



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Svetlana H. Lakićević

**KINETIKA ALKOHOLNE FERMENTACIJE I
KARAKTERIZACIJA VINA DOBIJENOG OD ŠIRE SA
DODATKOM LEKOVITOG BILJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2020.



UNIVERSITY OF NIŠ



FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC

Svetlana H. Lakićević

**THE KINETICS OF ALCOHOLIC FERMENTATION AND
CHARACTERIZATION OF WINE MADE FROM MUST
WITH THE ADDITION OF MEDICAL HERBS**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2020.

MENTOR :

Prof. dr Miodrag Lazić,
redovni profesor
Tehnološki fakultet u Leskovcu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Predrag Vukosavljević,
redovni profesor
Poljoprivredni fakultet u Zemunu

Prof. dr Ivana Karabegović,
vanredni profesor
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Prof. dr Jelena Popović Đorđević,
vanredni profesor
Poljoprivredni fakultet u Zemunu

Datum odbrane: _____

Подаци о докторској дисертацији

Mentor: Prof. dr Miodrag Lazić, redovni profesor,
Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu

Naslov: Kinetika alkoholne fermentacije i karakterizacija vina dobijenog od šire sa dodatkom lekovitog bilja

U okviru ovog rada ispitan je uticaj dodatka lekovitog bilja: semena anisa (*Pimpinella anisum* L), kore cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*), lista pelina (*Artemisia absinthium*) i korena sladića (*Glycyrrhiza glabra*) na kinetiku alkoholne fermentacije autohtote sorte grožđa Prokupca i Plovdine. Kinetika alkoholne fermentacije šire praćena je na dve temperature 17°C i 22°C, a kinetika kljuka praćena je na 25°C.

Fizičko-hemijskom analizom vina Prokupac i Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja određen je sadržaj: alkohola, ukupnih kiselina, isparljivih kiselina, ukupnog ekstrakta, ekstrakta bez šećera, sadržaj šećera, pepela i ukupnih fenolnih jedinjenja. Dodatak lekovitog bilja u toku alkoholne fermentacije šire i kljuka Prokupca i Plovdine uticao je na promenu fizičko-hemijskih parametara vina.

Rezime: Sadržaj ukupnog ekstrakta, pepela, fenolnih jedinjenja i flavonoida povećavao se sa dodatkom lekovitog bilja.

Mikrobiološkom analizom uzoraka vina disk-difuzionom metodom najveću osetljivost pokazale su gram(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis* (46,67% aktivnosti hloramfenikola, odnosno 40,0% aktivnosti streptomicina).

Najjače antimikrobno dejstvo određeno mikrodilucionom metodom pokazalo je vino Prokupac sa dodatkom pelina prema G(+) bakteriji *Enterococcus faecalis*.

Najveću antioksidativnu aktivnost pokazalo je vino Prokupac sa dodatkom cimeta i vino Plovdina sa dodatkom cimeta, a najmanju vina bez dodatka lekovitog bilja.

HPLC-DAD metodom u vinu Prokupac i vinu Plovdina identifikovane su hidroksicimetne i hidroksibenzoeve kiseline, flavan-3-oli

(katehin i epikatehin), rutin, kvercetin i hiperozid.

GC/MS analizom vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja identifikovane su: organske kiseline, acetati, alkoholi, aldehidi, ketoni, etil-estri i terpeni. U vinu Prokupac identifikovano je ukupno 26 jedinjenja, u vinu Prokupac sa dodatkom anisa 33 jedinjenja, u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta 30 jedinjenja, u vinu Prokupac sa dodatkom pelina 41 jedinjenje i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića identifikovano je 29 jedinjenja.

Naučna oblast:	Biohemijско inženjerstvo
Naučna disciplina:	Tehničko tehnološke nauke
Ključne reči:	Kinetika alkoholne fermentacije, vino, lekovito bilje, polifenolna jedinjenja, aromatski profil vina, antimikrobna aktivnost, antioksidativna aktivnost
UDK:	663.252.4
CERIF klasifikacija:	T 360
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:

prof. dr Miodrag Lazić, professor
Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš

Title:

The kinetics of alcoholic fermentation and characterization of wine made from must with the addition of medical herbs

Abstract:

In this paper the effect of the addition of medicinal herbs: anise seeds (*Pimpinella anisum* L), cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum*), wormwood leaf (*Artemisia absinthium*) and liquorice root (*Glycyrrhiza glabra*) on the kinetics of alcoholic fermentation of must and pomace of two autochthonous grape varieties, Prokupac and Plovdina was analyzed. The kinetics of alcoholic fermentation of must was monitored at the temperatures of 17 °C and 22 °C, and the kinetics of pomace was monitored at the temperature of 25 °C.

The content of alcohol, total acids, volatile acids, total extract, the extract without sugar, sugar, ash and of total phenolic compounds was determined by both physical and chemical analysis of Prokupac and Plovdina wines with the addition of medical herbs.

The content of the total extract, ash, phenolic compounds and flavonoids was increased with the addition of medicinal herbs; the smallest total extract was observed in the control sample, and the largest one was found in the wine to which cinnamon was added.

By microbiological analysis and using a disk-diffusion method, it was determined that gram(+) bacteria from *Bacillus subtilis* genus proved to be the most sensible ones. Prokupac wine to which anise and liquorice were added showed the bactericidal activity towards gram(+) bacteria from the *Bacillus subtilis* genus (46.67% Chloramphenicol activity, i.e. 40.0% Streptomycin activity).

The strongest antimicrobial activity towards G(+) bacteria *Enterococcus faecalis* determined by the microdilution method was observed in Prokupac wine to which wormwood was added.

The strongest antioxidant activity was observed in Prokupac and Plovdivina wines to which cinnamon was added, and the weakest antioxidant activity was found in the wines to which no medicinal herbs were added.

Hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids, flavan-3-ols (catechin and epicatechin), rutin, quercetin and hyperoside were identified in Prokupac and Plovdivina wines by the HPLC-DAD method.

By the GC / MC analysis of Prokupac wine, with the addition of medicinal herbs, the following groups of compounds were identified: organic acids, acetates, alcohols, aldehydes, ketones, ethyl esters and terpenes. In Prokupac wine, a total of 26 compounds were identified. In Prokupac wine with the addition of anise 33 compounds were identified, in Prokupac wine with the addition of cinnamon 30 compounds were identified, in Prokupac wine with the addition of wormwood a total of 41 compounds were identified and in Prokupac wine with the addition of liquorice root 29 compounds were identified.

Scientific
Field:

Biochemical engineering

Scientific
Discipline:

Technologically technological sciences

Key Words:

Kinetics of alcoholic fermentation, wine, herbs, polyphenolic compounds, aromatic wine profile, antimicrobial activity, antioxidant activity

UDC:

663.252.4

CERIF Clas-
sification:

T 360

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. ALKOHOLNA FERMENTACIJA	3
2.1.1. Hemijski procesi u toku alkoholne fermentacije	5
2.1.2. Kvasci izazivači alkoholne fermentacije	10
2.1.2.1. Klasifikacija kvasaca	11
2.1.2.2. Morfologija kvasaca	13
2.1.2.3. Razmnožavanje kvasaca	14
2.1.2.4. Važniji predstavnici kvasaca	14
2.1.2.4.1. <i>Rod Saccharomyces</i>	14
2.1.2.4.2. <i>Rod Kloeckera</i>	15
2.1.2.4.3. <i>Rod Torulopsis</i>	15
2.1.2.5. <i>Primena selekcionisanog kvasca</i>	15
2.1.3. Uticaj nekih faktora na kinetiku alkoholne fermentacije	17
2.1.3.1. Uticaj temperature	17
2.1.3.2. Uticaj kiseonika	19
2.1.3.3. Uticaj sadržaja šećera	19
2.1.3.4. Uticaj pH	20
2.1.3.5. Uticaj hranljivih sastojaka	20
2.1.3.6. Uticaj alkohola	21
2.1.3.7. Uticaj ugljen-dioksida	22
2.1.3.8. Uticaj pesticida	22
2.1.4. Autoliza kvasca	22
2.1.5. Prekid alkoholne fermentacije	23
2.1.6. Pokretanje alkoholne fermentacije	26
2.2. LEKOVITO BILJE U PROIZVODNJI VINA	27
2.2.1. Anis (<i>Pimpinella anisum</i>)	28
2.2.2. Cimet (<i>Cinnamomum verum</i>, sinonim, <i>C. zeylanicum</i>)	32
2.2.3. Pelin (<i>Artemisia absinthium</i>)	34
2.2.4. Sladić (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	36
2.3. HEMIJSKI SASTAV VINA	38
2.3.1. Alkoholi	39
2.3.2. Ekstrakt vina	41
2.3.3. Ogranske kiseline	42
2.3.3.1. Neisparljive kiseline	42
2.3.3.2. Isparljive kiseline	45
2.3.4. Mineralne materije	45
2.3.5. Fenolna jedinjenja	47
2.3.5.1. Flavonoidi	47
2.3.5.1.1. <i>Flavonoli</i>	51
2.3.5.1.2. <i>Antocijani</i>	52
2.3.5.1.3. <i>Flavan-3-oli</i>	57

-+2.3.5.2. Fenolna jedinjenja neflavoidne strukture	60
2.3.5.3. Sadržaj fenolnih jedinjenja u grožđu	62
2.3.5.4. Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu	63
2.3.6. Aromatske komponente vina	66
2.4. ANTIOKSIDANSI I SLOBODNI RADIKALI	72
2.4.1. Slobodni radikali	72
2.4.2. Antioksidansi i oksidativni stres	76
2.5. FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA GROŽĐA I VINA	77
2.6. AUTOHTONE SORTE VINOVE LOZE	79
2.6.1. Prokupac	80
2.6.2. Plovdina	81
3. MATERIJAL I METODE	83
3.1. MATERIJAL	83
3.1.1. Grožđe	83
3.1.2. Lekovito bilje	83
3.1.3. Hemikalije i reagensi:	83
3.2. METODE	84
3.2.1. Određivanje sadržaja šećera	84
3.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih kiselina	84
3.2.3. Određivanje isparljivih kiselina	84
3.2.4. Određivanje sadržaja ukupnog sumpordioksida	84
3.2.5. određivanje sadržaja pepela	85
3.2.6. Određivanje relativne gustine vina	85
3.2.7. Određivanje sadržaja alkohola u vinu	85
3.2.8. Određivanje sadržaja ekstrakta	85
3.2.9. Određivanje sadržaja ekstrakta bez šećera	85
3.2.10. Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja	85
3.2.11. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida	86
3.2.12. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana	86
3.2.13. Određivanje intenziteta i nijanse boje vina	87
3.2.14. Određivanje udela žute, crvene i plave boje i oblika spektra	87
3.2.15. Određivanje ukupnih flavan-3-ola	87
3.2.16. Određivanje antioksidativne aktivnosti	88
3.2.17. HPLC-DAD hromatografija	89
3.2.18. Ekstrakcija isparljivih jedinjenja u vinu putem mikroekstrakcije gasno-čvrsta faza (HS-SPM)	89
3.2.19. GC/MS analiza isparljivih jedinjenja vina	90
3.2.18. Određivanje antimikrobne aktivnosti vina	96
3.2.18.1. Disk difuziona metoda	91
3.2.18.2. Mikrodiluciona metoda	91
3.3. SENZORNO OCENJIVANJE VINA	92
3.4. STATISTIČKA ANALIZA	92
4. REZULTATI I DISKUSIJA	94
4.1. KINETIKA ALKOHOLNE FERMENTACIJE	94

4.1.1. Kinetika alkoholne fermentacije Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja	94
4.1.1.1. Kinetika alkoholne fermentacije šire Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja na 17°C	94
4.1.1.2. Kinetika alkoholne fermentacije šire Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja na 22°C	96
4.1.1.3. Kinetika alkoholne fermentacije kljuka Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja na 25°C	98
4.1.1.4. Uticaj temperaure na brzinu fermentacije šire i kljuka Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja	99
4.1.2. Kinetika alkoholne fermentacije Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja	99
4.1.2.1. Kinetika alkoholne fermentacije šire Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja na 17°C	99
4.1.2.2. Kinetika alkoholne fermentacije šire Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja na 22°C	100
4.1.2.3. Kinetika alkoholne fermentacije kljuka Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja na 25°C	102
4.1.2.4. Uticaj temperaure na brzinu fermentacije šire i kljuka Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja	103
4.2. FIZIČKO-HEMIJSKA ANALIZA VINA	104
4.2.1. Fizičko–hemijska analiza vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja	104
4.2.1.1. Fizičko-hemijski parametri vina Prokupac dobijenog fermentacijom šire Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja na 17°C i 22°C	104
4.2.1.2. Fizičko-hemijski parametri vina Prokupac dobijenog fermentacijom kljuka Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja na 25°C	109
4.2.2. Fizičko–hemijska analiza vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja	112
4.2.2.1. Fizičko-hemijski parametri vina Plovdina dobijenog fermentacijom šire Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja na 17°C i 22°C	112
4.2.2.2. Fizičko-hemijski parametri vina Plovdina dobijenog fermentacijom kljuka Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja na 25°C	114
4.3. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA VINA	117
4.3.1. Disk-difuziona metoda	117
4.3.2. Mikrodiluciona metoda	121
4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST VINA	126
4.4.1. Antioksidativna aktivnost vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja	126
4.4.2. Antioksidativna aktivnost vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja	127
4.5. KORELACIJA SADRŽAJA UKUPNIH FENOLNIH MATERIJA U VINU I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI ODREĐENE DPPH METODOM	128
4.6. SENZORNE KARAKTERISTIKE VINA PROKUPCA I PLOVDINE SA DODATKOM LEKOVITOG BILJA	130
4.6.1. Senzorne karakteristike vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja	130
4.6.2. Senzorne karakteristike vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja	134
4.7. HPLC ANALIZA VINA	136

4.7.1. HPLC analiza fenolnih jedinjenja crvenog vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja	136
4.7.1.1. Analiza glavnih komponenti (PCA) crvenog vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja	138
4.7.2. HPLC analiza fenolnih jedinjenja vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja	142
4.7.3. Aromatski profil vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja	143
5. ZAKLJUČAK	157
6. LITERATURA	165
BIOGRAFIJA	185
7. PRILOG	188

UVOD

Brojne studije ukazuju da se sa povećanim konzumiranjem voća, povrća, vina i aromatičnog bilja smanjuje rizik od pojave zaraznih, kardiovaskularnih i psihosomatskih bolesti, dijabetesa i kancera. U mnogim radovima dokumentovano je da hrana sadrži od 5.000 do 10.000 organskih jedinjenja koja imaju svojstvo antioksidanata. Veliki broj naučnika ukazuje na blagotvorno delovanje prirodnih antioksidanata na zdravlje ljudi. Upotreba sintetičkih antioksidanata se sve više smanjuje zbog njihovog toksikološkog dejstva. Veliki značaj za efikasno suzbijanje štetnog delovanja slobodnih radikala imaju antioksidanti koji se unose putem ishrane, kao što su vitamin E, vitamin C, karotenoidi i polifenolna jedinjenja biljnog porekla (Dorman et al., 2004). Mnogim naučnim istraživanjima je ukazano na veću efikasnost i zdravstvenu bezbednost prirodnih antioksidanata, izolovanih iz biljaka (fitonutrijenti), mikroorganizama, gljiva i životinjskog tkiva (Moyer et al., 2002). Iako humani organizam ima kompleksan enzimski sistem zaštite od delovanja slobodnih radikala, u uslovima pojačane produkcije slobodnih radikala, neophodno je u organizam unositi i dodatne antioksidativne komponente kroz hranu, definisanu kao funkcionalna hrana, u cilju prevencije njihovog negativnog delovanja. U Francuskoj, gde je konzumiranje masne hrane veliko a takođe i veće konzumiranje vina, pojava kardiovaskularnih oboljenja je 3 do 5 puta manja u odnosu na zemlje gde je potrošnja vina mala. Niz studija je ukazalo na to da vino u svom sastavu sadrži fenolna jedinjenja koja povoljno deluju na krvne sudove, štite od štetnog sunčevog i radioaktivnog zračenja, deluju kao antiinflamatorni, antivirusni, antikariogeni i antikancerogeni agensi, a poseduju i antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja zasniva se na njihovom redoks potencijalu, pa stoga oni mogu da deluju kao redukujući agensi, "kvenčeri" singletnog kiseonika, da otpuštaju vodonik i heliraju metale (Ivanova et al., 2005).

Vino je proizvod alkoholne fermentacije šire ili kljuka grožđa koji se karakteriše složenim hemijskim sastavom. Crvena vina su bogata fenolnim jedinjenjima koja se iz čvrstih delova grozda ekstrahuju u fazi maceracije. Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu zavisi od sorte vinove loze, klimatskih i agroekoloških uslova i od primenjenog postupka vinifikacije. Tehnološki uslovi proizvodnje, pH, koncentracija etanola, prisustvo sumpordioksida, temperatura kao i udeo čvrste faze u kljuku su od presudnog značaja za ekstrakciju fenolnih jedinjenja.

Predmet istraživanja

U okviru predložene teme doktorske disertacije ispitivana je kinetika alkoholne fermentacije šire dobijene od autohtonih sorti grožđa: Prokupac i Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja kao i senzorne karakteristike, hemijski sastav, antioksidativno i antimikrobno dejstvo vina.

Ciljevi ispitivanja:

Najvažniji ciljevi ispitivanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije bili su:

- Ispitivanje uticaja dodatka lekovitog bilja na kinetiku alkoholne fermentacije šećera iz šire i definisanje optimalnog vremena trajanja alkoholne fermentacije.
- Ispitivanje senzornih karakteristika vina dobijenog fermentacijom sa dodatkom lekovitog bilja.
- Određivanje sadržaja fenolnih i flavonoidnih materija u uzorcima vina dobijenog fermentacijom šire sa dodatkom lekovitog bilja.
- Određivanje antioksidativne aktivnosti vina dobijenog fermentacijom šire sa dodatkom lekovitog bilja DPPH metodom i utvrđivanje korelacija sa sadržajem fenola i flavonoida
- Ispitivanje antimikrobne aktivnosti vina na izabrane sojeve mikroorganizama
- HPLC analiza uzoraka vina
- Ispitivanje aromatskog profila vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja GC/MS analizom isparljivih jedinjenja.

Metode ispitivanja

Alkoholna fermentacija šećera vršena je pomoću soja komercijalnog selekcionisanog kvasca *Sacharomyces cerevisiae* Lalvin V1116, (Lallemand, Denmark). U širu pre fermentacije dodavane su sledeće lekovite biljne vrste: seme anisa (*Pimpinella anisum*), kora cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*), list pelina (*Artemisia absinthium*) i koren sladića (*Glycyrrhiza glabra*), na temperaturi od 17°C i 22 °C, kao i u kljuk Prokupca i Plovdine na 25°C. Sadržaj fenola i flavonoida određen je standardnim spektrofotometrijskim metodama a antioksidativna aktivnost DPPH metodom. Antimikrobna aktivnost određena je standardnom mikrobiološkom disk difuzionom metodom i metodom sa „bunarčićima“. Za identifikaciju flavonoida korišćena je HPLC metoda sa DAD detektorom.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Alkoholna fermentacija predstavlja jednu od najvažnijih faza u procesu proizvodnje vina, a počinje odmah posle muljanja grožđa i ceđenja šire. Kvasci alkoholne fermentacije koji se nalaze na pokožici bobice grožđa prelaskom u širu počinju intenzivno da se razmnožavaju i razlažu šećer do etanola i ugljen-dioksida. Pored etanola i ugljendioksida kao glavnih produkata alkoholne fermentacije, stvara se i čitav niz drugih jedinjenja kao što su glicerol, sirćetna kiselina, ćilibarna kiselina, diacetil, aceton, 2,3-butandiol, viši alkoholi i estri. U toku alkoholne fermentacije izdvaja se i određena količina energije u vidu toplote koju kvasci delimično koriste za svoje životne potrebe.

Nekoliko vrsta kvasaca može biti prisutno u širi na početku alkoholne fermentacije što zavisi od sorte vinove loze, zrelosti grožđa, klimatskih uslova, zaštite vinove loze od bolesti, razvoja sive truleži i dr. U spontanoj alkoholnoj fermentaciji učestvuju različite vrste kvasaca čak i u uslovima kada je prisutan sumpor-dioksid. U različitim fazama alkoholne fermentacije dominiraju *Kloeckera*, *Hansenijspora* i *Candida* (Zamora, 2009).

Javlja se kasnije *Pichia*, a zatim *Saccharomyces cerevisiae* koji je dominantan kvasac zbog veće otpornosti na visoke koncentracije etanola, dok kvasci kao što su *Schizosaccharomyces*, *Zigosaccharomyces* i *Bretanomyces* takođe mogu biti prisutni tokom alkoholne fermentacije i u daljem toku fermentacije što može uticati na negativne organoleptičke karakteristike vina. Tokom alkoholne fermentacije različite vrste kvasaca mogu uticati pozitivno ili negativno na sastav vina, a da bi se sprečio razvoj neželjenih kvasaca dodaje se sumpor-dioksid koji selektivno deluje na razvoj kvasaca. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je otporniji na sumpor-dioksid od većine drugih kvasaca i na taj način se favorizuje njegov razvitak.

Tokom vinifikacije, količina i međusobni odnos pojedinih jedinjenja, kao i količina stvorene energije dosta se razlikuju, što zavisi od mnogobrojnih činilaca koji utiču na tok vinifikacije, odnosno na stvaranje jednih ili drugih jedinjenja i količine energije.

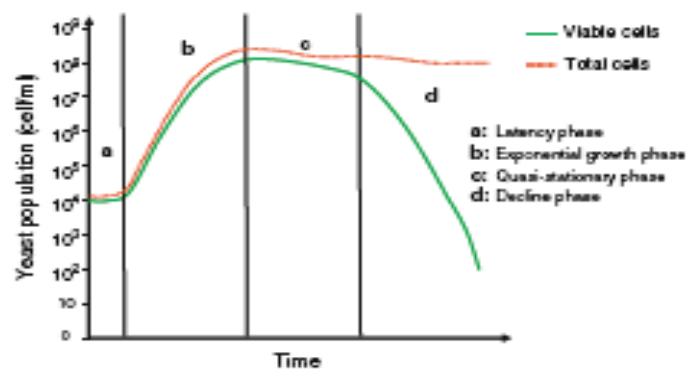
Tok alkoholne fermentacije se može podeliti u više faza:

Prva faza alkoholne fermentacije je *latentna faza*. Tokom ovog perioda ćelije se prilagođavaju uslovima sredine. Ukoliko kvasac nije dodat broj ćelija u 1 ml šire na kraju ove faze je 10^4 , a trajanje zavisi prvenstveno od temperature i ne prelazi 24 časa. Ukoliko se doda selekcionisani kvasac broj ćelija je znatno veći 5×10^6 /ml. Šira počinje da se muti i stvaraju se fini mehurići od ugljendioksida (Flanzy, 1998). Da bi se alkoholna fermentacija

obavila pravilno potrebna je određena masa ćelija kvasca. Stvaranje novih aktivnih ćelija kvasca se vrši razmnožavanjem u prisustvu vazdušnog kiseonika. Provetravanjem šire se obezbeđuje dovoljna količina kiseonika. U prisustvu kiseonika kvasac počinje da se razmnožava.

Druga faza je *eksponencijalna faza* i traje sve do kraja razmnožavanja kvasaca. Kada se stvori oko 5g/l CO₂, a što odgovara količini od oko 10 g/l utrošenog šećera aktivnost kvasaca prolazi kroz svoj maksimum. Ova faza traje od 3 do 6 dana.

U anaerobnim uslovima kvasac koristi šećer iz šire za obezbeđenje potrebne energije. U anaerobnim uslovima kvasac prelazi sa procesa disanja na proces intenzivne fermentacije. Ovaj se period naziva *stadijum burne fermentacije* ili burnog vrenja. Sadržaj stvorenog alkohola u ovom stadijumu iznosi od 5 do 8 vol. %. Za vreme ovog stadijuma intenzivno se oslobađa ugljendioksid i u vinu dolazi do jakih konvekcioni strujanja koja razbijaju kolonije kvasca na pojedinačne ćelije. Unutrašnjost ovih ćelija je bogata u rezervnoj hrani u glikogenu i mastima i sa Lugolovim rastvorom se boji braon bojom.



Slika 2.1. Ciklus razvitka kvasaca, (Fleet 1993, Nobile Del et al., 2003).

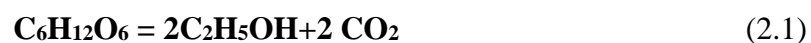
U sledećoj fazi takozvanoj *stacionarnoj fazi*, kvasci se više ne razmnožavaju. Aktivnost kvasaca progresivno opada iako je prisutan još uvek veliki broj živih ćelija. Razlog padu aktivnosti kvasca je osiromašenje sredine u asimilirajućem azotu. Da bi se održala aktivnost kvasaca u toku ove faze, trebalo bi dodavati azot. Na kraju fermentacije, kada je preostala mala količina šećera, aktivnost kvasca naglo opada i prestaje, (slika 2.1).

Faza izumiranja kvasaca je poslednja faza kada dolazi do naglog pada populacije kvasca. Zbog nepovoljnih uslova za život: nedostatak hranljivih materija, kao i zbog stvorenog alkohola, ali i nekih drugih jedinjenja dolazi do potpunog iscrpljenja kvasca kao posledice dužeg "gladovanja" i on postepeno izumire. Obim ćelije kvasca se još više smanjuje a

protoplazma se više ili manje odvaja od membrane i skuplja prema centru ćelije. Do izumiranja pojedinih kvašćevih ćelija dolazi u toku samog vrenja a pre njenog završetka. Uginule ćelije se razlikuju od živih ćelija po bojenju sa metilenskim plavim. Membrana uginulih ćelija propušta boju i unutrašnjost će se obojiti intenzivno plavo, za razliku od živih ćelija gde metilensko plavo ne prolazi kroz membranu. Efikasnost alkoholnog vrenja zavisi od održavanja populacije živih ćelija kvasaca sve dok se ne utroši sav fermentabilni šećer.

2.1.1. Hemijski procesi u toku alkoholne fermentacije

Alkoholna fermentacija ili alkoholno vrenje je biohemijski proces transformacije monosaharida (glukoza, fruktoza) u alkohol i ugljen-dioksid uz pomoć kvasca i niza enzima. Prvu formulu hemijskog procesa alkoholne fermentacije postavio je Gay-Lussac, 1815. godine:



Alkoholna fermentacija se odvija u ćeliji kvasca preko niza enzima u aerobnim i anaerobnim uslovima. Za fermentaciju su značajni kvasci iz grupe *Saccharomyces sensu stricto* (*S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus* i *S. pastorianus*). Najznačajniji među njima je *S. cerevisiae*.

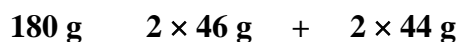
U aerobnim uslovima transformacija šećera ide do stvaranja ugljendioksida i vode uz oslobađanje velike količine energije. Ovo je vrlo ekonomičan proces, jer sa veoma malom potrošnjom šećera kvasac za svoj razvoj obezbeđuje veliku količinu energije.

1. Faza: Disanje



Alkoholna fermentacija je biohemijski proces pri kome se šećer razlaže u anaerobnim uslovima bez prisustva kiseonika u živoj ćeliji kvasca. U anaerobnim uslovima transformacija šećera ne ide do kraja, već ide do formiranja etanola i ugljendioksida uz oslobađanje 40 kcal/mol. Ovaj proces nije ekonomičan kao disanje, pa kvasci da bi obezbedili dovoljnu količinu energije moraju fermentisati veliku količinu šećera, što je od velikog praktičnog značaja.

2. Faza: Alkoholna fermentacija



Biohemijski proces alkoholne fermentacije može se podeliti na dve faze:

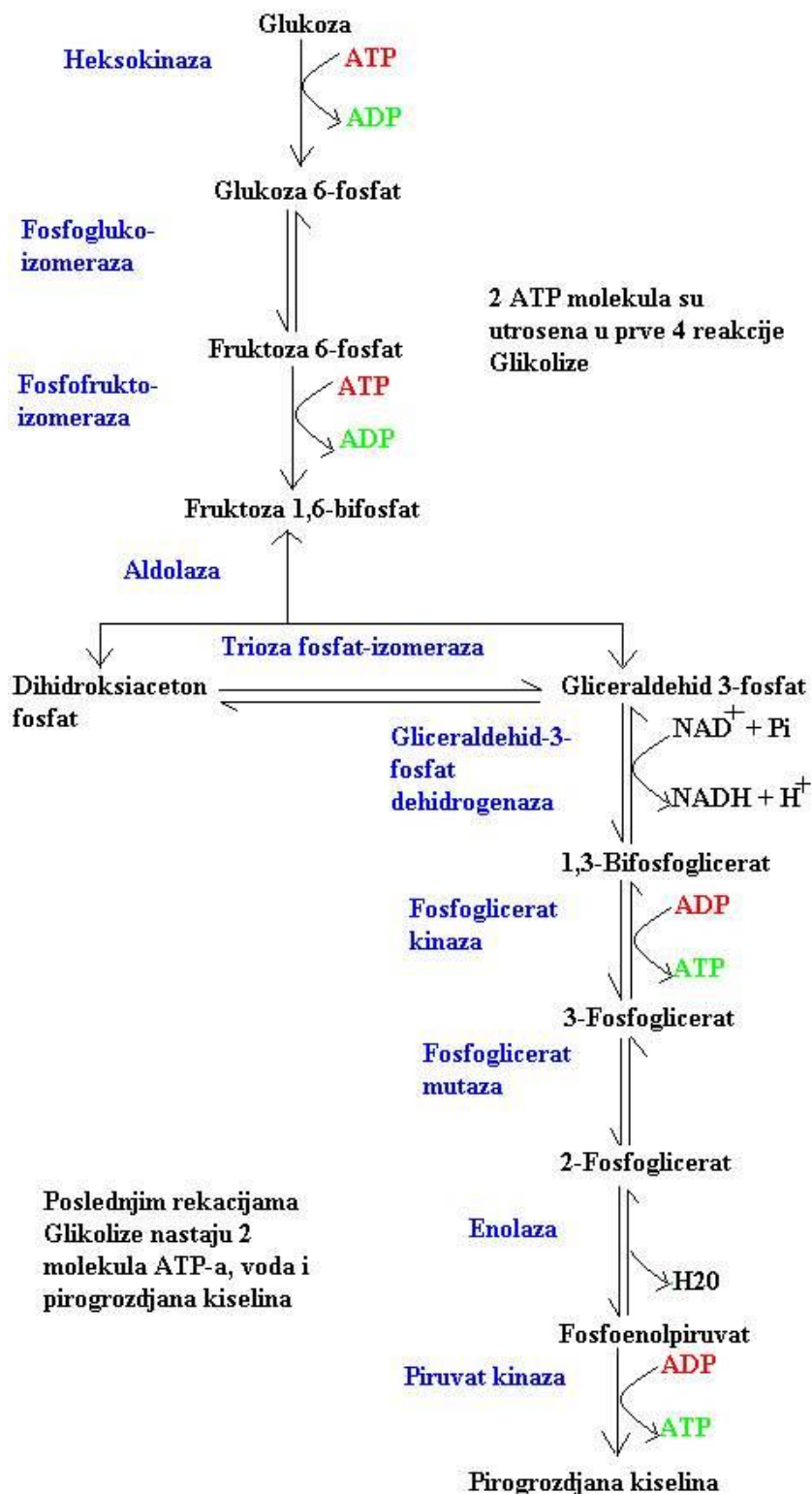
- 1) razgradnja glukoze do pirogrogždane kiseline (glikoliza) i
- 2) "prava alkoholna fermentacija".

Reč glikoliza potiče od grčkih reči (glukus – slatko) i (lysis- razgradnja) a proces se sastoji od intracelularne transformacije glukoze (i fruktoze) u piruvat. Ovaj biohemijski put je početni proces razlaganja ugljenih hidrata kod većine organizama i odvija se u citoplazmi. U potpunosti je opisan 1940 godine od strane Gustava Embdena i Ottoa Meyehofa i po njima je nazvan Embden-Majerhof put (Gancedo 1988).

Kao glavni put za katabolizam šećera kod kvasaca je glikolitički put. Pentozni put koriste bakterije sirćetne kiseline kao glavni put za katabolizam šećera, a kvasci ovaj put koriste i kao izvor riboze i NADPH (Schaaf-Gersteenschlager and Miosga 1996; Horecker 2002). Riboza je neophodna za sintezu nukleotida i nukleinskih kiselina, gde je NADPH potreban za neke metaboličke procese kao što su sinteza lipida. Kvasci koriste pentozni put pre svega da bi obezbedili neke supstance koje su neophodne za ćelijsku deobu a ne da bi obezbedili energiju.

Glikoliza (slika 2.2) uključuje sekvencu od jedanaest hemijskih reakcija koje su uključene u razlaganje heksoza i oslobađanje energije u hemijskom obliku ATP-a (Barnett i Entian 2005). U početku heksoze se prenose unutar ćelije olakšanom difuzijom (Lagunas 1993). Unutrašnja koncentracija šećera je niža od spoljašnje koncentracije pa nikakva energija nije potrebna za ovaj proces.

Prvi korak u glikolizi je fosforilacija glukoze i fruktoze od strane enzima zvanih fosfokinaze da bi nagradile glukozo-6-fosfat i fruktozo-6-fosfat.



Slika 2.2. Biohemijski put razlaganja šećera do piruvata

Ova reakcija koristi ATP, ali drži nisku koncentraciju intracelularne heksoze i ovo koristi transportu šećera u ćeliju preko plazma membrane. Posle ovoga, fosfo-gluko-izomeraza konvertuje glukozu-6-fosfat u fruktozu-6-fosfat (Gancedo 1988). Osim što su

posrednici glikolize, glukozo-6-fosfat i fruktozo-6-fosfat su veoma bitni supstrati za sekundarni metabolizam a takođe i za sintezu polisaharida koji se koriste za izgradnju ćelijskog zida (Cabib et al. 1982). U sledećoj fazi fruktozo-6-fosfat je opet fosforilisana od strane fosfofruktokinaze do fruktozo-1,6-difosfata. Enzim aldolaza razlaže fruktozo-1,6-difosfat na dve fosfo trioze: dihidroksiaceton fosfat i gliceraldehid-3-fosfat. Ovom reakcijom nastaje veća količina dihidroksiaceton fosfata (96%) koji se brzo transformiše u gliceraldehid-3-fosfat od strane triozo-fosfat-izomeraze (Heinisch and Rodicio 1997). Nakon toga, enzim gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza transformiše gliceraldehid-3-fosfat u 1,3 di-fosfoglicerat. Ova reakcija uključuje oksidaciju molekula koji je povezan sa smanjenjem NAD^+ do NADH da bi se popravila redoks ravnoteža. Osnovni nivo fosforilacije je stvaranje veze bogate energijom između oksidovanih grupa ugljenika i neorganskog fosfata.

