može trajati 5 do 20 dana, ovisno o vremenskim uvjetima (Preiner 2013.).

Četvrtu fazu karakterizira rast i razvoj bobica. Sama faza započinje zametanjem bobica, a završava početkom dozrijevanja grožđa. Nakon oplodnje dolazi do intenzivne diobe i rasta stanica zbog čega se povećava volumen bobica. Raste sadržaj kiselina u bobicama, a pred početak dozrijevanja dostiže maksimum. Ta faza može trajati 30 do 60 dana, a traje sve do početka dozrijevanja (Preiner 2013.).

Peta je faza dozrijevanje grožđa. Ova fenofaza je poznata po promjenama koje se nazivaju šarama. Dolazi do promjene boje kožice te uskoro nakon toga bobica počinje mekšati, a na njenoj površini pojavljuje se voštana prevlaka, odnosno mašak. Također, događa se i fiziološka zrelost grožđa, odnosno bobice se nastavljaju povećavati uglavnom na račun mesa (težina sjemenki uglavnom ostaje nepromijenjena), a sjemenke završavaju svoj razvoj i postaju fiziološki zrele (Preiner 2013.).

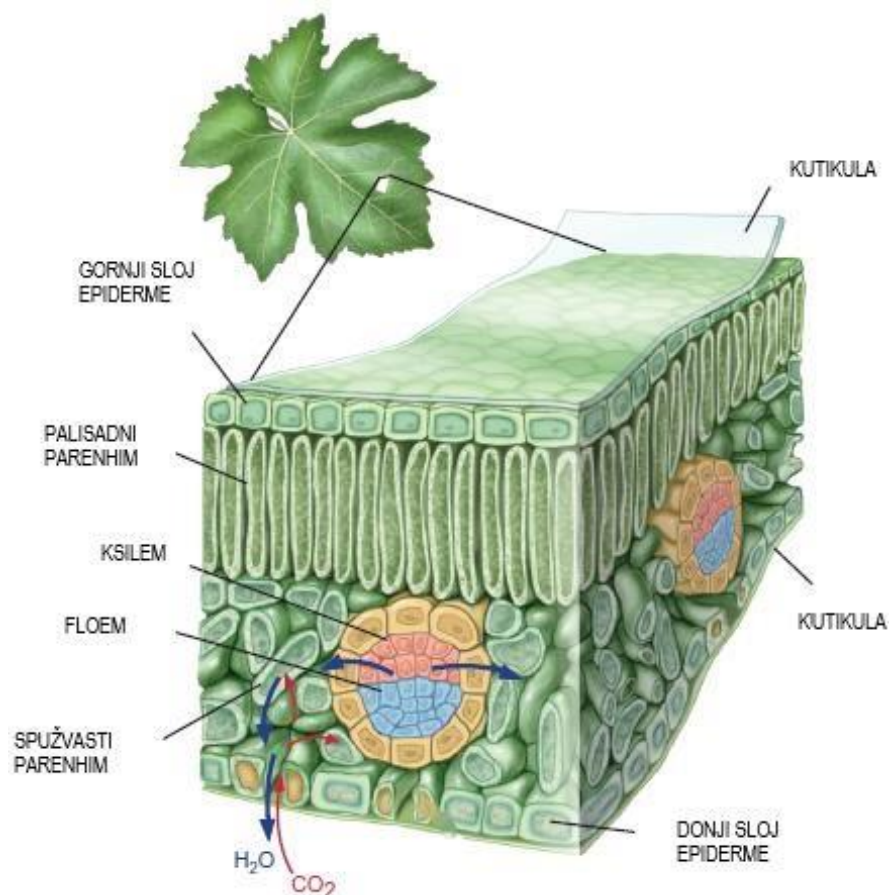
U šestoj fazi ili samoj pripremi za zimsko mirovanje dolazi do pripreme za zimsko mirovanje. Stvoreni asimilati sada se skladište u mladicama (nodiji), starom drvu i korijenu. Fiziološki su procesi usmjereni primarno na skladištenju rezervnih tvari, dovršetku diferencijacije pupova, dozrijevanju mladica, a rezervne tvari su izuzetno bitne radi otpornosti na niske zimske temperature i nastavak aktivnog života idućeg proljeća. Opadanjem listova nastupa zimski odmor vinove loze. U takvim uvjetima, smanjuju se sve životne funkcije trsa radi povećanja otpornosti na niske zimske temperature (Preiner 2013.).

### **3.2. List vinove loze**

List predstavlja pouzdani čimbenik prepoznavanja određene vrste vinove loze. Listovi su poredani na svakom koljencu mladice naizmjenično. Građeni su od peteljke i plojke. Postoje različite veličine listova, odnosno mali listovi (10-12 cm), srednje dugi (17-20 cm) i veliki (veći

od 20 cm). Rast lista je usporedan s rastom mladice, a odvija se u tri faze, ukupnog trajanja od 30-40 dana. Tako u prvoj fazi list postigne oko 15% svoje normalne veličine, u drugoj fazi naraste do 70% veličine, a u trećoj završava rastom (Mirošević i Karoglan Kontić 2008.).

Detaljnijim pogledom na samu anatomiju lista (Slika 3.2.1.), mogu se uočiti određeni dijelovi. Odnosno, plojka je plosnatog oblika, a po obodu plojke razvijeni su zupci različitih oblika i veličine, a razlikujemo vršne, rubne i dopunske zupce. Naličje lista je u velikom broju slučajeva pokriveno dlačicama, koje mogu biti mekane, paučinaste i oštre, čekinjaste. Prema anatomiji, razlikuju se gornja i donja strana plojke, odnosno gornji i donji sloj epiderme. Kutikula predstavlja tanku opnu koja pokriva vanjske stanične membrane epiderme. Izgrađena je od kutina, tvari slične mastima, pa samim time slabo propušta vodu i plinove. Tkivo između dva sloja epiderme naziva se mezofil. Sam mezofil se sastoji od jednog sloja izduženih stanica nazvanih palisadnim parenhimom i četiri do šest slojeva nepravilno oblikovanih, lagano nabijenih stanica nazvanih spužvastim parenhimom, koje zauzimaju više intercelularnog prostora (Keller 2015.).



Slika 3.2.1. Anatomska građa lista (izvor: M. Keller, 2010)

List ima određene zadaće koje obavlja kao proces fotosinteze, disanja i transpiracije. Fotosinteza je proces pretvaranja svjetlosne energije u kemijsku i njezino pohranjivanje u vidu



molekula šećera, odnosno proces gdje list vinove loze uz pomoć sunčeve energije iz molekule CO<sub>2</sub> i vode sintetizira ugljikohidrate. Ona se odvija u specijaliziranim staničnim organelima i kloroplastima, pa se samim time može reći da je list svojom građom prilagođen ovoj funkciji. Odnosno, velike je površine, sadrži specijalizirane stanice s kloroplastima, veliki broj puči za usvajanje CO<sub>2</sub> te mrežu provodnih žila koje omogućavaju transport vode u list, te ugljikohidrata u ostale dijelove vinove loze. Disanje, kao drugi važan proces koji list vinove loze obavlja, može se definirati kao proces oksidacijskog razlaganja ugljikohidrata pri čemu se oslobađa energija, CO<sub>2</sub> i voda, dok transpiracija kao fiziološki proces pri kojem se ispušta voda u obliku vodene pare iz listova u okoliš (Mirošević i Karoglan Kontić 2008.).

### 3.3. Fenolni spojevi

Fenoli su jedan od najvažnijih spojeva sadržanih u vinovoj lozi, čija je primjena šarolika. Zbog svog sastava, vinova loza se može koristiti u prehrambenoj industriji (Bravo 1998.), a radi svoga antioksidacijskog djelovanja i u farmaceutskoj industriji kao biljni lijek za liječenje srčanih bolesti i mikrocirkulacije (Hmamouchi i sur. 1996.). Zanimljivo je da su fenoli zaslužni i za takozvani francuski paradoks (engl. *Frenchparadox*) koji objašnjava činjenicu da u Francuskoj postoji relativno mala učestalost srčanih bolesti, unatoč tome da je njihova prehrana zasićena i bogata mastima (Renaud i De Lorgeril 1992.). Na temelju toga, nedvojbeno je kako fenoli imaju veliku važnost u svakidašnjem životu biljnoga, ali i ljudskoga svijeta.

Fenolni su spojevi najrašireniji sekundarni metaboliti u biljnom carstvu. Za razliku od osnovnog (primarnog) metabolizma koji se isključivo odnosi na anaboličke i kataboličke procese potrebnih za život stanice i proliferaciju, sekundarni metabolizam uključuje spojeve sadržane u posebnim stanicama koji nisu izravno uključeni u fotosintezu ili disanje. Bez obzira na to, oni su neophodni da bi biljka preživjela u svojoj okolini. Danas se procjenjuje kako 2% ugljika asimiliranog tijekom fotosinteze biljka prevodi u fenolne spojeve. Oni se obično nalaze u vakuolama stanica epiderme. Općenito, fenoli se sintetiziraju iz aminokiseline fenilalanina te čine organske spojeve kod kojih je hidroksilna grupa (-OH) neposredno vezana na C atom aromatske jezgre (Karalić 2014.). Njihova je građa složena, te su fenoli podijeljeni u brojne skupine i podskupine, a podjela se temelji na broju sadržanih fenolnih prstenova te na temelju strukturnih elemenata koji međusobno povezuju iste te prstenove (Tomaz 2016.). Podjela fenola može se vidjeti u Tablici 1.

**Tablica 1.** Podjela fenola na skupine i podskupine

OSNOVNA STRUKTURA	SKUPINA
C <sub>6</sub>	Jednostavni fenoli, benzokinoni
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Hidroksibenzojeve kiseline
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Feniloctene kiseline
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Hidroksicimetne kiseline, fenilpropeni, kumarini, kromeni
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftokinoni
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Ksantoni
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbeni, antrakinoni
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavanoidi (flavoni, flavonoli, flavanonoli, flavanononi, antocijanini, flavanoli, čalkoni)
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignini
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Kondenzirani tanini

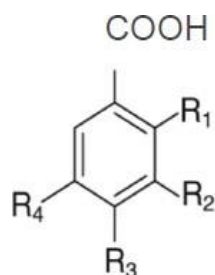
Dvije su osnovne grupe polifenola: neflavonoidi (fenolne kiseline) i flavonoidi (Karalić 2014.). U odnosu na polifenole bobica grožđa, podaci o sadržaju i sastavu polifenola u listovima vinove loze su oskudniji. Međutim, u posljednjih par godina, povećao se interes za njihovo proučavanje. Prethodna su istraživanja fenolnih spojeva ukazala na povećanu zastupljenost flavonoida, točnije flavonola (Schoedl i sur. 2011.) i flavan-3-ola (Schoedl i sur. 2011.), kao i neflavonoida, odnosno derivata hidroksicimetne kiseline (Schoedl i sur. 2011.) i derivata hidroksibenzojeve kiseline (Weber i sur. 2005.) u listovima vinove loze.

### 3.3.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline predstavljaju bezbojne spojeve koji sa svojim svojstvima mogu utjecati na stabilnost boje crnih vina ili utjecati na miris, dok neki od njih imaju izraženu biološku aktivnost. Fenolne kiseline i njihovi derivati predstavljaju podskupinu neflavonoida koja je široko rasprostranjena u biljnom carstvu. Zahvaljujući svojim potencijalnim biološkim funkcijama, kao što su protuupalno, antialergijsko, antimikrobno, antikancerogeno i antivirusno djelovanje, pojačava se zanimanje za njihova istraživanja (Jolić 2017.). Dvije osnovne fenolne kiseline su hidroksicimetna kiselina (HCA) i hidroksibenzojeva kiselina (HBA) koje se razlikuju po svojoj strukturi i stupnjevima hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Robbins 2003., prema Jolić, 2017.).