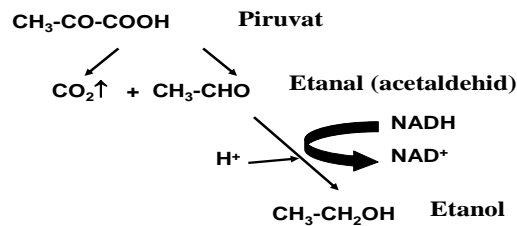
Kvasci su fakultativni anaerobni mikroorganizmi jer poseduju genetski materijal za anaerobni i aerobni metabolizam šećera (Boulton et al.1996). Kvasci mogu da konzumiraju šećer koristeći dva metabolička puta: disanje i fermentaciju (Racker 1974). Oba puta počinju sa glikolizom koja generiše piruvat kao finalni proizvod. Piruvat može da se transformiše u etanal i ugljendioksid pod dejstvom enzima piruvat dekarboksilaze a nakon toga etanal se može redukovati u etanol. Ovaj proces se naziva alkoholna fermentacija i odvija se u citoplazmi. Alkoholna fermentacija regeneriše NAD^+ koji je konzumiran tokom glikolize i kvascu donosi energetske dobitak od 2 molekula ATP-a tokom procesa metabolizma heksoze (Barnett and Entian 2005). Takođe, piruvat može da se transformiše u acetil-CoA i CO_2 dejstvom piruvat dehidrogenaze. Ovom reakcijom se redukuje NAD^+ do NADH i brzo reaguje sa Acetil-CoA.

Acetil-CoA se može ugraditi u Krebsov ciklus gde se razlaže do CO_2 i pri tome nastaju više manjih molekula koenzima (NADH i FADH_2). Smanjenje produkcije koenzima u Krebsovom ciklusu i glikolizi reoksiduje se u respiratornim lancima redukcijom molekularnog kiseonika do vode (Barnett and Entian 2005). Ovaj proces je poznat kao disanje i daje ukupnu energetske dobit od 36–38 molekula ATP-a po metabolisanoj heksozi i mnogo je korisniji za kvasce od fermentacije u energetske pogledu. Kiseonik je potreban kao supstrat, a inhibira ga visoka koncentracija šećera (Crabtree 1929). Transformacija piruvata u etanol ili acetil-CoA je ključna tačka za regulisanje metabolizma kvasaca (Ribereau-Gayon et al., 2000). Luj Paster je još 1861. godine utvrdio da aeracija povećava proizvodnju biomase i smanjuje kinetiku potrošnje šećera i proizvodnju etanola tj., zaključio je da aeracija inhibira alkoholno vrenje (Racker 1974). Ovaj fenomen je poznat kao Pasterov

efekat a pripisuju mu se nekoliko mehanizama (Barnett and Entian 2005). Pri disanju (respiraciji) su potrebne velike količine ADP u mitohondrijama za oksidativnu fosforilaciju, pa kako se proces respiracije odvija u citoplazmi nedostaje ADP i neorganski fosfat (Lagunas and Gancedo 1983) a to zauzvrat smanjuje prenos šećera unutar ćelije (Lagunas et al., 1982). Ovi mehanizmi objašnjavaju kako aeracija inhibira alkoholnu fermentaciju. Kada kvasac počne da konzumira šećer, proizvode se velike količine ugljen-dioksida. Oslobođeni ugljendioksid potiskuje kiseonik i stvara semi anaerobne uslove koji favorizuju fermentaciju. Međutim, čak i uz prisustvo kiseonika i kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, neće da teče fermentacija ako je koncentracija šećera veća od 9 g/l. Crabtree je prvi opisao ovaj fenomen 1929. godine koji je poznat pod različitim imenima: Crabtreeov efekat, katabolička represija glukoze ili Pasterov suprotni efekat (Meijer et al., 1998, Ribereau-Gayon et al., 2000). Kada *Saccharomyces cerevisiae* raste u podlozi sa visokom koncentracijom šećera, njegove mitohondrije se degenerišu. Istovremeno, sinteza enzima Krebsovog ciklusa i sastavnih respiratornih lanaca je suzbijena (Gancedo 1992; Polakis et al., 1965; Barnett and Entian 2005). Pod niskim fermentacionim uslovima, *Saccharomyces cerevisiae* može samo fermentisati šećere. *Saccharomyces cerevisiae* može da koristi samo disanje kada je koncentracija šećera zaista niska i kada je kiseonik prisutan u medijumu. Ovi uslovi se koriste za industrijsku proizvodnju izabranog suvog kvasca.

U anaerobnim uslovima piruvat je prvenstveno usmeren u pravcu stvaranja etanola. Dekarboksilacijom piruvat prelazi u etanal, posredstvom enzima piruvat dekarboksilaze, a etanal se redukuje u etanol posredstvom enzima alkohol-dehidrogenaze. Enzimu piruvat dekarboksilazi potrebni su magnezijum i tiamin pirofosfat kao kofaktori (Hohmann 1996). Alkohol dehidrogenaza koristi cink kao kofaktor (Ciriacy 1996). Finalni proizvodi alkoholne fermentacije, etanol i ugljendioksid, se transportuju van ćelije jednostavnom difuzijom.

Pored ovog glavnog puta manja količina šećera utroši se i na stvaranje sekundarnih proizvoda alkoholne fermentacije (slika 2.3).



Slika 2.3. Šema nastajanja etanola

2.1.2. Kvasci izazivači alkoholne fermentacije

Termini koji se koriste za kvasac: u engleskom jeziku *yeast*, holandskom jeziku *guist*, u nemačkom jeziku *hefe* proistekli su iz zapadno-nemačkog izraza *haf-jon* što znači prouzrokovati vrenje. Grčka reč *zymi* koristi se za kvasce i za testo, javlja se kao koren reči koje se koriste za pivo i fermentaciju, dok savremeniji izraz potiče od reči *en zymi* što znači “u kvascu” (Feldmann, 2005).

Korišćenje kvasca datira još iz perioda 6.000. i 2.000. godine pre nove ere a koristili su se u procesu pravljenja piva u Vaviloniji i u pravljenju testa u Egiptu. Godine 1680. kvasac je prvi put posmatran pod mikroskopom “Antonie van Leeuwenhoek” a Luj Paster je prvi dokazao da su ćelije kvasca zaslužne za konverziju groždanog šećera u etanol. Sredinom 1800-tih godina sa radovima Pastera u Francuskoj i Hansena u Danskoj koji su proučavali mikrobiološki aspekt fermentacije piva i vina, otpočelo je naučno-tehnološko razumevanje uloge kvasca u proizvodnji hrane i pića. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je prvi opisan kvasac (Meyen, 1838). Naziv ovog kvasca označava šećernu plesan (*saccharomyces*) i pivo (*cerevisiae*), na galskom jeziku *kerevigia* ili starom francuskom jeziku *cerevoise*.

Kvasci kao nosioci alkoholnog vrenja imaju veoma značajnu ulogu u proizvodnji vina. Šira je sredina u kojoj oni žive i koju svojom aktivnošću menjaju, pa time utiču na kvalitet vina, odnosno učestvuju u formiranju hemijskog sastava, ukusa i mirisa vina (Ružić et al., 2000). Luj Paster je, 1863. godine, otkrio svet mikroorganizama i procese koji se odvijaju tokom fermentacije. Saznanje da je kvasac odgovoran za transformaciju šećera iz

grožđa u alkohol i ugljendioksid vinari su konačno mogli u potpunosti da kontrolišu razvoj vina od grožđa do finalizacije vina (Pretorius, 2000).

2.1.2.1. Klasifikacija kvasaca

Rasprostranjena je podela pravih gljiva *Eumycota* na tri empirijske grupe: plesni, kvasci i pečurke. Naziv kvasci ne predstavlja sistematsku kategoriju ni u botanici ni u mikrobiologiji. Kvasci čine različite sistematske grupe (klase i porodice), između kojih je teško postaviti granicu na osnovu ispitivanja morfoloških i fizioloških karakteristika.

Prema svojim biohemijskim i fiziološkim osobinama kvasci se mogu podeliti na tri grupe: a) oksidativni kvasci (rodovi: *Cryptococcus*, *Candida* i *Rhodotorula*) koji ne vrše fermentaciju šećera i pretežno se vrši aerobna disimilacija; b) oksidativno-fermentativni kvasci (rodovi: *Hansenula*, *Pichia* i *Torulopsis*) koji vrše aerobnu i anaerobnu disimilaciju, a kada vrše fermentaciju kao glavni proizvod su estri, a ne etanol; i c) fermentativni kvasci (rodovi: *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* i *Kloeckera*) koji vrše anaerobnu disimilaciju i fermentišu šećere do etanola i ugljendioksida.

Kvasci koji su pogodni za alkoholnu fermentaciju su askosporogeni iz klase *Ascomycetes*, tj. vrste iz roda *Saccharomyces* i *Schizosaccharomyces*. Savremena klasifikacija kvasaca je sledeća (Kirk, 2015):

Kraljevstvo: *Fungi*

Podkraljevstvo: *Dikarya*

Razdeo: *Ascomyceta*

Podrazdeo: *Saccharomycotina*

Klasa: *Saccharomycetes*

Red: *Saccharomycetales*

Porodica: *Saccharomycetoideae*

Rod: *Saccharomyces*

Rod *Schizosaccharomyces* pripada porodici *Shizosaccharomycetaceae*, redu *Shizosaccharomycetales*, klasi *Shizosaccharomycetes*, podrazdelu *Taphrinomycotina*, i razdelu *Ascomycota*. Prva ispitivanja kvasaca datiraju još iz 1838. godine i ipitivani su kvasci iz roda *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen, 1838). Hansen je prvi koristio izabrane sojeve kvasaca kao starter kulture u pivarstvu („Carlsberg” pivara u Danskoj) i uveo je razliku između sojeva kvasaca gornjeg vrenja koje je nazvao *Saccharomyces cerevisiae* i sojeva kvasaca donjeg vrenja koje je nazvao *Saccharomyces pastorianus*, (Eriksson, 1997).

U tabeli 2.1. prikazani su kvasci roda *Saccharomyces*. Kvasci iz roda *Saccharomyces* podjeljeni su u dve grupe: u užem (*stricto*) i širem (*lato*) smislu i to: *Saccharomyces sensu stricto* kompleks (imenovan od strane Van der Walt-a 1970. godine) koga čine vrste kvasaca koje su povezane sa fermentacionom industrijom, a čine ga *S. cerevisiae* i kvasci bliski ovoj vrsti i *Saccharomyces sensu lato* kompleks (obuhvata oko 100 vrsta kvasaca), (Rainieri et al., 2003). Kompleks *Saccharomyces sensu stricto* obuhvata šest vrsta: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kurdiavzevii*, *Saccharomyces mikatae* i jedan hibrid *Saccharomyces pastorianus*, sinonim za *Saccharomyces carlsbergensis*.

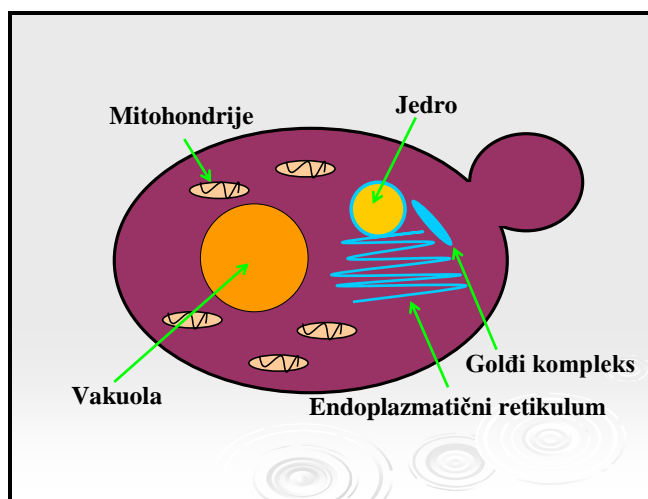
Tabela 2.1. Promene u nazivima i grupisanju vrste kvasaca u okviru kompleksa *Saccharomyces sensu stricto* prema najznačajnijim taksonomskim monografijama u periodu od 1912. do 1998. godine (Rainieri et al., 2003).

GUILLIERMOND, 1912.	LOODER I KREGER VAN RIJ, 1952	LOODER, 1970	BARNETT, PAYNE I YAROOW, 1984.	KURTZMAN I FEEL, 1998*
<i>S. cerevisiae</i> <i>S. ellipsoideus</i> <i>S. turbidans</i> <i>S. ilicus</i> <i>S. vordermanni</i> <i>S. sake</i> <i>S. cartilagenosus</i> <i>S. batatae</i> <i>S. tokyo</i> <i>S. yeddo</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. willianus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. validus</i>	<i>S. willianus</i>			
<i>S. coreanus</i>	<i>S. coreanus</i>	<i>S. coreanus</i>		
<i>S. carlsbergensis</i> <i>S. monacensis</i>	<i>S. carlsbergensis</i> <i>S. uvarum</i> <i>S. logos</i>	<i>S. uvarum</i>		
<i>S. uvarum</i> <i>S. logos</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i>	<i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. oviformis</i> <i>S. beticus</i>	<i>S. bayanus</i>		
	<i>S. heterogenicus</i>	<i>S. heterogenicus</i>		
	<i>S. chevalieri</i> <i>S. fructuum</i>	<i>S. chevalieri</i>		
	<i>S. italicus</i> <i>S. steineri</i>	<i>S. italicus</i>		
	<i>S. globosus</i>	<i>S. globosus</i>		
		<i>S. aceti</i> <i>S. prostoserdovi</i> <i>S. oleaginosus</i> <i>S. oleaceus</i> <i>S. capensis</i> <i>S. diastaticus</i> <i>S. hispaniensis</i> <i>S. inusitatus</i> <i>S. norbensis</i> <i>S. abuliensis</i> <i>S. cordubensis</i> <i>S. gaditensis</i> <i>S. hispalensis</i>		

2.1.2.2. Morfologija kvasaca

Kvasci mogu biti različitog oblika: okruglastog, elipsoidnog, jajastog, izduženog, trouglastog i kreću se pasivno u tečnosti. Veličina kvasaca je različita, širina je najčešće oko 5 μm a dužina od 8 do 10 μm . U tečnoj sredini kvasci teže da zauzmu okruglasti oblik, a u čvrstoj izduženi. Na čvrstoj hranljivoj podlozi nastaju beličaste kolonije kvasaca, a u tečnim podlogama stvaraju navlake.

Kvasci se odlikuju eukariotskom građom ćelije. Eukariote se odlikuju time što sadrže jasno izdiferencirano jedro okruženo membranom. Ćelija kvasca sastoji se iz ćelijskog zida, citoplazmatične membrane, citoplazme, jedra, hondriozoma i jedne ili više vakuola. Ćelijski zid daje čvrstinu i oblik ćeliji i ima zaštitnu ulogu. Citoplazmatična membrana odvaja citoplazmu od ćelijskog zida i na njoj se nalaze enzimi koji vrše razlaganje jedinjenja ili prenose hranljive materije. Sastoji se iz spoljašnje i unutrašnje membrane. Spoljašnja je propustljiva za veći broj supstanci, a unutrašnja je polupropustljiva i propušta samo jedinjenja male molekulske mase. Citoplazma predstavlja unutrašnji sadržaj ćelije. U sastav citoplazme ulazi: voda 75-90 %, proteini 50-80 %, ugljeni hidrati 10-20 % i masne materije 1-30 %. Jedro (nukleus) je karakteristična organela za sve eukariote i jasno je izdiferencirano. Jedro je ispunjeno genetskim materijalom (DNK). U vakuolama su rastvorene razne materije kao što su: šećeri, kiseline, soli, proteini i one su odvojene od protoplazme jednom polupropustljivom membranom, (slika 2.4).



Slika 2.4. Ćelija kvasca roda *Saccharomyces*

2.1.2.3. Razmnožavanje kvasaca

Razmnožavanje kvasaca može da bude bespolno i polno. Bespolno može biti pupljenjem i deljenjem. Polno razmnožavanje se vrši obrazovanjem spora.

Razmnožavanje pupljenjem se odvija tako što na vrh majke ćelije raste pupoljak, a za to vreme DNK se deli na dva dela i jedan deo ulazi u pupoljak. Kad pupoljak dovoljno naraste on se odvaja od majke. Vreme koje je potrebno da nastane ćerka ćelija je 2 sata. Kvasci iz roda *Saccharomyces* se najčešće razmnožavaju pupljenjem.

Deljenjem se razmnožavaju kvasci iz roda *Shizosaccharomyces*. Ćelije ovih kvasaca se pregrađuju jednom pregradom na dva dela. Za 20-30 minuta nastaju nove generacije i jedne od ovih ćelija su mlađe, to su ćerke ćelije a druge starije, to su majke ćelije. Mlađe ćelije brže rastu i zamućuju rastvor u kome se razvijaju.

Kada se nađe u sredini koja nije povoljna za njegov život (nedostatak hranljivih sastojaka i dr.) kvasac se razmnožava putem obrazovanja spora. Tada se jedro deli na dva dela, a ova jedra se mogu deliti na isti način. Novo jedro sa delom protoplazme stvara svoju membranu pa se u staroj ćeliji stvaraju nove ćelije. Membrana stare ćelije zadebljava i tako se stvara askus sa 1-4-8 askospora. Kada takav kvasac dođe u povoljne uslove, askospore bubre, stara membrana puca a spore se oslobađaju kao nove ćelije. Ove ćelije se dalje razmnožavaju pupljenjem.

2.1.2.4. Važniji predstavnici kvasaca

U alkoholnoj fermentaciji šire učestvuje više vrsta, pa čak i rodova kvasaca. Među njima su najznačajniji kvasac *Sacharomyces cerevisiae*. Kvasci se dele na rodove, vrste i sojeve.

2.1.2.4.1. Rod *Saccharomyces*

Najznačajniji rod kvasaca je rod *Saccharomyces*, koji obuhvata veći broj vrsta, od kojih su neke vrste nosioci alkoholne fermentacije. To su sporogeni kvasci i razmnožavaju se pupljenjem i obrazovanjem spora. Najznačajnije su dve vrste: *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus*. *Saccharomyces cerevisiae* je glavna vrsta i može da stvori oko 17 % alkohola. Kada se koriste suvi selekcionisani kvasci, alkoholno vrenje šire se najviše izvodi sa različitim sojevima iz okvira te vrste. Posle završene alkoholne fermentacije ovaj kvasac brzo izumire i retko se sreće u vinu i nema značaja za pojavu naknadne fermentacije.

Druga vrsta je *Saccharomyces bayanus* i slična je prethodnoj vrsti i najveće razmnožavanje ima na kraju fermentacije. Ona ima značaja za šire bogatije u sadržaju šećera,

odnosno kada fermentaciju u prisustvu većih količina alkohola treba dovesti do kraja, kao i kada se želi izazvati naknadna alkoholna fermentacija.

2.1.2.4.2. Rod *Kloeckera*

Kvasci ovog roda su veoma zastupljeni na svim plodovima. Na grožđu se javljaju za vreme šarka. Ovaj rod obuhvata nekoliko vrsta, a za tehnologiju vina najznačajnija vrsta je *Kloeckera apiculata*. Ovaj kvasac po obliku je izdužen i podseća na limun pa se zove limunasti ili vrškasti kvasac. On je u spontanoj mikroflori najbrojniji među kvascima, ali po svojim osobinama koje se nepovoljno odražavaju na kvalitet vina ovaj kvasac se ubraja u „divlje kvasce”. Osetljiv je prema alkoholu i podnosi najviše 4-5 vol. % alkohola i stvara velike količine isparljivih kiselina. Njegovo razmnožavanje se sprečava sumporisanjem šire pre početka alkoholne fermentacije. Alkoholnu fermentaciju nastavljaju kvasci koji su otporni na sumpordioksid i stvaranjem određene količine etanola ne dozvoljavaju razmnožavanje vrškastog kvasca i ako prestane dejstvo sumpordioksida.

2.1.2.4.3. Rod *Torulopsis*

Vrsta *Torulopsis stellata* (stari naziv *Torulopsis bacillaris*) je najviše zastupljena kod grožđa koje je napadnuto plemenitom plesni. Spada u spontanu mikrofloru, javlja se na početku fermentacije zajedno sa vrškastim kvascem. Za razliku od kvasca *Kloeckera apiculata* ostaje i dalje aktivan i može da stvori preko 11 vol. % alkohola.

2.1.2.5. Primena selekcionisanog kvasca

Na samom početku u širi se nalazi mešavina različitih populacija kvasaca. Spontano alkoholno vrenje često, zbog nekontrolisanih uslova, dovodi do nezadovoljavajućih organoleptičkih karakteristika vina. Od izuzetne je važnosti da soj kvasca sa najboljim fermentacionim sposobnostima nadvlada ostale sojeve i privede vrenje kraju. Sredinom 60-tih godina 20. veka na tržištu su se pojavili prvi preparati suvih aktivnih kvasaca koje je tržište uveliko prihvatilo. Karakteristike vrenja uz primenu selekcionisanih kvasaca su: brzo otpočinjanje vrenja, vrenje na niskoj temperaturi i pod pritiskom, aktivnost za vreme vrenja, tolerancija prema alkoholu, otpornost prema sumporastoj kiselini, brzina taloženja posle vrenja, “killer” fenomen, degradacija jabučne kiseline i dr.

Šira, kojoj se dodaje razmnožena kultura selekcionisanog vinskog kvasca, previre s plemenitim kvascem, čija su svojstva poznata (vrlo dobro sprovode vrenje šire, a prevrela vina su zdrava i bistra), a bez "divljih" kvasaca i bakterija. Važno je, da se iz lošeg,

plesnivog grožđa može jakim sumporisanjem i primenom selekcionisanog kvasca proizvesti zdravo vino. Spontana mikroflora ne može efikasno delovati u specifičnim slučajevima npr. pri visokom sadržaju šećera ili sumpordioksida, zatim kod plesnivog grožđa, pri niskoj temperaturi ili većem sadržaju alkohola. Rezultat spontane alkoholne fermentacije u tim slučajevima može biti ostatak neprevrelog šećera, zatim može doći do kvarenja, pogotovo ako šira nije dovoljno sumporisana, a u kasnijoj fazi može doći do naknadnog vrenja (re-fermentacije).

Plemeniti kvasci razlikuju se po svojim svojstvima kod njihove pripreme sprovođenja vrenja. U upotrebi su najčešće selekcije dveju vrsta kvasaca prilagođenih, svaki za sebe posebnim potrebama tehnologije vina.

Izdvajaju se selekcije sledećih kvasaca:

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Saccharomyces bayanus*

Svaki od njih ima svoje dobre i loše osobine. Dobre osobine su:

- Sposobnost previranja (visok sadržaj šećera, visok sadržaj alkohola);
- Otpornost na niske temperature ("kriofilni" kvasci);
- Razvijena otpornost na prisutnost sumpordioksida ("sulfitni" kvasci);
- Brzo razmnožavanje kvasca u širi i brz početak vrenja (dominacija selekcionisanog kvasca nad prirodno prisutnim);
- Predvidljivost početka, trajanja, maksimalne brzine vrenja – brže se uočavaju problemi tokom vrenja i preduzimaju odgovarajuće mere;
- Smanjeno negativno delovanje prisutne mikroflora na organoleptička svojstva vina;
- Primena kvasca koji proizvodi određene arome (posebna aroma karakteristična za određeni kvasac).

U selekciji kvasaca izbegavaju se njihova loša svojstva, koja se mogu pojaviti a to su:

- Stvaranje većih količina isparljivih kiselina, zavisno od količine šećera u širi,
- Stvaranje vodoniksulfida, (H₂S) pa su nakon vrenja potrebni dodatni poslovi na mladom vinu.

Tokom programa selekcije kvasaca utvrđuje se niz činilaca koji bi olakšali alkoholno vrenje, odnosno osigurali kvalitetniji i sigurniji tok. Među njima spada i "killer" faktor, odnosno sposobnost određenog soja kvasca da ubija osetljive kvasce. Bevan i Makower (1963) su otkrili killer fenomen unutar sojeva *Saccharomyces cerevisiae*. Killer fenotip, koji

su oni opisali bazirao se na sekreciji proteina male molekulske mase, a njegova aktivnost bila je vidljiva kroz uništavanje osetljivih ćelija (killer sensitive) istog ili srodnog roda kvasaca. Taj protein nazvan je “killer” toxin. “Killer”-sojevi imuni su na vlastite toksine, ali mogu biti osetljivi na toksine drugih killer sojeva.

Uskoro su usledila dalja istraživanja, koja su dokazala da taj fenomen nije ograničen samo na rod *Saccharomyces*, već je prisutan i kod nekih drugih rodova kvasaca.

Tokom zadnjih dvadeset godina, killer toksini, odnosno sojevi kvasaca koji izlučuju same toksine pronašli su i svoju praktičnu primenu. U tehnologiji vina, “killer” sojevi se koriste u borbi protiv divljih sojeva kvasaca, koji mogu dovesti do kontaminacije vina.

Da bi mogle da se iskoriste pogodnosti koje nude selekcionisani kvasci potrebno je da se obrati posebna pažnja, pored izbora kvasca, na pripremu kvasca i dozu inokulacije kvasca.

Pravilna priprema kvasca je od izuzetne važnosti za normalno odvijanje alkoholnog vrenja. Ona omogućava brzi početak alkoholne fermentacije i smanjuje rizik od mogućih problema. U toku rehidracije suvog kvasca dodaju se zaštitna jedinjenja, koja ojačavaju membranu kvasca specifičnim sterolima i nezasićenim masnim kiselinama i čine je jačom i otpornijom u toku vrenja (cilj je da se u citoplazmatičnoj membrani kvasca formira stabilna barijera između unutrašnjosti ćelije - citoplazme i spoljne sredine). Ćelije kvasca su otpornije na alkohol što im osigurava, bolji i čistiji kraj alkoholne fermentacije i smanjenje nastajanja nepoželjnih jedinjenja kao što su: vodonik-sulfid, isparljive kiseline i dr.

2.1.3. Uticaj nekih faktora na kinetiku alkoholne fermentacije

Alkoholna fermentacija je složen biohemijski proces u kome glavnu ulogu igraju ćelije kvasca. Ćelijama kvasca neophodni su odgovarajući uslovi za život od kojih zavisi tok i krajnji rezultat procesa vrenja. Od velikog teorijskog i praktičnog značaja za tehnologiju vina je poznavanje uticaja pojedinih faktora na rast kvasca. Neki od ovih faktora utiču na tok vrenja od početka do kraja, dok drugi faktori deluju na proces vrenja usmeravajući ga u određenom smeru (Radovanović, 1986).

2.1.3.1. Uticaj temperature

Uticaj temperature na tok alkoholne fermentacije je od velikog značaja. Temperatura je bitna za početak, tok i završetak alkoholne fermentacije. Povećanje temperature iznad optimalne vrednosti ima efekat na brojne enzimske reakcije i negativno se odražava na

razviće ćelija, ali u odsustvu toksičnih sastojaka ne dovodi do smrti ćelije. Povišenje temperature sa 25 °C na 40 °C smrtnost ćelija eksponencijalno raste u prisustvu čak i male količine etanola, zatim u prisustvu masnih kiselina sa kratkim lancem (propionska i buterna kiselina) (Flanzy, 1998). Povećana smrtnost ćelija na višim temperaturama se objašnjava denaturacijom proteina u internoj mitohondrijalnoj membrani. Optimalna temperatura za razmnožavanje kvasca je oko 25 °C, ali optimalna temperatura vrenja teško može da se definiše kao jedna nepromenljiva vrednost (Jović, 2003). U literaturi se preporučuju temperature za vrenje šire između 15 i 18 °C, a za vrenje kljuka od 25 do 30 °C (Flanzy, 1998).

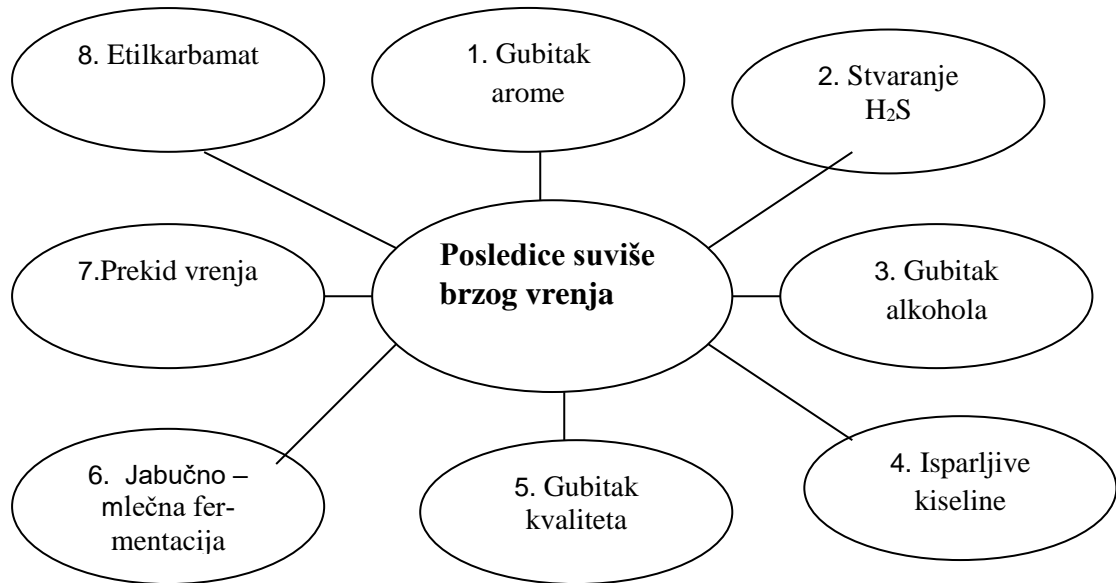
Burno previranje dovodi do naglog porasta temperature i brzog završetka vrenja (3–5 dana). Dinamika alkoholnog vrenja se usporava hlađenjem šire ili kljuka i tako se sprečava nagli skok temperature i vrenje se produžava na 10–15 dana.

Gubitak aromatičnih materija je jedna od posledica fermentacije na visokoj temperaturi. Uglavnom se radi o aromatičnim materijama koje daju voćni karakter, odnosno o estrima sirćetne kiseline i viših alkohola. Njihov gubitak je oko 50 % na temperaturi vrenja između 20 i 25 °C, odnosno oko 75 % na temperaturi od 25 i 30 °C (Jović, 2003).

Posledica suviše brzog vrenja je nastajanje velike količine ugljendioksida i njegovog gubitka, a on je značajan za svežinu belih vina. Njegov gubitak dovodi i do gubitka alkohola.

Ukoliko je temperatura vrenja viša dolazi do intenzivnijeg razmnožavanja bakterija sirćetne kiseline, bakterija mlečne kiseline i „divljih kvasaca“. Oni utiču na pogoršanje senzornih karakteristika vina, odnosno gubitka kvaliteta vina.

Temperature koje su znatno preko 30 °C mogu dovesti i do prekida alkoholnog vrenja. Kvaščeve ćelije izumiru a mogu da se aktiviraju i bakterije mlečne i sirćetne kiseline. Bakterije mlečne kiseline iz šećera stvaraju jedinjenja koja su znak kvarenja vina (mlečna kiselina, sirćetna kiselina, manit i dr.). Na višim temperaturama vrenja može da nastane vodoniksulfid i druga sumporna jedinjenja neprijatnog mirisa, kao i veća količina nepoželjnog etilkarbamata (Jović, 2003), (slika 2.5).



Slika 2.5. Posledice suviše brzog vrenja šire (Jović, 2003)

2.1.3.2. Uticaj kiseonika

Aerisanje šire značajno utiče na tok fermentacije jer je kiseonik potreban za razvoj i rast kvasaca. Alkoholno vrenje je anaeroban proces, ali u teoriji i praksi je utvrđeno da se ona puno intenzivnije odvija uz prisustvo kiseonika. Pod strogo anaerobnim uslovima vrenje je jako otežano i ne odvija se do kraja, tj. zaostaje izvesna količina neprevrelog šećera. Kiseonik je naročito potreban u ekspanzionalnoj fazi, dok se kvasci razmnožavaju. U strogo anaerobnim uslovima izostaje njihovo razmnožavanje. Dodavanje kiseonika pri kraju faze razmnožavanja kvasaca, pomaže ćeliji da pojača sintezu sterola i nezasićenih masnih kiselina, kao esencijalnih sastojaka citoplazmatične membrane. Na taj način poboljšava se propustljivost ćelijske membrane a time i ulazak šećera, odnosno ćelija kvasca postaje otpornija na etanol. Ta jedinjenja predstavljaju faktore preživljavanja kvasaca i faktore koji čine kvasce otpornijim na stvoreni etanol. Nedostatak kiseonika delimično može biti nadoknađen lipidima koji su sadržani u talogu šire. U tehnologiji belih vina, kada se šira štiti od oksidacije i intenzivnije bistri, potreba za dodavanjem kiseonika je veća.

2.1.3.3. Uticaj sadržaja šećera

Luj Paster je otkrio da aeracija povećava proizvodnju biomase i smanjuje brzinu potrošnje šećera i proizvodnje etanola, dok aeracija inhibira alkoholno vrenje (Pasteur 1861,

Racker 1974). U toku procesa oksidativne fosforilacije troše se velike količine ADP unutar mitohondrija. Tokom procesa disanja citoplazmi nedostaju ADP i neorganski fosfat (Lagunas and Gancedo, 1983), što kao posledicu ima smanjenje prenosa šećera unutar ćelije (Lagunas et al., 1982). Ovi mehanizmi objašnjavaju da aeracija inhibira alkoholnu fermentaciju. Kada kvasac počne da konzumira šećer oslobađaju se velike količine ugljendioksida. Oslobodeni ugljendioksid potiskuje kiseonik i stvaraju se polu anaerobni uslovi koji favorizuju fermentaciju. Međutim, čak i u prisustvu kiseonika *Saccharomyces cerevisiae* ne fermentiše šećer ako je koncentracija veća od 9 g/l. Crabtree je opisao ovaj fenomen 1929. godine, a poznat je pod različitim imenima: Cerebratov efekat, katabolička represija ili Pasterov suprotni efekat (Meijer et al., 1998; Ribereau-Gayon et al., 2000), pri koncentraciji šećera većoj od 2-5 g/l kvasac fermentiše šećere u etanol i pri aerobnim uslovima. Kada *Saccharomyces cerevisiae* raste u visokoj koncentraciji šećera koja se nalazi u širi dolazi do degenerisanja mitohondrija u ćeliji kvasca (Polakis et al., 1965, Gancedo, 1992, Barnett and Entian, 2005).

2.1.3.4. Uticaj pH

U uslovima fermentacije šire, iako je spoljna sredina relativno kisela, u ćeliji kvasca pH se održava blizu neutralne vrednosti. Međutim, pasivnim protokom protona iz spoljne sredine preko citoplazmatične membrane može da dođe do zakišeljavanja citoplazme. Pored toga, postoje i drugi fizičko-hemijski mehanizmi koji deluju u istom pravcu: sirćetna i neke druge organske kiseline, koje se normalno stvaraju u toku vrenja kao sekundarni proizvodi, mogu kao nedisosovane da slobodno difunduju kroz citoplazmatičnu membranu i da se akumuliraju u ćeliji. Tu dolazi do njihove disocijacije što dovodi do osetnijeg intraćelijskog pada pH.

Kvasci su jako osetljivi na prisustvo sirćetne kiseline. Sadržaj sirćetne kiseline od oko 2 g/l otežava vrenje šire, a pri koncentraciji od 4-5 g/l vrenje potpuno prestaje. Ovo je naročito značajno prilikom pokretanja naknadnog vrenja, jer ukoliko vino sadrži više od 2 g/l sirćetne kiseline, u tom slučaju veoma teško se može pokrenuti alkoholno vrenje.

2.1.3.5. Uticaj hranljivih sastojaka

Nedostatak asimilirajućeg azota i tiamina u sastavu šire ometaju normalan tok alkoholnog vrenja. Nedostatak azota u širi limitira razmnožavanje kvasca i vrenje traje veoma dugo. Asimilirajući azot sastoji se od amonijačnog azota i amino azota (slobodne

amino kiseline). Azot je esencijalni element potreban za sintezu proteina. Šira sadrži do 400 mg/l asimilirajućeg azota, a nedostatkom se smatra sadržaj od 150 do 180 mg/l.

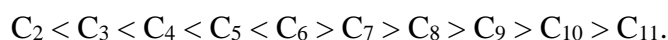
U uslovima prerade grožđa i dobijanja vina, tj, uslovima pogodnim za razviće kvasaca neophodni su vitamini: biotin, pantotenska kiselina i tiamin. U širi je najčešće prisutna dovoljna količina vitamina, izuzetak čini vitamin tiamin koga su kvasci sposobni da sintetišu a njegovim dodavanjem ubrzava se i pojačava razviće kvasaca. Tiamin je jedan od limitirajućih faktora i njegov nedostatak (ako je sadržaj niži od 250 µg/l) može da uspori alkoholnu fermentaciju. Kvasci imaju sposobnost da sintetišu tiamin, ali pošto je sinteza veoma spora, mnogo sporija nego što ga kvasci usvajaju iz sredine, njegov nedostatak u sredini može biti uzrok otežane fermentacije. Kvasac vrlo brzo koristi tiamin tako da za 1 do 3 sata asimilira celokupnu količinu tiamina i iz tih razloga potrebno ga je dodavati.

Dodatak azota imaće bolji efekat ukoliko se dodaje više puta i ako se kombinuje sa aeracijom. Prvu dozu treba dodati kada fermentacija počinje, drugu u sredini stacionarne faze, a treću na kraju ove faze.) Za održanje aktivnosti kvasca u toku stacionarne faze trebalo bi kontinualno dodavati izvor azota (Zamora 2009).

2.1.3.6. Uticaj alkohola

Relativno visok sadržaj alkohola koji nastaje u toku alkoholnog vrenja, jedan je od uzroka zaustavljanja vrenja. U zavisnosti od fiziološkog stanja kvasac podnosi višu ili nižu koncentraciju alkohola. Pri kraju alkoholnog vrenja povišeni sadržaj alkohola narušava propustljivost citoplazmatične membrane i time se smanjuje njena selektivnost. Zbog toga dolazi do prodora protona iz spoljne sredine (pH oko 3,0) u unutrašnjost ćelije i kvasac da bi održao pH citoplazme, koja je blizu neutralne, aktivira membransku propustljivost (povećavanje propustljivosti protona kroz membranu može imati višestruke posledice koje dovode do smanjenja vitalnosti ćelije kvasca).

Kako etanol, tako i viši alkoholi imaju toksično dejstvo na kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Ovo dejstvo je u tesnoj vezi sa dužinom lanca ugljenika:



Da bi se formirala stabilna barijera između citoplazme (unutrašnjosti ćelije kvasca) i okoline glavnu ulogu ima plazmatska membrana (Pillet et al., 2006). Steroli i fosfolipidi koji se nalaze u membrani odgovorni su za održavanje integriteta membrane kvasca, povećavajući mu otpornost na alkohol. Prilikom rehidracije kvasca u vodi ćelija kvasca ugrađuje ekstraceluarne lipide i sterole (Vagnoli et al., 2006). Inkorporacija ovih materija

posebno je značajna u cilju osiguravanja preživljavanja ćelije pri kraju alkoholne fermentacije. Fitosteroli koji se nalaze u grožđu nemaju istu hemijsku strukturu kao steroli kvasca i zato oni ne mogu da očuvaju životnost ćelije kvasca za vreme alkoholne fermentacije (Pietta et al., 2000).

2.1.3.7. Uticaj ugljen-dioksida

Ugljen-dioksid izaziva promene u strukturi membrane menjanjem sastava masnih kiselina u njoj kao posledica povećane propustljivosti membrane. Do tih promena dolazi ako se fermentacija odvija na 12–20 °C pod pritiskom CO₂ od 2 bara. U istim uslovima zapaženo je i značajno povećanje zapremine ćelije što ima za posledicu duboku dezorganizaciju intraćelijske strukture (posebno vakuola). Takođe je zapažena intraćelijska proteoliza čime se jako smanjuje vitalnost ćelije.

2.1.3.8. Uticaj pesticida

Pesticidi su egzogeni inhibitori alkoholnog vrenja. Savremena proizvodnja grožđa nezamisliva je bez upotrebe sredstava za zaštitu vinove loze od bolesti i štetočina. Danas su uglavnom u upotrebi organski sintetički fungicidi, koji pored svojih dobrih osobina u zaštiti vinove loze mogu da ispoljavaju manje ili više negativne pojave u vinarstvu, odnosno da inhibitorno deluju na vinski kvasac, a time pomeraju početak alkoholne fermentacije i imaju uticaja na hemijski sastav i senzorne karakteristike vina.

Neke pesticide koji se koriste u zaštiti vinove loze od parazita, kvasci u toku fermentacije mogu da razgrađuju pri čemu nastaju sumporna jedinjenja neprijatnog mirisa. S druge strane fungicidi iz grupe triazola i imidazola blokiraju sintezu ergosterola kod parazitnih gljiva (oidium) i istovremeno narušavaju propustljivost plazmatične membrane ćelije kvasca smanjenjem sinteze sterola i nezasićenih masnih kiselina. To kvasce čini osetljivijim na prisustvo alkohola u sredini (Flanzy, 1998).

2.1.4. Autoliza kvasca

Posle izumiranja kvasca dolazi do enzimske razgradnje ćelijskih sastojaka (autolize ćelije). To je vrlo složen proces gde degradacija membrane omogućava hidrolizu ćelijskih sastojaka. Razgradnjom sastojaka ćelijske opne (glukani i manoproteini), povećana je poroznost opne pa je time olakšano izdvajanje proizvoda razgradnje ćelijskih sastojaka (autolize) u spoljnu sredinu - vino. Kako ćelije kvasca mahom podležu autolizi kada pređu u

stelju, po završetku fermentacije, to je ovaj stadijum kvasca veoma značajan i sa gledišta vremena otakanja vina sa stelje.

Tri fenomena karakterišu autolizu kvasaca (Flanzy, 1998): razgradnja ćelijske opne, proteoliza i formiranje isparljivih sastojaka. Glikoproteini prisutni u zidu kvašćevih ćelija oslobađaju se u toku autolize mrtvih ćelija pod dejstvom enzima β -glukanaza. Enološki značaj manoproteina kvasca je veliki jer utiču na aktiviranje jabučno-mlečnog vrenja, na stabilnost vina (proteina, tartarata, fenolnih jedinjenja) i poboljšava senzorne osobine vina (povećava punoću ukusa i doprinose mekoći ukusa taninskih vina).

Autolizom mrtvih ćelija kvasaca degradacijom proteina pod dejstvom enzima proteaza oslobađaju se proteidi i amino-kiseline. Autolizom kvasaca na pH 3-3,5 dolazi do proteolize koju izaziva endoproteaza i oslobađaju se prvenstveno peptidi (oko 70% od oslobođenog azota), a manje amino kiseline. Na višem pH odnos je obrnut, odnosno oslobađaju se više amino-kiseline. Amino-kiseline mogu da posluže kao materijal za ishranu raznim predstavnicima mikroflore vina među kojima često mogu da se nađu i štetni mikroorganizmi.

Autolizom kvasaca u kiselom vodeno-alkoholnom rastvoru nastaje 80 do 100 različitih isparljivih sastojaka (Flanzy, 1998). Najzastupljeniji su estri. Druga grupa sastojaka su alkoholi, prvenstveno terpenški, koji su značajni sa aromatskog aspekta, tim pre što im je prag osetljivosti veoma nizak. Treća grupa jedinjenja su aldehidi i najzastupljeniji je metil-3-butanal. Nastaje od amino-kiseline leucin, kao i oksidacijom izoamil-alkohola. Identifikovano je 8 laktona, koji mogu doprineti aromi vina jer imaju miris na breskvu i kokosov orah.

Negom vina na stelji mogu se pojaviti i neka isparljiva sumporna jedinjenja. U uslovima vinifikacije kada su temperature niske, kao i niske pH vrednosti autoliza kvasca odvija se veoma sporo a dolazi do izražaja u proizvodnji penušavih vina koja se neguju više meseci, kao i mirnih vina koja se neguju na stelji 7 – 8 meseci uz povremeno dizanje stelje.

2.1.5. Prekid alkoholne fermentacije

Kontrola alkoholne fermentacije je znatno poboljšana primenom selekcionisanih kvasaca, kontrolom temperature i dr, ali nije redak slučaj odstupanja od normalnog toka alkoholne fermentacije, odnosno otežane fermentacije, pa i njenog zaustavljanja. To je najčešći problem sa kojim se vinari susreću u proizvodnji vina. Rezultat toga je dobijanje vina lošijeg kvaliteta.

Po Bisson-u cit. Zamora (2009) postoje tri tipa usporene alkoholne fermentacije:

I. Usporen početak alkoholne fermentacije

Uzroci:

1. Primena spontane fermentacije kada je prisutan neaktivan soj kvasaca ili mali broj ćelija kvasca i kada nije sprovedena rehidracija kvasca na odgovarajući način.
2. prisustvo inhibitora (previsoka koncentracija SO₂, prisustvo fungicida na grožđu za vreme berbe ili mikrobna aktivnost koja rezultira inhibicijom kvasca (veći sadržaj sirćetne kiseline koju proizvode divlji kvasci i/ili bakterije ili previsoka/preniska temperatura šire);
3. kvalitet grožđa (gubitak mikronutrijenata u grožđu inficiranom pre berbe i visoka koncentracija bakterija mlečno-kiselinskog vrenja, plesni grožđa, gljivica i bakterija).

II. Alkoholna fermentacija usporena celim tokom

Uzroci:

1. nije postignuta maksimalna koncentracija ćelija (oko 10⁸ CFU/ml);
2. limitacija hranljivih materija;
3. neodgovarajući soj kvasca;
4. uslovi (temperatura, pH) inhibiraju fermentaciju.

III. Fermentacija započinje normalno ali kasnije usporava

Uzroci:

1. temperaturni šok;
2. nastajanje inhibitora - nagli prekid može se dogoditi ako postoji značajna aktivnost drugih mikroorganizama čiji krajnji produkti deluju inhibitorno (sirćetna i druge organske kiseline);
3. kvasac jako osetljiv na etanol - fermentacija će naglo stati kad kvasac stvori maksimalnu koncentraciju etanola koju može podneti (u ćelijama se smanjuje sadržaj sterola i nezasićenih masnih kiselina potrebnih za formiranje membrane rezistentne na etanol);

Ukoliko dođe do temperaturnog šoka kad je fermentacija već odmakla ali nije još gotova i kad su već prisutne visoke koncentracije etanola ili ako dođe do promene pH zbog njegovog podešavanja.

Fermentacije s ovim tipom poremećaja toka je najteže ponovo pokrenuti.

IV. Normalna fermentacija, zatim nagli prekid

Može biti povezano s ulaskom kvasca u stacionarnu fazu rasta.

Osnovni razlog je manji broj živih ćelija kvasaca, što može da bude posledica nedostatka hranljivih sastojaka, prisustva inhibitora ili uticaj nekog drugog faktora. Ako je gustina ispod 1,005 i smanjuje se za samo 0,001 ili 0,002 po danu može se očekivati prekid alkoholnog vrenja. Ponovno pokretanje vrenja ne predstavlja veći problem ako je sadržaj alkohola niži od 12 vol. % a sadržaj šećera najmanje 15 g/l. Ukoliko je koncentracija šećera manja od 10 g/l i kada je došlo do jabučno-mlečnog vrenja često je veoma teško pokrenuti prekinutu alkoholnu fermentaciju.

Na prekid alkoholne fermentacije mogu da utiču sledeći faktori (Ribereau-Gayon et al., 1999):

1. Koncentracija šećera, odnosno nastali sadržaj alkohola koji je toksičan. Etanol sprečava mnoge ćelijske aktivnosti, pa i prenos amino-kiselina i drugih hranljivih materija. Etanol inhibira citoplazmatičnu membranu, koja se uglavnom sastoji od proteina i lipida i ona ima značajnu ulogu u regulisanju unosa i izlučivanja ćelijskih komponenti.

2. Ekstremni temperaturni uslovi: visoka i niska temperatura fermentacije. Visokotemperatura fermentacije nastaje usled visoke početne temperature, većeg sadržaja šećera i veličine suda, a niska temperatura na početku fermentacije usporava razmnožavanje kvasca i smanjuje biomasu kvasca.

3. Potpuno anaerobni uslovi: anaerobni uslovi negativno utiču na rast i razmnožavanje kvasca, dok je kiseonik neophodan za sintezu ergosterola i masnih kiselina dugog lanca. U odsustvu kiseonika kvasci adaptiraju svoje membrane na uslove sredine. Aeracija povećava brzinu vrenja i ona mora biti prisutna tokom faze rasta kvasca (eksponencijalna faza). Da bi se kvasci normalno razvijali i održali svoju životnu aktivnost, potrebna im je određena količina kiseonika. Smatra se da nivo rastvorenog kiseonika iznosi 5-10 mg/l, (Sablayrolles et al., 1986). Kiseonik se uvodi u vino i širu u toku starenja vina u količini od 1-6 mg/l u periodu od mesec dana (Parish et al., 2000; Sullivan et al., 2002).

4. Nedostatak nekih hranljivih sastojaka: izaziva ozbiljne probleme u toku alkoholnog vrenja (azot, vitamini i mineralne materije). Ako oni nisu prisutni u dovoljnoj količini, kvasac se neće dovoljno razmnožiti i vrenje može biti usporeno ili potpuno zaustavljeno zbog čega se dodaju aktivatori rasta kvasca. Uobičajena aktivacija se vrši dodavanjem amonijum-sulfata ili amonijum-fosfata i tiamina. Doza azota mora biti određena uzimajući u obzir početnu koncentraciju lako asimilovanog azota i potencijalnog sadržaja alkohola u vinu. Dodavanje azota će biti efikasnije ako se obavlja dva ili više puta i u kombinaciji sa aeracijom (Zamora, 2009).

5. Prisustvo masnih kiselina srednjeg lanca: prisustvo ovih kiselina (C₆, C₈ i C₁₀) sprečava rast kvasca i intenziviraju toksičnost alkohola. Ovaj problem je više izražen u belom vinu, jer se vrenje obično vrši na niskim temperaturama i bez ikakve aeracije. Da bi se izbegao ovaj problem treba koristiti ćelijske opne kvasaca. One adsorbuju masne kiseline srednjeg lanca iz sredine i obezbeđuju sterole za kvasce. Opne kvasca se mogu primenjivati kao preventiva (20 g/hl) ili u koncentraciji od 40 do 50 g/hl kod usporene ili prekinute fermentacije.

6. Ostatak pesticida: pesticidi koji se koriste za zaštitu vinove loze dospevaju u širu u manjoj ili većoj količini. Oni deluju na enzimski sistem kvasca izazivajući poremećaje pojedinih njegovih funkcija. Do prekida fermentacije dolazi ako se ne poštuje karenca za primenjena sredstva (za fungicide na bazi bakra karenca je 35–42 dana, a za botriticide od 21–28 dana).

7. Nedovoljna količina kvasca

8. Antagonističke pojave među kvascima kao i „killer“ fenomen: određeni sojevi kvasca poznati su kao „killer“ kvasci i oni izlučuju toksine u svom okruženju i na taj način ubijaju druge osetljive sojeve kvasaca. Ćelija ugine za 2–3 sata nakon kontakta sa toksinom jer se formiraju pore u citoplazmatičnoj membrani. U odnosu na „killer“ faktor postoje tri vrste kvasaca:

- kvasci koji proizvode toksine i otporni su na njih;
- kvasci koji ne proizvode toksine i otporni su na njih i
- kvasci koji su osetljivi na toksine.

Ponovno alkoholno vrenje je često teško uspostaviti, jer je sredina bogata u alkoholu i siromašna u šećeru. Zatim kvasci su iscrpljeni od prethodnog vrenja i kvasac u fazi izumiranja više nije aktivan. Bitno je da se upotrebi selekcionisani kvasac koji je prilagođen uslovima prekinutog vrenja (temperatura, pH i sadržaj etanola).

2.1.6. Pokretanje alkoholne fermentacije

U slučaju pokretanja prekinute alkoholne fermentacije kod crvenih vina treba ga odvojiti od komine čime se smanjuje mogućnost bakterijske kontaminacije i uvesti kiseonik koji će pospešiti rast kvasca a sumporisanjem vina sprečavati razvoj bakterija. Dodavanjem aktivnog starter kvasca, koji je prilagođen sadržaju od 9 % alkohola i sadrži 15 g/l šećera i 3 g/hl SO₂ postižu se najbolji rezultati. Zapremina starter kvasca može se postupno povećati dodavanjem veće količine vina sa prekinutom alkoholnom fermentacijom. Količine sumpordioksida koje je potrebno dodati kreću se od 3 do 5 g/hl i fermentacija će se ponovo

pokrenuti nakon zasejavanja kvasca. Može se dodati i amonijum-sulfat u koncentraciji od 5 g/hl. Alkoholnu fermentaciju treba pratiti, posebno merenje isparljivih kiselina kako bi se sprečilo zamućenje vina usled razvoja bakterija koje izazivaju mlečno-kiselinsko vrenje.

2.2. LEKOVITO BILJE U PROIZVODNJI VINA

Primena lekovitog bilja u proizvodnji vina uglavnom se odnosila na aromatizovana vina. To su proizvodi koji se dobijaju od prirodnih ili specijalnih vina uz dodatak lekovitog bilja. Ova vina su poznata pod imenom: vermut i bermet. Najčešći naziv im je vermut, što dolazi od nemačke reči “Wermut” i znači pelin - *Artemisia absinthium* (Radovanović, 1986).

U proizvodnji vermuta značajnu ulogu ima izbor vina, kao osnovne sirovine i izbor smeše trava i drugih biljnih delova. U tome je specifičnost pojedinih tipova vermuta. Postoji veliki broj trava i drugih biljaka koje se upotrebljavaju u proizvodnji vermuta i pored pelina su: anis (*Pimpinella anisum*), ruzmarin (*Rosmarinus officinalis*), hajdučka trava (*Achillea millefolium*), žalfija (*Salvia officinalis*), korijander (*Coriandrum sativum*) i dr.

Bermet je specijalno aromatizovano vino, neobičnog i originalanog ukusa, koje se pravi od grožđa iz vinograda sa padina Fruške gore (Vojvodina, Srbija) uz dodatak čak do 26 vrsta aromatičnih, lekovitih biljaka (Milijić i Puškaš, 2012). Tačna receptura se čuva kao proizvođačka tajna, i kao takva se prenosi s generacije na generaciju. Ovo daje bermetu posebnu vrednost i upečatljivost. Lekovite biljke koje su uključene u proizvodnju bermeta su: pelin (*Artemisia absinthium*), lincura (*Gentiana lutea*), anis (*Pimpinella anisum*), cimet (*Cinnamomum zeylanicum*), kičica (*Trifolium arvense*), crna gorušica (*Brassica nigra* L.), korijander (*Coriandrum sativum*), karanfilić (*Sizigium aromaticum*), rogač (*Ceratonia silikua*) i sladić (*Glicirrhiza glabra*). Pored ovih biljaka koristi se još i kora pomorandže i limuna, štapići vanile, suvo grožđe, smokva i muskatni orah (*Miristica fragrans*). Farmakološki aktivna jedinjenja iz ovih biljaka ispoljavaju snažnu antioksidativnu aktivnost, a mnoga od njih mogu se ponašati i kao tonik, antiseptik, antidiuretik, antipiretik itd. U srpskoj narodnoj medicini ove biljke se često koriste u cilju poboljšanja varenja i protiv bolova u želucu.

Bermet, kao vredno lekovito piće na bazi bilja, pokazuje pozitivan komplementaran efekat između fenolnih jedinjenja iz crvenog vina i brojnih farmakološki aktivnih jedinjenja iz lekovitog i aromatičnog bilja koje se dodaje tokom proizvodnje (Milijić i Puškaš, 2012).

2.2.1. Anis (*Pimpinella anisum*)

Sistematika

Carstvo: *Plantae*

Razdeo: *Magnoliodyta*

Razred: *Magnoliopsida*

Red: *Apiales*

Porodica: *Apiaceae*

Rod: *Pimpinella*

Vrsta: *Pimpinella anisum*



Slika 2.6. Izgled biljke i cveta anisa (*Pimpinella anisum*)

Izgled biljke: Anis je jednogodišnja zeljasta biljka.

Koren: Vretenast, tanak, slabo razvijen, prostire se do dubine 20 – 30 cm. Slabe je usisne moći.

Stablo: Uspravno 30-70 cm visine, šuplje valjkasto, obraslo kratkim mekanim dlačicama, uzdužno rebrasto. Grana se pri vrhu a na krajevima grana se formiraju štitaste cvasti.

Listovi: Različitog su oblika. Donji su sroliki, na dugim drškama. Listovi na sredini stabla su trojno deljeni, trojno perasti, na kraćim drškama, dok su gornji sedeći, izduženi i izdeljeni na uzane, duguljaste režnjeve.

Cvetovi: Složeni u štitaste cvasti (složen štit) koje čini 10-15 štitića sa do 15 cvetova u svakom štitiću. Cvetovi su petodelni, krunični listići beli, čašica prekrivena finim maljama.

Plod: Šizokarpijum koji se sastoji od dva plodića, (semena) spljoštenog oblika, jajasta, obrasla sa jednoćelijskim bradavičastim dlačicama. Plod je sivozelene boje i u perikarpu koji je dosta debeo se nalaze male šupljine ispunjene uljem. Dužina semena je 3-6 mm a debljina do 3 mm. Masa 1000 zrna je 1- 4 g.

Anis je jednogodišnja biljka koja može da izraste od pola do jednog metra visine. Ima granatu šuplju stabljiku, pokrivenu pahuljastim dlačicama, sa okruglastim i usko lancetastim belim cvetovima. Plod je jajastog oblika, prema vrhu je sužen, dugačak je od 3 do 6 mm a debeo je 3 mm. Plod je svetlozelenosiv, sa čekinjama i 10 rebara. Vreme cvetanja je od maja do avgusta, a vreme sazrevanja je avgust i septembar. Raste u istočnoj mediteranskoj regiji, zapadnoj Aziji, na Bliskom istoku, Meksiku, Egiptu, i Španiji (Salehi, 2010). Anis se prvenstveno gaji zbog semena koje se koristi kao začim (Gülçin et al., 2003), (slika 2.6). Eterična ulja se koriste za lečenje nekih bolesti uključujući i napade epilepsije (Avicenna et al., 1988). Ulje anisa se koristi u preradi hrane za poboljšavanje ukusa kolačima i bezalkoholnim pićima (Rodrigues et al., 2003). Trans-anetol u velikoj meri se koristi u farmaceutskoj industriji kao supstrat za sintezu različitih supstanci kao što je fenobarbitol (Sousa et al., 1991).

Lekoviti deo biljke: Upotrebljava se zrelo seme (*Fructus Anisi vulgaris Semen Anisi*) koje se bere samo po suvom vremenu.

Lekovite supstance koje sadrži anisovo seme: etarsko ulje, masti, belančevine, šećeri. Etarsko ulje sastoji se uglavnom od anetola. Seme anisa sadrži 1,5-6 % etarskog ulja koje se sastoji pre svega od trans-anetola, 8-11 % lipida bogatih palmitinskom i oleinskom kiselinom, 4 % ugljenih hidrata i 18 % proteina (Sousa et al., 1991). Ostale studije su pokazale prisustvo eugenola, trans-anetola, anis-aldehida (Wagner, 1984), estragola (Zargari et al., 1989), skopoletina, kumarina, umbeliferona, estara (Burkhardt, et al., 1986), terpena ugljovodonika (Karting et al., 1975), poliiena i poliacetilena kao glavnih sastojaka eteričnog ulja semena anisa (Schulte et al., 1970). Fenolna jedinjenja prisutna u etarskim uljima imaju antimikrobno dejstvo. Etarsko ulje anisa (*Anisi aethroleum*) je bistra bezbojna tečnost ili bezbojna kristalna masa, prijatnog aromatičnog mirisa i slatkog ukusa. Očvrsne na temperaturi između 15 i 20 °C usled prisustva velike količine *trans*-anetola (80-90%), čija je tačka topljenja 22,5 °C. To je smeša fenolnih jedinjenja, seskviterpena, i alkena. Glavni sastojak je *trans*-anetol a njegov izomer metilkavikol (estragol) čini 4%, dok su ostale komponente anisaldehyd, anisketon, dianetol, *cis*-anetol. *Cis*-anetol je toksičan i njegova količina treba da se kreće u granicama od 0,2-0,5%. (Ullah, 2012).

Analizom etarskog ulja ploda anisa koji potiče iz Turske utvrđeno je da je *trans*-anetol zastupljen sa 77-86,3%, metilkavikol (estragol) sa 8,0-9,8%, pseudoizoeugenil-2-metilbutirat (3,5-4,6%), γ -himahalen, *cis*-anetol, anisaldehyd, epoksi-*trans*-pseudoizoeugenil-2-metilbutirat i dr. (Kurkcuoğlu et al., 2003). Etarsko ulje anisa analizirano je GC i GC-MS metodom i identifikovan je *trans*-anetol (93,9 %), metilkavikol (2,4 %), a

komponente *trans*-metileugenol, α -kuparen, α -himahalen, β -bisabolen, *p*-anisaldehyd, *cis*-anetol identifikovane su u količinama većim od 0,06 % (Ozcan i Chalchat, 2006).

Koncentracija pojedinih komponenti u etarskom ulju značajno varira u zavisnosti od uslova gajenja i genetskih resursa. Analizom etarskog ulja iz semena anisa dobijenih uzgajanjem na različitim područjima Evrope utvrđen je različiti hemijski sastav etarskog ulja (Orav et al., 2008). Glavna komponenta je *trans*-anetol (76,9-93,7%) i γ -himahalen (0,4-8,2 %), *trans*-pseudoizoeugenil-2-metilbutirat (0,4-6,4%), *p*-anisaldehyd (do 5,4%), i metilkavikol (0,5-2,3%). U uzorcima ulja poreklom iz Grčke, Mađarske, Škotske, Litvanije, Italije i Nemačke sadržaj *trans*-anetola je veći od 90%, a etarsko ulje semena anisa iz Etiopije je bogato γ -himahalenom (8,2%), *trans*-pseudoizoeugenil-2-metilbutiratom (6,4%), dok uzorci iz Francuske sadrže najveću količinu anisaldehyda (5,4%), (Orav et al., 2008).

Akhtar sa saradnicima (2008a) godine je ispitivao antibakterijsku aktivnost vodenog, metanolnog, acetonskog i petrol-etarskog ekstrakta plodova anisa protiv četiri patogene bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Echerichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* pomoću disk difuzione metode. Acetonski i petroletarski ekstrakt ne inhibira rast ovih bakterija dok vodeni i metanolni ekstrakt pokazuju antibakterijsku aktivnost, s tim što je vodeni ekstrakt mnogo efikasniji (Akhtar et al. 2008b).

Etarsko ulje anisa poseduje antimikrobnu aktivnost i prema Gram pozitivnim (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) i prema Gram negativnim bakterijama (*Echerichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) (Mohammed, 2009). Ispitivanja koja su sproveli Ates i Erdogru (Ates i Erdogru, 2003) sa vodenim i alkoholnim ekstraktima semena anisa na Gram(-) bakterije pokazala su da vodeni ekstrakt nije bio aktivan prema Gram negativnim bakterijama (*Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli*) ali je bio efikasan prema *Candida albicans*, dok je alkoholni ekstrakt pokazao antibakterijske osobine prema *Micrococcus luteus*, i *Mycobacterium smegmatis*. Etarsko ulje anisa pokazuje inhibitornu aktivnost protiv gljiva. Kosalec et. al. (2005) su utvrdili da ekstrakt semena anisa i etarsko ulje semena anisa pokazuje antimikrobu aktivnost na sedam vrsta kvasaca: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, zaustavlja rast *Geotrichum spp.*, a neaktivan kod *C. glabrata*. Inhibitorno deluje protiv dermatofita *Trichopyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* i *M. gypsseum*. Antifungalna aktivnost etarskog ulja semena anisa utvrđena je protiv *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, (Ozcan and Chalchat 2006). Baskabady i Ramazani-Assari (2001), potvrdili su bronhodilatorni efekat vodenog i etanolnog ekstrakta i etarskog ulja semena anisa.

Etarsko ulje anisa se u Iranskoj medicini koristi u antikonvulzivnoj terapiji, a ovo su i potvrdili Pourgholami et al. (1999) i Janahmadi et al. (2008). Istraživanjima je utvrđen antikonvulzivni i neuroprotektivni efekat na mozak pacova (Karimzadeh et al., 2012) i mogućnost primene anisa u lečenju epilepsije.

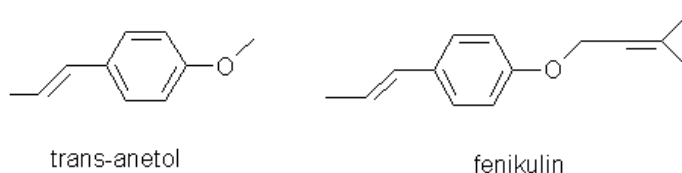
Rezultati studije koju je izveo Picon et al. (2010) pokazuju značajan laksativni efekat anisa tako da se on može koristiti kao bezbedna alternativa za tretman opstipacije. Ispitivanja etarskog ulja anisa pokazala su značajan analgetički efekat koji je sličan morfinu i aspirinu (Tas, 2009).

Singh et al. (2008) ispitivali su antioksidativni potencijal etarskog ulja iz semena anisa preko inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline, DPPH radikala, redukcijom Fe^{3+} i došli do zaključka da ulje anisa ima jaku antioksidativnu aktivnost veću od BHA i BHT.

Insekticidnu aktivnost 40 etarskih ulja ispitivali su Park et al. (2008), protiv larve *Lycoriella ingenua*. Ispitivanjima je utvrđeno da etarsko ulje poseduje dobru insekticidnu aktivnost, najefikasnija jedinjenja su alil-izotiocijanat, trans-anetol, dialil-disulfid i p-anisaldehyd, (slika 2.7).

Antioksidativni, antidijabetski i hipolipidemički efekat anisa primenjivan je kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2 korišćenjem 5 g/dan praha semena anisa u trajanju od 60 dana. Rezultati pokazuju da 36 % opada glukoza u krvi a takođe se javlja i značajno smanjenje holesterola i triglicerida u krvi (Rajeshwari et al., 2011).

Etarsko ulje iz semena anisa koristi se kao ekspektorans, karminativ, stomahik, galaktagog i korigans mirisa i ukusa. Stimuliše sekreciju žuči i pljuvačke. Eterično ulje anisa deluje na neuromuskulotorni sistem i deluje protiv gastralgije i kolika. Ulje anisa deluje i na centralni nervni sistem (Tucakov, 1997). Seme anisa deluje protiv nadimanja, umiruje grčeve, jača želudac i pospešuje probavu. Kneipp stavlja delovanje anisovog semena kao sredstva protiv nadimanja ispred komorača (*Foeniculum vulgare*), anisovo ulje (*Aetheroleum anisi*).



Slika 2.7. Struktura trans-anetola i fenikulina

2.2.2. Cimet (*Cinnamomum verum*, sinonim, *C. zeylanicum*)

Sistematika

Carstvo: *Plantae*

Razdeo: *Magnoliophyta*

Razred Magnoliopsida

Red: *Lurales*

Porodica: *Lauraceae*

Rod: *Cinnamomum*

Binomijalna nomenklatura

Cinnamomum verum

J.Presl

Sinonimi:

C. zeylanicum



Slika 2.8. Lekoviti delovi cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*)

Cimet je veoma star začin, pominje se 2800 godine pre n.e. u kineskoj botanici, a u starom Egiptu je korišćen za balsamovanje. Samonikla je biljka južne i jugoistočne Azije; kultivira se u Šri Lanki, na Sejšelima, u jugoistočnoj Indiji, Indoneziji, na Zapadnom Indijskom ostrvu i u Južnoj Americi. Komercijalno se uglavnom uvozi iz Šri Lanke, a manje sa Malezije, Madagaskara i Sejšela.

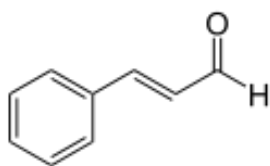
Cimet se dobija iz osušene kore zimzelenog drveta cimetovca karakteristične arome. Samonikli cimetovac može da naraste do 7 m a kultivisani do 3 m. U plantažnom se gajenju dobija redovnim podrezivanjem stabala koja se gaje kao grmovi. Kora se dobiva sa grana šestogodišnjih stabala debelih 2-3 cm ili sa dvogodišnjih izdanaka korena starijih biljaka. Listovi su ovalno-lancetasti, kožasti i žilavi, dugi su do 20 cm sa lučno savijenom nervaturom. Kada se protrljaju mirišu na karanfil. Cvetovi su u obliku cvasti, oko 0,5 cm, dlakavi su i svilenkasti, a plodovi su bobice purpurne boje. Razlikuju se cejlonski i kasija

cimet. Cejlonski cimet se prodaje u obliku štapića, žutobraon je boje i ima pikantniju aromu od kasija cimeta, (slika 2.8). Kasija cimet je lošijeg kvaliteta i crvenkaste je boje.