Preteče brojnih drugih spojeva važnih za rast i razvoj biljaka, upravo čine hidroksibenzojeve kiseline C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> aromatske karboksilne kiseline čije se strukture razlikuje s obzirom na broj i položaj hidroksilnih i metoksilnih skupina na benzenskom prstenu. Najčešće

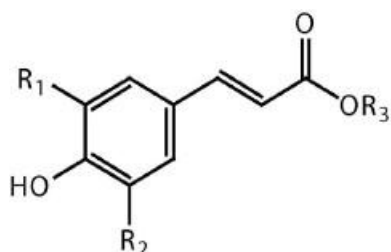
se nalaze u obliku estera ili glikozida, a mogu se nalaziti i u slobodnom obliku (Tomaz 2016.). Na Slici 3.3.1.1. prikazana je osnovna strukturna formula ove grupe kiselina.



Galna kiselina  $R_1 = H$ ;  $R_2 = R_3 = R_4 = OH$   
 Prokatehinska kiselina  $R_1 = H$ ;  $R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = R_4 = OCH_3$   
 Siringinska kiselina  $R_1 = H$ ;  $R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_4 = OCH_3$   
 Vanilinska kiselina  $R_1 = H$ ;  $R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = OH$ ;  $R_4 = H$

Slika 3.3.1.1. Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina (izvor: I. Tomaz, 2016)

S druge strane, hidroksicimetne kiseline imaju osnovnu strukturu s jedinicom  $C_6-C_3$  koja ima dvostruku vezu na bočnom lancu (Slika 3.3.1.2.), a ona pak može biti u *trans* i *cis* konfiguraciji. Što se tiče grožđa, najzastupljeniji su *trans*-izomeri. Sve hidroksicimetne kiseline se razlikuju i po broju i vrsti supstituenata koji su vezani na benzenskom prstenu. Od svih kiselina, najzastupljenije su: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska te sinapinska kiselina, a one mogu biti sadržane kao slobodne karboksilne kiseline ili esteri nastali povezivanjem s vinskom kiselinom, flavonoidima ili ugljikohidratima (Tomaz 2016.).



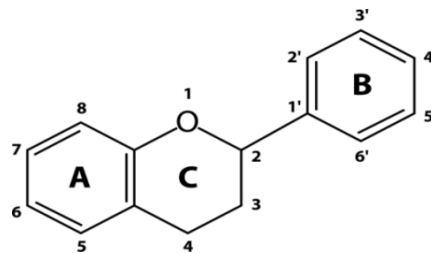
Kafeinska kiselina  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = R_3 = H$   
 Kaftarinska kiselina  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = C_4H_5O_6$  (tartarat)  
*p*-Kumarinska kiselina  $R_1 = R_2 = R_3 = H$   
*p*-Kutarinska kiselina  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = C_4H_5O_6$   
 Ferulinska kiselina  $R_1 = OCH_3$ ;  $R_2 = R_3 = H$   
 Sinapinska kiselina  $R_1 = R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = H$

Slika 3.3.1.2. Osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina (izvor: I. Tomaz, 2016)

Jedna od primarnih zadaća hidroksicimetne kiseline je ta što biljci pruža zaštitu od UV zračenja. U listovima su pronađene najveće količine hidroksicimetnih kiselina u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline. Od hidroksicimetnih kiselina, najviše je zastupljena kaftarinska kiselina, zatim slijede kutarinske, kafeinska i ferulinska (Ivančić 2019.).

### 3.3.2. Flavonoidi

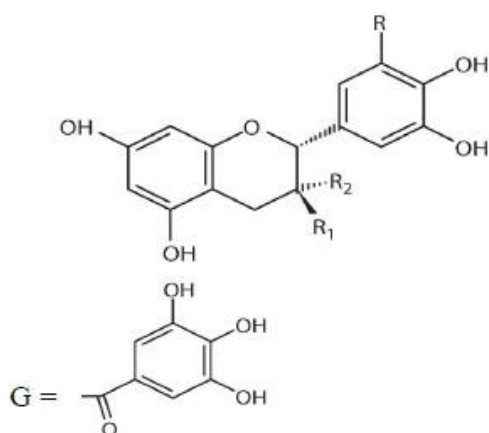
Flavonoidi su po svojim obilježjima najraširenija skupina prirodno složenih fenola. Ukupan sastav i sadržaj flavonoida ovisi o genotipu, a do promjene određenog stupnja može doći uslijed djelovanja nekih biotičkih i abiotičkih čimbenika (Tomaz 2016.). Najviše su zastupljeni u crnim vinima, gdje čine 85% ukupnih fenola, dok u bijelim vinima više prevladavaju neflavonoidi (Karalić 2014.). Flavonoidi su polifenolni spojevi čiju osnovnu strukturu čini difenilpropanska jedinica ( $C_6-C_3-C_6$ ) u kojoj su dva hidroksilirana benzenska prstena međusobno povezana lancem izgrađenim od tri atoma ugljika, a koji je dio heterocikličkog prstena. Osnovna struktura flavanoida prikazan je na Slici 3.3.2.1.



Slika 3.3.2.1. Osnovna struktura flavanoida (izvor: I. Tomaz, 2016)

Ujedno, flavonoidi se dijele na: flavan-3-ole, flavonole, antocijane i tanine. Rezultati istraživanja Anđelković i sur. (2015.), čiji je glavni cilj bio ispitati fenolni sastav listova vinove loze dvije crne sorte, ukazuju na povišene razine flavonola i flavan-3-ola.

Flavan-3-oli sadrže hidroksilnu skupinu na položaju tri prstena C (Tomaz 2016.). Osnovna struktura flavan-3-ola prikazana je na Slici 3.3.2.2. To su bezbojni spojevi koji su prisutni u prirodnim supstratima kao aglikoni koji su najčešće monomeri, oligomeri ili polimeri. Monomeri koji su sadržani u grožđu mogu se podijeliti na: (+)-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. Njihov se sadržaj mijenja s obzirom na sortu 5-100 mg/L, a ujedno ne utječu na boju vina, ali im daju oporan okus (Katanić, 2014).

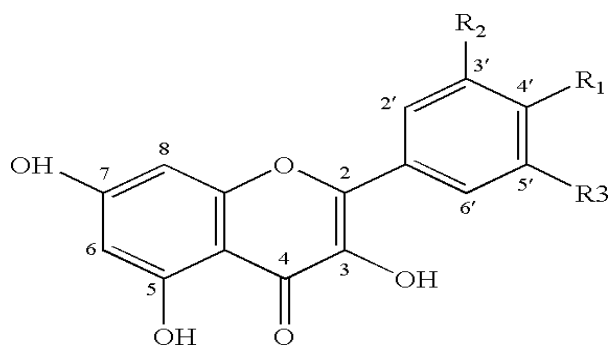


- (+)-Katehin R = H; R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H
- (-)-Epikatehin R = H; R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH
- (+)-Galokatehin R = OH; R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H
- (-)-Epigalokatehin R = OH; R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH
- (-)-Epikatehin-3-O-galat R = H; R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = O-G
- (+)-Galokatehin-3-O-galat R = OH; R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = O-G
- (-)-Epigalokatehin-3-O-galat R = OH; R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = O-G

Slika 3.3.2.2. Osnovna struktura flavan-3-ola (izvor, I. Tomaz, 2016)

Za flavonole je karakteristična prisutnost karbonilne, odnosno keto, skupine na položaju 4 i dvostruka veza između položaja 2 i 3 prstena C, a u samome grožđu su zastupljeni u obliku 3-O-glikozida. U bobici grožđa mogu se sintetizirati glikozidi slijedećih aglikona: kemferola, kvercetina, miricetina, izoramnetina, laricitrina te siringentina. Navedeni se spojevi međusobno razlikuju prema broju i vrsti supstituenata vezanih na prstenu B (Slika 3.3.2.3.) (Tomaz 2016).

Prema broju supstituenata koji se nalaze na prstenu B, mogu se podijeliti na monosupstituirane (kemferol), disupstituirane (kvercetin i izoramnetin) te na trisupstituirane (miricetin, laricitrin te siringetin). Ujedno, važno je istaknuti kako sastav flavonola uvelike ovisi o genotipu, dok na njihov sadržaj, uz genetsku podlogu, utječu i okolišni čimbenici. Od okolišnih čimbenika najznačajnija je izloženost sunčevoj svjetlosti, odnosno ono grožđe više izloženo sunčevoj svjetlosti sadrži veće masene udjele fenolnih spojeva u odnosu na ono grožđe zasjenjeno tijekom rasta i razvoja bobica (Tomaz 2016.). Samim time može se reći kako onda i sam položaj lista na biljci igra značajnu ulogu u sadržaju fenolnih spojeva. Greisser i sur. (2015.) smatraju kako su upravo fenolni spojevi važni u pružanju zaštite biljci. Naime, u stresnim situacijama, primjerice kada postoje deficiti vode ili prevelika izloženost sunčevoj svjetlosti, kao obrambeni odgovor na takvo stresno stanje, biljka proizvodi slobodne radikale. A kako bi se zaštitila od upravo stvorenih slobodnih radikala, biljka stvara određene zaštitne komponente, a flavonoli su samo jedni od njih. Tako, Schoedl i sur. (2013.) smatraju kako osobito veliku ulogu u samoj zaštiti protiv UV zračenja imaju kvercetin-3-O-glukozid i kemferol-3-O-glukozid.



Kemferol  $R_1=OH$ ;  $R_2=R_3$

Kvercetin  $R_1=R_2=OH$ ;  $R_3=H$

Miricetin  $R_1=R_2=R_3=OH$

Izoramnnetin  $R_1=OH$ ;  $R_2=OCH_3$

Laricetin  $R_1=OH$ ;  $R_2=OCH_3$ ;  $R_3=OH$

Siringetin  $R_1=OH$ ;  $R_2=R_3=OCH_3$

Slika 3.3.2.3. Strukturne formule aglikona flavonola (izvor: I. Tomaz, 2016)

### 3.3.3. Važnost i primjena fenola

Kolika je važnost fenola govori i činjenica da se ono najviše koristi u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Neke biljke posjeduju posebna ljekovita svojstva koja su zahvaljujući njihovom djelovanju prepoznata kao vrlo učinkovita sredstva za liječenje brojnih bolesti. Upravo ta ljekovita svojstva nekih biljaka mogu se pripisati fenolima. Primjerice, ekstrakt ginka (*Ginko biloba*, L.) bogat je flavonoidima, te je njegova primarna zaštita poboljšanje cirkulacije te zaštita kognitivnih funkcija. S druge strane, ekstrakt ploda sikavice (*Silybummarianum*) sadrži velike količine polifenola. Upravo silimarin se primjenjuje u poboljšanju djelovanja jetre. Zbog svojih protuupalnih, antimikrobnih i antitumorskih svojstava, fenoli mogu sprječavati nastanak kardiovaskularnih bolesti te samim time postaju potencijalne tvari za proizvodnju lijekova. Ujedno, fenoli imaju neuroprotektivno djelovanje, pa na taj način imaju sposobnost da zaštite osobu od upale neurona te sudjeluju u poboljšanju kognitivnih funkcija kao pamćenje ili učenje. Fenoli igraju važnu ulogu i u prehrambenoj industriji jer mogu poslužiti kao zamjena za konzervanse te umjetna bojila koja su pokazala veliki negativan utjecaj i posljedice na ljudsko zdravlje. Njihova važnost u istome povećana je kada je porasla svijest o zdravoj prehrani i konzumaciji proizvoda bez konzervansa, bojila ili antioksidansa. Također, fenoli su važni u kozmetičkoj industriji jer su se prepoznali kao vrlo bitnima u onim preparatima koji štite ljudsku kožu od prevelikog UV zračenja, ali i za zaštitu kože od starosti (Tomaz 2016.).