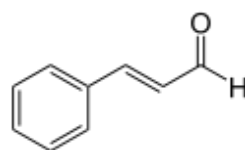
Cimet sadrži eterično ulje (0,4-8,0 %), celulozu, ugljene hidrate, tanine, manitol. Eterično ulje cimeta je svetložuta tečnost aromatičnog mirisa i slatkastog ukusa. Osnovne komponente eteričnog ulja su: cimetaldehid (65-75 %), α -bergamoten (27,4 %), α -copaen (23,0 %), transcimetna kiselina (10 %), cimetni alkohol (8 %), eugenol (5 %), tetradekanol (4,3 %), viridifloren (3,3 %), α -murolen (2,7 %), gemakren (2,1 %), epi- α -bisabolol (2,1 %), spatulenol (2,0 %), aroma dendren (1,8 %), globulol (1,7 %), γ -kadinen- (1,6 %), nonanol (1,1 %), α -pinen (0,9 %), (Jayaprakasha et al., 1997), (slika 2. 9).

Cimet je prirodni astringens, antimikotik, aromatik, antibakterik, antidijabetik, dezinficijens, hemostatik, korigens, stomahik, karminativ, spazmolitik i stimulans. Pomaže kod dijabetesa tipa 2, jača srce i želudac, pozitivno deluje na uravnotežavanje holesterola. Stimuliše mokrenje i djeluje protiv gihta, jača telesnu snagu posle teških bolesti (Keršek, 2004).

Koristi se u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Cejlonski cimet se obično nalazi u prodaji u obliku tankih uvijenih komada kore drveta cimetovca, dok kasija cimet se više upotrebljava u mlevenom obliku za umake. U kombinaciji sa drugim drogama koristi se kao stomahik i karminativ u lečenju problema pri varenju koje se javljaju nakon preobilnog obroka, blagih gastrointestinalnih spazama i kod smanjenog apetita. Najčešće se koristi kao korigens ukusa, kao začim i u pripremi likera. U tradicionalnoj medicini eterično ulje cimeta se koristilo za lečenje dismenoreje i hemostiptik. Korišćenje većih doza cimetovca ili osrednjih doza eteričnog ulja uzrokuju tahikardiju, podstiču intestinalnu peristaltiku, respiraciju i perspiraciju. Ne bi se smeo koristiti kod želudačnih i crevnih ulceracija a takođe ni za vreme trudnoće. Kontraindikacije su alergija na cimet. Malo je biljnih preparata koji sadrže koru cimetovca, a najčešće se koristi kao korigens ukusa i kao aromatik. Koristi se kao sastojak začinskih mešavina korišćenih za pripremu kuvanog vina. Eterično ulje cimeta koristi se u kombinaciji sa matičnjakom, a i sastavni deo je i kreme Carmol® u kombinaciji sa eteričnim uljima matičnjaka, kadulje, limuna, lavande, anisa, timijana, mente, karanfilića i oraha (Kalodera, 2009).

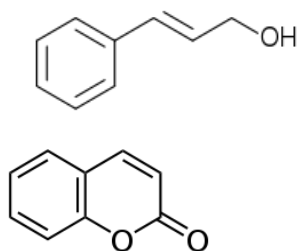


Cimetaldhid

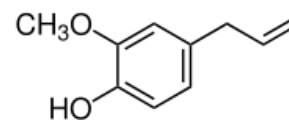


OCH3

O- Metoksi cimetaldehid



Cimetni alkohol



Eugenol

Kumarin

Slika 2.9. Komponente eteričnog ulja cimeta

2.2.3. Pelin (*Artemisia absinthium*)

Sistematika

Carstvo: Plantae

Razdeo: Magnoliophyta

Razred: Magnoliopsida

Red: Asterales

Porodica: Asteraceae

Rod: *Artemisia*

Vrsta: *A. absinthium*



Artemisia absinthium L.

Slika 2.10. Pelin (*Artemisia absinthium*)

Pelin je biljka poznata još iz antičkih vremena. Sakuplja se i gaji radi listova, herbe i rascvetalih cvasti. Pelin je višegodišnja, zeljasta, vrlo razgranata biljka, visoka 0,5 do 1,5

metara. Cela biljka je obrasla mekim, svilastim dlačicama, zbog čega je srebrnastozelena. Cveti u leto. Lišće je beličasto, svilasto, pokriveno gustim, mekim dlačicama. Prizemno lišće je krupno, troperasto i ima dugačke drške. Lišće na gornjem delu stabljike ima kratke drške, dvoperasto je ili jednoperasto, a okrajci su lopatičasti ili kopljasti. Lišće uz cvet je celo, bez drške, slično bodlji. I stabljika je dlakava. Cvasti su udružene u račvaste metlice s malim, loptastim, u prečniku oko 3 mm velikim žutim glavicama na kratkim drškama. Na dlakavom cvetištu ima mnogo cevastih, žutih cvetića sa žlezdama napunjenim uljem (Tucakov, 1997), (slika 2.10).

Lekovite supstance: Pelin sadrži niz lekovitih supstanci, a pre svega eterično ulje, sastavljeno od niza organskih jedinjenja. Osim toga, sadrži gorki glikozid absitin i gorke supstance artemisin, absintiin i anabsintiin, a od organskih kiselina nalaze se u pelinu jabučna, taninska i ćilibarna kiselina. Utvrđene su i supstance poput parafina čiji sastav nije još tačno određen. Osim toga, u listovima se nalazi zelenoplavo eterično ulje tujon, nadalje terpen, među njima azulen, tanacetone i konačno soli kalijuma i mangana. U evropskoj tradicionalnoj medicini koristi se za lečenje dijabetesa, a ekstrakti cele biljke koriste se za lečenje epilepsije, psihoneuritisa, depresije, razdražljivosti, nesаницe, anksioznog stresa (Walter et al., 2003). Sirovi ekstrakti su korišćeni kao agensi protiv malarije, a ekstrakti pelina imaju antitumornu aktivnost (Sun et al., 1992). Izolovana eterična ulja pelina imaju insekticidno, antimikrobno i antigljivično dejstvo (Judzientence i Buzelyte, 2006). Ispitivanjem i GS-MS analizom *Artemisia vulgaris* L. Izolovane su supstance: kamfor (16,8 %), α -tujon (11,3 %), germakren D (7,2 %), kampfen (6,5 %), 1,2-cineol (5,8 %) i β -kariofilin (5,4 %) (Sujatha et al., 2009).

Pelin pripada najčešće opisivanim biljkama i verovatno najčešće upotrebljenoj lekovitoj biljci za pospešenje probave i poboljšanje apetita. Pelin je sredstvo za jačanje (*tonicum*), on pobuđuje izlučivanje žuči iz jetre i otklanja veoma brzo sve probavne smetnje i nadimanja. Čaj od pelina preporučuje se bolesnicima kojima je operativnim putem uklonjena žučna kesa. Čaj od pelina odlično je sredstvo protiv grčeva u želucu i crevima, protiv katara želuca, hronične začepljenosti, proliva, prevelike kiseline u želucu, debljine, žutice, žgaravice, protiv žuto obloženog jezika i lošeg zadaha iz usta.

Budući da se izlučivanje bubrega u znatnoj meri pobuđuje pomoću eteričnog ulja sadržanog u pelinu, to se čaj od pelina može uzimati u malim količinama za lečenje katara mehura, a i kod upalnih nadražaja bubrega. Veće količine pripravaka nisu prikladne samo pri poslednjoj spomenutoj bolesti, jer prejako nadraživanje bubrega može čak zaustaviti

izlučivanje mokraćé i pojačati upalu bubrega. Kao isključivo gorka biljka, pelin deluje na stvaranje i poboljšanje krvi kao i na poboljšanje cirkulacije.

Mnogostruka lekovita dejstva pelina povoljno utiču na celokupni organizam tako da indirektno leče niz poteškoća koje direktno ne spadaju u područje lečenja pelinom. Nestaju teške smetnje u izmeni materije, debljina, šećerna bolest i duševne smetnje koje sve više ili manje imaju dublji uzrok u neredovnom radu probavnih organa, smetnjama u radu jetre, žuči i slezene i funkcijama ženskih polnih organa (Keršek, 2004).

2.2.4. Sladić (*Glycyrrhiza glabra*)



Glycyrrhizaglabra glabra L.

Sika 2.11. Sladić (*Glycyrrhiza glabra*)

Sistematika

Carstvo: *Plantae*
Razdeo: *Magnoliophyta*
Razred: *Magnoliopsida*
Red: *Asterales*
Porodica: *Fabaceae*

Podporodica: *Faboideae*
Rod: *Galegeae*

Vrsta: *Glycyrrhiza glabra* L.

Narodna imena: Sladić, glicirica, gospino zelje, patika, sladka korenica, sladko drvo, sladka trava, slatki bagrem.

Sladić je višegodišnja poludrvenasta biljka sa razvijenim korenom i stolonima koji dostižu i do 13 m dužine. Koren je spolja smeđe boje a iznutra je žut. Glavni koren vertikalno prodire u zemlju i iz njega se razvijaju mnogobrojni stoloni. Na svakom korenu

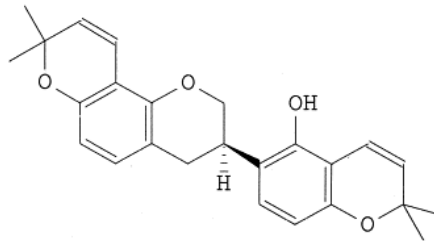
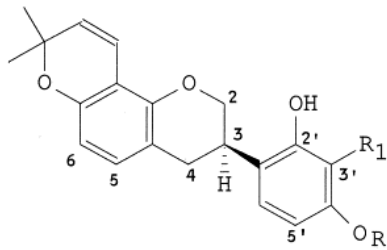
ima dva do pet stolona. Iz stolona koji se nalazi na površini, razvijaju se nove mlade biljke a iz njih se dalje razvijaju korenovi i stoloni. Na ovaj način se razvija veći broj biljaka koje su u gornjem delu razgranate, hrapave ili gusto pokrivenne dlakama i žlezdama, visoke su do 2 m. Stabljike su obrasle naizmenično postavljenim listovima koji su neparno perasto složeni sa 5-7 pari ovalnih listića celog oboda tako da podseća na bagrem. Listovi su jajastog oblika, dugački 2,5–5 cm. Cveta u maju, cvetovi su ljubičaste do plavoljubičaste boje, dužine oko 1 cm, formiraju grozdaste cvasti koje se sastoje od 20-30 cvetova. Plod je mahuna crvenkastosmeđe boje, dugačka 2-3 cm, sa 3-5 semenki. Seme je sitno. Masa 1.000 semenki iznosi oko 10 g (slika 2.11).

Lekovite supstance: Glavna lekovita supstanca je glicirizin, slađa je od šećera 50 puta, ima jednaka svojstva kao saponin, nerastvorna je, a njeno djelovanje ogleda se u rastvaranju i lakšem izlučivanju sluzi. Ona ne uzrokuje nikakav nadražaj na sluznicu. Koren nadalje sadrži azotna jedinjenja, malo tanina, masti, mnogo skroba, eterično ulje, gorke supstance, asparagin, malo oksalne kiseline, smole i flavonoide. Polisaharidi sladića sastoje se od: ramnoze, glukoze, arabinoze i galaktoze, pri čemu je glukoza najzastupljenija komponenta (Renije, 2008).

Preporučuje se kao sredstvo protiv kašlja kod tuberkuloze pluća i kao sredstvo za lečenje želuca.

Koren sladića i od njega dobiveni sok smiruje upale i grčeve. Koristi se u lečenju kašlja, kod gastritisa i čira na želudcu, upalnih procesa, problema sa jetrom, kod alergija, bronhitisa (Xu et al., 2002).

Koren je čest sastojak čajeva protiv kašlja i nagomilavanja sluzi, a i čajeva za želudac. Koristi se i sam koren sladića bez dodataka kao blago sredstvo za čišćenje. (Keršek, 2004). Koren sladića ima antibakterijsko delovanje prema *Staphylococcus aureus* (Christopher et al., 2005). U službenoj upotrebi su koren (*Liquiritiae radix*) i stoloni stari 3-4 godine. Koren sadrži glicirizin (do 15 %), kalijumovu i kalcijumovu so glicirinske kiseline, šećere (5-10 %), skrob (do 30 %), pektine. Sadrži fenolna jedinjenja (likviricin) od koga potiče žuta boja korena. Glicirizin je triterpenski saponozid koji se hidrolizom razlaže na gliceretinsku kiselinu (gliciretin) i dva molekula glikuronske kiseline (Kišgeci, 2002), (slika 2.12).

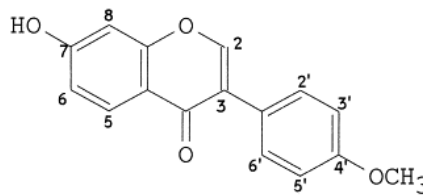
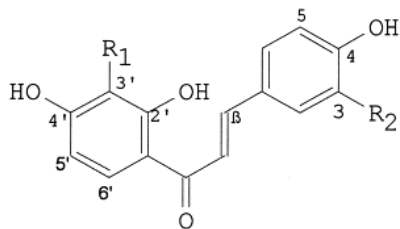


1 - Hispaglabridin A, $R=H, R_1=CH_2CH=C(CH_3)_2$

4 - Hispaglabridin B

2 - 4'-O-Methylglabridin, $R=CH_3, R_1=H$

3 - Glabridin, $R=R_1=H$



5- Isoprenylchalcone, $R_1=R_2=CH_2CH=C(CH_3)_2$

7- Formononetin

6- Isoliquiritigenin, $R_1=R_2=H$

Slika 2.12. Molekulske strukture izoflavana (1-4) halkona (5 i 6) i izoflavona (7) izolovanih iz korena sladića

2.3. HEMIJSKI SASTAV VINA

Alkoholno vrenje predstavlja vrlo složen biohemijski proces. Neki se sastojci samo delimično menjaju, dok drugi sasvim nestaju i prelaze u nova jedinjenja. Vino se sastoji najvećim delom od vode u kojoj je rastvoreno više od 1000 jedinjenja koja čine hemijski sastav vina. Na hemijski sastav vina utiču sledeći faktori: sorta vinove loze, stepen zrelosti grožđa, klimatski i zemljišni uslovi, primenjene agrotehničke mere i način vinifikacije.

Tabela 2.2. Važniji sastojci vina i njihove količine

PARAMETAR	SADRŽAJ
Voda, %	70 - 80
Etanol, g/l	50 - 130
Metanol i viši alkoholi, g/l	0,200 - 0,800
Glicerol, g/l	6 - 24
Kiseline, g/l	4 - 10
Ugljeni hidrati	1 - 250
Fenolna jedinjenja, g/l	0,2 - 4,0
Azotna jedinjenja, g/l	0,3 - 1,0
Aromatične materije, g/l	0,8 - 1,2
Aldehidi, g/l	0,01 - 0,1

2.3.1. Alkoholi

U vinu se nalazi veći broj alkohola, od kojih su jedni manje a drugi više zastupljeni i koji se po svojim osobinama znatno razlikuju među sobom. Od monovalentnih alkohola u vinu su zastupljeni: metanol, etanol i viši alkoholi, a od polivalentnih: 2,3-butilenglikol, glicerol i manitol.

Najznačajniji alkohol je etanol i predstavlja glavni proizvod alkoholne fermentacije. Fermentacijom šećera šire nastaje najčešće do 16 vol. % alkohola, a najviše 18 vol. %. Prisustvo ovog alkohola predstavlja jedan od pokazatelja kvaliteta vina. Količina stvorenog etanola zavisi od sorte i stepena zrelosti grožđa, klimatskih uslova tokom sazrevanja grožđa i dr. Kvalitetnija vina imaju veći sadržaj alkohola. Vino sa sadržajem alkohola do 10 vol. % je slabo, od 10 do 12 vol. % srednje jačine, od 12 do 15 jako i preko 15 vol. % vrlo jako. Vina sa većim sadržajem alkohola su stabilnija i lakše se čuvaju.

Metanol je bezbojna tečnost, po mirisu je sličan etanolu i odlikuje se velikom toksičnošću. Ovaj alkohol prelazi iz grožđa u vino. Nalazi se u sastavu pektinskih materija. Hidrolizom ovih jedinjenja pod uticajem enzima pektin esterase oslobađa se metanol. Sadržaj metanola zavisi od stepena zrelosti grožđa i od načina prerade, odnosno dužine maceracije. Pošto se pektinske materije najviše nalaze u čvrstim delovima grozda pa će i metanola biti više u onim vinima koja su fermentisala sa čvrstim delovima grozda, kao što je slučaj sa crvenim vinima. Vina proizvedena od grožđa zahvaćenog sivom plesni sadrže 1,5 do 3,5 puta veće količine metanola u odnosu na vina od zdravog grožđa (Jović, 2003). Maksimalna dozvoljena količina metanola za bela vina je 150 mg/l, a za crvena 300 mg/l.

Viši alkoholi u svom molekulu imaju više od dva ugljenikova atoma, jednovalentni su, a tačka ključanja je viša od tačke ključanja etanola. Glavni viši alkoholi koji nastaju u

toku alkoholne fermentacije su: n-propanol, izo-butanol, amilalkohol, izo-pentanol i feniletanol (u toku alkoholne fermentacije stvori se više od 90 % viših alkohola i oni su glavni deo arome vina koji se stvara u toku alkoholne fermentacije). Njihov sadržaj u vinu se kreće od 150 do 550 mg/l (Ribereau-Gayon et al., 1982; Jackson, 2000). Sadržaj viših alkohola do 300 mg/l deluje pozitivno na kompleksnost bukea vina (Ribereau-Gayon et al., 1999), a ako je veći (do 1g/l) predstavlja manu arome (Flanzy, 1998). Bistrenje šire i neki drugi postupci kojima se smanjuje sadržaj nerastvorljivih jedinjenja u širi (posebno proteina), može da utiče na finalni sadržaj viših alkohola u vinu, (2.2). Neki viši alkoholi imaju oštar i neprijatan miris a sa kiselinama daju estre vrlo prijatnih mirisa. Nastajanje (sinteza) viših alkohola zavisi od sorte, stepena zrelosti grožđa, sadržaja šećera i amino kiselina, koncentracije ostalih azotnih jedinjenja, načina vinifikacije, mutnoće šire, vrste i soja kvasca, temperature fermentacije i od sadržaja tiamina.

Postoji više hipoteza za tumačenje sinteze viših alkohola. Opšte je prihvaćeno da nastaju i od amino-kiselina i od šećera (odnosno od intermedijarnog metabolita α -keto kiselina, koje su dobijene ili od amino-kiselina ili od šećera). Dva su puta njihovog nastanka (Rodopulo, 1983): po jednom - katabolizam amino-kiselina pri čemu dolazi do njihove dekarboksilacije iza čega sledi redukcija nastalih α -keto kiselina (Erlich-ov put). Drugi put je anabolizam amino-kiselina preko odgovarajućih α -keto kiselina nastalih od šećera. Keto-kiseline, nastale reakcijama bilo anabolitske ili katabolitske prirode bivaju dekarboksilacijom i redukcijom prevedene u odgovarajuće više alkohole. Koji će od ovih puteva biti dominantan zavisi od izvora azota u širi: nedostatak asimilirajućeg azota izaziva akumulaciju α -keto kiselina i posledica je stvaranje više viših alkohola. U suprotnom slučaju (prisustvo u sredini veće količine amino-kiselina) stvaranje viših alkohola anaboličkim putem je inhibirano, ali se zato oni više stvaraju kataboličkim putem. Među višim alkoholima u vinu su najviše zastupljeni izo-pentanal i izo-pentanol, izo-butanol i propanol. Ostali viši alkoholi zastupljeni su u vrlo malim količinama, čak u tragovima. Ovi alkoholi nastaju u toku fermentacije od amino kiselina i šećera.

U toku alkoholne fermentacije, kao sekundarni proizvodi, nastaju polihidroksilni alkoholi (polioli): glicerol i 2,3-butandiol. Pored njih mogu da budu prisutni i tzv. šećerni alkoholi: eritritol, arabitol, ribitol, ksilitol, manitol, sorbitol i inozitol. Oni nastaju redukcijom odgovarajućih aldo ili keto šećera.

Glicerol je trohidroksilni alkohol koga posle etanola najviše ima u vinu. On je glavni predstavnik sekundarnih proizvoda alkoholne fermentacije. Nastaje redukcijom

dioksiacetonfosfata uz $\text{NADH} + \text{H}^+$ pre nastajanja etanala i njegova pojava vezana je za prvu fazu fermentacije). Nastaje glicerolfosfat koji se posredstvom glicerolfosfataze konvertuje u glicerol. Njegovo prisustvo je veoma značajno za kvalitet vina, jer vina sa više glicerola na ukusu su punija i harmoničnija. Sadržaj glicerola u vinu se kreće od 5 do 11g/l. Količina glicerola zavisi od soja kvasca, od sastava šire (više šećera - više glicerola), od temperature fermentacije (viša temperatura - više glicerola) i dr. Grožđe napadnuto plemenitom plesni sadrži veću količinu glicerola, često i do 15 i 20g/l (Ribereau-Gayon et al., 1999). Glicerol služi kvascima da im poveća otpornost na osmotski pritisak (Amerine i Joslyn, 1970). Glicerol se akumulira u citoplazmi ćelije, a višak prostom difuzijom prelazi u spoljnu sredinu, a utiče na senzorna svojstva vina i bogatstvo ukusa (Puchades et al., 1991; Verret et al., 2001). 2,3-butandiol je dvovalentni alkohol, koji se javlja kao sekundarni proizvod alkoholne fermentacije (nastaje iz produkata razgradnje šećera). Vino sadrži od 0,3 do 1,0 g/l a njegov sadržaj zavisi od količine šećera i od aeracije vina. U šeri vinima veći je sadržaj ovog alkohola. Ima slatkast ukus i doprinosi harmoničnosti ukusa (Ribereau-Gayon et al., 1999).

2.3.2. Ekstrakt vina

Ekstrakt predstavljaju svi neisparljivi sastojci vina. Ovi sastojci su vrlo različite hemijske prirode i u vinu se nalaze bilo u vidu pravih rastvora ili kao koloidi (Radovanović, 1986).

U vinu se razlikuju dva ekstrakta: ukupni ekstrakt i ekstrakt bez šećera. Ukupni ekstrakt je skup svih materija vina koje pod određenim fizičkim uslovima ne isparavaju. To su: glicerol, neprevreli šećeri, neisparljive kiseline, mineralne materije i dr. Ekstrakt bez šećera je vrednost ukupnog ekstrakta umanjena za vrednost redukujućih materija (šećera) iznad jednog grama.

Sadržaj ekstrakta u vinu je od velikog značaja za njegov kvalitet. Vina bogata u ekstraktu su puna i harmonična. Vina sa malim sadržajem ekstrakta su više „prazna“ i neharmonična. Sadržaj ekstrakta u vinu zavisi od više faktora. Jedan od faktora je sortna odlika. Kvalitetne sorte daju vina sa više ekstrakta, a sorte slabijeg kvaliteta manje. Zatim, na sadržaj ekstrakta u vinu utiču klimatski i zemljišni uslovi. Vina iz severnih krajeva i siromašnih zemljišta uglavnom sadrže manje ekstrakta, dok južni krajevi i plodnija zemljišta daju vina sa većim sadržajem ekstrakta. Na sadržaj ekstrakta u vinu utiče zdravstveno stanje grožđa (grožđe u vidu suvarka ili napadnuto od plemenite plesni daje vino sa više ekstrakta),

zatim način prerade grožđa (jačim ceđenjem kljuka prelazi više ekstraktivnih materija), kao i način vinifikacije (bela vina imaju manje ekstrakta od crvenih vina) i dr.

Granicu sadržaja ekstrakta u vinu propisuje zakon. Po Pravilniku o kvalitetu vina propisane su minimalne vrednosti ekstrakta bez šećera i to:

Bela vina	15 g/l
Roze vina	16 g/l
Crvena vina	18 g/l

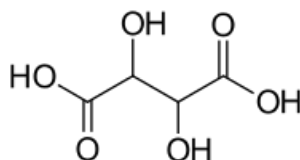
2.3.3. Ogranske kiseline

Kiseline vina su značajne za ukus i postojanost vina. Organske kiseline vina uglavnom potiču od grožđa. Manji deo kiselina nastaje u samom vinu, odnosno u toku alkoholne fermentacije. U aciditet vina organske kiseline ulaze kao neisparljive i isparljive kiseline. Vino ima manje kiselina od šire, jer se u procesu fermentacije i sazrevanja vina one smanjuju, a i menjaju se pojedine kiseline (Radovanović, 1986). Kiselost vina (izražena kao vinska) kreće se od 4,5 do 12 g/l.

2.3.3.1. Neisparljive kiseline

Najveći deo neisparljivih kiselina potiče iz grožđa. Iz grožđa u vino prelaze vinska, jabučna i limunska kiselina. Manji deo ovih kiselina nastaje u vinu kao međuprodukt ili konačan produkt alkoholne fermentacije: ćilibarna, pirogroždana, 2-keto-glutarna, C-4 do C-10 masne kiseline i isparljive kiseline: sirćetna i mravlja. Grožđe napadnuto gljivicom *Botrytis cinerea* sadrži glukonsku, sluznu i hidroksiglutarnu kiselinu. Mlečnom fermentacijom jabučne nastaje mlečna kiselina.

Vinova loza je jedna od malog broja biljaka u čijem lišću se sintetiše vinska kiselina a grožđe je jedini kultivisani plod koji u sebi akumulira značajnu količinu vinske kiseline. Radi se o stereo izomeru L(+) vinske kiseline čija koncentracija može da dostigne vrednost od 150 mM/l u širi od grožđa u šarku i 25 do 75 mM/l u širi zrelog grožđa (što odgovara 3,8 –11,3 g/l) (Flanzy, 1998), (slika 2.13).

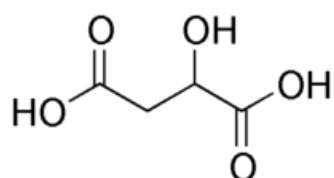


Slika 2.13. Vinska kiselina

Vinska kiselina je sekundarni metabolit šećera, odnosno sintetiše se iz glukoze, preko glukonske kiseline, kao međuproizvoda, u pentozo-fosfatnom ciklusu. Fazu razvića zelene bobice karakteriše brza akumulacija vinske kiseline što je u skladu sa intenzivnim razmnožavanjem ćelija bobice. U toku sazrevanja sadržaj vinske kiseline ostaje relativno postojan.

Odmah posle zametanja bobica vinska kiselina se nalazi uglavnom kao slobodna. Sa pridolaskom alkalija iz zemljišta u toku porasta bobice i sazrevanja grožđa ova kiselina prelazi u soli. U grožđu su prisutne kalijumove i kalcijumove soli vinske kiseline.

Vinova loza sadrži L(-) izomer jabučne kiseline. U lišću i mladoj zelenoj bobici dolazi do znatne akumulacije jabučne kiseline u toku faze porasta zelene bobice u količini od 15 do 25 g/l (Radovanović, 1986). Jedan deo ove kiseline potiče od direktne sinteze karboksilacijom pirogroždane kiseline, reakcijom koju katalizuje jabučni enzim čija je aktivnost veoma značajna pre šarka, (slika 2.14).



Slika 2.14. Jabučna kiselina

U toku sazrevanja grožđa, dolazi do značajnih promena u metabolizmu jabučne kiseline. U fazi tehnološke zrelosti, šira grožđa koje potiče iz severnijih krajeva sadrži 4-6,5 g/l jabučne kiseline, dok je u širi iz južnijih regiona koncentracija 1 – 2g/l. Ovaj pad tumači se korišćenjem jabučne kiseline za proizvodnju energije u grožđu i ona u toku sazrevanja grožđa predstavlja stvarni energetski supstrat.

Limunska kiselina je prirodno zastupljena u grožđanom soku u srazmerno niskim koncentracijama. Ona ima veoma važnu biohemijsku i metabolitičku ulogu u Krebsovom ciklusu trikarbonskih kiselina. U toku razvića bobica i sazrevanja grožđa sadržaj ove kiseline se ne menja mnogo i može se naći u koncentracijama do 0,3 – 0,4 g/l (Flanzy, 1998).

U organoleptičkom smislu kiseli ukus vina potiče od tri kiseline poreklom od grožđa (vinske, jabučne i limunske) i tri kiseline koje nastaju u toku alkoholnog vrenja ili mlečnog vrenja jabučne kiseline (sirćetne, mlečne i ćilibarne kiseline). Viši sadržaj vinske kiseline daje vinu tzv. „metalni karakter“, tvrdoću i utisak trpkosti. U vinima vrhunskog kvaliteta

sadržaj vinske kiseline nije visok. Viši sadržaj jabučne kiseline u vinu daje tzv. "zeleni karakter", a limunska kiselina kao da je vino zakišeljeno. Sirćetna kiseline se više oseća ako je u obliku estra - etilacetata; ćilibarna kiselina ima gorak i slani ukus a mlečna kiselina ima više nakiseo ukus.

Tabela 2.3. Organske kiseline u vinu i njihova promena u odnosu na širu (Jović, 2003)

Hemijski naziv	Strukturna formula	Promena u odnosu na širu	Sadržaj
Vinska kiselina	HOOC-CHOH-CHOH-COOH	smanjenje	2-5 g/l
Jabučna kiselina	HOOC-CH ₂ -CHOH-COOH	smanjenje	1- 4 g/l
Mlečna kiselina	HOOC-CHOH-CH ₃	novonastala	0,5- 5 g/l
Ćilibarna kiselina	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -COOH	novostvorena	0,6- 1,8 g/l
Pirogrždana kiselina	HOOC-CO-CH ₃	novostvorena	2-500 mg/l
2-Ketoglutarna kiselina	HOOC-CO-(CHOH) ₃ -CH ₂ OH	novostvorena	4 – 197 mg/l
Sirćetna kiselina	CH ₃ - COOH	novostvorena	0,2- 0,6 g/l
Limunska kiselina	HOOC- CH ₂ - C(HOH)-CH ₂ COOH	porast	0,1- 0,5 g/l
Glioksilna kiselina	HOOC-CH ₂ OH	porast	10-20 mg/l
Glicerinska kiselina	HOOC-CHOH-CH ₂ OH	novostvorena	1,2- 2 g/l
Sluzna kiselina	HOOC-(CHOH) ₄ -COOH	novostvorena	0,25-5,0 g/l
Glukonska kiselina	HOOC-(CHOH) ₄ -CH ₂ OH	porast	do 2 g/l
Galakturonska kiselina	HOOC-(CHOH) ₄ -CHO	porast	do 2 g/l

Mlečna kiselina se u vinu javlja u manjim količinama kao sekundarni proizvod alkoholne fermentacije, dok se veći deo ove kiseline stvara na račun jabučne kiseline pri jabučno-mlečnoj fermentaciji. Kao normalni sastojak vina ova se kiselina nalazi u količini od 0,5 do 2,5 g/l, dok u vinima u kojima je došlo do kvarenja ove kiseline ima znatno više (u vinima sa zaostalim šećerom može doći do mlečne fermentacije šećera i stvaranja većih količina mlečne kiseline).

Ćilibarna kiselina se nalazi u grožđu u malim količinama. Više je ima u vinu. Jedan deo ove kiseline u vinu nastaje kao sekundarni proizvod alkoholne fermentacije, a drugi deo nastaje iz glutaminske kiseline. U vinu se nalazi u količinama od 0,25 do 1,5 g/l.

2.3.3.2. Isparljive kiseline

Pod isparljivim kiselinama se podrazumeva grupa nižih masnih kiselina koje se nalaze u vinu. Nastaju u vinu uglavnom kao sekundarni proizvodi alkoholne fermentacije, a mogu nastati i u procesima kvarenja vina. U ove kiseline spadaju: mravlja, sirćetna, propionska, buterna, valerijanska i dr. Isparljive kiseline u vinu se izražavaju kao sirćetna kiselina

Poreklo sirćetne kiseline u vinu može biti različito. Prve količine ove kiseline javljaju se kao sekundarni proizvod alkoholne fermentacije. Na to utiču više faktora: kvasac, temperatura, sadržaj šećera, pristup vazduha. Sadržaj ove kiseline u vinu zavisi i od načina vinifikacije, tako da u belim vinima ove kiseline ima redovno manje nego u crvenim. Ovo dolazi zbog toga što su pri spravljanju crvenih vina komina pa i sam tečni deo više izloženi vazduhu, što omogućava jači razvoj bakterija sirćetne kiseline.

Količina isparljivih kiselina je karakteristični pokazatelj kvaliteta vina. Normalne količine sirćetne kiseline u vinu se kreću u granicama od 0,2 do 0,6 g/l. Sirćetna kiselina se može stvoriti i posle alkoholne fermentacije u toku čuvanja vina. Veće količine sirćetne kiseline u vinu nastaju kao rezultat delovanja bakterija koje stvaraju sirćetnu ili mlečnu kiselinu (količina isparljivih kiselina iznad 0,8 g/l siguran je znak početka kvarenja vina). Stvorena sirćetna kiselina se brzo esterifikuje do etilacetata koji vinu daje karakterističan miris.

2.3.4. Mineralne materije

Mineralne materije vinova loza uzima preko korena iz zemljišta. Nedostatak mineralnih materija dovodi do poremećaja u razviću bobice. Mineralne materije se uglavnom nalaze u čvrstim delovima bobice (1–2 % u pokožici; 0,2–0,4 % u mesu; 1–2 % u semenkama) i u peteljci (Flanzy, 1998). Sadržaj mineralnih materija (pepela) u širi kreće se od 3 do 5 g/l, a u vinu od 1,5 do 3 g/l. Mineralne materije u širi se nalaze u obliku soli neorganskih i organskih kiselina (vinske, jabučne mlečne i dr.). Oni su prisutni i u vinu, s tim što je sadržaj nekih sastojaka manji iz razloga smanjenja rastvorljivosti u toku alkoholne fermentacije i nege vina.

Količina mineralnih materija u grožđu i širi zavisi od sorte, zemljišta, stepena zrelosti grožđa, količine padavina tokom vegetacije i drugih faktora. U toku razvića i sazrevanja grožđa sadržaj mineralnih materija se stalno povećava. Prisustvo mineralnih materija u širi je veoma značajno i za proces alkoholne fermentacije (utiče na razmnožavanje kvasca).

Količina mineralnih materija u vinu zavisi od maceracije kljuka i postupka stabilizacije vina. Vino je siromašnije u mineralnim materijama od šire, zbog taloženja u vinu slabo rastvornih kalijum-hidrogen-tartarata, kalcijum-tartarata, a jedan deo mineralnih materija koristi i kvasac za vreme alkoholne fermentacije. Crvena vina sadrže više mineralnih materija od belih, jer se dobijaju vrenjem kljuka pri čemu mineralne materije prelaze iz čvrstih delova grozda u vino. Mineralne materije u vinu učestvuju u mnogim fizičko-hemijskim reakcijama) u stabilizaciji vina ili kao katalizatori oksido-redukcionih reakcija.

Mineralne materije se mogu podeliti s obzirom na njihov sadržaj i veoma različite osobine u tri grupe: glavni elementi, oligoelementi i elementi u tragovima.

Od glavnih elemenata prisutni su kalijum i natrijum, kao alkalni elementi i kalcijum i magnezijum, kao zemnoalkalni elementi.

Kalijuma ima do 1 g/hl i njegov sadržaj zavisi od prirode zemljišta, načina gajenja, sorte, podloge, klimatskih uslova, đubrenja i dr.

Sadržaj natrijuma se kreće od 10 do 250 mg/l i zavisi od tipa zemljišta, blizine mora i prirode vode koja se koristi za navodnjavanje.

Kalcijum u širi je zastupljeniji od magnezijuma, dok je u vinu obrnuto zbog taloženja kalcijuma u obliku kalcijumtartarata. Za razliku od soli kalijuma i kalcijuma, soli magnezijuma su rastvorljive i lakše prelaze iz čvrstih delova grozda.

Od anjona, najviše su prisutni fosfati, sulfati i hloridi. Od fosfata u širi i vinu dominira monokalijumfosfat a sadržaj se kreće od 0,5 do 2 g/l (Ribereau-Gayon et al., 1999). U crvenim vinima njihov sadržaj je veći nego u belim. Na sadržaj fosfata u grožđu ima uticaja đubrenje vinograda fosfornim đubrivima. Sadržaj sulfata u vinu kreće se od 100 do 400 mg/l i retko prelazi granicu od 700 mg/l, izraženo kao K_2SO_4 (Ribereau-Gayon et al., 1982). Na ovo može da utiče dodavanje amonijumsulfata i sumporisanje šire.

Od oligoelemenata u grožđu, širi i vinu prisutni su: gvožđe, bakar, bor, silicijum, aluminijum, mangan, brom, kobalt, nikel. Način gajenja vinove loze, đubrenje i zaštita vinove loze od bolesti i štetočina mogu da utiču na sadržaj oligoelemenata u grožđu, pa time u širi i u vinu. Pored toga, u toku prerade grožđa i proizvodnje vina može doći do obogaćivanja u nekim elementima.

2.3.5. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja predstavljaju veoma rasprostranjenu grupu biljnih metabolita, a mogu biti jednostavne ili vrlo složene strukture. Zajednička karakteristika fenolnih jedinjenja je da sadrže aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa (Robards et al., 1999). Grožđe sadrži širok spektar fenolnih jedinjenja u pokožici, mesnatom delu i semenkama (Gürbüz et al., 2007).

U vinu i grožđu su izolovana fenolna jedinjenja: fenolne kiseline (derivati cimetine i benzoeve kiseline), flavanoli (glikozidi kvercetina i kampferola), flavan-3-oli (epikatehin, katehin i njihovi derivati), dihidroflavanoli, antocijani (cijanidin, malvidin, petunidin, peonidin i delfinidin), (German et al., 1997).

Fenolna jedinjenja je Spranger (1993) svrstao u grupe:

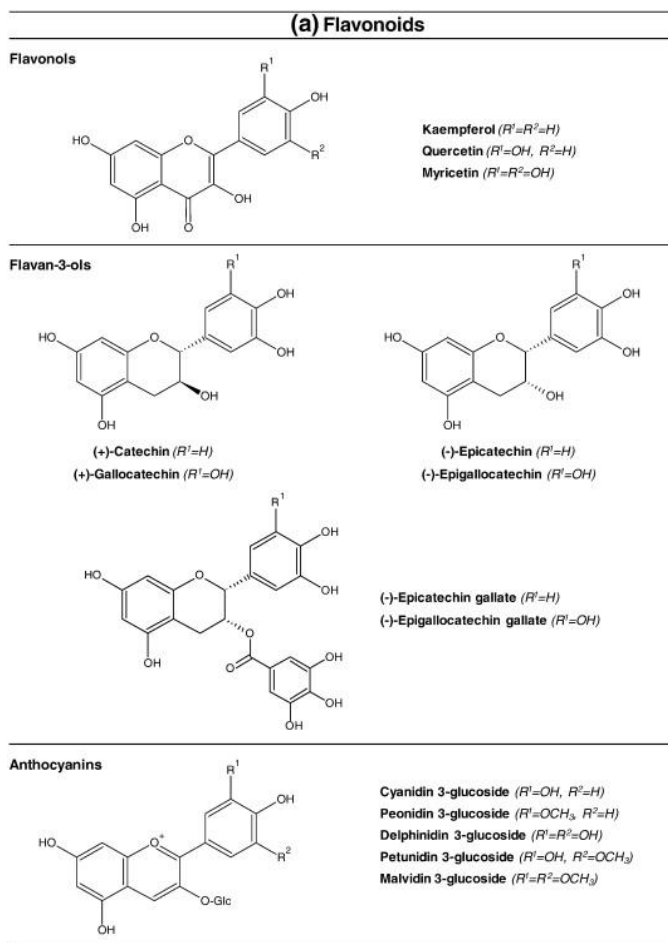
1. Flavonoidi
2. Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture
3. Isparljiva fenolna jedinjenja

U biljkama polifenoli obavljaju funkcije koje imaju veliki uticaj na ekofiziologiju biljaka: deluju kao antioksidansi, antimikrobni agensi, fotoreceptori, kao zaštita biljnih tkiva od UV-zračenja (Pietta, 2000; Fang et al., 2002; Heim et al., 2002).

2.3.5.1. Flavonoidi

U striktnom smislu, a na osnovu strukture fenil-2-benzopirona u grožđu su prisutni prvenstveno flavonoli, dok se u širem smislu ovde ubrajaju i antocijani i flavan-3-oli (3-flavanoli). U manjoj količini u grožđu su prisutni i dihidroflavanoli (flavanonoli), a u lišću flavoni.

U osnovnoj strukturi C₆-C₃-C₆ flavonoidi imaju 15 C atoma, devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C) (Cook i Samman, 1996), (slika 2.15). Ostalih 6 C atoma čine benzenski prsten B koji je povezan sa benzopiranoznim prstenom na poziciji dva (flavoni, flavani, flavonoli, dihidroflavoni, katehini i antocijanidini), tri (izoflavonoidi), i četiri (fenilkumarini).



Slika 2.15. Osnovne grupe flavonoida

Flavonoidi su heterociklična jedinjenja po svojoj strukturi koja se mogu izvesti iz hromana i hromona, (slika 2.16).



Slika 2.16. Strukturna formula hromana i hromona

Promenom oksidacionog stanja alifatičnog niza odnosno heterocikličnog prstena nastaju različite klase ovih jedinjenja sa istom osnovnom strukturom:

- *Halkoni*
- *Dihidrohalkoni*
- *Katehini*
- *Leukoantocijanidini*
- *Flavonoidi*
- *Flavanonoli*
- *Flavoni*
- *Flavonoli*

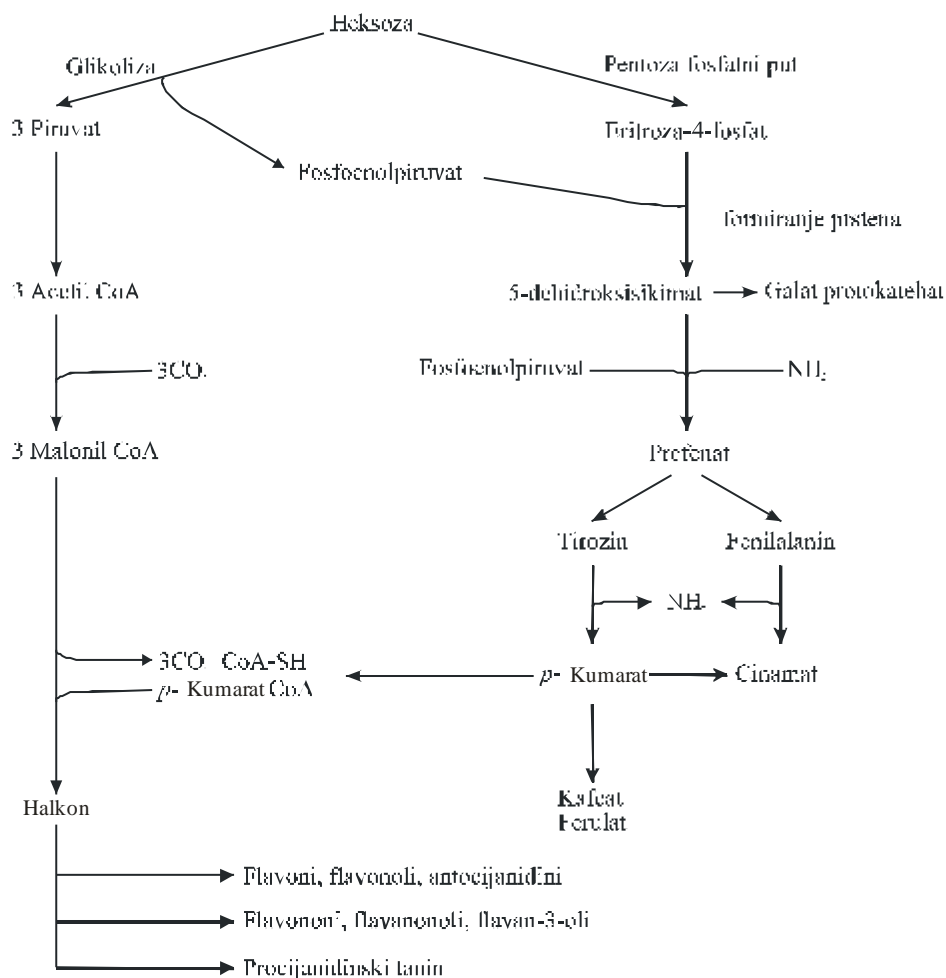
- *Auroni*
- *Antocijani*

Flavonoidi su veoma rasprostranjeni i često se javljaju u biljnom carstvu, od najprimitivnijih biljaka (zelene alge) do viših biljaka (Iwashina, 2000). Često se nalaze i u tkivu mladih biljaka. Flavonoidi se javljaju u svim delovima biljaka, uključujući listove, koren, drvo, koru, polen, nektar, cveće, bobice i semenke (Markham, 1982; Harborne, 1989). Generalno, flavonoidi su prisutni kao glikozidi u vakuolama cveća, lišća, stabljici ili korenu (Iwashina, 2000). Flavonoidi imaju veoma veliku ulogu kod biljaka, a naročito antocijani koji su intenzivno obojeni flavonoidi i javljaju se kao kopigmenti boji cveća i voća ali se retko javljaju u drveću (Harborne, 1989; Strack, 1997). Cveće koje oprašuju ptice je često crveno zahvaljujući prisustvu antocijana, dok je cveće koje oprašuju insekti često žuto kao rezultat akumuliranja flavonoida (ili karotenoida) (Parr i Bolwell, 2000). Flavonoidi, naročito flavoni i flavonoli, štite biljke od oštećenja UV radijacijom. Oni se pojavljuju u najvećoj količini u delu biljke koji je izložen jakoj svetlosti (Harborne i Williams, 2000; Parr i Bolwell, 2000).

Dokazano je da flavonoidi doprinose otpornosti na bolesti, bilo kao gradivni antifungalni agensi ili kao fitoaleksini (Harborne i Williams, 2000). Veliki broj raznovrsnih struktura flavonoida javljaju se kao rezultat modifikacija kao što su: dimerizacije, O-metilovanja hidroksilnih grupa, hidroksilovanja, vezivanje neorganskog sulfata a kao najvažnija je glikozilovanje hidroksilnih grupa (nastajanje O-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glikozida). U grožđu su ovi molekuli prisutni u monoglikozidnoj formi sa ostacima šećera na OH-grupi u poziciji C-3 na prstenu C (Flamini, 2003).

Flavonoidi su potencijalni antioksidansi, hvatači slobodnih radikala, helatori metalnih jona i inhibitori lipidne peroksidacije. Takođe, pripisuju im se i brojna biološka svojstva uključujući antiinflamatornu, antialergijsku, antikancerogenu, antihipertenzivnu i antimikrobnu aktivnost (Rodriguez, 2007). Iz ove grupe jedinjenja u crvenom vinu su najzastupljeniji antocijani, flavanoli (katehini) i flavonoli (kvercetin i rutin) (McDougall, 2005).

Na slici 2.17. je prikazana biosinteza fenolnih jedinjenja. Flavonoidi nastaju mešovitim biosintetskim putem. Prstenovi A i C nastaju acetogeninskim putem, a prsten B putem šikimske kiseline. Prvi prekursori tokom biosinteze flavonoida su halkoni koji izomerizacijom daju flavanone. Nizom složenih biohemijskih reakcija, u prisustvu tri različite oksigenaze nastaju ostale grupe flavonoida (Lea i Leegood, 1999).



Slika 2.17. - Biosinteza fenolnih jedinjenja (Ribereau-Gayon et al., 1998)

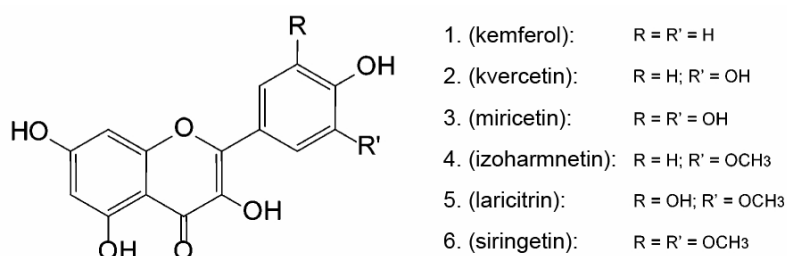
Benzenov prsten nastaje kondenzacijom eritroze-4-fosfat, kao intermedijarnog proizvoda pentozofosfatnog ciklusa sa fosfoenolpirogrožđanom kiselinom. Ovaj put biosinteze je poznat kao put šikiminske kiseline i vodi ka stvaranju benzoeve i cimetine kiseline, kao i aromatičnih amino-kiselina: fenilalanina i tirozina (slika 16). Jedan od prstenova formira se od šećera preko šikiminske kiseline. Ovaj prsten će formirati fragment C₆ – C₃ i biće uveden u strukturu flavonoida pod vidom p-kumarne kiseline. Kondenzacijom tri molekula sirćetne kiseline aktivirane u acetil-CoA, nastalih u Krebsovom ciklusu i koji se pod uticajem enzima acetil-CoA-karboksilaze transformiše u molekule malonil-CoA, nastaje takođe benzenov prsten. On reaguje sa karboksilnom grupom p-kumarne kiseline i formira se halkon, koji je zajednički za celu grupu flavonoida. Na putu sinteze fenolnih jedinjenja značajan je enzim fenilalaninamonijum liaza koja eliminacijom NH₃ radikala skreće fenilalanin sa puta sinteze proteina ka nastajanju transcimernih kiselina i ostalih

fenolnih jedinjenja. Nizom složenih biohemijskih reakcija, u prisustvu tri različite oksigenaze nastaju ostale grupe flavonoida (Lea i Leegood, 1999).

2.3.5.1.1. Flavonoli

Flavonoli su flavonoidi koji se u mnogim biljkama nalaze u obliku glikozida. To su žuti pigmenti koji određuju boju kod belih vina a kod crvenih vina oni su maskirani crvenim pigmentima-antocijanima. Sinteza flavonoida se odvija u pokožici bobice grožđa (Price et al., 1995). U B prstenu flavonola hidroksilne grupe se mogu naći u položajima C-4 i C-3'; C-4' i C-3'; C-4' i C-5'. U grožđu i vinu prisutni su kampferol, kvercetin i miricetin.

U grožđu, flavonoli se nalaze u obliku 3-glikozida, a u vinu se nalaze i aglikoni nastali kao rezultat hidrolize u kiselj sredini. Najzastupljeniji šećer je glukoza vezana za C-3 atom kvercetina, kempferola, miricetina i izorhamnetina (Cheynier i Rigaud, 1989). U grožđu se u najvećoj količini nalazi kvercetin-3-O-7-glukozid, i kvercetin-3-O-glukuronid (Price et al., 1995; Downey et al., 2003). Kvercetin se u grožđu nalazi i kao 3-ramnozilglukozid (rutin), 3-glukozilgalaktoza i 3-glukozilksilozid kao i drugi kampferol 3-glikozidi uključujući 3-glukozilarabinozid i 3-galaktozid (Cheynier et al, 2003), (slika 2.18). Na sadržaj flavanola utiče i debljina pokožice grožđa, sa debljom pokožicom veća je i količina flavonola (McDonald et al., 1998), a takođe utiče i osunčanost grožđa. Grožđe iste sorte vinove loze može sadržati i do 10 puta više flavonola ako je bilo izloženo suncu u odnosu na grožđe koje se nalazilo u senovitim delovima čokota. U grožđu se flavonoli nalaze kao 3-glikozidi a u vinu se nalaze i u obliku aglikona koji nastaju njihovom hidrolizom u kiselj sredini. Najzastupljeniji šećer je glukoza koja je vezana za C-3 ugljenikov atom kemferola, kvercetina, miricetina i izoramnetina. Flavonoli utiču i na kvalitet crvenih vina jer stabilizuju flavilijum oblike antocijana u mladim crvenim vinima reakcijama ko-pigmentacije.



Slika 2.18. Strukture flavonola grožđa

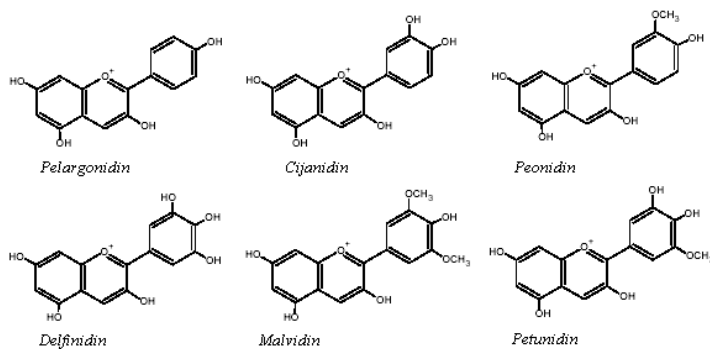
2.3.5.1.2. Antocijani

Antocijani pripadaju flavonoidnoj grupi polifenola. Imaju C₆-C₃-C₆ kostur tipičan za flavonoide. Antocijani su glikozilovani polihidroksi i polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilium katjona odnosno flavilijum katjona (Brouillard, 1982). Glavni deo antocijana je njegov aglikon, flavilijum katjon, koji sadrži konjugovane dvostruke veze odgovorne za absorpciju svetlosti pri talasnim dužinama od oko 500 nm, što omogućava pigmentu da se ljudskom oku čini crvenim. Aglikoni se nazivaju antocijanidini, a obično su penta (3,5,7,3',4') ili hekza supstituisani (3,5,7,3',4',5'). Danas su poznata 22 različita antocijanidina, ali samo njih 6 je značajno za hranu (Francis, 1989).

Najznačajniji antocijanidini su pelargonidin, cijanidin, peonidin, delphinidin, malvidin i petunidin. Ovi se aglikoni međusobno razlikuju po broju hidroksilnih i metoksilnih grupa na B prstenu flavilijum katjona. Antocijanidini se kao takvi retko nalaze u prirodi. U obliku glikozida odnosno antocijana nalaze se u cveću, voću itd. Antocijani su mnogo stabilniji i rastvorljiviji u vodi od antocijanidina zbog glikozilovanja (Robinson i Leon, 2005). Najčešće vezani šećeri na antocijane su monosaharidi: glukoza, ramnoza, galaktoza, arabinoza i ksiloza. Od disaharida i trisaharida: rutinoza, soforoza, sambubioza i glukorutinoza (Kähkönen et al., 2003).

Antocijani mogu biti i acilovani. Organske kiseline, koje su vezane na antocijanin glikozil jedinicu preko estarskih veza jesu ili aromatične fenolne kiseline ili alifatične dikarboksilne kiseline ili njihova kombinacija. Najčešće fenolne kiseline su derivati hidroksićilbarne kiseline (kumarinska kiselina, ferulna, kafena kiselina i sinapinska kiselina) i hidroksibenzojeve kiseline (npr. galna kiselina). Najčešće alifatične kiseline su malonska kiselina, sirćetna kiselina, jabučna kiselina, ćilibarna kiselina i oksalna kiselina (Francis, 1989; Cabrita et al., 2000).

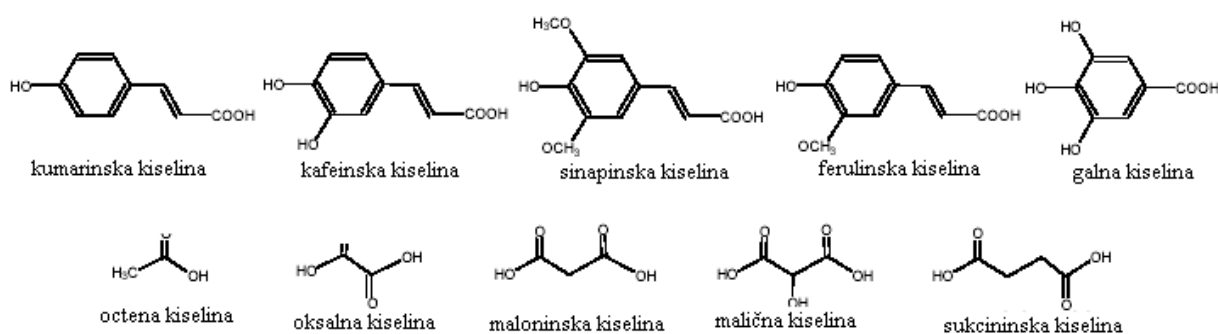
Na slici 2.19. prikazane su strukture najznačajnijih prirodnih antocijanidina.



Slika 2. 19. Najznačajniji prirodni antocijanidini (Kopjar, 2007.)

Antocijanidini se kao takvi retko nalaze u prirodi. U obliku glikozida odnosno antocijana nalaze se u cveću, voću itd. Antocijani su mnogo stabilniji i rastvorljiviji u vodi od antocijanidina zbog prisustva šećerne komponente u molekulu (Robinson i Leon, 2005).

Na stabilnost boje antocijana utiču: pH, rastvarač, temperatura, koncentracija antocijana i struktura, kiseonik, svetlost, enzimi i drugi prisutni sastojci. Glikozilne jedinice i acilne grupe vezane na aglikon, mesto vezivanja imaju značajan uticaj na stabilnost i reaktivnost antocijana. Mesto supstitucije na antocijanidinu, broj i pozicija hidroksilnih i metoksilnih grupa na aglikonu utiču na hemijsko ponašanje antocijana (slika 2.20).



Slika 2.20. Najčešće aromatske fenolne kiseline i alifatske dikarboksilne kiseline koje se vezuju na antocijanin glikozil jedinicu (Kopjar, 2007.)

Povećano hidroksilovanje na aglikonu stabilizuje antocijanidin; delfinidin je stabilniji od cijanidina u zakišljenom metanolu (Dao et al., 1998). Ipak, postoje odstupanja od pravila uticaja hidroksilovanja aglikona na stabilnost molekula. U puferском rastvoru pH 3,1 cijanidin 3-glukozid je stabilniji od pelargonidin 3-glukozida, ali je delfinidin 3-glukozid manje stabilan nego cijanidin 3-glukozid. Takođe, petunidin 3-glukozid, sa dve hidroksilne grupe na B prstenu je manje stabilan nego peonidin 3-glukozid koji ima samo jednu hidroksilnu grupu u istom prstenu (Cabrita i sar., 2000). Povećanjem metilovanja hidroksilnih grupa smanjuje se stabilnost antocijana. Metoksi grupe na C-4' i C-7 smanjuju stabilnost pigmenta u odnosu na pigmente s hidroksilnim grupama u istom položaju (Mazza i Brouillard, 1987). U puferском rastvoru cijanidin 3-glukozid je stabilniji nego petunidin 3-glukozid koji ima jednu metoksi grupu više (Cabrita et al., 2000).

Prisutnost hidroksilnih i metoksi grupa ne utiče samo na stabilnost antocijana, već i na boju. Boja antocijana se menja od ružičaste prema plavoj kako se broj hidroksilnih grupa povećava (Mazza i Brouillard, 1987). Glikozilnom supstitucijom postiže se stabilniji molekul antocijanina, ali na stabilnost utiče i sama pozicija glikozilovanja ali i vrsta glikozilne jedinice (Timberlake i Bridle, 1966.; Starr i Francis, 1968). Antocijani brusnice s

galaktozom su stabilniji nego s arabinozom tokom skladištenja (Starr i Francis, 1968). Broennum-Hansen i Flink (1985) su otkrili da su antocijani koji sadrže disaharid, sambubiozu, stabilniji od onih koji sadrže monosaharid, glukozu (Broennum-Hansen i Flink, 1985). Smatra se da je spora hidroliza 3-glikozilnih jedinica antocijana u kiselim uslovima odgovorna za bolju stabilnost ovih pigmenata (Mazza i Brouillard, 1987). Antocijan 3-glukozidi su jače obojeni nego 3,5-glukozidi i 5-glukozidi (Kähkönen et al., 2003). Povećanje broja glukoznih jedinica uzrokuje stvaranje pigmenta žute boje (Giusti et al., 1999).

Veoma važna karakteristika antocijana je što kiseonik u heterocikličnom prstenu može da ima pozitivno naelektrisanje. Zbog ove osobine antocijani se ponašaju kao katjoni u kiseloj sredini i grade soli sa kiselinama, a u alkalnoj sredini ponašaju se kao anjoni i grade soli sa bazama. Na boju antocijana utiču pH sredine, kompleksiranje sa metalima, prisustvo tanina i dr.

Boja antocijana zavisi i od broja hidroksilnih grupa vezanih za B prsten, tako da je delfidin ljubičaste boje, cijanidin tamnocrven a pelargonidin oranž-crven. Metilovanjem hidroksilnih grupa na B prstenu povećava se intenzitet boje (Grujić-Injac i Lajšić, 1998).

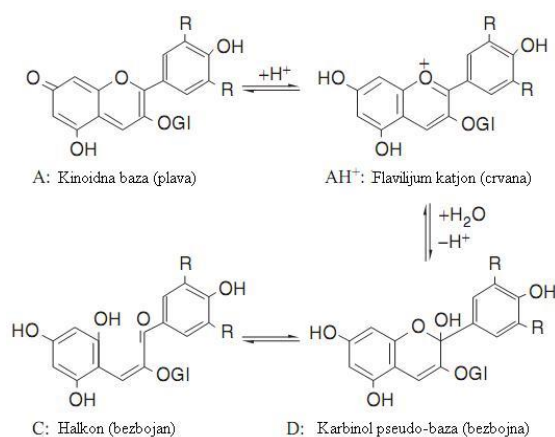
Antocijani su odgovorni za boju crvenih sorti grožđa i crvenih vina. Nalaze se u spoljašnjim slojevima pokožice bobica grožđa, najčešće u vakuolama ili antocijanoplastima, a kod nekih sorti kao što su bojadiseri antocijani se nalaze i u pulpi bobica.

Najznačajniji antocijani su 3-O-glukozidi cijanidina, delfinidina, peonidina, petunidina i malvidina. U toku procesa prerade grožđa, tokom fermentacije i maceracije antocijani se ekstrahuju iz pokožice i prelaze u širu i vinu daju boju. Intenzitet boje crvenih vina zavisi od sorte grožđa, tj., od sadržaja antocijana u grožđu. Intenzitet boje vina zavisi i od uslova maceracije a takođe i od uslova gajenja grožđa jer vina dobijena od iste sorte grožđa razlikuju se po sadržaju antocijana u zavisnosti od geografskog područja u kome je odgovarajuća sorta vinove loze gajena. Boja vina zavisi i od načina prerade kao što je temperatura maceracije i dužina trajanja maceracije, količina dodatog sumpor-dioksida i količina dodatog bojadisera ako je dodat radi korekcije boje vina.

Antocijani su stabilniji u kiseloj sredini nego u alkalnoj sredini. Pokazuju široki raspon boja zavisno od pH vrednosti. Jonska priroda antocijana omogućava promenu strukture molekula s obzirom na pH, što rezultira različitim bojama i nijansama boja pri različitim pH vrednostima (Von Elbe et al., 1996; Brouillard, 1982).

U kiselim vodenim rastvorima antocijani postoje u četiri glavna oblika: hinoidna baza (A), flavilijum katjon (AH^+), halkon (C) i karbinol pseudo-baza (D) (slika 2.21). U vrlo

kiseloj sredini crveni flavilijum katjon je dominantan oblik. Povećanjem pH dolazi do smanjenja intenziteta boje i koncentracije flavilijum katjona zbog hidratacije preko nukleofilnih veza, te nastaje bezbojni karbinolni oblik. Karbinolni oblik gubi konjugovane dvostruke veze između A i B prstena i ne absorbuje vidljivu svetlost (Brouillard, 1982). Takođe dolazi do brzog gubitka protona s flavilijum katjona kako pH dalje raste i nastaje obojeni gvinoinalni oblik. Relativna količina svakog oblika varira zavisno od pH i strukture svakog antocijana (Mazza i Brouillard, 1987; Jackman et al., 1987).



Slika 2.21. Četiri glavna oblika antocijana u vodenom medijumu

Na stabilnost antocijana utiče i temperatura. Brzina degradacije antocijana se povećava tokom procesiranja i skladištenja kako se temperatura povećava (Broennum-Hansen i Flink, 1985; Giusti et al., 1999). Povećanje temperature u pH intervalu 2-4 izaziva gubitak glikozilnih jedinica antocijana hidrolizom glikozidne veze, što dovodi do gubitka boje antocijana s obzirom da su aglikoni manje stabilni od svojih glikozidnih oblika. Stvaranje halkona je prvi korak tokom termičke degradacije antocijana (Adams, 1973; Markakis et al., 1957). Termička degradacija vodi ka stvaranju smeđih pigmenta, posebno u prisustvu kiseonika.

Kiseonik pojačava uticaj drugih degradacionih procesa antocijana. Štetan uticaj kiseonika na antocijane se može manifestovati kroz direktnu oksidaciju i/ili indirektnu oksidaciju gde oksidovane komponente medijuma (sredine) dalje reaguju s antocijanima, pa se stvaraju bezbojni ili smeđi produkti (Jackman et al., 1987). Antocijani reaguju i sa radikalima kiseonika odnosno s peroksi radikalima. U takvim reakcijama antocijani deluju kao antioksidansi, pa se smatra da je to svojstvo antocijana odgovorno za njihov pozitivan

uticaj na kardiovaskularna oboljenja (Matsufuji et al., 2003; Rossetto et al., 2004; Garcia-Alonso et al., 2004).

Svetlost utiče na antocijane na dva različita načina. Neophodna je za biosintezu antocijana, ali i ubrzava njihovu degradaciju (Markakis, 1982). Boja antocijana se očuva mnogo bolje kada se proizvodi čuvaju u mraku.

Inaktivacija enzima poboljšava stabilnost antocijana (Garcia-Palazon et al., 2004). Enzimi koji najčešće uzrokuju degradaciju su glikozidaze, koji raskidaju kovalentnu vezu između glikozilnih jedinica i aglikona što dovodi do degradacije vrlo nestabilnog antocijanidina, zatim peroksidaze i fenolaze kao što su fenol-oksidaza i polifenol-oksidaza koji prirodno postoje u voću (Kader et al., 1997; Pifferi i Cultrera, 1974). Kod enzimske degradacije antocijana, hinoni imaju vrlo značajnu ulogu. Enzimi najpre oksiduju druge fenolne materije u medijumu do odgovarajućih hinona koji zatim reaguju s antocijanima i dolazi do njihove degradacije i stvaranja smeđih produkata kondenzacije.

Šećeri su prirodno prisutni u voću, a vrlo često se dodaju tokom dobijanja različitih proizvoda na bazi voća. Šećer, kao i njegovi produkti degradacije smanjuju stabilnost antocijana. Reakcijom između antocijana i degradacionih produkata šećera i askorbinske kiseline nastaju smeđi pigmenti (Krifi et al., 2000). Takođe je ustanovljeno da šećer može i štiti antocijane. Ustanovljeno je da saharoza štiti antocijane tokom skladištenja zamrzavanjem i sprečava posmeđivanje i stvaranje polimera verovatno zbog inhibicije enzimskih reakcija, ili zbog smanjenja aktiviteta vode (Wrolstad et al., 1990).

Boja antocijana se može stabilizovati i pojačati kopigmentacionim reakcijama. Iako su antocijani obojeni u prirodi, njihov obojeni oblik je jako stabilizovan drugim prirodnim komponentama tzv. kopigmentima, koji postoje u ćelijama cveća i voća (Brouillard, 1982).

Kopigmentacija može biti vrlo korisna odnosno prirodan način za poboljšanje boje prehrambenih proizvoda bogatih antocijanima. Uočeno je da je kopigmentacija intenzivnija u sokovima bobičastog voća nego s čistim antocijanima tih sokova, a što upućuje na činjenicu da i druge materije soka imaju ulogu u fenomenu kopigmentacije (Wilska-Jeszka i Korzuchowska, 1996).

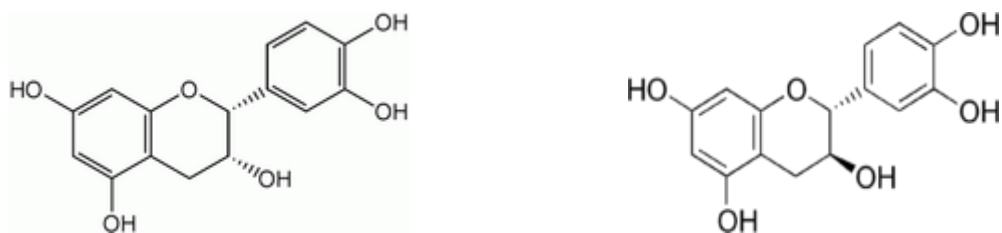
Kopigmentacija se može odvijati na nekoliko načina. Najznačajniji mehanizmi kopigmentacije su formiranje inter-molekularnih i intra-molekularnih kompleksa. Međusobno povezivanje i stvaranje metalnih kompleksa su takođe mogući mehanizmi za stvaranje kopigmenata.

Antocijani su zaslužni i za obojenost crvenih i roze vina, koja pored grožđa predstavljaju važan izvor ove klase flavonoida u ishrani. Međutim, utvrđeno je da tokom

starenja vina dolazi do obrazovanja novih najčešće narandžasto obojenih, kopigmenata reakcijom antocijana sa drugim bezbojnim polifenolima, karbonilnim jedinjenjima, jonima metala, proteinima i ugljenim hidratima (Seabra et al., 2008). Struktura antocijana omogućava im izuzetnu reaktivnost kako ka elektrofilima tako i prema nukleofilima (Gould et al., 2009).

2.3.5.1.3. Flavan-3-oli

Flavanoli i flavan-3-oli se nalaze u čvrstom delu bobice grožđa (drška, pokožica, seme) i nalaze se u monomernim, oligomernim i polimernim oblicima, (oligomerni i polimerni oblici su proantocijanidini ili kondenzovani tanini). Monomerni oblici u vinu su katehin i epikatehin, prikazani na slici 2.22. Poseduju antioksidativnu aktivnost, a katehin inhibira LDL oksidaciju i agregaciju trombocita (Monagas et al., 2005).