Također osim svoje primjene, fenoli imaju zaštitnu ulogu, kao primjerice u zaštiti protiv gljivičnih bolesti. Naime, veliki broj patogenih gljiva uzrokuje bolesti poput plijesni ili truleži, obično prvo inficirajući list zbog čijeg oštećenja dolazi do smanjenja fotosintetske aktivnosti što uništava zdravlje vinove loze. Samim time, kovalentno vezanje fenola na polisaharidne dijelove stanične stijenke povećava njezinu otpornost na gljivične bolesti (Weber 1995.).

## 4. Materijali i metode

### 4.1. Vinogradarsko vinarsko pokušalište „Jazbina“

Više od sedamdeset godina u sastavu Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, djeluje pokušalište "Jazbina", udaljen oko 3,5 km od fakultetskih zgrada. Posjed je smješten na blagim padinama Medvednice okrenutim jugu i jugozapadu s najvišom točkom na 302 m nadmorske visine, što upravo „Jazbinu“ čini prikladnom za voćarsku i vinogradarsku proizvodnju. Od trenutka nabave „Jazbine“ pa sve do 1960. prva svrha njezine izgradnje je bilo da predstavlja nastavni i eksperimentalni objekt. Da bi se ista svrha realizirala, podignuti su voćnjaci s različitim vrstama voća, te vinogradi različitih sorata i uzgojnih oblika. Godine 1995. pristupa se revitalizaciji objekta, te od te godine pokušalište poprima svoj današnji oblik ([www.agr.unizg.hr](http://www.agr.unizg.hr)).

Pokušalište zauzima prostor od 25 hektara na kojima su posađeni vinogradi, voćnjaci, ali i na kojem se nalaze gospodarske zgrade (Žarak 2018., prema Ivančić, 2019.). Prije svega, „Jazbina“ je danas znanstveno-nastavni poligon i kao njezina osnovna zadaća ističe se edukacija studenata, budućih stručnjaka i istraživanja iz područja vinogradarstva i vinarstva. Kao druge zadaće ističu se stjecanja praktičnih znanja te se studentima Agronomskog fakulteta pruža mogućnost organiziranja vježbi i obavezne stručne prakse. Na pokušalištu se pruža mogućnost upoznavanja i s velikim brojem različitih genotipova loze. Samim time, na pokušalištu su posađeni vinogradi u kojima se nalaze gospodarski važne sorte ovoga vinogradarskog područja. Također, posađene su stolne sorte vinove loze, međuvrsni križanci, kao i matični nasad loznih podloga te kolekcija autohtonih sorata vinove loze. Ujedno, na pokušalištu se nalaze gospodarske zgrade u kojima je opremljen vinski podrum sa prostorom i opremom namijenjenom za primarnu preradu grožđa te doradu i punjenje vina ([www.agr.unizg.hr](http://www.agr.unizg.hr)).



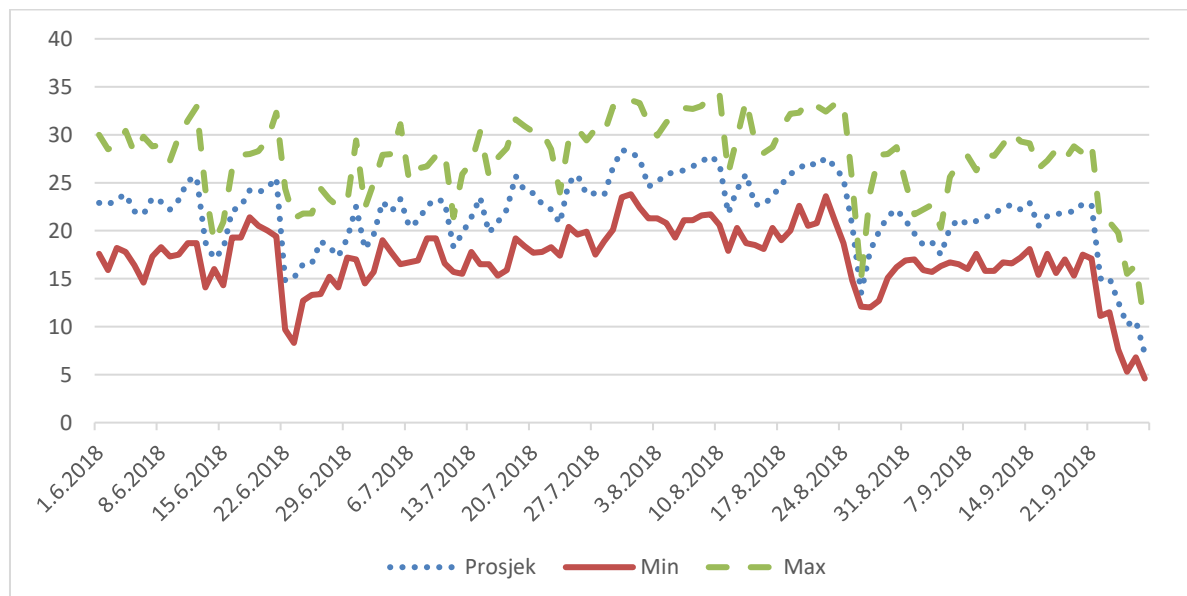
Slika 4.1. Položaj na karti i prikaz Jazbine iz zraka (izvor: [www.agr.unizg.hr](http://www.agr.unizg.hr))

Sam kolekcijski nasad podignut je u razdoblju od 2001. do 2005. godine. Nada se prostire na površini od 0,8 hektara na nadmorskoj visini 250 metara. Redovi se pružaju u smjeru sjeveroistok – jugozapad, s nagibom oko 5 %. Razmak sadnje je 2,20 x 1,10 m, a kao podloga upotrijebljena je SO4 (Vitis berlandieri x Vitis riparia). Uzgojni oblik je jednostrani kordonac visine stabla 80 centimetara, prosječnog opterećenja 8 do 10 pupova. (Andabaka 2015., prema Ivančić, 2019.). Također, na ovom pokušalištu su uzgajane sorte koje su se koristile u svrhu ovoga istraživanja, a to su: 'Babić', 'Ljutun', 'Plavac mali', 'Dobričić', 'Plavina', 'Vranac', 'Trnjak', 'Tribidrag', 'Lasina', 'Ninčuša', 'Merlot' i 'Teran'.

U sklopu gospodarskih zgrada nalazi se i laboratorij unutar kojega su se čuvali svi prikupljeni uzorci na kojima su se obavljale potrebne analiza za svrhu ovoga rada.

## 4.2. Meteorološki podaci

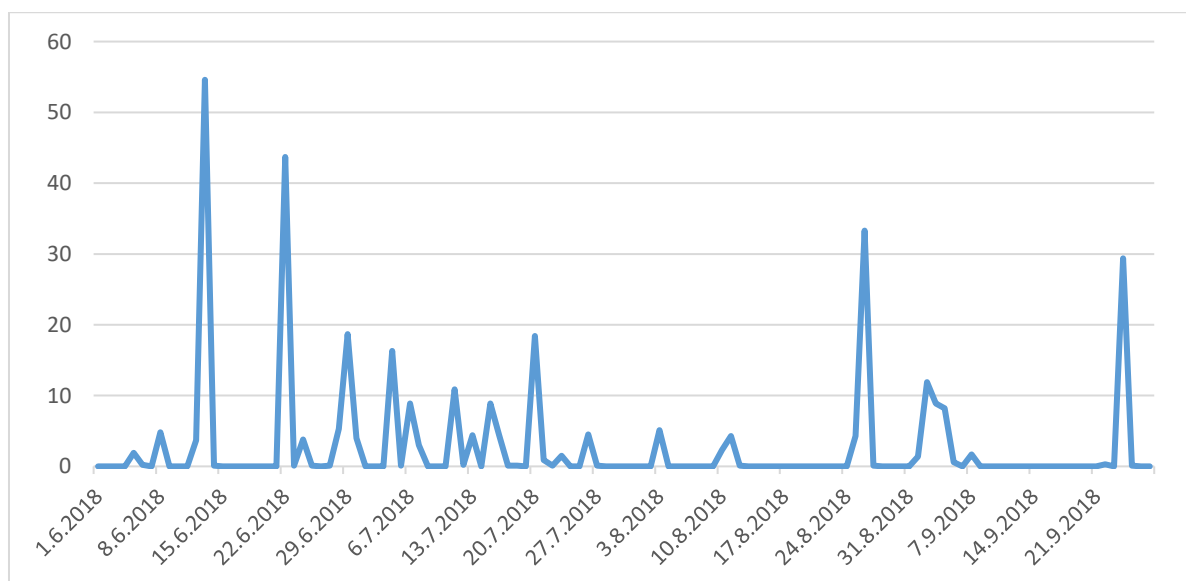
Za potrebe ovoga istraživanja, obavljena su dodatna mjerenja temperature zraka (C°) i intenziteta UV zračenja (W/m<sup>2</sup> s). Sva potrebna mjerenja su obavljena na meteorološkoj stanici koja se nalazi u sklopu pokušališta „Jazbina“. Temperatura zraka se mjerila u periodu od 01.06. (prvo uzorkovanje je bilo 20.06) do 27.09. (zadnje uzorkovanje bilo je 13.09.) Minimalne, maksimalne i prosječne temperature zraka za navedeni period mogu se očitati na Grafu 4.1.



Graf 4.1. Temperature zraka u periodu od 01.06 do 27.09.



U razdoblju od 01.06. do 27.09. provedena su mjerenja intenziteta UV zračenja. Na Grafu 4.2. su prikazani intenziteti UV zračenja za navedeni period.



Graf 4.2. Intenzitet UV zračenja u periodu od 1.06. do 21.09.

### 4.3. Prikupljanje uzoraka

Uzorci su prikupljeni tijekom 2018. godine. Prvi uzorci su prikupljeni neposredno nakon cvatnje, odnosno sredinom lipnja, a posljednji su prikupljeni u vrijeme tehnološke zrelosti pojedine sorte. Uzorci su se prikupljali otprilike svaka tri tjedna početkom od 20. lipnja (Tablica 4.1).

Tablica 4.1. Termini uzorkovanja

Termini uzorkovanja	
1.	20.06.2018
2.	10.07.2018
3.	1.08.2018
4.	23.08.2018
5.	13.09.2018

Radi veće reprezentativnosti uzorka, uzimali su se samo oni listovi koji su rasli nasuprot prvom grozdu na mladici. Ukoliko nije bilo takvih listova, za uzorak su se uzimali sljedeći listovi. Svi prikupljeni uzorci spremali su se u kuverte s jasno naznačenim imenom sorte i datumom uzorkovanja (Slika 4.2.). Uzorci su se do analiza čuvali u zamrzivaču na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ .

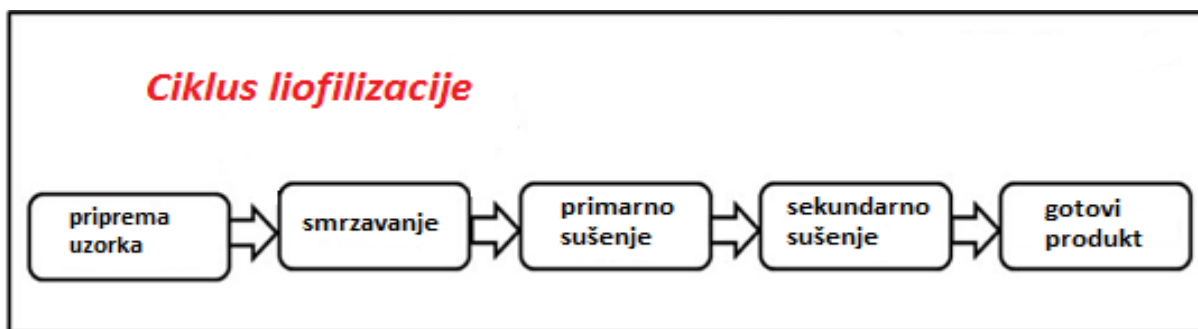


Slika 4.2. Spremljeni uzorci listova (izvor: P. Baždarić)

#### 4.4. Postupak liofilizacije

Liofilizacija je postupak sušenja materijala koji se provodi u tri faze, a to su smrzavanje materijala, primarno sušenje (sublimacija) i sekundarno sušenje (desorpcija). Proces liofilizacije sastoji se od tri koraka (Habuš 2017.). Prvi korak odnosi se na smrzavanje uzorka, najčešće pri temperaturi nižoj od  $-40^{\circ}\text{C}$  (Abdelwahed i sur. 2006a., prema Habuš, 2017). Zatim, drugi korak predstavlja primarno sušenje zamrznutog uzorka koje se temelji na sublimaciji, točnije prelasku leda u vodenu paru pri uvjetima sniženog tlaka i temperature. Nakon primarnog sušenja slijedi sekundarno sušenje, odnosno desorpcija zaostale vode koja tijekom smrzavanja nije prešla u led. Sekundarno sušenje provodi se pri sobnoj ili povišenim temperaturama, dok se ne dobije produkt s prihvatljivim sadržajem ostatne vlage (Muzzio i Dini 2011., prema Habuš, 2017.). Kratki prikaz postupka može se vidjeti na Slici 4.3.

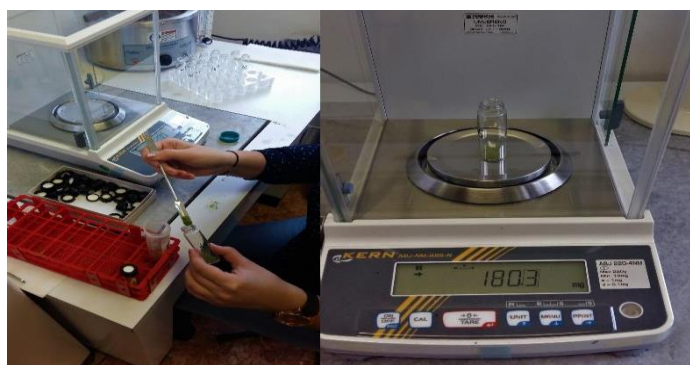
Prije nego što su se listovi stavili u liofilizator, bilo je potrebno odvojiti peteljku od plojke lista. Prvo su se plojke stavljale u kuverte, a zatim u liofilizator. Primarno sušenje je provedeno pri tlaku od 0, 10 mbar u trajanju od najmanje 24 sata, a sekundarno pri tlaku od 0, 01 mbar u trajanju od najmanje 12 sati. Za navedeni proces, uporabljen je liofilizator Alpha 1-2 LDPlus (Martin Christ, Njemačka)



Slika 4.3. Shematski prikaz liofilizacije (izvor: Nireesha i sur., 2013, prema Habuš 2017.)

#### 4.5. Postupak ekstrakcije

Nakon samoga postupka liofilizacije listovi su usitnjeni u fini prah i prosijani radi uklanjanja dlačica. Uzorci listova stavljeni su u staklene posudice za uzorke. Na izvagane uzorke mase  $180 \pm 1$  mg dodano je 10 mL ekstrakcijskog otapala, koje se sastojalo od 20 % acetonitrila, 1 % mravlje kiseline i 79 % vode. Ovako pripravljena ekstrakcijska smjesa stavljena je na magnetnu miješalicu u trajanju od 90 min pri temperaturi od 48 °C. Dobiveni supernatant filtriran je preko membranskog filtra (PTFE (teflon), 0,45  $\mu\text{m}$ ) te potom stavljen na HPLC analizu.



Slika 4.4. Vaganje usitnjenih uzoraka (izvor: M. Žarak)

#### 4.6. HPLC analiza

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Agilent 1100 series se koristio za provođenje analize uzoraka. Isti instrument se sastoji od automatskog uzorkivača, detektora s nizom dioda, binarne pumpe te fluorescentnog detektora, boca za pokretnu fazu i računala preko kojeg se upravlja programom za HPLC. Kolona Luna Phenyl-Hexyl (4,6× 250 mm; 5  $\mu\text{m}$  veličina čestica (Phenomenex, SAD)) se koristila zbog razdvajanja pojedinih polifenola. U ovoj analizi koristila se 0,5 % (v/v) vodena otopina fosforne kiseline kao prvo, a kao drugo otapalo otopina acetonitrila, vode i fosforne kiseline (50:49,5:0,5; v/v/v) Brzina protoka bila je 0,9 mL/min, volumen ubrizganog uzorka 20  $\mu\text{L}$ , a temperatura kolone 50 °C. Analize su provedene u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi u  $\mu\text{g/g}$  suhog lista.

#### **4.7. Statistička obrada podataka**

Da bi se utvrdila značajnost razlika između pokusnih varijanti, provedena je jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*). Istim statističkim postupkom utvrđena je statistički značajna razlika varijanata. Usporedba srednjih vrijednosti, odnosno aritmetičkih sredina provedena je pomoću Duncan Multiple Range testa. Za statističku obradu podataka upotrijebljen je SAS v 9.3 statistički softvera (2012, SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD)

## 5. Rezultati i rasprava

### 5.1. Promjena u sadržaju fenolnih spojeva u listovima ispitanih sorata prema terminima uzorkovanja

Maseni udjeli fenolnih spojeva zastupljenih u listovima crnih sorata odabranih u ovom istraživanju mogu se vidjeti u tablicama 5.1. do 5.5. Maseni udjeli izraženi su u  $\mu\text{g/g}$  suhog lista. Od hidroksicimetnih kiselina u listovima uočene su kaftarinska, kufeinska, kutarinska, kumarinska, fertarična i sinapinska kiselina. Od navedenih, najviše je zastupljena kaftarinska kiselina. Nadalje, od hidroksibenzojevih kiselina zastupljene su galna, prokatehinska i vanilijska. S druge strane, od flavonoida, točnije flavonola, u listovima zastupljeni su bili mircetin-3-*O*-glukonorid, mircetin-3-*O*-glukozid, rutin, kvercetin-3-*O*-glukonorid, kvercetin-3-*O*-glukozid, kemferol-3-*O*-glukonorid, kemferol-3-*O*-glukozid, kemferol-3-*O*-galaktozid i izoramnetin-3-*O*-glukozid. Također, od ostalih flavonoida, odnosno flavan-3-ola zastupljeni su bili galokatehin, procijanidin B1, epigalokatehin, procijanidin B3, katehin, procijanidin B4, procijanidin B2 i epikatehin.

#### 5.1.1. Prvi termin uzorkovanja (20. lipnja)

U tablici 5.1. navedeni su maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u prvom terminu uzorkovanja, točnije maseni udjeli fenolnih spojeva izmjerenih 20. lipnja.

U navedenom terminu, najviši sadržaj flavonola izmjeren je kod sorte 'Lasina' ( $36\,237,5 \mu\text{g/g}$ ) dok je najniži sadržaj pronađen kod sorte 'Tribidrag' ( $21\,683,5 \mu\text{g/g}$ ). Od ispitivanih flavonola najzastupljeniji su bili kvercetin-3-*O*-glukozid i rutin. Također, od ispitivanih flavonola, najmanje je bio zastuplje kemferol-3-*O*-glukonorid, budući da kod nekih sorata (primjerice sorta 'Dobričić') nije bio ni uočen.

Od svih sorata, 'Lasina' je pokazala najvišu zastupljenost hidroksicimetnih kiselina, točnije  $5\,428,31 \mu\text{g/g}$ , dok s druge strane, sorta 'Plavac' najmanje ( $1\,444,53 \mu\text{g/g}$ ). Od svih hidroksicimetnih kiselina, kaftarinska kiselina se istaknula kao najviše zastupljena kod svih sorata, a zatim kutarinska te kafeinska. Najmanje je bila zastupljena fertarična kiselina.

Najviši maseni udio hidroksibenzojevih kiselina bio je izmjeren kod sorte 'Lasina' i iznosio je  $277,970 \mu\text{g/g}$ . Najmanji sadržaj izmjeren je kod sorte 'Tribidrag' te je iznosio  $125,500 \mu\text{g/g}$ . Također, ova skupina fenolnih spojeva predstavlja najmanji maseni udio izmjeren u ovom terminu uzorkovanja. Najzastupljenija od hidroksibenzojevih kiselina bila je prokatehinska, nakon nje vanilijska, a najmanje galna.

Flavan-3-oli su najviše bili zastupljeni u sorti 'Lasina' (1554,035 µg/g), a najmanje kod sorte 'Vranac' (399, 940 µg/g). Od iste skupine fenolnih spojeva, najviše su bili zastupljeni procijanidin B2 i epigalokatehin.

Ukupno gledajući, najveća zastupljenost svih fenolnih spojeva uočena je kod sorte 'Lasina' točnije ukupno 43497, 875 µg/g, te kod sorte 'Merlot' 39411, 95 µg/g. Kod sorata 'Plavina' (4341, 965 µg/g) i 'Trnjak' (6101, 925 µg/g) izmjerene su najmanji maseni udjeli fenolnih spojeva.

Prvo uzorkovanje izvršavalo se nakon cvatnje vinove loze. U ovoj fenofazi uzgoja vinove loze listovi su gotovo posve razvijeni te samostalno obavljaju fotosintezu. Prosječne temperature zraka u periodu od 01.06. do 20.6. (prvi termin uzorkovanja) kretale su se od 18°C do 25°C. Također, u navedenom terminu, tri dana bilježe najviše izmjerenu temperaturu od 33°C (Graf 4.1.). Takve vremenske prilike omogućile su proces fotosinteze koji je potaknuo nastajanje fenola kao sekundarnih metabolita.

Tablica 5.1. Maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u prvom terminu uzorkovanja

	<b>Hidroksicimetne kisljine</b>	<b>Hidroksibenzojeve kisljine</b>	<b>Flavonoli</b>	<b>Flavan-3-oli</b>
<b>Babić</b>	2248,00 i	133,265 g	25678,9 e	471,910 h
<b>Ljutun</b>	4732,09 b	218,005 b	25334,5 e	702,515 e
<b>Plavac mali</b>	3337,31 f	162,245 f	31516,5 c	813,025 c
<b>Dobrićić</b>	3340,25 f	160,020 f	23930,3 g	943,000 b
<b>Plavina</b>	1444,53 k	173,005 e	2291,0 h	433,430 i
<b>Vranac</b>	2478,50 h	189,000 d	31075,5 c	399,940 j
<b>Trnjak</b>	2879,00 g	206,720 c	24596,5 f	419,705 ij
<b>Tribidrag</b>	1689,45 j	125,500 g	21683,5 i	495,895 g
<b>Lasina</b>	5428,31 a	277,970 a	36237,5 a	1554,035 a
<b>Ninćuša</b>	4665,28 c	195,000 d	29229,5 d	954,500 b
<b>Merlot</b>	4180,00 d	193,040 d	34275,9 b	763,000 d
<b>Teran</b>	3509,70 e	192,815 d	23412, 5 hg	531,730 f

\*srednje vrijednosti oznaćene različitim slovima među sortama razlikuju se na razini  $p < 0,05$  korištenjem Duncan's multiple- range testa

\*\*sve brojćane vrijednosti izražene su u µg/g suhog lista

### 5.1.2. Drugi termin uzorkovanja (10. srpnja)

U Tablici 5.2. mogu se vidjeti maseni udjeli fenolnih spojeva izmjerenih u drugom terminu uzorkovanja, točnije 10.07.