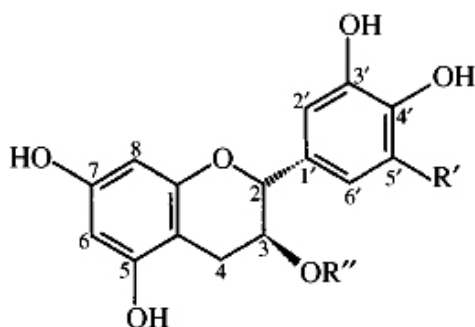


Epikatehin

Katehin

Slika 2.22. Hemijske strukture katehina i epikatehina

Flavan-3-oli su gradivne jedinice kondenzovanih tanina. Tanini su polikondenzovana jedinjenja oporog ukusa i velikih molekulskih masa. Na osnovu strukture tanini se dele na: kondenzovane tanine i hidrolizovane tanine (galotanini i elagitanini). Na slici 2. 23 prikazana je struktura flavan-3-ola. Kondenzovani tanini (proantocijanidoli ili proantocijanidini) se sastoje iz dve ili više jedinica flavan-3-ola ili flavan-3,4-diola. Najčešće jedinice proantocijanidola su (+) katehin sa 2,3 trans položajem supstituenta i (-) epikatehin sa 2,3 cis položajem supstituenta.



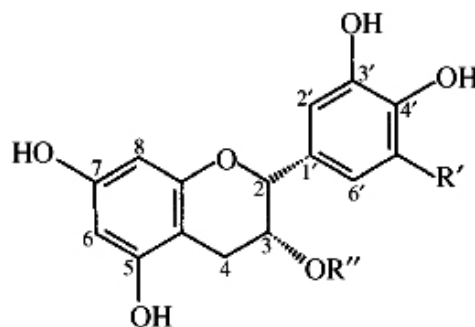
Katehin serija

$R' = H, R'' = H$: (+)-katehin (2R,3S)

$R' = H, R'' = H$: (-)-katehin (2S,3R)

$R' = OH, R'' = H$: galokatehin

$R' = H, R'' =$ galna kiselina:
katehin-3-O-galat



Epikatehin serija

$R' = H, R'' = H$: (+)-epikatehin (2S,3S)

$R' = H, R'' = H$: (-)-epikatehin (2R,3R)

$R' = OH, R'' = H$: epigalokatehin

$R' = H, R'' =$ galna kiselina:
epikatehin-3-O-galat

Slika 2.23. Struktura flavan-3-ola

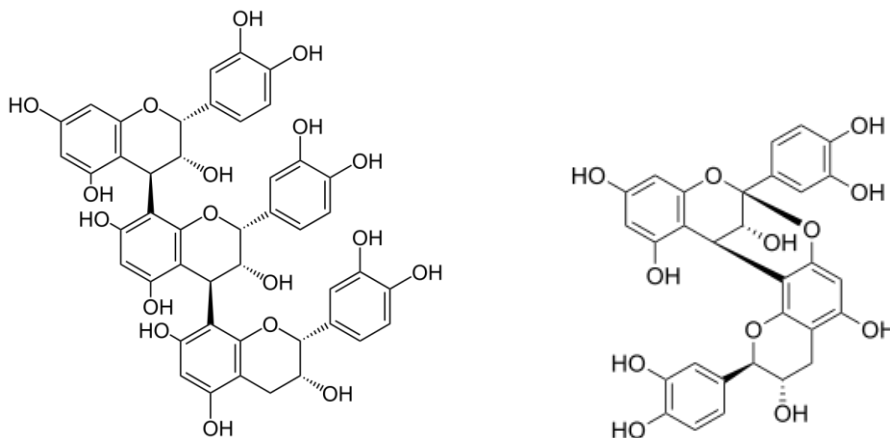
Razlikuju se 3 serije flavan-3-ola u zavisnosti od broja OH grupa u prstenu B i od položaja supstituenata na C₂ i C₃ atomu (Kovač et al., 1991), (tabela 2.4).

Tabela 2.4. Serije flavan-3-ola u zavisnosti od položaja hidroksilnih grupa

SERIJA	POLOŽAJ OH GRUPE
afzelenska	5, 7, 4`
katehinska	5, 7, 3` i 4`
galokatehinska	5, 7, 3`, 4` i 5`

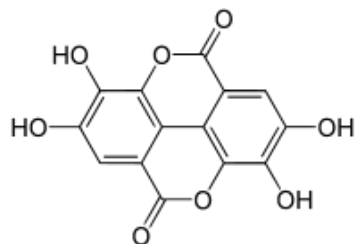
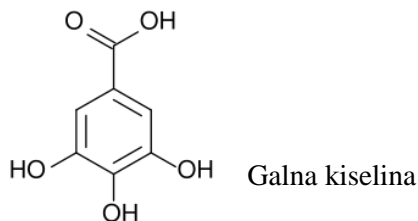
Katehini su najznačajniji jer su najrasprostranjeniji u biljnom svetu, nalaze se u slobodnom obliku a mogu biti esterifikovani najčešće galnom kiselinom. U grožđu i vinu se nalaze (+)-katehin, (-)-epikatehin, epikatehin-3-O-galat (Lee et al., 1987; Czochanska et al., 1979) i epigalokatehin (Tsai et al., 1969; Yang, 2001) i njihovi oligomeri: dimeri i trimeri.

Na slici 2.24. prikazana je struktura dimera proantocijanidola.

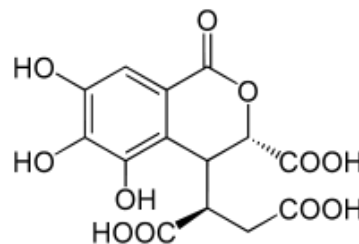


Slika 2.24. Struktura dimera proantocijanidola

Delimičnom hidrolizom tanina koji predstavljaju estre šećera i fenolnih kiselina ili njihovih derivata dobijaju se monomeri. Šećerna komponenta je glukoza, a u nekim slučajevima su identifikovani i polisaharidi. Hidrolizovani tanini se dele u dve podgrupe: galotanine i elagitanine.



Elaginska kiselina



Hebulinska kiselina

Slika 2.25. Fenolne kiseline

Galotanini su estri galne kiseline i m-galne kiseline i glukoze ili polisaharida. Ova jedinjenja mogu da sadrže i 1-galoil-, 3,6-digaloil- i 1,3,6-trigaloilglukozu dobijenih hidrolizom ili delimičnom degradacijom kompleksnih molekula. Na slici 2.25. prikazana je struktura fenolnih delova hidrolizovanih tanina. Galna kiselina se nalazi u semenkama i pokožici grožđa i prirodni je sastojak vina. Elagitanini su estri elaginske kiseline, hebulinske

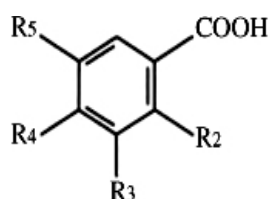
kiseline ili heksahidroksidifenske kiseline i glukoze. Ovi tanini nisu prirodni sastojci grožđa i predstavljaju komercijalne tanine koji se koriste kao aditivi.

2.3.5.2. Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture

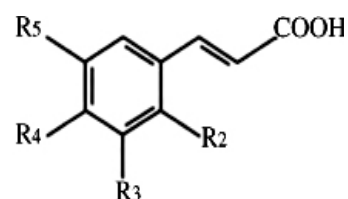
Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture (fenolne kiseline i stilbeni) sadrže C₆-C₁, C₆-C₃ ili C₂-C₆ osnovni skelet. Fenolne kiseline su derivati benzojeve i cimetine kiseline (slika 2.26).

Derivati benzojeve kiseline kao što su: p-hidroksi benzojeva kiselina, prokatehinska, vanilinska, galna, siringinska, salicilna i jorgovanska kiselina nalaze se u vinu i grožđu, a od derivata cimetine kiseline nalaze se kumarinska, kafena, ferulinska i sinapinska kiselina (tabela 2.5). U grožđu su prisutne fenolne kiseline koje se nalaze u glikozidnoj formi a oslobađaju se kiselom hidrolizom, ili se nalaze u obliku estara a oslobađaju se alkalnom hidrolizom (Ribereau-Gayon, 1965). Iako su bezbojna, neflavonoidna jedinjenja poboljšavaju i stabilizuju boju crvenih vina, doprinose boljem ukusu vina (isparljive fenolne kiseline), a neka od njih (npr. resveratrol) pokazuju snažnu biološku aktivnost.

Hidroksicimetine kiseline poseduju C₆-C₃ skelet i formalno pripadaju grupi fenilpropanoida. Derivati cimetine kiseline mogu biti prisutni u cis i trans-konfiguraciji. trans-oblici su stabilniji i rasprostranjeniji. U vinu su hidroksicimetine kiseline prisutne u malim količinama u slobodnom obliku, a dominiraju estri L(+) vinske kiseline.



Benzojeva kiselina



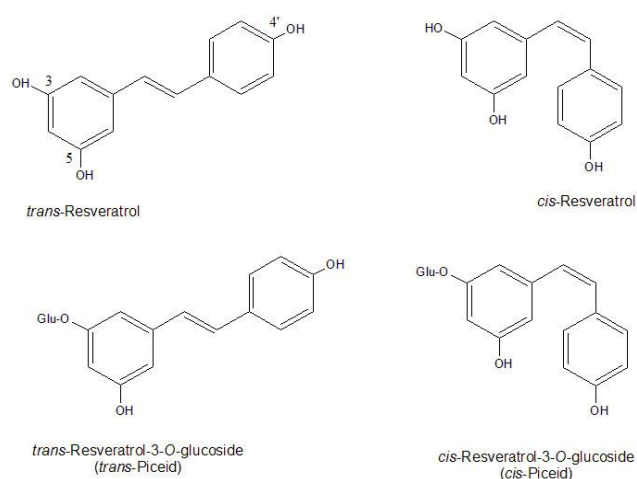
Cimetna kiselina

Slika 2.26. Struktura benzojeve i cimetine kiseline

Tabela 2.5. Derivati benzoeve i cimetne kiseline grožđa i vina (Ribereau-Gayon, 1999).

BENZOEVA KISELINA	R2	R3	R4	R5	CIMETNA KISELINA
p-hidroksi benzoeva	H	H	OH	H	Kumarinska
prokatehinska	H	OH	OH	H	Kafena
Vanilinska	H	OCH3	OH	H	Ferulna
Galna	H	OH	OH	OH	
Siriginska OCH3	H		OH	OCH3	Sinapinska
Salicilna	OH	H	H	H	
Jorgovanska OH		H	H	H	

Od stilbena u grožđu i vinu prisutan je resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), koji u svojoj strukturi sadrži dva aromatična prstena spojena metilenskom vezom, ubraja se u neflavonoidna polifenolna jedinjenja. Nalazi se u *trans*- ili *cis*- obliku, slobodan ili u glikozidnoj formi kao 3-mono-D-glukozid (piceid), slika 2.27.



Slika 2.27. Resveratrol

Resveratrol pripada klasi biljnih antibiotika poznatih kao fitoaleksini i antifungicidi jer inhibira razvoj infekcija izazvanih gljivicama *Botrytis cinerea*, i *Plasmopara viticola*. To je jedinjenje koje biljke sintetišu kao odgovor na napad bolesti, prilikom povređivanja tkiva, prilikom mikrobioloških infekcija ili delovanja UV zračenja.

2.3.5.3. Sadržaj fenolnih jedinjenja u grožđu

Fenolna jedinjenja su veoma značajna u enologiji jer direktno ili indirektno deluju na kvalitet vina. Pored toga, u zavisnosti od njihove prirode, mogu imati prehrambeni ili farmakološki značaj. Grožđe sadrži ne flavonoidne sastojke uglavnom u pulpi a flavonoidne u pokožici, semenkama i peteljci.

Sadržaj fenolnih materija u grožđu zavisi pre svega od sorte vinove loze, od proizvodnog postupka, od spoljašnjih faktora (zemljište, klima, geografsko poreklo) i od stepena zrelosti grožđa (Singleton et al., 1978; Ribereau-Gayon, 1982; Macheix et al., 1990).

Fenolna jedinjenja biljkama pružaju mikrobiološku i antioksidativnu zaštitu, a neka fenolna jedinjenja se sintetišu kao odgovor na napad gljivica ili oštećenje tkiva.

Fenolna jedinjenja se nakupljaju sa porastom bobice i u procesu sazrevanja grožđa. Koncentracija antocijana se povećava u procesu sazrevanja grožđa a počinje da se smanjuje kada dođe do prezrevanja grožđa. Koncentracija tanina u ekstraktu semenki opada u toku sazrevanja grožđa, dok sadržaj tanina raste u pokožici grožđa. Sadržaj tanina zavisi i od vremenskih uslova. Ranije se smatralo da dolazi do migracije proantocijanidola iz semenki do pokožice. Detaljnijim ispitivanjima je dokazano da ne dolazi do migracije proantocijanidola iz semenki u pokožicu već dolazi do njihove polimerizacije tako da je njihova ekstrakcija iz semenki alkoholno-vodenim rastvaračima otežana. Neke sorte imaju veći sadržaj tanina kao što su (*Cabernet franc*, *Pinot noir* itd.) a druge imaju znatno manji sadržaj (*Cabernet sauvignon*). Sintezu antocijana inhibiraju visoke dnevne temperature (35°C) i visoke noćne temperature, dok odlaganje vremena berbe ne utiče na porast sadržaja antocijana. U tabeli 2.6. je dat sadržaj antocijana u stonim (*Cardinal*, *Muscat hamburg*, *Ribier*) i vinskim sortama grožđa (*Prokupac*, *Vranac*, *Merlot*, *Cabernet sauvignon*).

Tabela 2.6. Sadržaj antocijana u nekim stonim i vinskim sortama grožđa (Mitić, 2011).

	Antocijan	Cardinal	M. Hamburg	Ribier	Prokupac	Vranac	Merlot	C. sauvignon
1	Dp-3-glukozid	0,53	4,11	1,84	2,47	10,19	5,36	8,29
2	Cy-3-glukozid	1,19	3,54	0,72	1,25	6,70	1,62	0,40
3	Pt-3-glukozid	0,74	4,23	2,46	2,93	11,71	5,97	4,54
4	Pn-3-glukozid	14,57	15,72	5,19	7,92	14,33	9,35	7,04
5	Mv-3-glukozid	11,17	22,23	17,67	27,64	29,14	43,97	54,47
6	Dp-3-acetil-glukozid	nd	nd	nd	nd	0,71	0,89	0,92
7	Dp-p-kumaroil-glukozid	nd	nd	nd	1,74	2,37	1,10	0,95
8	Mv-3-acetil-glukozid	nd	nd	0,98	3,77	2,74	3,02	3,52

9	Cy-3-p-kumaroil-glukozid	nd	nd	1,19	nd	1,30	0,40	0,80
10	Pt-3-p-kumaroil-glukozid	nd	nd	nd	0,83	1,57	2,30	2,85
11	Pn-3-p-kumaroil-glukozid	2,66	1,59	3,11	2,86	2,29	2,78	2,92
12	Mv-3-p-kumaroil-glukozid	1,64	1,08	11,51	7,27	5,17	12,94	9,90
Ukupno, mg/100 g svežag grožđa		32,50	52,50	44,67	58,68	88,22	89,70	96,60

Od fenolnih jedinjenja u semenkama 50-70 % čine flavan-3-oli tj. proantocijanidoli. Proantocijanidoli semenki su nižeg stepena polimerizacije i sadrže do 28 jedinica flavanola, dok tanini pokožice mogu da sadrže i do 70 monomernih jedinica. Tokom zrenja menja se hemijski sastav fenolnih jedinjenja, smanjuje se sadržaj proantocijanidola u semenkama za 60% a sadržaj monomernih flavan-3-ola čak za 90%. Proantocijanidoli pokožice imaju koloidnu prirodu i tokom zrenja dolazi do gubitka izrazito jakog taninskog karaktera i adstrigencije jer opada njihova reaktivnost. U semenkama se nalazi oko 60% ukupnih fenolnih materija a u peteljci oko 20%. Proantocijanidoli peteljke su po reaktivnosti slični proantocijanidolima semenki i nekoloidne su prirode. Tokom zrenja grožđa količina proantocijanidola se vrlo malo menja u peteljci, dok svi ostali delovi grožđa sadrže jednake količine nisko polimerizovanih proantocijanidola katehina.

Vrlo je važno brati grožđe u fazi „fenolne zrelosti“ jer tada grožđe sadrži maksimalnu količinu antocijana i ukupnih fenolnih materija. Vino sa maksimalnim sadržajem ukupnih fenolnih materija i antocijana dobija se od grožđa koje je obrano u fazi pune zrelosti ili od blago prezrelog grožđa (Ribereau-Gayon et al., 1999).

2.3.5.4. Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu

U toku fermentacije tečna faza ekstrahuje: polisaharide, azotna jedinjenja, mineralne materije, fenolna jedinjenja kao što su antocijani i proantocijanidoli. Ova jedinjenja se ekstrahuju iz semenki i pokožice grozda a nekada i iz peteljke. Step en ekstrakcije zavisi od stepena zrelosti grožđa i sorte vinove loze, a oko 20-30 % od ukupnih fenolnih materija grožđa ekstrahuje se u vino (Ribereau-Gayon et al., 1999).

Tokom maceracije u tečnu fazu ekstrahuju se fenolna jedinjenja (antocijani i proantocijanidoli koji će vinu dati boju, ukus i trpkost) polisaharidi, aromatična jedinjenja, mineralne materije, azotna jedinjenja. Ova jedinjenja se ekstrahuju iz čvrstih delova, pokožice, semenki i peteljke. Na step en ekstrakcije utiču uslovi pod kojima se odvija maceracija (temperatura, mešanje, prisustvo kiseonika, sumpor-dioksida i sadržaj alkohola),

intenzitet muljanja grožđa, odnos čvrste i tečne faze u kljuku, sorta vinove loze i zrelost grožđa. Tokom maceracije u vino se ekstrahuje oko 20–30 % od ukupnih fenolnih jedinjenja koja se nalaze u grožđu.

Proces maceracije odvija se u tri faze:

-*pred-fermentativna faza maceracije* - odvija se pre početka alkoholne fermentacije i traje od nekoliko sati do nekoliko dana

- *faza maceracije* – odvija se u toku alkoholne fermentacije a traje od 2 do 7 dana,

- *post-fermentativna faza maceracije*- odvija se posle završetka alkoholne fermentacije a traje od nekoliko dana do nekoliko nedelja.

U početnoj fazi maceracije tj., pred-fermentativnoj fazi fenolna jedinjenja se najbrže ekstrahuju iz pokožice. Glavni izvor fenolnih materija su semenke i peteljka jer su one njima bogatije od pokožice.

Odmah nakon muljanja grožđa počinje ekstrakcija antocijana, u pred-fermentativnoj fazi a pre početka alkoholne fermentacije. Ekstrakcija antocijana prestaje kada koncentracija alkohola dostigne određeni nivo. Vina koja su dobijena samo maceracijom pokožice sadrže manje fenolnih jedinjenja dok vina dobijena uz dodatak peteljke sadrže veću količinu fenolnih materija zbog veće koncentracije fenolnih jedinjenja u peteljci. Prema Singletonu (Singleton et al., 1992) semenke su značajan izvor proantocijanidola u vinu. Ekstrakcijom proantocijanidoli iz semenki postaju rastvorljivi kada se kutikula rastvori u etanolu, na polovini alkoholne fermentacije a nastavlja se i u toku postfermentativne maceracije. Intenzitet boje vina se povećava u pred-fermentativnoj fazi maceracije i srazmeran je ekstrakciji bojnih materija i reakcijama ko-pigmentacije. U drugoj fazi etanol prekida reakcije ko-pigmentacije dok u trećoj fazi intenzitet boje se povećava zbog nastanka kompleksa tanin-antocijanin.

U slučajevima kada je stepen zrelosti grožđa idealan ekstrakcija fenolnih jedinjenja je relativno jednostavna operacija, a kada uslovi nisu idealni potrebno je primeniti neke postupke da bi se nedostaci otklonili. Primenjuju se sledeći postupci: pravilan izbor trajanja maceracije, podešavanje čvrste i tečne faze, primena odgovarajućih selekcionisanih kvasaca i enzima, regulisanje temperature, potapanje klobuka. Grožđe sadrži enzime koji ubrzavaju degradaciju ćelijskih zidova što dovodi do ekstrakcije tanina i fenolnih materija. Da bi se ovi procesi ubrzali dodaju se komercijalni enzimski preparati kao što su proteaze, pektinaze, celulaze, hemicelulaze, a delovanjem ovih preparata ekstrakcija tanina je intenzivnija u odnosu na antocijane čime se dobijaju punija i karakternija crvena vina.

U peteljci su pronađene značajne količine fenolnih materija a od toga je od 40-50 % polimerizovano (Bourzeix et al., 1986; Kantz et al., 1990) tako da vina koja su proizvedena sa dodatkom peteljke sadrže veće količine fenolnih materija od vina koja su proizvedena bez dodatka peteljke. Prema nekim studijama semenke predstavljaju značajan izvor fenolnih materija, pre svega monomera flavan-3-ola i proantocijanidola (Cheynier i Prieur, 1997; Ricardo da Silva, 1997; Singleton, 1992). Ukoliko se želi proizvesti vino sa kvalitetnim fenolnim sastavom neophodno je da se ekstrahuju proantocijanidoli iz semenki, temperatura u toku i nakon fermentacije treba biti relativno visoka, potrebno je obezbediti dovoljnu aeraciju a trajanje maceracije treba da bude od 3-4 nedelje. Ova vina treba da se proizvode od zdravog i kvalitetnog grožđa obranog u fazi pune zrelosti. Tokom procesa maceracije dolazi do adsorpcije fenolnih i drugih materija na ćelije kvasca i čvrste delove kljuka, tj. do smanjenja njihovog sadržaja. Pri ovome antocijani privremeno prelaze u slabije obojene redukovane oblike. Reakcija je povratna i izlaganjem ovakvog vina vazdušnom kiseoniku u toku 24 h dolazi do porasta intenziteta boje vina, za ovo je zaslužan kompleks- Fe^{3+} (Ribereau-Gayon et al., 2005).

Postoji proporcionalna zavisnost između koncentracije fenolnih jedinjenja i dužine trajanja maceracije. Na početku fermentacije ekstrakcija fenolnih jedinjenja u vinu je intenzivnija a kasnije se smanjuje (Sudraud, 1963). Na početku maceracije prvo se ekstrahuju antocijani pokožice, i za njihovu ekstrakciju nije potreban etanol. Sa porastom etanola ekstrahuju se tanini iz pokožice, a za ekstrakciju tanina iz semenki potreban je duži vremenski period (Boulton, 1996). Ispitivanjem uticaja trajanja maceracije na sadržaj fenolnih jedinjenja došlo se do zaključka da sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja raste sa produženjem maceracije do 15 dana. Produžena maceracija utiče je na povećanje nijanse boje, dok se sadržaj antocijana povećavao do šestog dana maceracije a zatim je počeo da opada (Puškaš et al., 2005).

Na ekstrakciju fenolnih jedinjenja tokom maceracije veliki uticaj ima i temperatura. Sa porastom temperature ubrzava se ekstrakcija fenolnih jedinjenja (Merida et al., 1991). Dolazi do degradacije ćelijskih zidova i isticanja sadržaja iz njih. Kod kratkotrajne maceracije koja traje oko četiri dana blago raste nijansa boje i sadržaj antocijana, a intenzivnije se povećava vrednost intenziteta boje, sadržaj ukupnih fenolnih materija i proantocijanidola.

Na koncentraciju fenolnih jedinjenja u vinu i na njegove senzorne karakteristike značajan uticaj ima odnos čvrste i tečne faze u kljuku (Scudomore et al., 1990; Auw et al., 1996). Semenke i peteljka sadrže znatnu količinu fenolnih materija pa se njihovim

dodavanjem postiže veći sadržaj fenolnih materija u vinu. Sadrže (+) katehin, (-) epikatehin i dimere B1, B2, B3 i B4 (Ricardo da Silva et al., 1991; Revilla et al., 1997).

Različiti sojevi kvasaca utiču različito na sadržaj fenolnih materija a takođe i na boju crvenih vina. Zapaženo je fizičko delovanje kvasaca na sastav fenolnih materija u vinu, dolazi do adsorpcije antocijana na ćelijske zidove kvasaca (Vasserot, 1997; Morata et al., 2003). Pojedini kvasci deluju tako što utiču na povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja, monomera antocijana i povećanja intenziteta boje vina. Mogu uticati i na povećani sadržaj flavan-3-ola i proantocijanidola. Primenom odgovarajućih sojeva kvasaca koji imaju manju sposobnost adsorpcije antocijana na ćelijske zidove dobijena su vina sa višim sadržajem flavan-3-ola i monomera antocijana što je pozitivno uticalo na intenzitet boje vina (Bartowsky et al., 2003, Eglinton et al., 2003, Eglinton et al., 2004, Caridi et al., 2004).

2.3.6. Aromatske komponente vina

Aroma vina je kompleksno svojstvo koje je rezultat međudejstva između hemijskih jedinjenja u vinu i osećaja mirisa i ukusa. Aromu čine aromatska jedinjenja iz grožđa, kao i jedinjenja koja se formiraju tokom i nakon alkoholne fermentacije. Do sada je identifikovano nekoliko stotina aromatskih komponenti sa širokim rasponom malih koncentracija koje se izražavaju u mg/L, µg/L ili ng/L (Rapp, 1988). Poreklo arome u vinu je predmet velikog broja istraživanja zahvaljujući napretku analitičkih metoda koje nam pomažu u detekciji tih jedinjenja (Güth, 1997; López et al., 2002; Ferreira et al., 2000; Francis i Newton, 2005; Ebeler i Thorngate, 2009).

Aroma predstavlja najsloženiju hemijsku komponentu grožđa i vina, čine je veliki broj jedinjenja čija koncentracija varira pod uticajem sorte (Sanchez-Palomo et al., 2005; Prosen et al., 2007a) i teroara (Miklosy i Kerény, 2004). Na aromu grožđa mogu uticati primena pojedinih ampelotehničkih mera, momenat berbe, stresni uslovi gajenja poput suše (Bureau et al., 2000; Darriet et al., 2001; Gashons et al., 2005; Sanchez-Palomo et al., 2007), soj kvasca koji se upotrebljava tokom fermentacije, vrsta drveta od koga je napravljen sud i dužina odležavanja vina (Spillman et al., 2004; Francis i Newton, 2005; Chalier et al., 2007; Košmerl et al., 2008) itd.

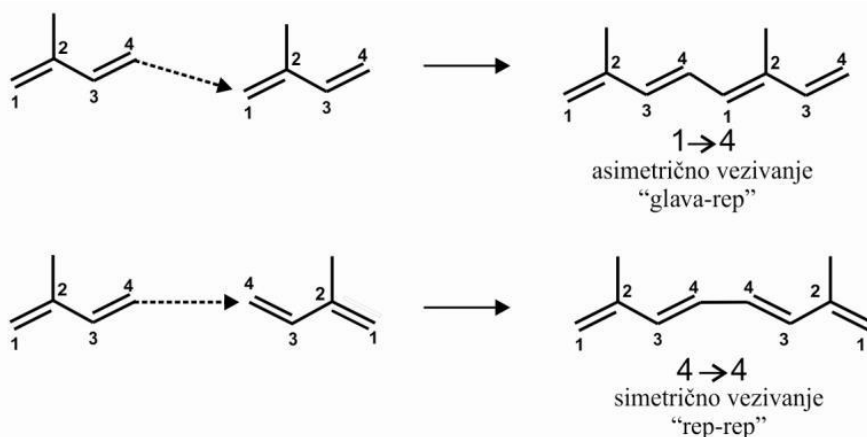
Arome se prema poreklu dele na: primarnu aromu (potiče iz grožđa), sekundarnu aromu (nastaje tokom primarne prerade, muljanjem grožđa, aktivnošću enzima), aromu koja nastaje tokom fermentacije i aromu čuvanja vina (nastaje tokom odležavanja i čuvanja vina). Sadržaj aromatičnih materija u vinu kreće se od 0,8-1,2 g/l, a polovinu čine alkoholi

koji nastaju u toku alkoholne fermentacije. Prag detekcije mirisa aromatičnih materija je između 10^{-4} do 10^{-12} g/l (Rusjan, 2010).

Primarna ili sortna aroma obuhvata jedinjenja koja potiču od grožđa. Najvažniji predstavnici ove grupe su terpeni, C_{13} - norizoprenoidi, derivati benzojeve kiseline, isparljiva tiolska jedinjenja i pirazini. Terpeni koji su vezani za šećere ne daju aromu vinu, dok sortno tipični buke vina daju slobodni terpeni. Jedinjenja aromatskog kompleksa vina skoncentrisana su u pokožici i tankim delovima ispod pokožice, a maksimalni intenzitet i aromu vinu daju vina dobijena alkoholnom fermentacijom zrelog i zdravog grožđa.

Isparljivi sastojci su tipični za sortu. Ta jedinjenja pripadaju prvenstveno dvema hemijskim familijama: pirazini (karakteristični za sorte porodice kaberna) i terpeni (karakteristični za muskatne sorte).

Terpeni su ugljovodonici biljnog porekla hemijske formule $(C_5H_8)_n$ i njihovi oksidovani, hidrogenovani i dehidrogenovani derivati. Terpeni se u grožđu, širi i vinu nalaze slobodni ili glikozidno vezani. Glikozidno vezani terpeni su prekursori arome grožđa i vina. Čitava grupa terpena nastala je kondenzovanjem C_5 izoprenskih jedinica povezanih na način glava-rep (asimetrično povezivanje) prikazano na slici 2.28.



Sl.2.28. Načini vezivanja C_5 izoprenskih jedinica u terpenskim molekulima (Šarac, 2014)

Terpeni su podeljeni prema broju C_5 izoprenskih jedinica na: monoterpene- C_{10} , seskviterpene- C_{15} , diterpene- C_{20} , sesterpene- C_{25} , triterpene- C_{30} i tetreterpene- C_{40} . Politerpeni nastaju vezivanjem velikog broja C_5 izoprenskih jedinica čija molekulska masa se kreće preko 100 000. Svaka od ovih grupa terpena deli se na podgrupe u zavisnosti od broja prstenova koji se nalazi u grupi:

-Aciklični terpeni- ne poseduju prstenastu strukturu,

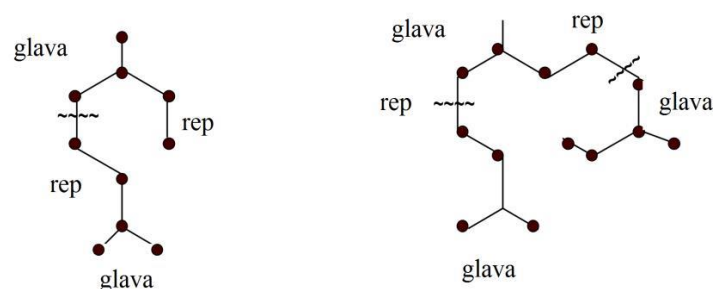
- Monociklični terpeni- prisutan jedan prsten

- Biciklični,

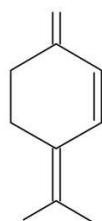
-Triciklični,

-Tetraciklični terpeni.

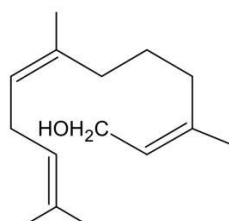
U zavisnosti od funkcionalne grupe koju poseduju terpeni mogu biti: ugljovodonici, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, kiseline i estri. Na slici 2.29. predstavljen je način povezivanja terpena.



Primjeri:



Mircen



Farnesol

Slika.2.29 Načini povezivanja terpena

Terpeni su jedinjenja koja daju tipičnost, posebno muskatnim, ali i drugim sortama. Najčešće su to monoterpeni, nekoliko seskviterpena, kao i odgovarajući alkoholi i aldehidi, koji su i najinteresantniji sa olfaktivnog aspekta. U prirodi je dokazano oko 4000 terpenskih jedinjenja od kojih je oko 400 terpenoida (sa C₁₀) i skoro 1000 seskviterpenoida (sa C₁₅).

Te dve serije jedinjenja su karakteristike esencijelnih ulja biljaka i među njima su jedinjenja sa vrlo intenzivnim i prijatnim mirisom cveća i agruma. Ta jedinjenja prisutna su u grožđu svih sorti, a sadržaj je veći u muskatnim sortama i kreće se od 500 do više od 1700 µg/l u širi i predstavljaju 40-50 % od ukupnih isparljivih sastojaka u okviru bobice. Slobodni terpeni nalaze se u svim delovima bobice s tim što se u ćelijskim opnama pulpe i pokožice

nalazi oko 50 %. Slobodni geraniol i nerol su oko 90 % u pokožici bobice, a od linalola je oko ½ u širi.

Sadržaj slobodnih terpena se povećava u toku razvića bobice. U zelenom grožđu ima ih samo u tragovima ili ih čak i nema kao što je slučaj sa α -terpineolom i citronelolom, koji se pojavljuju tek u vreme šarka. U toku sazrevanja grožđa sadržaj se konstantno povećava s tim što u fazi zrelosti sadržaj nekih jedinjenja može da se smanjuje kao što je slučaj sa α -terpineolom i linalolom (slučaj sorte muscat de Frontignan).

Ulogu prekursora mogu da imaju više različitih jedinjenja:

-monoterpeni, dioli i terpeniski polioli, masne kiseline, karotenoidi, glikozilni prekursori arome, prekursori arome sovinjona.

Monoterpeni: su jedinjenja manje ili više podložna promenama pod uticajem procesa hidratacije i oksidacije. Te promene mogu se odvijati u toku nege vina. Tako na primer od linalola u toku 3 meseca nastaju 4 glavna sastojka: nerol, geraniol, α -terpineol i 6,7-dihidroksi-linalol.

Dioli ili terpeniski polioli: U kiseljoj sredini, kao što je šira ili vino, dioli se transformišu u monoterpene sa manjim ili većim stepenom oksidacije. Neka od tih jedinjenja daju vinu strani miris: trans-1,8-terpen ima miris na eukaliptus a 3,9-epoksi-8-menten-1 ima miris na aromatičnu biljku "fenovil".

Masne kiseline: U toku prvih nekoliko minuta koji slede nakon muljanja grožđa, javlja se značajna količina aldehida i alkohola sa 6 ugljenikovih atoma. Neki od njih imaju miris na zgnječeno lišće, na zeleniš i gorkog su ukusa (Flanzy,C.,1998). Njihovi prekursori su nezasićene masne kiseline. Sadržaj nezasićenih masnih kiselina u grožđu sorti *Vitis vinifera* je oko 500 mg/kg bobica (ne računajući semenke).

U ukupnoj masi masnih kiselina na nezasićene masne kiseline dolazi 70-75 %, a među njima na linoleinsku i linolensku kiselinu dolazi 55-63%. Druge nezasićene masne kiseline kao: palmitinska, oleinska prisutne su u mnogo manjoj količini.

Masne kiseline praktično nisu prisutne u slobodnom obliku, već su esterifikovane i angažovane u različitim klasama lipida: fosfolipidi sa 64-71 % od ukupnih lipida, neutralni lipidi sa 17-24 % i glikolipidi sa 8-14 %.

Karotenoidi: Visok kvalitet vina od nearomatičnih sorti može se pripisati karotenoidima koji daju poseban aromatični karakter. On se zapaža nekada već u mladom vinu, odmah nakon završene alkoholne fermentacije, ali svoj vrhunac dostiže u toku nege vina, a

to znači da se te materije oslobađaju od svojih prekursora. Ta jedinjenja imaju isto poreklo kao i terpenoli s tim što su višeg stepena polimerizacije.

Isparljivi sastojci predfermentativnog stadijuma: Te arome se razvijaju od berbe, preko transporta, muljanja, presovanja, do eventualne termičke obrade ili karbonske maceracije. Mehanički efekat ovih operacija ogleda se u ostvarivanju kontakta između različitih enzimatskih sistema i supstanci prisutnih u bobici. Kiseonik je uključen u te enzimatske procese. Osim enzimatskog posmeđivanja i promene boje, neki od enzima učestvuju u stvaranju jedinjenja koja utiču na aromu vina. Radi se o enzimima koji učestvuju u stvaranju aldehida i alkohola sa 6 C atoma i koji su odgovorni za miris na zeleno, herbacee, a nekad i za gorčinu.

Viši alkoholi: Količinski dominiraju 2 i 3-metil butanoli, propanol, 2-metil propanol, butanol, pentanol, 2-feniletanol, 3-metiltio-propanol, tirozol i triptofol. Njihov prosečan ukupan sadržaj u vinu je 400-500 mg/l, što je optimum za aromu vina, a ako je veći (do 1g/l) predstavlja manu arome. Nastaju metabolizmom aminokiselina, što znači da je sadržaj u velikoj zavisnosti od izvora azota u širi. Dva su puta njihovog nastanka: po jednom katabolizmom aminokiselina pri čemu dolazi do njihove dekarboksilacije iza čega sledi redukcija nastalih α -keto kiselina. Drugi put je anabolizam aminokiselina preko odgovarajućih α -keto kiselina nastalih od šećera. Koji će od ovih puteva predominirati zavisi od izvora azota u širi: nedostatak asimilirajućeg azota izaziva akumulaciju α -keto kiselina i posledica je stvaranje više viših alkohola. U suprotnom slučaju (prisustvo u sredini veće količine aminokiselina) stvaranje viših alkohola anaboličkim putem je inhibirano, ali se zato oni više stvaraju kataboličkim putem.

Polioli: 1,2-propandiol, 2,3-butandiol i 2,3-pentadioli stvaraju kvasci redukcijom odgovarajućih karbonilnih sastojaka i sa glicerinom predstavljaju najznačajniju grupu jedinjenja u pogledu količine, ali nemaju direktno dejstvo na aromu (Flanzy,C.,1998).

Alkoholi sa 6 C atoma: heksenol i heksanol. Potiču od oksidacije lipida koji nastaju u predfermentativnom stadijumu. Daju vinu biljni i herbacee karakter koji je čak neprijatan ako su ove komponente prisutne u većoj količini.

Kiseline i njihovi estri: Masne kiseline i njihovi estri sa alkoholima predstavljaju glavne markere fermentativne arome. Vina sa prijatnom fermentativnom aromom su ona u kojima je stvoreno više masnih kiselina i to se pripisuje njihovim estrima koji imaju prijatan voćni karakter, sa izuzetkom etilacetata koji sam po sebi nije neprijatan ali pri sadržaju većem od 100 mg/l kviri aromu vina. Same masne kiseline imaju neprijatan miris, ali njihova koncentracija u vinu retko prelazi prag osetljivosti. U klasičnom smislu ovu familiju

jedinjenja čine: masne kiseline sa kratkim lancem (C₂ do C₁₀), njihovi etilestri i acetati viših alkohola. Biogenetski sva ta jedinjenja nastaju preko acil-S-koenzim A od kojeg nastaju bilo masne kiseline hidrolizom, bilo etilestri masnih kiselina ili acetati viših alkohola alkoholizom.

Isparljivi fenoli: Glavni isparljivi fenoli koje stvaraju kvasci *S.cerevisiae* su 4-vinilfenol (miris na karanfil) i 4-vinilgajakol (miris na karanfilić). Kvasci ih stvaraju enzimatskom dekarboksilacijom kumarinske i ferulinske kiseline. Iako je sadržaj ovih kiselina u crnom grožđu veći, sadržaj nastalih isparljivih fenola je veći u belim vinima. Razlog tome je što neka fenolna jedinjenja crvenog vina inhibitorno deluju na enzime koji vrše dekarboksilaciju navedenih fenolnih kiselina. Treba napomenuti da druge fenolne kiseline (cimetne i benzojeve) ne podležu dekarboksilaciji. Isparljivi fenoli utiču pozitivno na aromu vina.

Sekundarna aroma se razvija u periodu od berbe grožđa do početka fermentacije šire ili kljuka. U ovom periodu dolazi do složenih biohemijskih i hemijskih reakcija i do sinteze sekundarnih aromatskih jedinjenja. Ova aroma se naziva predfermentativnom aromom. Masne kiseline kratkog, srednjeg i dugog lanca su produkt metabolizma kvasaca i imaju ulogu u ukupnoj aromi vina (Francis i Newton, 2005). Masne kiseline kratkog lanca su maslačna, izomaslačna, propionska i izovalerijanska kiselina, masne kiseline srednjeg lanca su heksanonska, oktanska i dekanska i njihova koncentracija zavisi od sorte grožđa, sastava šire, soja kvasca i temperature fermentacije (Edwards et al.,1990, Bardi et al.,1999).

Tercijarna aroma ili bouquet vrenja nastaje u toku alkoholne fermentacije ili jabučno mlečne fermentacije kao proizvod metabolizma kvasca i bakterija. Nastaju aromatična jedinjenja kao što su viši alkoholi, isparljive kiseline, etil estri masnih kiselina i isparljivi fenoli. Najvažniji estri u vinu su etil estri masnih kiselina i acetatni estri uključujući etil acetat, etil butirrat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanoat, heksil acetat, izoamil acetat, izobutil acetat i fenil etil acetat (Guth 1997, Ferreira et al., 2000, Francis i Newton 2005, Swiegers et. al.,2005). Gubitak voćnih i cvetnih aroma mladih vina povezan je sa hidrolizom estara (Marais i Pool 1980). Viši alkoholi nastaju kao proizvod a nastaju katabolizmom aminokiselina od strane kvasaca kroz Ehrlichov put sinteze (Swiegers et al., 2005).

Aroma dozrevanja (postfermentativna fermentacija ili bouquet starenja) nastaje tokom dozrevanja i skladištenja vina. Tokom zrenja vina gube voćne mirise i sortne karakteristike a dobijaju poseban bouquet starosti koji je cenjen kod crvenih vina.

Terpeni daju floralne tonove vinima, od estara i laktona potiče voćnost a viši alkoholi i aldehidi daju herbalne tonove. Kod mladih crvenih vina najizraženije su primarne

arome, a adležavanjem javljaju se sekundarne arome kao i arome usled starenja vina. (Prosen et al., 2007a; Castro-Vasquez et al., 2002; Schneider et al., 2001).

Prema Ribereau-Gayon et al. (2006) u vinu i grožđu sreću se od 30-40 mirisno najaktivnijih komponenti od oko 800 koliko se nalazi u grožđu i vinu.

U obliku aglikona javljaju se najvažnija aromatska jedinjenja iz grupe terpena, viših alkohola, estara, isparljivih fenola, derivata benzola i C₁₃ norisoprenoida.

2.4. ANTIOKSIDANSI I SLOBODNI RADIKALI

2.4.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli sa jednim ili više nesparenih elektrona u strukturi. Nastaju iz neradikala koji su po prirodi slabo reaktivni i imaju u orbitalama paran broj elektrona suprotnih spinova, a to je energetski najpovoljnije i najstabilnije stanje. Gerschman i saradnici su 1954. godine prvi ukazali na činjenicu da se brojni hemijski procesi odvijaju putem formiranja slobodnih radikala (Gerschman et al., 1954; Guteridge et al., 1999; Gerschman et al., 2001). Slobodni radikali, za razliku od neradikala, poseduju jedan nespareni elektron u spoljašnjoj orbitali, koji je odgovoran za njihovu nestabilnost i reaktivnost.

Neradikal se može konvertovati u slobodni radikal gubitkom ili primanjem jednog elektrona, pri čemu se bitno menjaju njegova fizička i hemijska svojstva. Jednom nastali slobodni radikal može da izazove niz lančanih reakcija u fazi inicijacije, sa drugim manje reaktivnim vrstama. Slobodni radikali predstavljaju najreaktivnije vrste, a i neradikalni oblici su oksidacioni agensi i oni se konvertuju lako u radikale (Halliwell et al., 1989; Halliwell et al., 1999). Oni lako stupaju u hemijske reakcije sa drugim molekulima, pri tome nespareni elektroni obrazuju hemijske veze, oslobađa se energija i pri tome ceo sistem prelazi u niže energetske stanje.

Prooksidansi su različite hemijske vrste koje u biološkim i hemijskim sistemima uzrokuju ili ubrzavaju reakcije oksidacije. Dele se na reaktivne slobodnoradikalne i neradikalne vrste (oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale). Najvažnije reaktivne vrste kiseonika (ROS), hlora (RCS) i azota (RNS), date su u tabeli 2.7.

Tabela 2.7. Reaktivne i slobodno radikalske i neradikalske vrste kiseonika. (Halliwell i Whiteman, 2004).

Slobodno radikalske kiseonične vrste (ROS)	Neradikalske vrste
superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet -}$),	ozon (O_3), singletni kiseonik (O_2^1)
hidroksil radikal ($\bullet OH$),	organski peroksidi ($ROOH$),
hidroperoksil radikal ($\bullet HO_2$),	peroksinitrit ($ONOO^-$),
peroksil radikal (RO_2^{\bullet}),	peroksinitritna kiselina ($ONOOH$),
karbonatni radikal ($CO_3^{\bullet -}$),	hipohlorna kiselina ($HOCl$),
ugljendioksidni radikal ($CO_2^{\bullet -}$),	hipobromna kiselina ($HOBr$),
alkoksil radikal (RO^{\bullet}).	vodonik-peroksid (H_2O_2),
Reaktivne hlorne vrste (RCS)	Neradikalske vrste
Atomski hlor, Cl^{\bullet}	Hipohlorna kiselina, $HOCl$ Nitril (nitronijum) hlorid, NO_2Cl Hloramini
Reaktivne azotove vrste (RNS)	Neradikalske vrste
Azotmonoksidni radikal, NO^{\bullet} Azotdioksidni radikal, NO_2	Azotasta kiselina, HNO_2 Nitroksil katjon, NO^+ Nitroksil anjon, NOD Azot tetroksid tetroksid, N_2O_4 Azot trioksid, N_2O_3 Peroksinitrit, $ONOO$ Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$ Nitronijum (nitril) katjon, NO_2^+ Alkilperoksinitriti, $ROONO$ Nitril (nitronijum) hlorid, NO_2Cl

Zbog prisustva nesporenog elektrona, slobodni radikal je jak oksidans i veoma je reaktivan, pa teži da se spoji sa drugim elektronom, oduzimajući mu od molekula jedan elektron i na taj način dolazi do lančane reakcije. Molekul od koga je oduzet elektron i sam postaje slobodan radikal. Slobodni radikali mogu da oštete ćelijsku membranu, holesterol, masne kiseline, DNA i proteine i imaju ulogu u patogenezi mnogih degenerativnih bolesti. Oksidacija ćelijskih proteina i membrana dovodi do bolesti kao što su: reumatoidni artritis, Parkinsonova bolest, oksidacija LDL holesterola dovodi do pojave ateroskleroze, a oksidativno oštećenje DNA dovodi do nastanka karcinoma. Oksidativni stres predstavlja poremećaj ravnoteže između prooksidanasa i oksidanasa usled čega dolazi do oštećenja makromolekula u ćeliji.

Respiratorni lanac u mitohondrijama dovodi do nastanka mnogih reaktivnih grupa kiseonika kao što su hidroksil radikal OH i superoksid radikal O₂⁻. Imuni odgovor na alergene povećava proizvodnju slobodnih radikala.

U živom organizmu slobodni kiseonikovi radikali stvaraju se na nekoliko načina:

- delovanjem jonizujućeg zračenja na biološke molekule,
- tokom procesa ćelijskog disanja, zbog odlaska pojedinih elektrona u transportnom lancu elektrona i nepotpune redukcije kiseonika,
- sintezom u ćelijama imunološkog sistema, neutrofilima i makrofazima, posredstvom enzima NADPH- oksidaze i mijeloperoksidaze (respiratorni prasak), (Halliwell i Gutteridge., 2000). Slobodni radikali nastali na ovakve načine reaguju sa okolnim molekulima kako bi postigli stabilnost, a molekul sa kojim reaguju postaje novi slobodni radikal.

Primarne produkte lipidne peroksidacije, hidroksiperokside, nije moguće kvantitativno odrediti zbog njihove nestabilnosti i reaktivnosti, pa se u praksi mere sekundarni oksidacioni produkti kao što su malondialdehidi (MDA). MDA se koristi kao marker lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa.

U živim organizmima postoje odbrambeni mehanizmi koji održavaju ravnotežu oksido-redukcionih procesa i to su:

- Postojanje ćelijskih organela, (mitohondrije, lizozomi), koje odvajaju veće količine slobodnih radikala od ostalih vitalnih delova ćelije,
- Ćelijski enzimi: superoksid dizmutaza, katalaza i glutathion peroksidaza,
- Antioksidansi: vitamin E, C, mokraćna kiselina.

Slobodni radikali se stalno stvaraju i neutrališu u organizmu. Problem nastaje kada se oni stvaraju većom brzinom nego što organizam može da ih neutrališe, a do toga dolazi u uslovima stresa, kod povećanih fizičkih i umnih naprezanja, pod dejstvom otrova, pesticida, herbicida, duvanskog dima, zračenja, izduvnih gasova, prekomernog sunčanja kao i upotrebe nekih lekova.

Kada se slobodni radikali stvaraju većom brzinom nego što organizam može da ih neutrališe, nastaju uslovi za propadanje ćelija i razvoj bolesti. Mnoga oboljenja nerava, krvnih sudova, srca, tumori povezuju se sa povećanom izloženošću nekim štetnim agensima, koji su preko stvaranja slobodnih radikala doveli do razvoja bolesti. Slobodni radikali takođe ubrzavaju starenje organizma, jer dovode do ubrzanog propadanja ćelija.

Slobodni radikali spadaju u najreaktivnije hemijske vrste, lako stupaju u hemijske reakcije zbog svoje hemijske reaktivnosti pri čemu nespareni elektroni obrazuju hemijske

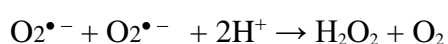
veze, oslobađa se energija i sistem prelazi u niže energetska stanje. Slobodni radikali najčešće nastaju preko sledećih tipova reakcija: oksido-redukcionih procesa, fotolize, termolize i radijacije visoke energije (Piletić i sar., 1993). Nastanak slobodnih radikala u biosistemima dešava se tokom enzimskih reakcija koje katalizuju oksidaze, u endoplazmatičnom retikulumu tokom procesa biotransformacije endogenih i egzogenih supstrata, apsorpcije radijacije, fagocitoze itd. Genetska predispozicija na neku bolest utiče na povećano stvaranje slobodnih radikala kao i infekcije, hronične bolesti, stres, izlaganje suncu, pušenje i zagađeni vazduh. U toku metabolizma nastaju i neki slobodni radikali, a čak 90% kiseonika iz vazduha u organizmu sisara se redukuje do vode primanjem četiri elektrona od transportnog sistema u respiratornom lancu mitohondrija (Acworth, 2003).

Hidroksil radikal, ($\bullet\text{OH}$) je najreaktivniji slobodni radikal, brzo reaguje sa biomolekulima, njegov poluživot je kratak i najodgovorniji je za citostatične efekte kiseonika. Nastaje tokom hemijskih reakcija u prisustvu redukovanih oblika prelaznih metala ili $\text{O}_2^{\bullet-}$ u Fentonovoj reakciji ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^{\bullet} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$), nastaje i u Haber-Weissovoj reakciji ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$; $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^{\bullet} + \text{HO}^-$). Nastaje i homolitičkim raskidanjem O-O veze pod dejstvom toplotne energije i reakcijom vode i ozona u alkalnoj sredini. Hidroksi radikal izaziva velika oštećenja unutar malog radijusa od mesta nastanka, kratkog je poluživota i napada i oštećuje ćelijske biomolekule, inicira lančane procese inicirajući pri tome razne ćelijske i metaboličke poremećaje (Halliwell, 2001).

Superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) i njegov protonovani oblik, *peroksilni radikal* ($\text{HO}_2^{\bullet-}$) nastaju jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, ili jednoelektronskom oksidacijom vodonik peroksida. U reakcijama katalizovanim ksantin oksidazama nastaju značajne količine ovih radikala (Ohara i sar., 2015).

Singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$) je veoma reaktivan a nastaje tokom enzimskih reakcija u prisustvu laktoperoksidaza i mieloperoksidaza.

Vodonik peroksid (H_2O_2) ubraja se u reaktivne vrste kiseonika ali nije slobodni radikal. Nastaje direktnom dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili enzimskom mutacijom dejstvom superoksid dizmutaze :



Proces stvaranja vodonik peroksida odvija se na nivou mitohondrija, peroksisoma, mikrozoma i ćelijske membrane.

2.4.2. Antioksidansi i oksidativni stres

Antioksidansi prema definiciji koju je dao Halliwell (1990) su “supstance koje su prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata”.

Antioksidansi deluju preko više mehanizama:

- kao “hvatači” (skevindžer) slobodnih radikala
- kao donori H-atoma
- kao donori elektrona
- kao akceptori elektrona
- akceptori H-atoma

Antioksidansi se prema mestu nastajanja dele na: endogene i egzogene. Endogeni antioksidansi nastaju u ljudskom organizmu, dok se egzogeni antioksidansi unose putem hrane i lekova. Fenolna jedinjenja predstavljaju najvažniju grupu prirodnih egzogenih antioksidanasa.

Shi i saradnici (2001) klasifikovali su antioksidanse prema načinu i nivou delovanja u ljudskom organizmu na: preventivne antioksidanse, “skevindžer” antioksidanse i “reparacione” antioksidanse. Preventivni antioksidansi imaju ulogu u sprečavanju nastanka slobodnih radikala, “skevindžer” antioksidansi imaju ulogu u hvatanju slobodnih radikala a reparacioni antioksidansi obnavljaju ili uklanjaju vitalne biomolekule koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa. U “reparacione” antioksidanse spadaju proteaze, fosfataze, transferaze, enzimi koji obnavljaju DNK, itd.

Oksidativni stres je definisao H. Sies 1985. godine kao poremećaj u kome su slobodni radikali brojniji u odnosu na antioksidanse usled čega dolazi do oštećenja bitnih ćelijskih makromolekula (proteina, lipida, ugljenih hidrata i DNK). Poremećena ravnoteža između antioksidanasa i produkcije prooksidanasa dovodi do povećanog stvaranja slobodnih radikala što može dovesti do ozbiljnih ćelijskih oštećenja. Slobodni radikali nastaju tokom normalnih metaboličkih procesa a mogu biti i uzrok oksidativnog oštećenja ćelija u nekontrolisanim uslovima (Valko et al, 2007). Slobodni radikali mogu imati fiziološku ili patološku ulogu u organizmu, a oksidativna oštećenja nastaju zbog povećane produkcije slobodnih radikala ili zbog nedovoljne efikasnosti antioksidativnog sistema zaštite.

Pojam oksidativni stres označava poremećaj ravnoteže između stvaranja oksidanasa i sposobnosti odbrambenih sistema u organizmu da te oksidanse eliminiše (Beeridge et al., 1996). Antioksidativni stres se danas spominje u kontekstu mnogih bolesti poput

ateroskleroze, Parkinsonove bolesti, infarkta miokarda, Alzheimerove bolesti, sindroma hroničnog umora.

2.5. FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA GROŽĐA I VINA

Upotrebu vinove loze u medicini poznavali su stari Egipćani i stari Grci. Sok, isceden iz zeljastih izdanaka, tada je korišćen kao popularan lek protiv raznih kožnih bolesti. Listovi su, zbog adstringentnih i hemostatičkih svojstava, često korišćeni u lečenju dijareja, hemoralgija, proširenih vena i hemoroida. Za lečenje upala grla, često je ceđen sok zelenih plodova i korišćen za ispiranje. Osušeni zreli plodovi korišćeni su kao blagi laksans, ali i za podsticanje izlučivanja urina, za olakšavanje iskašljavanja, za poboljšanje apetita i za podizanje tonusa organizma, kod izgadnelosti, oticanja ekstremiteta, dijareja, mučnina i različitih oboljenja kože, bubrega i jetre.

Farmakološka vrednost vina je takođe poznata još iz antičkih vremena. Starogrčki lekari – Hipokrat i Galen – koristili su adstringentno i tonično delovanje crnog vina u lečenju mnogih oboljenja, dok je belo vino obično korišćeno kao diuretik.

Ulje, dobijeno ceđenjem semena grožđa, je korišćeno kao laksans, antacid, protiv opekotina i površinskih ozleda kože, ali i za podsticanje lučenja žuči.

U Ajurvedi, drevnom holističkom indijskom sistemu lečenja, korišćeni su plodovi crnog grožđa kao afrodisijak, diuretik, laksans, protiv astme, groznice, oboljenja očiju, žutice i upala grla. I u drugim delovima sveta tradicionalno se koristi list i plod vinove loze u lečenju groznice, oboljenja jetre, protiv skorbuta i difterije, protiv poremećaja nastalih usled nedostatka gvožđa (prvenstveno kod male dece), kao analgetik protiv bolova različite etiologije i dr.

U našoj narodnoj medicini je često korišćen list, u lečenju poremećaja menstrualnog ciklusa žene, ali i protiv kamena i peska u bubrezima.

Od 1991. godine govori se o tzv. „francuskom paradoksu“ u čijoj osnovi leži činjenica da Francuzi i pored toga što konzumiraju hranu bogatu mastima životinjskog prekla doživljavaju u mnogo manjoj meri infarkt miokarda u odnosu na stanovnike USA i ostale narode zapadne Evrope. Suština ovog paradoksa je u sledećem: količina holesterola u krvi čoveka zavisi od genetske konstitucije i načina ishrane. Hrana bogata masnoćom povećava sadržaj lipoproteina niske gustine (LDL) u krvi, koji se vremenom talože kao vosak na zidove arterija. Lipoproteini vezuju kiseonik iz krvi i time otežavaju rad srčanog mišića a time se uvećava rizik od infarkta miokarda. Proantocijanidoli, kvercetin i resveratrol poseduju antioksidativno svojstvo i imaju ulogu koronarnih zaštitnika. Ova

fenolna jedinjenja sprečavaju oksidaciju LDL i utiču na porast lipoproteina visoke gustine (HDL), koji sprečavaju začepljenje arterija i predstavljaju pozitivne regulatore masnoće u krvi.

Kardioprotektivni efekat crvenog vina je u početku pripisivan etanolu a studija Siemanna i Creasy-ja (1992) godine ukazuje na to da kardioprotektivni efekat ima resveratrol (Sovak, 2001). Najznačajnija biološka dejstva resveratrola su: inhibicija lipidne peroksidacije, neutralizacija slobodnih radikala, inhibicija agregacije trombocita, antikancerogena aktivnost, estrogena aktivnost, helacija bakarnih jona, vazorelaksaciona aktivnost.

Kao pripadnici klase polifenola, ova jedinjenja imaju sposobnost da "hvataju" i neutrališu toksične oblike kiseonika – tzv. slobodne radikale. U organizmu čoveka, slobodni radikali reaguju sa lipidima ćelijskih membrana, proteinima tkiva ili enzimima, ugljenim hidratima i DNK, izazivajući oštećenja ćelijskih membrana i lizu ćelija, modifikaciju proteina i enzima, oksidaciju ugljenih hidrata i oštećenja DNK. Oštećenja izazvana slobodnim radikalima (oksidativni stres) direktno su povezana sa procesom starenja (naročito kože i vezivnih tkiva) i razvojem nekih degenerativnih oboljenja, kao što su reumatoidni artritis, oboljenja srca i krvnih sudova, degenerativne očne bolesti (katarakta), i razni neurodegenerativni procesi, multipla skleroza, astma, dijabetes i neki oblici karcinoma. Konkretno, resveratrol u značajnoj meri snižava nivo serumskih lipida i smanjuje agregaciju krvnih pločica, što u velikoj meri umanjuje rizik od infarkta miokarda. Antocijanini su vazoaktivne supstancije, a ispoljavaju i vrlo izraženu antioksidantnu aktivnost. Procijanidini izolovani iz semena grožđa imaju veliki značaj u lečenju nekih vaskularnih poremećaja.

Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja rezultat je njihove sposobnosti da budu donori vodonika slobodnim radikalima (npr. u reakciji oksidacije lipida) i nakon toga nastaju manje reaktivni fenoksil radikal: $\text{Ph-OH} + \text{ROO}^\circ \rightarrow \text{Ph-O}^\circ + \text{ROOH}$

Stabilizacija fenoksil radikalima moguća je kuplovanjem sa slobodnoradikaliskim vrstama koje su karakteristične za reakcije oksidacije lipida, pri čemu nastaju relativno stabilne neradikalske vrste (Duh et al., 1999). Polifenolna jedinjenja definisana kao antioksidansi moraju da zadovoljavaju dva osnovna uslova:

1. Antioksidansi prisutni u malim koncentracijama u supstratu mogu da odlože, uspore ili spreče delovanje slobodnih radikala (Halliwell i Gutteridge, 1990);
2. Novonastali radikal (nastao dejstvom antioksidanasa) mora da bude stabilan (Shahidi i Wanasudara, 1992).

Nekoliko studija ukazuju na to da zbog svojih antioksidativnih svojstava crveno vino je u stanju da inhibira oksidaciju LDL (Frankel et al., (1993, 1998); Maier et al., 1994), blokira genotoksični efekat mutagene okoline (Kobayashi et al., 1999), i smanji učestalost bolesti srca i krvnih sudova (Burns et al., 1993, Waterhouse, 2008). U svetu se proizvode vina obogaćena tim sastojcima, koja se u prometu deklarišu kao „vino za srce“.

Dokazano je da flavonoidi i polifenolne komponente vina: ferulat, etilgalat, ferulna kiselina, galna kiselina, kafe kiselina i dr. inhibiraju do 80% HIV pojava oblika, time što inhibiraju lipoperoksidaciju ćelija. Smatra se da povezivanjem flavonoida i drugih čestica slobodnih radikala u kombinaciji sa antivirusnim lekovima može biti dobijeno terapijsko sredstvo u borbi protiv „kuge dvadesetog veka“ (Edeas i Lindenbaum, 2001).

Brojna istraživanja dejstva kvercetina na organizam pokazala su da ovo flavonoidno jedinjenje poseduje pozitivne osobine: antikancerogeno dejstvo se ogleda u inhibiranju proliferacije ćelija; antivirusno dejstvo usled inhibicije aktivnosti polimeraze, enzima odgovornog za replikaciju virusa; anti inflamatorno dejstvo se ogleda u inhibiranju metabolizma ekanoida koji su značajni za reakcije inflamacije; kardioprotekorno dejstvo ogleda se u redukciji aktivnosti krvnih pločica čime se umanjuje rizik od tromboze (Jović et al., 2002).

U vinu se nalazi i salicilna kiselina koja ne samo da je u stanju da razgađuje masnoću i snižava nivo holesterola u krvi, već deluje i kao rastvarač čestica koje se nalaze u krvi i time sprečava začepljenje arterija (Maury, 2001). U vinu je nađeno oko 60 mg/l salicilne kiseline, što predstavlja dvostruko veću količinu u poređenju sa dnevnom dozom aspirina koji lekari preporučuju kao predohranu za oboljenja kardiovaskularne prirode.

2.6. AUTOHTONE SORTE VINOVE LOZE

U svakom vinogradarskom regionu sveta postoje sorte koje su se u toku dugog vremenskog perioda prilagodile klimatsko-edafskim uslovima područja (Savić, 2003). Takav sortiment nosi naziv autohtoni ili aborigeni koji pod uticajem ekoloških i agrotehničkih uslova, ispoljava svoj sirovinski potencijal, koji je osnova za proizvodnju grožđa karakterističnog sastava i osobina koje daju pečat kvalitetu vina. U Srbiji, pored stranih sorti, u sortimentu sve značajnije mesto počinju da zauzimaju i autohtone sorte: Prokupac, Smederevka, Tamnjanika bela i crna, Kreaca, Plovdina i dr. Autohtone sorte dobijaju imena prema kraju iz kog potiču ili putu kojim su dospele u određene krajeve.

2.6.1. Prokupac

Sorta Prokupac je jedna od najrasprostranjenijih autohtonih sorti Srbije, a gaji se i u Makedoniji i Bugarskoj.

Sinonimi po kojima se može naći kod nas su: Niševka, Prokupka, Crnka, Kameničarka, Rskavac, Skopsko crno, Majki čorni, Zarčin. U Srbiji je zastupljen u sortimentu vinogradarskog regiona Centralna Srbija, i to u južnim područjima (niški, nišavski, toplički, leskovački, vranjski rejon) ali se mestimično može naći i u vinogradarskom regionu Vojvodine. Sve je zastupljenija u novim zasadima na jugu Srbije.

Ova sorta vodi poreklo iz okoline Prokuplja. Pretpostavlja se da je dobila ime po Prokuplju i selu Kamenica „kameničarka”. Prokuplje sa okolinom predstavlja stari vinogradarski centar. Rimski spomenici iz I, II i III veka n.e., sa urezanim delovima vinove loze, potvrđuju činjenicu da je vinogradarstvo bilo razvijeno još na početku nove ere, a možda i ranije. Kneginja Milica je poveljom iz 1395. godine poklonila vinograd manastiru Svetog Pantelejmona na Svetoj Gori. To je prvi pisani dokument u kome se pominje ime Prokuplja, kao područja koje je bogato vinovom lozom. Još od tog vremena verovatno potiče i sorta vinove loze Prokupac.

List je razvijen i veliki, trodelan je i ceo, sa plitkim gornjim lateralnim urezima. Liska je tamno zelena, plitko olučasta, mrežasto naborana i mekana. Na licu lista nalaze se jedva vidljive paučinaste dlačice, a naličje je obraslo srednje gustim sivim maljama. Peteljka je osrednje dužine i debljine, malo rebrasta, zelena i delimično ljubičasta. Cvet je dvopolan i sa 5-6 prašnika, koji su viši u odnosu na dobro razvijeni tučak flašastog oblika.

Grozd je srednje krupan do krupan, srednje zbijen i valjkast. Masa grozda varira u zavisnosti od varijeteta i kreće se od 150 do 300 g. Grozd se obično nalazi na četvrtom ili petom kolencu rodnog lastera. Bobica je srednje krupna, okrugla, tamno plave boje pokožice, sa obilnom peteljkom i prijatnog je ukusa i mirisa.

Grožđe sazreva u III i IV epohi, pa je veoma poznata sorta. Prinos grožđa je vrlo dobar, pa čak i obilan (od 15 do 20 t/ha). Grozdovi su srednje veličine, kupastog ili valjkastog oblika, umereno zbijene strukture. Bobice su srednje veličine, okruglog oblika sa dosta debelom pokožicom. Pokožica sadrži veliku količinu taninskih materija, (slika 2.30).



Slika 2.30. Sorta Prokupac

Šira sadrži od 18 do 22 % šećera i 5 do 7 g/l ukupnih kiselina. Vino sadrži od 10,5 do 13 vol. % alkohola. Ima lepu otvoreno ili zatvoreno rubin boju. Veoma je pitko i harmonično vino. U zavisnosti od načina prerade ova sorta je najpogodnija za proizvodnju kod nas veoma omiljenog vina tipa ružica. Vina mogu da služe za kupažiranje sa drugim sortama i za proizvodnju lozovače i vinjaka.

2.6.2. Plovdina

Sorta plovdina je poreklom sa Balkanskog poluostrva. Najviše se gaji kod nas i to u rejonima uže Srbije, ali i u Bugarskoj, Rumuniji, Makedoniji, Turskoj i Albaniji. Poznata je i pod imenima: Crvena slankamenka, Lisičina crvena, Drenak, Pamid i dr. Grožđe sazreva u III epohi. Veoma je prinosna sorta (od 15 do 20 t/ha). Grozd je srednje veličine ili velik, cilindrično konusan. Bobice su srednje veličine, izduženog ili ovalnog oblika. Pokožica je svetlije ili tamnije crvenkaste boje, slika 2.31.



Slika 2.31. Sorta Plovdina

Šira sadrži od 15 do 18 % šećera, a ukupnih kiselina od 4 do 6 g/l. Vino sadrži od 9,5 do 11 vol. % alkohola. Sorta daje redovno slabiji kvalitet vina. Ovo vino se koristi za kupažu sa drugim kvalitetnijim vinima ili za proizvodnju vinskog destilata.

Vino je pitko, tanko, sa niskim sadržajem alkohola i kiselina, obično žute boje, vrlo često sa blagom crvenkastom nijansom, posebno kada je u pitanju varijetet sa crnim bobicama. Neutralnog je ukusa, siromašno na mirisu, tanko, jednostavno. Zbog niskog sadržaja alkohola i kiselina, vino se teško čuva. Na domaćem tržištu ova sorta daje najveći deo sirovine za bela stona vina. Grožđe je prijatno za jelo, pa se često koristi i kao stono.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Grožđe

Za izradu eksperimentalnog rada kao sirovina je korišćeno grožđe dve autohtone sorte Prokupca i Plovdine sa područja Topličkog vinogorja (Jug Bogdanovački vinogradi, 43° 13' N/21° 42' E, na nadmorskoj visini od 250-400 m). Grožđe je brano u fazi tehnološke zrelosti (sadržaj šećera 19.29 % i sadržaj ukupnih kiselina 6.2 g/l) i odmah je obrađeno u laboratorijskim uslovima uz upotrebu tehnike mikroviniifikacije. U svrhu mikroviniifikacije korišćeno je 5 kg grožđa, muljanje grožđa je obavljeno ručnom muljačom sa valjcima uz odvajanje peteljki.

3.1.2. Lekovito bilje

Lekovito bilje: seme anisa (*Pimpinella anisum*), kora cimeta (*Cinnamomum verum*, sinonim, *C. zeylanicum*), list pelina (*Artemisia absinthium*), koren sladića (*Glycyrrhiza glabra*) nabavljene od „Adonis d.o.o. Soko Banja“. Lekovite biljke su dodavane u širu i kljuk na početku fermentacije u količini od 1 % (w/w).