U navedenom terminu, najveći maseni udio flavonola izmjeren je u sorti 'Merlot' (42037, 5 µg/g), a najmanji kod sorte 'Tribidrag' (22113, 4 µg/g). Od flavonola, najviše su bili zastupljeni kvercetin-3-glukozid te zatim kvercetin-3-glukonoroid i rutin. S druge strane, kemferol-3-glukonoroid je bio najmanje zastupljen iz razloga što kod nekih sorata (primjerice 'Merlot') nije bio zastupljen.

Kod sorte 'Lasina' izmjeren je najveći maseni udio hidroksicimetnih kiselina (5853, 00 µg/g), dok kod sorte 'Tribidrag' najmanji (1973, 16 µg/g). I u ovom uzorkovanju, kaftarinska kiselina se izdvojila kao najzastupljenija od hidroksicimetnih kiselina kod svih sorata.

Kao i kod hidroksicimetnih kiselina, kod sorte 'Lasina' uočen je najveći maseni udio hidroksibenzojevih kiselina (345, 230 µg/g), dok kod sorte 'Tribidrag' najmanji (181, 125 µg/g). Redoslijed zastupljenosti kiselina je takav da je prokatehinska svojim udjelom najzastupljenija, a zatim slijede galna te vanilijska.

Sorta 'Plavac' u drugom uzorkovanju mjeri najveću razinu masenog udjela flavan-3-ola (10558, 00 µg/g), dok sorta 'Trnjak' najmanju (507, 00 µg/g). Od flavan-3-ola prema svojoj zastupljenosti najviše se izdvojio galokatehin, a najmanje procijanidin B4.

Prosječne temperature izmjerene između prvog i drugog perioda uzorkovanja iznosile su od 15°C do 23°C. Samo u jednom danu navedenog termina maksimalna temperatura iznosila je 30 °C (Graf 4.1.). Što se tiče ukupnog sadržaja fenolnih spojeva, sorta 'Lasina' se istaknula kao ona koja sadržava najveći maseni udio fenolnih spojeva (41992, 73 µg/g), dok sorta 'Tribidrag' najmanje (24827, 685 µg/g).

Tablica 5.2. Maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u drugom terminu uzorkovanja

	Hidroksicimetne kiseline	Hidroksibenzojeve kiseline	Flavonoli	Flavan-3-oli
<b>Babić</b>	3162,16 g	197,720 f	28115,0 d	1009 b
<b>Ljutun</b>	4771,50 b	304,385 b	27262,0 d	1169 b
<b>Plavac mali</b>	3791,87 e	289,915 c	38407,0 b	1267 b
<b>Dobričić</b>	3340,39 f	204,500 f	25233,3 e	767 b
<b>Plavina</b>	2910,54 h	294,410 bc	27501,8 d	10558 a
<b>Vranac</b>	3346,34 f	271,835 d	33686,1 c	606 b
<b>Trnjak</b>	2629,24 i	264,845 d	25920,1 e	507 b
<b>Tribidrag</b>	1973,16 j	181,125 g	22113,4 f	560 b
<b>Lasina</b>	5853,00 a	345,230 a	33630,5 c	1174 b

<b>Ninčuša</b>	4514,68 c	275,520 d	33049,4 c	1536 b
<b>Merlot</b>	4584,00 c	270,500 d	42037,5 a	1086 b
<b>Teran</b>	3964,50 d	243,580 e	22559,3 f	565 b

\*srednje vrijednosti označene različitim slovima među sortama razlikuju se na razini  $p < 0,05$  korištenjem Duncan's multiple- range testa

\*\*sve brojčane vrijednosti izražene su u  $\mu\text{g/g}$  suhog lista

### 5.1.3. Treći termin uzorkovanja (1. kolovoz)

U Tablici 5.3. vidljiv je prikaz masenih udjela fenolnih spojeva u sortama u trećem terminu uzorkovanja, odnosno 1. 08.

Od zastupljenosti flavonola, sorte 'Plavac' (41036, 00  $\mu\text{g/g}$ ) i 'Merlot' (39545, 50  $\mu\text{g/g}$ ) mjere najveći maseni udio, dok sorte 'Tribidrag' (25019,40  $\mu\text{g/g}$ ) i 'Teran' (22000, 50  $\mu\text{g/g}$ ) najmanji. Kao i u prijašnjim terminima uzorkovanja kvercetin-3-glukonoroid je najviše bio zastupljen, dok kemferol-3-glukonorid najmanje budući da u većem broju sorti ('Dobričić', 'Lasina', 'Merlot' i 'Teran') zastupljenost je bila jednaka vrijednosti 0.

Vrijednosti hidroksicimetnih kiselina kretale su se od najveće, uočene kod sorte 'Ninčuša' (5654, 70  $\mu\text{g/g}$ ), do onih najmanjih, točnije 3385, 80  $\mu\text{g/g}$ , izmjerenih kod sorte 'Plavac'. I dalje, kaftarinska kiselina svojom vrijednošću dominira nad ostalim hidroksicimetnim kiselinama.

Hidroksibenzojeve kiseline su i ovom terminu bile najmanja zastupljena skupina fenolnih spojeva. Sorta 'Trnjak' je pokazala najvišu zastupljenost hidroksibenzojeve kiseline (426, 330  $\mu\text{g/g}$ ), dok sorte 'Merlot' (254, 120  $\mu\text{g/g}$ ) i 'Babić' (253, 455  $\mu\text{g/g}$ ) najmanje. Kao i kod prijašnjih termina, redosljed vrijednosti hidroksibenzojevih kiselina je prokatehinska, galna i vanilijiska.

Sorta s najvećim sadržajem flavan-3-ola bila je 'Ninčuša' sa 2019, 00  $\mu\text{g/g}$ . Također sorte 'Ljutun' i 'Plavina' pokazuju približno jednake vrijednosti flavan-3-ola, odnosno vrijednosti 1084, 28  $\mu\text{g/g}$  za sortu 'Ljutun' i 1083, 44  $\mu\text{g/g}$  za sortu 'Plavina'. Najmanju zastupljenost flavan-3-ola pokazala je sorta 'Teran' u vrijednosti 891, 09  $\mu\text{g/g}$ . Također, galokatehin se pokazao kao najzastupljeniji flavan-3-ol i u trećem terminu uzorkovanja.

U razdoblju između drugog i trećeg termina uzorkovanja prikupljeni su podaci o temperaturi zraka. Prosječna je temperatura iznosila od 23°C do 26 °C, dok kod pojedinih dana maksimalan temperatura je iznosila i više od 35 °C (Grad 4.1.). Od svih sorata, u trećem uzorkovanju sorta 'Plavac mali' je pokazala najvišu razinu masenih udjela fenolnih spojeva, točnije 48471. 88  $\mu\text{g/g}$ , dok najniža vrijednost od 27900, 925  $\mu\text{g/g}$  je izmjerena kod sorte 'Teran'.



Tablica 5.3. Maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u trećem terminu uzorkovanja

	Hidroksicimetne kiseline	Hidroksibenzojeve kiseline	Flavonoli	Flavan-3-oli
<b>Babic</b>	4580,2 ab	253,455 j	32404,9 e	1329,78 e
<b>Ljutun</b>	5419,0 a	316,390 f	26633,0 i	1084,28 fg
<b>Plavac mali</b>	5492,3 a	395,210 b	41036,0 a	1548,37 c
<b>Dobričić</b>	4334,8 ab	281,510 h	29638,3 g	1483,56 d
<b>Plavina</b>	3385,8 b	341,835 e	28302,6 h	1083,44 fg
<b>Vranac</b>	4302,7 ab	357,025 d	29877,4 g	1041,75 fg
<b>Trnjak</b>	4470,7 ab	426,330 a	31734,6 e	1108,05 f
<b>Tribidrag</b>	4431,4 ab	302,795 g	25019,4 j	976,07 i
<b>Lasina</b>	4917,0 ab	358,590 cd	33504,3 d	1788,43 b
<b>Nincusa</b>	5654,7 a	368,955 c	36050,6 c	2019,00 a
<b>Merlot</b>	4881,7 ab	254,120 j	39545,5 b	1037,49 h
<b>Teran</b>	4738,8 ab	270,535 i	22000,5 k	891,09 j

\*srednje vrijednosti označene različitim slovima među sortama razlikuju se na razini  $p < 0,05$  korištenjem Duncan's multiple- range testa

\*\*sve brojčane vrijednosti izražene su u  $\mu\text{g/g}$  suhog lista

#### 5.1.4. Četvrti termin uzorkovanja (23. kolovoz)

Četvrti termin uzorkovanja provodio se 23.08, te se vrijednosti masenih udjela fenolnih spojeva za navedeni dan mogu vidjeti u Tablici 5.4.

Od zastupljenosti flavonola, sorte 'Lasina' ( $37979,5 \mu\text{g/g}$ ) i 'Ninčuša' ( $34569,7 \mu\text{g/g}$ ) pokazale su najveću zastupljenost određenih flavonola. Sorte 'Vranac' i 'Trnjak' pokazuju podjednake vrijednosti zastupljenosti flavonola, točnije vrijednosti  $32819,3 \mu\text{g/g}$  i  $32845,2 \mu\text{g/g}$ , kao i sorte 'Ninčuša' i 'Merlot' sa vrijednostima od  $34569,7 \mu\text{g/g}$  i  $34536,9 \mu\text{g/g}$ .

Od hidroksicimetnih kiselina, vrijednosti zastupljenosti kretale su se od najviše, kod sorte 'Trnjak' ( $6463,10 \mu\text{g/g}$ ) do onih najmanjih uočenih kod sorte 'Plavina' ( $1493,21 \mu\text{g/g}$ ).

Kao i u prijašnjim terminima, hidroksibenzojeve kiseline pokazuju najniže vrijednosti zastupljenosti u odnosu na ostale fenolne spojeve. 'Vranac' se sa vrijednošću od  $447,440 \mu\text{g/g}$  ističe nad ostalim sortama, dok sorta 'Babić' pokazuje najniže vrijednosti zastupljenosti ( $217,255 \mu\text{g/g}$ ).

Vrijednosti flavan-3-ola kretale su se od najvećih, točnije od 1731, 77  $\mu\text{g/g}$  (uočeno kod sorte 'Ninčuša'), do onih najnižih kao kod sorte 'Plavina' sa 795, 50  $\mu\text{g/g}$ . Neke sorte pokazale su vrijednosti koje su sa svojim iznosima približno jednake, kao kod sorti 'Tribidrag' i 'Babić' sa vrijednostima od 889, 00  $\mu\text{g/g}$  i 886, 80  $\mu\text{g/g}$ .

U periodu između trećeg i četvrtog uzorkovanja izmjerene su visoke temperature zraka. Točnije prosječne temperature kretale su se od 20°C do 29 °C, a par dana u terminu od 1.08. do 23.08. pokazuje temperature više od 30 °C (Graf 4.1.). Također, kao i u prijašnjim terminima, sorta 'Lasina' pokazuje najviše vrijednosti fenolnih spojeva, dok sorte 'Babić' i 'Plavina' najmanje. U trećem i u četvrtom terminu, sorte pokazuju veće vrijednosti fenolnih spojeva u odnosu na prvo uzorkovanje. Sukladno tome, povećane temperature zraka mogle su doprinijeti sintezi više fenolnih spojeva te su se na taj način sorte prilagodile uvjetima okoliša.

Tablica 5.4. Maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u četvrtom terminu uzorkovanja

	<b>Hidroksicimetne kiseline</b>	<b>Hidroksibenzojeve kiseline</b>	<b>Flavonoli</b>	<b>Flavan-3-oli</b>
<b>Babić</b>	3107,13 i	217,255 g	27623,8 g	886,80 h
<b>Ljutun</b>	5040,39 c	397,700 cd	30292,5 e	1123,51 d
<b>Plavac mali</b>	3475,26 g	344,170 e	33416,5 c	1069,37 e
<b>Dobričić</b>	3413,8 gh	265,825 f	28097,35 f	895, 78 gh
<b>Plavina</b>	1493,21 l	339,570 e	28384,8 f	795,50 i
<b>Vranac</b>	4114,00 e	447,440 a	32819,3 d	979,00 f
<b>Trnjak</b>	6463,10 a	381,415 d	32845,2 d	1165,00 bc
<b>Tribidrag</b>	2228,50 k	281,870 f	25639,5 i	889,00 h
<b>Lasina</b>	4705, 91 d	419, 635 bc	37979,5 a	1190,5 b
<b>Ninčuša</b>	5205,02 b	389,740 d	34569,7 b	1731,77 a
<b>Merlot</b>	2328,68 j	266,150 f	34536,9 b	925,23 g
<b>Teran</b>	3798,32 f	395,375 cd	26718,1 h	1159,00 c

\*srednje vrijednosti označene različitim slovima među sortama razlikuju se na razini  $p < 0,05$  korištenjem Duncan's multiple- range testa

\*\*sve brođane vrijednosti izražene su u  $\mu\text{g/g}$  suhog lista

### 5.1.5. Peti termin uzorkovanja (13. rujna)

Posljednje uzorkovanje bilo je 13. rujna, a u tablici 5.5. prikazani su dobiveni rezultati za vrijednosti fenolnih spojeva.

Sorta 'Ninčuša' pokazala je najveće vrijednosti flavonola (39487,0 µg/g), dok sorta 'Ljutun' najmanje (23416,0 µg/g). Sorte 'Babić' i 'Tribidrag' pokazuju slične vrijednosti, odnosno vrijednosti od 24720, 4 µg/g i 24758, 0 µg/g.

S obzirom na hidroksicimetne kiseline, sorta 'Teran' je pokazala najveće vrijednosti (6587,47 µg/g), a slijede sorte 'Plavac mali' (5823, 50 µg/g) i 'Lasina' (5818,72 µg/g). Sorta sa najmanjom izmjenom vrijednosti hidroksicimetnih kiselina je 'Plavina' (3588,36 µg/g).

Hidroksibenzojeve kiseline i dalje imaju najmanje iznose zastupljenosti fenolnih spojeva u sortama. U 'Vrancu' je izmjerena najviša razina (622,00 µg/g), a u sorti 'Dobričić' (263,715 µg/g) najmanja.

'Ninčuša' je izmjerila najvišu razinu flavan-3-ola (2864,35 µg/g), dok sorta 'Tribidrag' (1139,38 µg/g) najmanju. Sorte 'Babić' i 'Teran' imaju vrijednosti čija je varijabilnost izrazito mala (1335, 24 µg/g za sortu 'Babić' i 1334, 12 µg/g za sortu 'Teran').

Što se tiče zastupljenosti ukupnih fenolnih spojeva, sorte 'Lasina' i 'Ninčuša' pokazale su najviše vrijednosti fenolnih spojeva (47183,225 µg/g i 47910,350 µg/g). S druge strane, u sorti 'Tribidrag' su izmjerene najniže vrijednosti (30240,125 µg/g).

Također, u terminu od četvrtog do petog uzorkovanja dolazi do općenitog smanjenja fotosintetske aktivnosti i do starenja samog lista. U prilog istome, temperature mjerene između navedenog termina bile su niže u odnosu na ostale termine, točnije prosječne temperature iznosile su od 10 °C do 23 °C (Graf 4.1.) Navedene okolinske promjene uzrokovale su smanjenu sintezu fenolnih spojeva, to jest smanjenje njihovog sadržaja u listovima.

Tablica 5.5. Maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u prvom terminu uzorkovanja

	Hidroksicimetne kiseline	Hidroksibenzojeve kiseline	Flavonoli	Flavan-3-oli
<b>Babić</b>	4741,47 f	270,965 j	24720,4 h	1335,24 i
<b>Ljutun</b>	5663,50 c	421,780 e	23416,0 i	1684,55 d
<b>Plavac mali</b>	5823,50 b	328,450 h	34134,0 d	1549,69 f
<b>Dobričić</b>	4256,42 h	263,715 j	26188,9 g	1469,79 g
<b>Plavina</b>	3588,85 j	440,820 d	27537,5 f	1420,25 h
<b>Vranac</b>	5333,36 d	622,000 a	33701,0 d	2474,50 b
<b>Trnjak</b>	4404, 395 f	529, 87 b	31684, 45 e	1456, 445 g
<b>Tribidrag</b>	3994,78 i	347,965 g	24758,0 h	1139,38 j

<b>Lasina</b>	5818,72 b	513,145 c	38800,4 b	2050,99 c
<b>Ninčuša</b>	5048,50 e	510,500 c	39487,0 a	2864,35 a
<b>Merlot</b>	5705,00 bc	312,660 i	35521,7 c	1587,60 e
<b>Teran</b>	6587,47 a	404,240 f	25970,7 g	1334,12 i

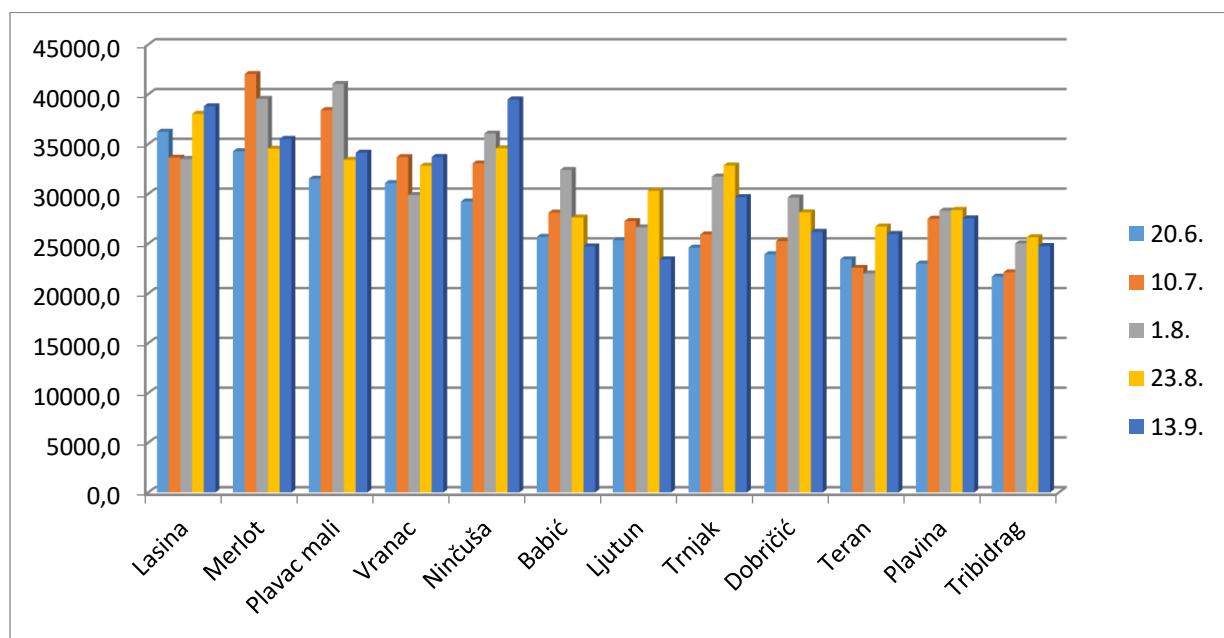
\*srednje vrijednosti označene različitim slovima među sortama razlikuju se na razini  $p < 0,05$  korištenjem Duncan's multiple- range testa

\*\*sve brojčane vrijednosti izražene su u  $\mu\text{g/g}$  suhog lista

Analizom prethodno navedenih podataka moguće je utvrditi da neke sorte pokazuju veću zastupljenost fenolnih spojeva u odnosu na druge sorte. Primjerice 'Lasina', 'Merlot', 'Ninčuša' ili 'Plavac mali' pokazuju više vrijednosti u odnosu na pojedince sorte kao 'Tribidrag', 'Trnjak' ili 'Plavina'.

## 5.2. Promjene sadržaja fenolnih spojeva u listovima ispitanih sorata po terminima uzorkovanja

### 5.2.1. Promjene sadržaja flavonola



Graf 5.1. Promjene u sadržaju flavanola u sortama

Analizom podataka (Graf 5.1.) utvrđena je varijabilnost fenolnih spojeva, odnosno flavanola među pojedinim sortama. Ujedno, utvrđena je i razlika u sadržaju navedenih spojeva tijekom pojedinih termina uzorkovanja.

U prvom terminu uzorkovanja 20.06. sorta 'Lasina' sa svojom vrijednosti flavonola dominira nad ostalim sortama. Ujedno, i za sortu 'Merlot' se može reći kako ima visoke vrijednosti flavonola, ali niže s obzirom na sortu 'Lasina'. Točnije rečeno, razlika između dviju sorti iznosi 1951,6 µg/g. Sorte 'Plavac mali', 'Vranac' i 'Ninčuša' su također sorte koje su zastupljene sa flavanolima, ali njihovi iznosi zauzimaju srednje vrijednosti zastupljenosti flavonola. Sorta 'Tribidrag' zauzima najmanju vrijednost flavonola u prvom terminu uzorkovanja.

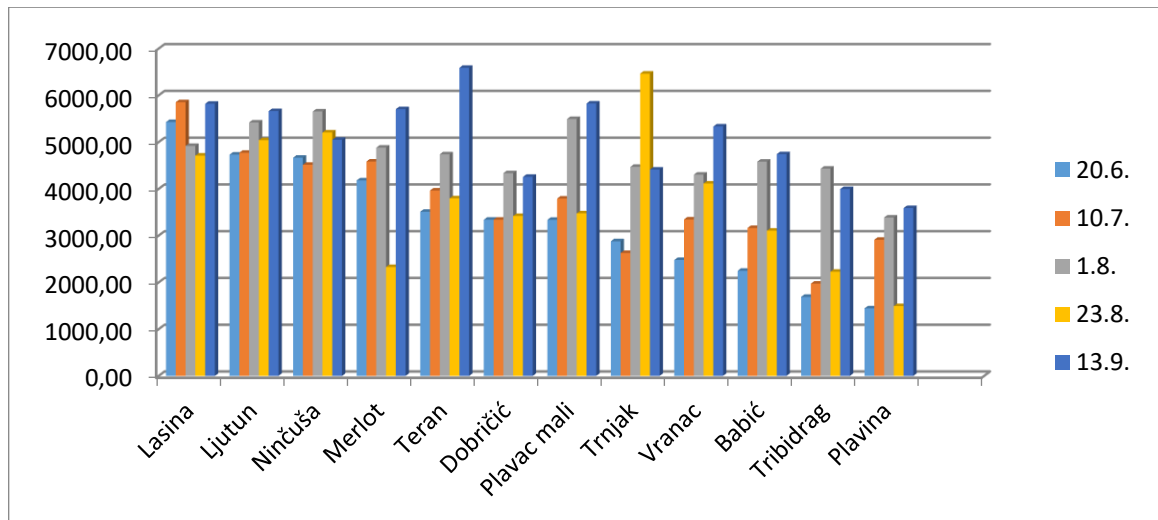
U drugom terminu uzorkovanja koji je bio 10.07. sorta 'Merlot' se izdvaja kao ona sa najvećim sadržajem flavonola, dok sorta 'Tribidrag' kao sa najmanjom vrijednosti zastupljenosti flavonola. Ujedno sorta 'Merlot' upravo u drugom uzorkovanju zauzima najveću vrijednost flavonola u odnosu na svih pet termina uzorkovanja. Zanimljivo je istaknuti kako je upravo sorta 'Merlot' sa svojom vrijednosti od 42037, 5 µg/g ona koja zaista dominira nad ostalim sortama s obzirom na flavonole, iako određeni flavonoli nisu bili zastupljeni, primjerice kemferol-3-glukonorid. Ostale sorte imaju približno podjednaku zastupljenost flavonola, te zauzimaju srednje vrijednosti, kao primjerice sorte 'Babić' i 'Ninčuša'.

Između drugoga i trećeg termina uzorkovanja, više od polovice sorata je zadržalo ili povećalo svoju visoku razinu flavonola. Takve su primjerice sorte 'Plavac mali', 'Ninčuša', 'Merlot', 'Babić', 'Trnjak', 'Dobričić', 'Plavina' i 'Tribidrag'.

'Plavac mali' u trećem terminu uzorkovanja mjeri najviše razine flavonola, dok 'Teran' najmanje. Nešto više, ali i dalje u manjim vrijednostima mjeri sorta 'Tribidrag'. Ujedno, sami treći termin uzorkovanja mjeri nešto više iznose flavonola pojedinih sorata u odnosu na prethodne termine. Primjerice sorte 'Plavac mali', 'Ninčuša', 'Babić', 'Trnjak', 'Dobričić', 'Plavina' i 'Tribidrag'. Razlog što više od polovice sorata imaju više iznose u odnosu na prethodna dva termina može biti zbog izmjerenih viših prosječnih temperatura koje su pogodovale nastanku fenolnih spojeva, točnije flavonola. Na temelju toga, slična se logika može primijeniti i na četvrti termin uzorkovanja, gdje sve sorte pokazuju visoke razine flavonola, te nijedna sorta ne pokazuje vrijednosti niže od 25 000 µg/g čiju približnu vrijednost zauzima sorta 'Tribidrag' (25639,5 µg/g). Najveću vrijednost četvrtog termina uzorkovanja zauzima sorta 'Lasina'. Ujedno, prelaskom iz trećeg u četvrti termin uzorkovanja, samo kod šest sorata su uočene veće vrijednosti flavonola u odnosu na prethodna dva termina (10.07. i 1.0.8), i te sorte su 'Lasina', 'Ljutun', 'Trnjak', 'Teran', 'Plavina' i 'Tribidrag'.

U zadnjem terminu uzorkovanja 13.09., sorte 'Ninčuša' i 'Lasina' svojom vrijednošću se ističu nad ostalim sortama. Važno je istaknuti kako sve sorte zauzimaju niže vrijednosti u odnosu na ostale, dok jedino sorte 'Ninčuša', 'Vranac' i 'Lasina' pokazuju rastuće vrijednosti u odnosu na prethodne termine.

## 5.2.2. Promjene sadržaja hidroksicimetnih kiselina



Graf 5.2. Promjene u sadržaju hidrosicimetnih kiselina u sortama

U prvom terminu uzorkovanja, sorta 'Lasina' je pokazala najvišu razinu hidroksicimetnih kiselina. Od 12 sorti, jedino su 'Merlot', 'Ninčušča' i 'Trnjak' sa svojim vrijednostima u ovom terminu pokazale višu razinu hidroksicimetnih kiselina u odnosu na ostale sorte i termine. Devet ostalih sorti u pet različitih termina uzorkovanja pokazale su najnižu razinu hidroksicimetnih kiselina upravo u prvom terminu uzorkovanja. Sorta 'Plavina' je pokazala najnižu razinu izmjerenih hidroksicimetnih kiselina u ovom terminu.

Prelaskom u razdoblje između prvoga i drugoga termina uzorkovanja (od 20.0.6 do 10.07) razine hidroksicimetnih kiselina su rasle. Kod svih sorata dolazi do povećanja, osim kod sorte 'Trnjak', kod koje se može uočiti blagi pad vrijednosti. Sorta koja se sa svojom vrijednosti hidroksicimetnih kiselina ističe od ostalih je sorta 'Lasina', dok sorta 'Tribidrag' pokazuje najnižu izmjerenu vrijednost, budući da u svim terminima uzorkovanja, osim u trećem, pokazuje najnižu zastupljenost hidroksicimetnih kiselina. Razlika između najviše i najniže izmjerene vrijednosti hidroksicimetnih kiselina iznosi 3879,84 µg/g.

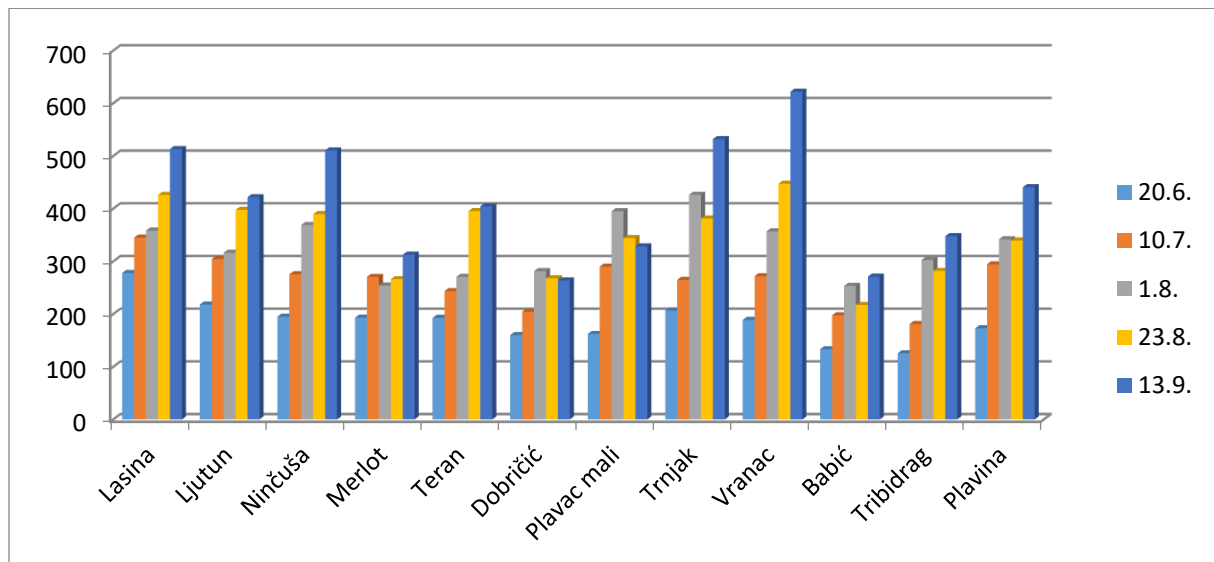
U trećem uzorkovanju (1.08.), zanimljivo je istaknuti kako upravo sorta 'Lasina' koja je u prethodnim terminima pokazala svoju najvišu vrijednost hidroksicimetnih kiselina, u ovom slučaju pokazuje niže vrijednosti, dok ostale sorte pokazuju porast vrijednosti. Primjerice sorta 'Tribidrag' je sa vrijednosti od 1973,15 µg/g izmjerenom u drugom terminu uzorkovanja, pokazala svoju vrijednost od 4431,4 µg/g u trećem terminu uzorkovanja. Jedan od razloga zbog čega su 11 sorti imale veće vrijednosti hidroksicimetnih kiselina u ovom terminu, mogu biti povišene vrijednosti temperatura zraka, ali i UV zračenje koje je pogodovalo stvaranju fenolnih spojeva.

Prelaskom iz trećeg u četvrto uzorkovanje (23.08.) vrijednosti hidroksicimetnih kiselina su se kod svih sorata smanjivale. Jedina sorta koja pokazuje nagli porast je sorta 'Trnjak' koja je

ujedno u ovom terminu pokazala svoje najviše izmjerene vrijednosti. Jedan od mogućih razloga zašto je došlo do smanjenja vrijednosti u sortama jesu niske vrijednosti UV zračenja koje nisu pogodovale biljkama da razviju više razine fenolnih spojeva.

Porastom UV zračenja, porasle su i vrijednosti hidroksicimetnih kiselina u razdoblju između 23.08. do 13.09, odnosno četvrtog i petog termina uzorkovanja. U petom terminu uzorkovanja izmjerene su najviše vrijednosti hidroksicimetnih kiselina u odnosu na preostale termine uzorkovanja. Vrijednosti su se kretale od najviših, 6587, 47  $\mu\text{g/g}$ , do najnižih, 3588, 85  $\mu\text{g/g}$ . 'Ninčuša', 'Trnjak' i 'Tribidrag' su pokazale nešto manje, ali i dalje visoke vrijednosti hidroksicimetnih kiselina u petom terminu uzorkovanja u odnosu na preostale termine.

### 5.2.3. Promjene sadržaja hidroksibenzojevih kiselina



Graf 5.3. Promjene u sadržaju hidroksibenzojevih kiselina u sortama

Također, utvrđena je značajna varijabilnost u sadržaju hidroksibenzojevih kiselina po pojedinim terminima uzorkovanja (Graf 5.3.). Kao i u prethodnih slučajevima, utvrđena je i varijabilnost masenog udjela hidroksibenzojevih kiselina kod pojedinih sorata tijekom promatranog perioda. Ujedno, ono po čemu se hidroksibenzojeve kiseline razlikuju od preostale tri skupine fenolnih spojeva, je njihova konstantna niža razina zastupljenosti.

U prvom terminu uzorkovanja (20.06.) zabilježene su niske razine hidroksibenzojevih kiselina. Primjerice sorta 'Tribidrag' sa svojom vrijednosti od 125, 500  $\mu\text{g/g}$  mjeri najnižu razinu kiselina zabilježenu u svim terminima uzorkovanja. Sorta 'Lasina' je mjerila najveću vrijednost od 277,970  $\mu\text{g/g}$ , te upravo takva mala razlika između najviše i najniže razine vrijednosti ide u

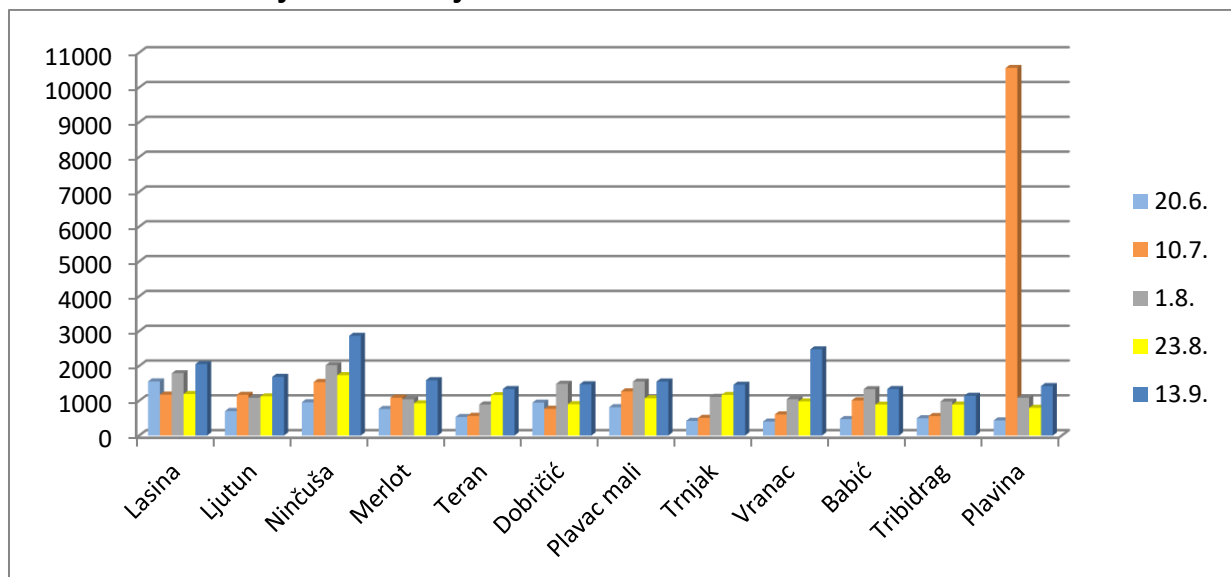
prilog činjenici kako su upravo u prvom terminu uzorkovanja zabilježene najniže vrijednosti hidroksibenzojevih kiselina u odnosu na preostale termine.

S porastom temperature, vrijednosti su prelaskom iz prvoga u drugi termin uzorkovanja (10.07.) rasle, iako ne značajno. I dalje sorta 'Lasina' mjeri najvišu, a sorta 'Tribidrag' najnižu vrijednost. Također, porastom temperature prema trećem terminu uzorkovanja (1.08.) povećavale su se vrijednosti hidroksibenzojevih kiselina. S obzirom na prva dva termina gdje je sorta 'Lasina' pokazivala svoju najveću vrijednost, sorta 'Trnjak' pokazuje ipak najveću zabilježenu vrijednost u ovom terminu. Iako mala, jedino je vrijednost sorte 'Merlot' pokazala nešto nižu vrijednost s obzirom na prva dva termina.

U četvrtom terminu uzorkovanja (23.08.) vrijednosti hidroksibenzojevih kiselina pokazuju neujednačen trend promjene po pojedinim sortama. Neke su sorte, primjerice 'Dobričić' ili 'Plavac mali' pokazale nižu vrijednost s obzirom na prijašnji termin uzorkovanja, dok neke sorte kao 'Lasina' ili 'Ljutun' više vrijednosti. Najviša je vrijednost izmjerena kod sorte 'Vranac', a najniža kod 'Babić'.

U prilog već spomenutoj činjenici kako su u razdoblju od 23.08. do 13.09. izmjerene više razine temperature zraka i UV zračenja, također su se i vrijednosti hidroksibenzojevih kiselina u pojedinim sortama povećale. Na Grafu 5.3. najveće se vrijednosti ovoga termina mogu uočiti kod sorti 'Vranac' i 'Trnjak'. Zbog svojih povećanih vrijednosti, budući da nijedna sorta nije pokazala manju vrijednost u odnosu na preostale termine uzorkovanja, može se sa sigurnošću reći kako u navedenom razdoblju dolazi do porasta hidroksibenzojevih kiselina u određenim crnim sortama.

#### 5.2.4. Promjene sadržaja flavan-3-ola



Graf 5.4. Promjene u sadržaju flavan-3-ola- u sortama



Na grafu 5.4. prikazane su vrijednosti flavan-3-ola za odabrane sorte u različitim terminima uzorkovanja. Kao i u prijašnjim terminima, neke sorte pokazuju više, a neke manje varijabilnosti.

U prvom terminu uzorkovanja (20.06.), sorta 'Lasina' je pokazala najveće, a 'Vranac' najmanje vrijednosti flavan-3-ola. U prvom terminu, ne postoji neki ujednačeni trend porasta ili smanjenja vrijednosti flavan-3-ola kod pojedinih sorata. Međutim, prelaskom iz prvoga u drugi termin uzorkovanja (10.07.) kod većeg broja sorata, povećavale su se vrijednosti flavan-3-ola. Primjerice kod sorti 'Ninčuša', 'Teran', 'Babić'. Kada se govori o samom porastu vrijednosti, nedvojbeno je važno istaknuti kako je sorta 'Plavina' značajno povećala svoju razinu u odnosu na druge sorte. Koliki je njezin značajni porast, može se objasniti činjenicom kako je razlika između njezine vrijednosti i one najmanje, izmjerene kod sorte 'Trnjak', 10051,00 µg/g.

Razbolje između drugoga i trećega uzorkovanja, zahvaljujući visokim temperaturama i UV zračenju, dovodi povećanja u vrijednosti. U trećem uzorkovanju (1.08.) jedino sorta 'Merlot' sa svojim vrijednostima je nešto manja u odnosu na drugi termin (10.07.) svega 48, 51 µg/g. Najveće zabilježene vrijednosti flavan-3-ola ima sorta 'Ninčuša', koju slijede 'Lasina' i 'Dobričić'. Sorta sa najnižim vrijednostima (ispod 1000 µg/g) je 'Tribidrag'.

Četvrto uzorkovanje, 23.08. kod nekih sorti prati veći trend vrijednosti, a kod nekih manji. Devet sorti ima vrijednosti niže u odnosu na prethodni termin uzorkovanja, a jedino sorte 'Ljutun', 'Trnjak' i 'Teran' one koje su viših vrijednosti flavan-3-ola. Također, važno je istaknuti kako u četvrtom terminu uzorkovanja nema značajnih razlika u vrijednostima flavan-3-ola među sortama.

Za peto uzorkovanje je značajno to što kod svih sorti, osim kod sorte 'Plavina' dolazi do povećanja vrijednosti te kako upravo u ovom terminu su najviše vrijednosti flavan-3-ola. Razlog se može opet pripisati povećanim razinama temperatura u razdoblju između četvrtoga i petoga uzorkovanja, te kao i povećane razine UV zračenja. Sorte 'Ninčuša' i 'Vranac' su one koje imaju najviše vrijednosti, dok sorta 'Tribidrag' najmanje.

## 6. Zaključak

Na temelju istraživanja provedenog tijekom 2018. godine o promjenama u sastavu i sadržaju fenolnih spojeva (flavonola, hidroksicimetnih kiselina, hidroksibenzojevih kiselina, flavan-3-ola) u listovima sorata 'Babić', 'Ljutun', 'Plavac mali', 'Dobričić', 'Plavina', 'Vranac', 'Trnjak', 'Tribidrag', 'Lasina', 'Ninčuša', 'Merlot' i 'Teran' mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Postoje značajne razlike u masenim udjelima fenolnih spojeva između sorata po pojedinim terminima uzorkovanja.
2. Postoje značajne razlike u masenim udjelima fenolnih spojeva unutar iste sorte tijekom različitih termina uzorkovanja.
3. Sadržaj fenolnih spojeva ovisi o okolišnim uvjetima kao što su UV zračenje te temperature zraka.
4. Najzastupljenija grupa ispitivanih fenolnih spojeva su hidroksicimetne kiseline, slijede ih flavonoli, flavan-3-oli te hidroksibenzojeve kiseline.
5. Najzastupljeniji flavonoli su kvercetin-3-O-glukozid i rutin. S druge strane, kemferol-3-O-glukonorid je najmanje zastupljen od svih flavanola, a kod nekih sorata nije ni detektiran po pojedinim terminima uzorkovanja.
6. Najzastupljenija hidroksicimetna kiselina je kaftarinska kiselina, dok se ostale pojavljuju u manjim količinama u odnosu na kaftarinsku kiselinu.
7. Najzastupljenija hidroksibenzojeva kiselina je prokatehinska, dok ovisno o sorti i terminu uzorkovanja slijede vrijednosti galne i valinijske kiseline.
8. Od flavan-3-ola najzastupljeniji su epigalokatehin, procijanidin B2, procijanidin B3 i epikatehin.

## 7. Literatura

1. Anđelković, M., Radovanović, B., Anđelković, A. M. i Radovanović, V. (2015). Phenolic compounds and bioactivity of healthy and infected grapevine leaf extracts from red varieties Merlot and Vranac (*Vitis vinifera* L.). *Plant foods for human nutrition*. 70(3): 317-323
2. Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional. *PubMed*. 56 (11): 317-333
3. Doshi, P., Adsule, P. i Banarjee, K. (2006). Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv. Kishmish Chornyi (Sharad Seedless) during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 1-9
4. Downey, M. O., Dokoozlian, N. K. i Krstic, M. P. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57(3): 257-268
5. Griesser, M., Weingart, G., Schoedl-Hummel, K., Neumann, N., Becker, M., varmuza, K., liebner, F., Schuhmacher, R. i Forneck, A. (2015). Sever drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). *Plant Physiology and Biochemistry*. 88: 17-26
6. Habuš, V. (2017). Liofilizacija lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom (Diplomski rad). *Farmaceutski-biokemijski fakultet, Zagreb*
7. Hmamouchi, M., Es-Safi, N., Lahrichi, M., Fruchier, A. i Essassi, E.M. (1996). Flavones and Flavonols in Leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* Cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*. 47: 2
8. Ivančić, I. (2019). Promjene u sastavu i sadržaju fenolnih spojeva u listovima bijelih sorata vinove loze tijekom pojedinih fenofaza (Diplomski rad). *Agronomski fakultet, Zagreb*
9. Jolić, N. (2017). Antioksidacijska aktivnost fenola: Interakcija derivata hidroksibenzojeve kiseline (Završni rad). *Kemijsko-tehnološki fakultet, Split*.
10. Karalić, H. (2014). Polifenolne tvari u vinu (Završni rad). *Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek*
11. Keller, M., (2010). Botany and Anatomy. In *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology*. Academic Press: San Diego, CA
12. Maletić, E., Karlogan-Kontić, J., Pejić, I., Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Stupić, D., Andabaka, Ž., Marković, Z., Šimon, S., Žulj Mihaljević, M., Ilijaš, I., Marković, D. (2015.). *Zelena knjiga - Hrvatske izvorne sorte vinove loze*. Zagreb. Državni zavod za zaštitu prirode
13. Mirošević, N. i Karoglan-Kontić, J., (2008). *Vinogradarstvo*. Udžbenik Sveučilišta u Zagrebu. Nakladni zavod Globus
14. Mirošević, N. i Turković, Z. (2003). *Ampelografski atlas*. Golden marketing-Tehnička knjiga
15. Preiner, D. (2013). Godišnji biološki ciklus vinove loze. *Glasnik Zaštite Bilja*-36(1); 70-75

16. Renaud S.C. i De Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary Heart disease. *Lancet*. 339; 1523-1526
17. Schoedl, K., Forneck, A. i Schuhmacher, R. (2011) Optimization, In-House validation, and Application of liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)- Based Method for the Quantification of Selected polyphenolic Compounds in Leaves of Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59; 10787-10794
18. Schoedl, K., Schuhmacher, R. i Forneck, A. (2013). Correlating physiological parameters with biomarkers for UV-B stress indicators in leaves of grapevine cultivars Pinot noir and Riesling. *Journal of Agricultural Science*. 151; 198-200
19. Tomaz, I. (2016). Optimiranje priprave uzoraka za analizu polifenolnih spojeva u kožici grožđa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. (Doktorski rad). Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
20. Weber, B., Hoesch, L., rast, D.M. (1995). Protocatechualdehyde and other phenols as cell wall components of grapevine leaves. *Phytochemistry*. 40(20); 433-437
21. Zoričić, M. (1998.). Crna i ružičasta vina. *Gospodarski list*. Zagreb

#### Elektronička literatura

1. [http://www.agr.unizg.hr/hr/category/poku%C5%A1ali%C5%A1te\\_jazbina/60](http://www.agr.unizg.hr/hr/category/poku%C5%A1ali%C5%A1te_jazbina/60); pristupljeno: 30.04.2019.

## Životopis

Filip Jakobović rođen je 23. rujna 1995. godine u Požegi. U Kutjevu završava osnovnu školu Zdenko Turković te ekonomsku školu u Požegi, smjer ekonomist. Nakon toga 2014. godine upisuje preddiplomski smjer Vinogradarstvo – vinarstvo – voćarstvo na Veleučilištu u Požegi. U rujnu 2017. godine stječe akademski naziv stručnog prvostupnika inženjera vinogradarstva – vinarstva – voćarstva obranom završnog rada na temu Određivanje vlage u sjemenkama grožđa sorte Cabernet sauvignon. Školovanje nastavlja 2017. godine na diplomskom studiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu smjer Hortikultura, usmjerenje Vinogradarstvo i vinarstvo.