3.1.3. Hemikalije i reagensi

Sve hemikalije koje su korišćene u analitičkom radu su analitičkog stepena čistoće:

- Folin-Ciocalteu (FC) reagens, DPPH (2,2-difeil-1-pikrilhidrazil), galna kiselina, katehin, (Sigma Chemical Company, USA).
- Natrijum-karbonat, Aluminijum(III) hlorid, (Alkaloid, Skoplje, Makedonija).
- Hlorovodonična kiselina (VWR Prolabo, Belgija).
- p-vanilin (Alfa Aesar, Germany).
- Metanol (Merck, Darmstadt, Germany).
- Bromtimolplavo, skrob, NaNO₂, NaOH, Kalijum metabisulfit, KMnO₄, aktivni ugalj, skrob, (Centrohema, Stara Pazova).
- CuSO₄ (mp Hemija, d.o.o., Beograd).
- Jod (NRK Inženjering, Beograd).
- Standardi za HPLC (Sigma, USA).

- Mueller-Hinton agar i Sabouard agar, hloramfenikol, streptomycin (Institut za imunologiju i virusologiju Torlak iz Beograda).
- Apsolutni etanol, HCl, (Zorka Pharma, Hemija, d.o.o).
- H₂SO₄ (RTB Bor Grupa)

3.2. METODE

Mikrovinifikacija u količini od 5 kg šire po ogledu je vršena u akreditovanoj laboratoriji Visoke Poljoprivredno prehrambene škole u Prokuplju. Sumporisanje je vršeno dodatkom 5% rastvora kalijummetabisulfita (K₂S₂O₅) u količini od 10 g/hl. Širi je dodato i lekovito bilje anis, cimet, pelin i sladić u količina od 1% u odnosu na masu šire.

Alkoholna fermentacija je izvođena na temperaturi od 16-18 °C i 22-25 °C pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* V1116 (Lalvin) u količini od 30 g/hl.

Analize vina urađene su u akreditovanoj laboratoriji VPPŠ, i laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Leskovcu i PMF-a u Nišu.

3.2.1. Određivanje sadržaja šećera

Sadržaj šećera u širi određivan je refraktometrijski pomoću laboratorijskog refraktometra po Abbe-u (Carl Zeiss, Jena, Nemačka).

3.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih kiselina

Sadržaj ukupnih kiselina u širi i vinu određivan je acidimetrijski i izražavan je kao sadržaj vinske kiseline u g/l. Vinu (10 cm³) se dodaje destilovana voda (30cm³) i titriše se NaOH (0,1 mol/dm³) uz dodatak bromtimol plavo kao indikatora do pojave plavo-zelene boje, (Daničić, 1985).

3.2.3. Određivanje sadržaja isparljivih kiselina

Isparljive kiseline određivane su u destilatu alkalimetrijskom metodom po Blarezu, (Daničić, 1985) uz fenolftalein kao indikator a izražavane kao sirćena kiselina u g/l.

3.2.4. Određivanje sadržaja ukupnog sumpordioksida

Sadržaj ukupnog sumpor dioksida određivan je jodometrijski po Ripper-u, (Daničić, 1985) a izražavan u mgSO₂/l.

3.2.5. Određivanje sadržaja pepela

Sadržaj pepela u vinu određivan je gravimetrijski posle uparavanja i žarenja uzorka vina na 550 °C. Izražavan je kao g/l. (Daničić, 1985).

3.2.6. Određivanje relativne gustine vina

Relativna gustina vina određena je piknometrijski (Daničić, 1985).

3.2.7. Određivanje sadržaja alkohola u vinu

Sadržaj alkohola u vinu određen je na osnovu relativne gustine destilata vina određene piknometrijski (Daničić, 1985).

3.2.8. Određivanje sadržaja ekstrakta

Ekstrakt vina čine neisparljivi sastojci, pa se ostatak posle destilacije vina prilikom određivanja sadržaja alkohola koristi za određivanje sadržaja ekstrakta u vinu. Na osnovu relativne gustina ostatka posle destilacije određene piknometrijski iz tablice se očitava sadržaj ekstrakta (g/l).

$$d_{\text{ost.dest.}} = (M_{\text{pod}} - M_{\text{pp}}) / (M_{\text{ph}} - M_{\text{pp}})$$

gde je:

$d_{\text{ost.dest}}$ – relativna gustina ostatka od destilacije ($d_{20/20}$); M_{pp} – masa praznog piknometra
 M_{ph} – masa piknometra sa vodom; M_{pd} – masa piknometra sa destilatom ; M_{pod} – masa piknometra sa ostatkom od destilacije, (Daničić, 1985).

3.2.9. Određivanje sadržaja ekstrakta bez šećera

Ekstrakt bez šećera predstavlja ukupni suvi ekstrakt koji se dobija kada se od sadržaja ekstrakta oduzme sadržaj ukupnih šećera (za sadržaj preko 1g/l), kalijum sulfata (za sadržaj preko 1g/l), prisutnog manitola i drugih prisutnih supstanci koje su dodate vinu.

3.2.10. Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja

Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja određivan je metodom po Folin-Ciocaltea-u (Singleton i Rossi, 1965). Analiziranom vinu (0,1cm³) (razblaženje 5 puta) dodata je destilovana voda (7,9 cm³), Folin Ciocalteau reagens (0,5 cm³) i vodeni rastvor Na₂CO₃ (1,5

cm³, ω=20%). Slepom probi je dodat Folin-Ciocalteu reagens (0,5 cm³), vodeni rastvor Na₂CO₃ (1,5 cm³, ω=20%) i 8 cm³ destilovane vode. Nakon inkubacije od 30 minuta na tamnom mestu i sobnoj temperaturi merena je apsorbancija reakcione smeše na 765 nm u odnosu na slepu probu na spektrofotometru (GENESYS 10S UV-VIS). Snimanjem apsorbanci serije standardnih rastvora galne kiseline dobijene su kalibraciona kriva (Prilog, sl. 1, tab 1) i jednačina standardne krive:

$$\text{Apsorbanca na 765 nm} = 0,0010 C_{\text{galna kiselina}} \text{ (mg/l)} + 0,0029, R^2 = 0,9950 \quad (2)$$

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja izražen je kao mg galne kiseline / dm³ (odnosno litru ispitivanog vina).

3.2.11. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u analiziranim vinima određen je spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum hloridom, koja se zasniva na stvaranju kompleksa flavonoidi-aluminijum (Zhishen et al., 1999 i Kim et al., 2003). U 1,0 cm³ uzorka vina (razblaženje 5) dodata je destilovana voda (4,0 cm³) a zatim 5% rastvor NaNO₂ (0,3 cm³). Nakon 5 minuta dodat je 10% rastvor AlCl₃ (0,3 cm³), a u šestom minutu rastvor NaOH (2 cm³, 1 mol/dm³) i 2,4 cm³ destilovane vode.

Odmah se pristupa merenju apsorbance na talasnoj dužini od 510 nm u odnosu na destilovanu vodu. Merenjem apsorbancije serije standardnih rastvora katehina dobijene su kalibraciona kriva (Prilog) i jednačina standardne prave:

$$A_{510} = 0,0032 C_{\text{katehina}} \text{ (mg/dm}^3 \text{ vina)} + 0,0376, R^2 = 0,9990$$

Ukupan sadržaj flavonoida izražen je kao mg katehina/l vina.

3.2.12. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana

Sadržaj ukupnih antocijana u analiziranim vinima određen je spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na svojstvu slobodnih antocijana da pri pH 1 povećavaju apsorpciju na 520 nm, a da se obezbojavaju sa SO₂ (koji se oslobađa u kiselj sredini iz natrijum-metabisulfita) (Ribereau-Gayoni Stonestreet, 1965). Boja koja ostane nakon obezbojavanja sa SO₂ potiče od polimernih pigmenata.

U prvi uzorak koji sadrži: analizirano vino (0,5 cm³), vodeni rastvor HCl (10 cm³, 2%), etanolni rastvor HCl (0,5 cm³ 1% rastvor u 96% etanolu) dodata je destilovana voda (4 cm³), a u drugi uzorak umesto destilovane vode dodat je Na-bisulfit (4 cm³, 20%). Nakon 20 minuta merena je optička gustina na talasnoj dužini od 520 nm. Iz razlike apsorbancije iz-

među dva uzorka, proračunavan je sadržaj antocijana u mg/dm^3 na osnovu kalibracione krive za koju je kao standard korišćen malvidin-3-glukozid, (Prilog) i jednačine krive:

$$A_{520} = 0,001C_{\text{malvidin-3-glukozid}} (\text{mg/dm}^3 \text{ vina}) - 0,001 \quad R^2 = 0,9990$$

3.2.13. Određivanje intenziteta i nijanse boje vina

Intenzitet i nijansa boje određeni su spektrofotometrijskom metodom (OIV, Edition 2012). Merenjem apsorbanci na talasnim dužinama 420, 520 i 620 nm dobijaju se vrednosti na osnovu kojih se izračunava intenzitet i nijansa boje. Vrednosti za intenzitet boje vina određuju „količinu“ boje u vinu, a nijansa boje se koristi kao parametar starenja vina. Intenzitet boje se izračunava kao zbir apsorbanci po obrascu:

$$I = A_{420} + A_{520} + A_{620} \quad \text{gde je } I \text{ - intenzitet boje,}$$

$$N = A_{420} / A_{520} \quad \text{gde je } N \text{ - nijansa boje}$$

3.2.14. Određivanje udela žute, crvene i plave boje i oblika spektra

Udeo pojedinih boja i oblik spektra određen je spektrofotometrijskom metodom (Glories, 1984). Merenjem apsorbanci vina na talasnim dužinama 420, 520 i 620 nm dobijaju se vrednosti na osnovu kojih se izračunava udeo žute, crvene i plave boje.

$$A_{420}\% = (A_{420} / I) 100; \quad \text{udeo žute boje u intenzitetu, } (A_{420}, \%):$$

$$A_{520}\% = (A_{520} / I) 100; \quad \text{udeo crvene boje u intenzitetu:}$$

$$A_{620}\% = (A_{620} / I) 100; \quad \text{udeo plave boje u intenzitetu}$$

$$\text{gde je } : I = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$dA\% = (1 - (A_{420} + A_{620}) / 2 A_{520}) 100; \quad \text{gde je } (dA\%) \text{ - oblik spektra}$$

3.2.15. Određivanje ukupnih flavan-3-ola

Koncentracija flavan-3-ola određena je spektrofotometrijskom metodom (Revilla et al., 1991). Flavonoidi manje molekulske mase (katehini), reaguju sa vanilinom gradeći crveno obojena jedinjenja sa maksimumom apsorpcije na 500 nm. U tabeli 3.1. je data šema pripreme uzoraka za određivanje flavan-3-ola:

Tabela 3.1. Način pripreme uzoraka za određivanje flavan-3-ola

	epruveta A	epruveta B	epruveta C
vino, ml	1,0	0,0	1,0
destilovana voda, ml	0,0	1,0	0,0
hlorovodonična kiselina, konc., ml	2,0	2,0	2,0
p-vanilin (1% rastvor u apsolutnom alkoholu), ml	1,0	1,0	0,0
96% (v/v) etanol, ml	1,0	1,0	2,0

Nakon 30 minuta meri se vrednost apsorbance na $\lambda=500$ nm u odnosu na destilovanu vodu kao slepu probu i dobijaju vrednosti za A_A , A_B i A_C , a vrednost za apsorbancu A izračunava se po jednačini:

$$A = A_A - A_B - A_C$$

Na osnovu izračunate vrednosti apsorbanci određuje se koncentracija ukupnih flavan-3-ola (mg/l CTE) iz kalibracione krive standardnog rasvora katehina (Prilog) i iz nje izvedena linearna jednačina krive: $y = 0,003 \cdot x + 0,008$, $R^2=0.999$

3.2.16. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost vina određivana je DPPH testom (Brand-Williams i sar., 1995). Napravi se serija razblaženja vina u opsegu koncentracija od 0,004 do 0,4 ml vina/ml i odgovarajuća zapremina uzorka ($2,5 \text{ cm}^3$) pomešana se sa 1 ml rastvora DPPH radikala u metanolu ($3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$). Nakon 30 minuta inkubacije, u mraku i na sobnoj temperaturi, merena je apsorbancija na talasnoj dužini od 517nm na spektrofotometru (GENESYS 10S UV-VIS) u odnosu na metanol kao slepu probu. Kao blank rastvor korišćen je metanol (1 cm^3) i različita razblaženja vina ($2,5 \text{ cm}^3$), a kao kontrola rastvor DPPH u metanolu. Kapacitet neutralisanja DPPH radikala izračunavan je korišćenjem formule:

$$\text{Kapacitet neutralisanja DPPH radikala (\%)} = 100 - [(A_u - A_b) 100/A_k]$$

A_u - Apsorbancija „uzorka“ na 517 nm ($2,5 \text{ cm}^3$ vina različitog razblaženja tretirano sa 1 cm^3 rastvora DPPH radikala)

A_b - Apsorbancija „blank-a“ na 517 nm ($2,5 \text{ cm}^3$ vina različitog razblaženja u 1 cm^3 metanola)

A_k - Apsorbancija „kontrole“ na 517 nm (1 cm^3 rastvora DPPH radikala koncentracije $3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ u $2,5 \text{ cm}^3$ metanola).

Vrednost EC_{50} izračunata je na osnovu eksperimentalnih podataka korišćenjem sigmoidne nelinearne metode pomoću programa Sigma Plot 2000 Trial.

3.2.17. HPLC-DAD hromatografija

Analiza fenolnih jedinjenja vina sa dodatkom lekovitog bilja izvršena je tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu Agilent 1200 Series sa UV-DAD (Ultra Violet-Diode Array Detektor) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Analiza je urađena po originalnoj metodi (Viet et al., 1995). Za hromatsko razdvajanje korišćena je Zorbax Eclipse XDB – C18 (150x4,6 mm, i.d., 5 μ m) pri zapremini injektiranog uzorka od 20 μ l, dok su hromatogrami snimljeni na talasnoj dužini od 360 nm. Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A- 1 % mravlja kiselina u vodenom rastvoru i B–metanol pri protoku od 0,5 cm³ /min i primenom sledećeg eluacionog profila: 0- 5 min: 70 % A i 30 % B; 5-20 min 30% A i 70 % B; 20-25min 10 % A i 90 % B .

Fenolna jedinjenja prisutna u vinima identifikovana su poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom za svaku komponentu. Potvrda identifikacije i određivanje sadržaja: galne kiseline, katehina, protokatehinske kiseline, epikatehina, kafene kiseline, vanilinske kiseline, siringinske kiseline, dihidroksi benzoeve kiseline, malvidin glukozida, sinapinske kiseline, ferulinske kiseline, kumarne kiseline, naringina, hiperozida, rutina, miricetina, naringenina, kvercetin određena je metodom eksternih standarda. Za svaki pojedinačni standard pripremljen je osnovni standard rastvora koncentracije 1,0 mg/cm³, rastvaranjem u metanolu a takođe i serija razblaženih rastvora koncentracija u opsegu 0,01-0,200 mg/cm³. Za svaki standard je konstruisana kalibraciona kriva, na osnovu dobijenih pikova u zavisnosti od koncentracije standarda. (Prilog). Iz jednačine linearne zavisnosti izračunate su koncentracije komponenti u uzorcima.

3.2.18. Ekstrakcija isparljivih jedinjenja u vinu putem mikroekstrakcije gasno-čvrstea faza (HS-SPM)

SPME ručni držač i fuzionirano vlakno od silike obloženo stacionarnom fazom Carboken®/ Polidimetilsilokane (CAR / PDMS) (debljina 85 μ m) nabavljene su od Supelco (Bellefonte, PA, USA) i korišćene za ekstrakciju jedinjenja arome iz uzoraka vina od strane HS-SPME. Pre prve upotrebe, vlakna su pripremljena prema uputstvu proizvođača. Dvadeset mililitara uzorka vina i 3 g NaCl stavljeno je u erlenmajer od 30 ml, zatvoreno gumenim zatvaračem i parafilmom i mešano magnetnom mešalicom. Da bi se postiglo stanje ravnoteže, uzorci su zagrejani na 55 °C i mešani magnetnom mešalicom tokom 15 minuta (predestrakcija).

Vlakno SPME je zatim umetnuto u prazan prostor uzorka i isparljive materije su ekstrahovane 35 minuta uz konstantno zagrevanje i mešanje na 55 °C. Vlakno je zatim desorbovano 10 minuta u ulazni split / splitless set na 250 °C u podeljenom režimu 20:1 i analizirano pomoću GC / MS i GC / FID.

3.2.19. GC/MS analiza isparljivih jedinjenja vina

GC-MS analiza isparljivih materija iz uzoraka vina izvršena je na gasnom hromatografu Agilent Technologies 7890B, spojenom sa inertnim, selektivnim detektorom mase 5977A iste kompanije. Komponente su razdvojene na slabo polarnoj, silicijumskoj kapilarnoj koloni, HP-5MS (5% difenil- i 95% dimetil-polisiloksan, 30 m × 0.25 mm, debljina filma 0.25 µm; Agilent Technologies, USA). Helijum je korišćen kao noseći gas, pri konstantnoj brzini protoka od 1 ml / min. Temperatura GC rerne držana je 2 min na 40 °C, povećana na 250 °C pri brzini od 7 °C / min, i na kraju održavana na 250 °C tokom 2 min. Ukupno vreme rada je bilo 34 min. Odvojene komponente su dalje analizirane masenim spektrometrom. Temperatura prenosne linije MSD, jonskog izvora i četvorostrukog masenog analizatora podešena je na 300 °C, 230 °C i 150 °C, respektivno. Napon jonizacije bio je 70 eV, a detekcija mase je izvršena u modu skeniranja, u opsegu od 25 do 550 *m/z*. Obrada podataka je izvršena pomoću MSD ChemStation (revizija F.01.00.1903) u kombinaciji sa AMDIS (revizija 2.70) i softverom NIST MS Search (verzija 2.0g) (Agilent Technologies, USA). Indeksi retencije komponenata iz uzorka eksperimentalno su određeni korišćenjem homolognih serija n-alkana iz C8-C20 kao standarda, analiziranih pod identičnim uslovima GC / MS i GC / FID. Identifikacija jedinjenja je zasnovana na poređenju eksperimentalno dobijenih indeksa linearne retencije (LR_Iekp-Tabele 1-5) sa onima u literaturi (LR_{II}lit - Tabele 1-5, Adams, 2007) kao i na poređenju njihovih EI masenih spektara sa podacima iz Villei 6, NIST11 i RTLPEST 3 biblioteka masenih spektara. Area % određene komponente u uzorcima je određeno na osnovu izveštaja o procentu površine (nekalibrisani postupak izračunavanja) generisanog od strane Agilent ChemStation softvera. Izveštaj Area% daje površinu svakog pika u toku kao procenat ukupne površine svih vrhova u toku.

3.2.20. Određivanje antimikrobne aktivnosti vina

Antimikrobna aktivnost vina određena je disk-difuzionom metodom (Acar i Goldstein, 1996) i mikrodilucionom metodom (Candan et. al., 2003).

3.2.20.1. Disk difuziona metoda

Uzorci vina su testirani *in vitro* na panel sojeve mikroorganizama koji pripadaju kolekciji mikroorganizama: ATCC (American Type of Culture Collection) i NCIMB (National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen). Standardni sojevi mikroorganizama nabavljeni su iz Instituta za imunologiju i virusologiju Torlak iz Beograda. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti vina vršeno je sa sledećim sojevima mikroorganizama: Gram-pozitivne bakterije: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 i kvasac: *Candida albicans* ATCC 10231.

Dobijeni rezultati su upoređivani sa aktivnošću antibiotika hloramfenikola, streptomocina i nistatina. hloramfenikol (30 µg/disk), streptomycin (10 µg/disk) i nistatin (30µg/disk) korišćeni su kao kontrola senzitivnosti testiranih mikroorganizama. Za mikrobiološku analizu korišćene su sledeće podloge: Müller-Hinton agar za gajenje G(+) bakterija i G(-) bakterija i Sabouraud dekstrozni agar za gajenje *Candida albicans*.

Sve agar ploče su pripremljene u Petri šoljama (90 mm) sa agarom (10 ml). Disk agar ploče inokulirane su sa suspenzijom testiranih mikroorganizama (100 µl). Sterilni diskovi filter papira ("Antibiotica Test Blattchen", Schleicher and Schuell, Dassel, Germany, 12,7 mm prečnika) su natopljeni sa svakim uzorkom vina (50µl) i postavljeni na inokulirane ploče. Petri šolje sa inokuliranim agarom i uzorcima vina su inkubirane (37 °C u toku 24h za bakterije i na 28 °C u toku 48 °C za gljivice).

Standardni diskovi (prečnika 6 mm) na hloramfenikol (30µg aktivne komponente), streptomycin (10 µg aktivne komponente), i nistatin (30µg aktivne komponente) su korišćene pojedinačno kao pozitivne kontrole. Mereni se prečnici zona inhibicije uzoraka (u mm) i upoređivani sa prečnicima zona inhibicije standarda (antibiotika).

3.2.20.2. Mikrodiluciona metoda

Antimikrobna aktivnost vina mikrodilucionom metodom urađena je korišćenjem mikrotitarske ploče sa 96 konusnih udubljenja. Mikrodilucionom metodom određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) prema nacionalnom komitetu za Klinički laboratorijski standard (NCCLS, 2003).

Za analizu su korišćeni mikroorganizmi:

Gram (+):

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,
- *Bacillus cereus* ATCC 11778,
- *Clostridium perfringens* ATCC 19404,
- *Enterococcus faecalis* ATCC 19433,
- *Sarcina lutea* ATCC 9341,

Gram (-):

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,
- *Salmonella enteritidis* ATCC 13076,
- *Escherichia coli* ATCC 11775,
- *Proteus mirabilis* ATCC 12453,
- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

Udubljenja su napunjena inokulisanim tečnim hranljivim medijumom u kome je dodata serija razređenja uzoraka. Vino je razblaživano u samoj tečnoj podlozi i dodato u mikrotitar pločama u Mueller-Hinton bujonu (zapremina 100 µl i koncentracija 10⁶ CFU/ml u svakom otvoru), ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Posle završetka inkubacije mikrobiološki rast je određivan uz pomoć univerzalnog čitača mikrotitarskih ploča na apsorbcanci od 620 nm. Dodatkom trifenil tetrazolijum hlorida (20 µl, 0,5%), određen je mikrobiološki rast. MIC je najniža koncentracija pri kojoj mikroorganizmi pokazuju vidljiv rast. Za određivanje MBC uzet je bujon sa svake ploče i inokuliran na Mueller-Hinton agaru (37 °C, 24 h). MBC je najniža koncentracija ekstrakata na kojima su ubijene 99,9 % inokilirane bakterijske kulture.

3.3. SENZORNO OCENJIVANJE VINA

Izvršeno je senzorno ocenjivanje vina od strane tri ocenjivača po sistemu pozitivnih bodova (sistem od 0 do 100). Tim sastavljen od tri ocenjivača ocenjivali su: vizuelni opažaji (boja i bistrina) 20 poena; olfaktorni opažaji (čistoća, finoća i intenzitet) 30 poena; gustativni opažaji (čistoća, struktura, harmonija) 30 poena; gustativno-olfaktorni opažaji (održivost, karakteristike vina sa geografskim poreklom) 20 poena.

3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Svi testovi su urađeni u triplikatu. Dobijeni eksperimentalni podaci obrađeni su odgovarajućim metodama koristeći paket Origin 8.0, Microsoft Excell 2007 i Sigma Plot Trial 2000. Statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima fenolnih jedinjenja između pojedinačnih uzoraka vina izvršena je u ANOVA. Za istraživanje značajnosti razlike

urađena je dvosmerna analiza varijanse. Zatim, poređenja su sprovedena pomoću Duncanovog testa sa nivoom značajnosti od 5%. Da bi se proučila korelacija između analiziranih parametara i sličnosti pojedinih uzoraka, primenjena je analiza glavne komponente (PCA). Ovaj metod je veoma koristan za analizu numeričkih podataka raspoređenih u matrici sa n opservacijama (uzorcima, tretmanima) i m promenljivima (parametrima). Da bi se vizualizirala korelacija između pojedinačnih parametara i sličnosti pojedinih tretmana, korišćen je *biplot*. Podaci su obrađeni u statističkom softveru XLSTAT. Matlab 2017 je korišćen za klastogram. Euklidsko rastojanje (Euclidean distance) je korišćeno kao mera udaljenosti pojedinih parametara, a (Pearson's) Pearsonov korelacioni koeficijent je korišćen za merenje sličnosti pojedinačnih parametara, a svi su bili najpre standardizovani.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. KINETIKA ALKOHOLNE FERMENTACIJE

Kinetika alkoholne fermentacije šire sa dodatkom lekovitog bilja praćena je merenjem mase erlenmajera u kojima se odvija alkoholna fermentacija gde razlika u masi predstavlja količinu proizvedenog ugljen-dioksida između dva merenja. Pretpostavljeno je da je zadovoljena stehiometrija između količine stvorenog ugljen-dioksida i alkohola i količine utrošenog šećera.

4.1.1. Kinetika alkoholne fermentacije Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja

4.1.1.1. Kinetika alkoholne fermentacije šire Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja na 17 °C

Masa ukupno oslobođenog ugljen-dioksida u toku alkoholne fermentacije šire Prokupca na temperaturi od 17 °C data je u tabeli 4.1. i predstavljena na slici 4.1.

Tabela 4.1. Ukupna količina izdvojenog CO₂ u toku fermentacije šire Prokupca na 17 °C

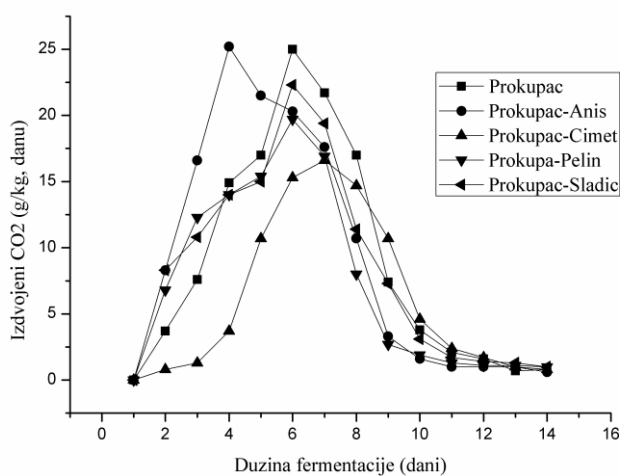
dani	Uzorak				
	Prokupac (PW)	Prokupac+Anis (PAW)	Prokupac+Cimet (PCW)	Prokupac+Pelin (PWW)	Prokupac+Sladić (PLW)
	Ukupno izdvojeni CO ₂ , g				
1	0	0	0	0	0
2	3,7	8,3	0,8	6,8	8,3
3	11,3	24,9	2,1	19,1	19,1
4	26,2	50,1	5,8	33,1	33,1
5	43,2	71,6	16,5	48,5	48,1
6	68,2	91,9	31,8	68,2	70,4
7	89,9	109,5	48,4	85,1	89,8
8	106,9	120,2	63,1	93,1	101,2
9	114,3	123,5	73,8	95,8	108,5
10	118,1	125,1	78,4	97,7	111,6
11	120,2	126,1	80,8	99,0	113,3
12	121,8	127,1	82,5	100,1	114,7
13	122,5	128,1	83,5	101,2	116,0
14	123,3	128,7	84,3	102,2	117,0
15	124,0	128,9	85,0	102,7	117,5
16	124,6	129,1	85,4	103,0	117,8

Trajanje *lag faze* na temperaturi od 17 °C je tri dana. Nakon toga ćelije kvasca se intenzivno dele, dolazi do povećanja koncentracije biomase koja se odvija eksponencijalno i praćeno je zamućenjem šire i izdvajanjem mehurića ugljendioksida. U ovoj fazi brzina rasta ćelija kvasca je najveća, a takođe je i najveća količina oslobođenog

ugljendioksida. Na dijagramu se vidi da *eksponecijalna faza* rasta kvasca traje od trećeg do sedmog dana. Eksponecijalna faza kod svih uzoraka se poklapa, sem kod vina sa dodatkom cimeta gde eksponecijalna faza počinje kasnije za jedan dan i kasnije se završava. U uzorku vina (Prokupac sa dodatkom cimeta) izdvaja se manja količina ugljendioksida. To se može objasniti inhibitornim delovanjem sastojaka cimeta na ćelije kvasca što ima za posledicu nastajanje manje količine etanola i sporiju fermentaciju koja u nekim slučajevima ne ide do kraja. Kio (1988) sa saradnicima je ispitivao inhibitorni efekat cimetaldhida na kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i dokazao da 100 µg/ml cimetaldhida u potpunosti inhibira rast ćelija kvasca. Sa rastom ćelija kvasca postepeno se iscrpljuje supstrat i dolazi do nagomilavanja etanola koji inhibira dalji rast ćelija kvasca, tako da se smanjuje brzina rasta ćelija kvasca a samim tim se smanjuje i količina oslobođenog ugljendioksida. Kvasci *Saccharomyces cerevisiae* tolerišu do 14 vol. % alkohola, osmofilni *S. rouxii* podnose do 18 vol. % (Arbeiter, 1999).

Na osnovu količine oslobođenog CO₂ izračunate su aktuelne brzine oslobađanja CO₂ (g/dm³dan) u toku eksponecijalne faze, kao i srednja brzina oslobađanja CO₂ u toku eksponecijalne faze rasta, što može indirektno poslužiti kao mera brzine potrošnje šećera i brzine rasta biomase kvasca. Vrednosti su prikazane na slici 4.1. i u tabeli 4.4.

Dodatak anisa širi povećava dok dodatak cimeta, pelina i sladića smanjuje srednju brzinu oslobađanja CO₂ pri čemu je najmanja brzina kod uzorka vina Prokupac kome je dodat cimet. Sličan efekat dodatak lekovitog bilja ima i na aktuelnu brzinu oslobađanja CO₂. Osim na brzinu dodatak anisa pomera maksimalnu brzinu prema početnom stadijumu fermentacije.



Slika 4.1. Brzina stvaranja ugljen-dioksida u toku alkoholne fermentacije šire Prokupca (temperatura 17 °C).

Na osnovu brzina oslobađanja CO₂ u eksponencijalnoj fazi maksimalna brzina fermentacije šire Prokupca ostvaruje se sa dodatkom anisa i to posle 5. dana fermentacije a najmanja dodatkom cimeta i to posle 8. dana fermentacije. Dodatak sladića, pelina i cimeta smanjuje i ukupno oslobođenu količinu CO₂ pa je stvorena količina za 5,5 % manja (sa dodatkom sladića), 17,3 % manja (sa dodatkom pelina) i 31,5 % manja (sa dodatkom cimeta) u odnosu na kontrolu (širu Prokupca bez dodatka lekovitog bilja), dok je za 3,6 % veća (sa dodatkom anisa) u odnosu na kontrolu.

4.1.1.2. Kinetika alkoholne fermentacije šire Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja na 22 °C

Kinetika alkoholne fermentacije šire Prokupca na temperaturi 22°C prikazana je u tabeli 4.2.

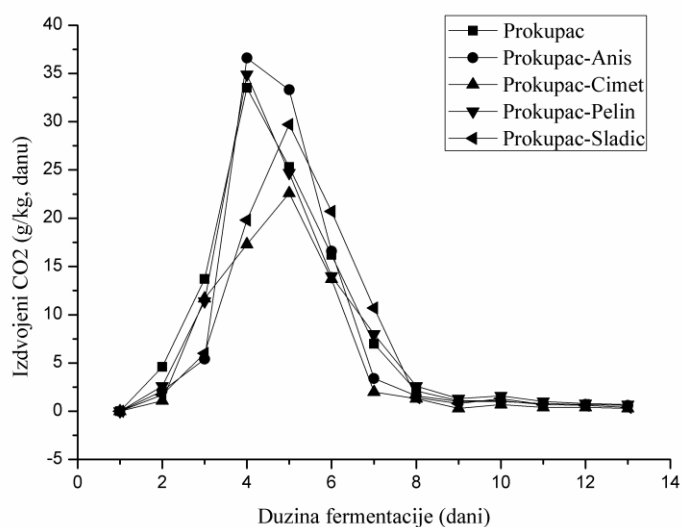
Tabela 4.2. Ukupna količina izdvojenog CO₂ u toku fermentacije šire Prokupca na 22 °C

dani	Uzorak				
	PW	PAW	PCW	PWW	PLW
	Ukupno izdvojeni CO ₂ , g				
1	0	0	0	0	0
2	4,6	2,1	1,1	2,6	1,7
3	18,3	7,5	12,8	14,0	7,7
4	51,8	44,1	30,1	48,9	27,5
5	77,1	77,4	52,7	73,6	57,2
6	93,3	94,0	66,4	87,6	77,9
7	100,3	97,4	68,4	95,6	88,6
8	102,4	99,0	69,7	98,2	90,0
9	103,5	100,0	70,0	99,5	90,8
10	104,6	101,0	70,7	101,1	92,1
11	105,3	101,8	71,1	102,1	92,8
12	105,9	102,5	71,5	102,9	93,4
13	106,3	103,1	71,8	103,6	93,8
14	106,6	103,5	72,1	104,0	94,1
15	106,9	103,8	72,4	104,3	94,4

Vrednosti brzina oslobađanja CO₂ u toku eksponencijalne faze prikazane su u tabeli 4.4.

U ovom slučaju najveća brzina oslobađanja CO₂ je kod vina Prokupac bez dodatka lekovitog bilja, dok je dodatak lekovitog bilja doveo do smanjenja brzine oslobađanja CO₂ kod svih uzoraka vina. Najmanja brzina oslobađanja CO₂ je kod uzorka vina Prokupac sa dodatkom cimeta.

Na osnovu vrednosti količine oslobođenog CO₂ izračunate su aktuelne brzine oslobađanja CO₂ u toku alkoholne fermentacije Prokupca na 22 °C (slika 4.2).



Slika 4.2. Brzina stvaranja ugljen-dioksida u toku alkoholne fermentacije šire Prokupca (temperatura 22 °C).

Na osnovu brzina oslobađanja CO₂ u eksponencijalnoj fazi maksimalna brzina se ostvaruje u vinu Prokupac sa dodatkom anisa posle 5. dana fermentacije, a najmanja u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta posle 8. dana fermentacije. Dodatak anisa, cimeta, pelina i sladića smanjio je ukupno oslobođenu količinu CO₂ u vinu, pa je stvorena količina za 2,4 % manja (sa dodatkom pelina), 2,6 % manja (sa dodatkom anisa), 11,7 % manja (sa dodatkom sladića) i 32,3 % manja (sa dodatkom cimeta) u odnosu na kontrolu.

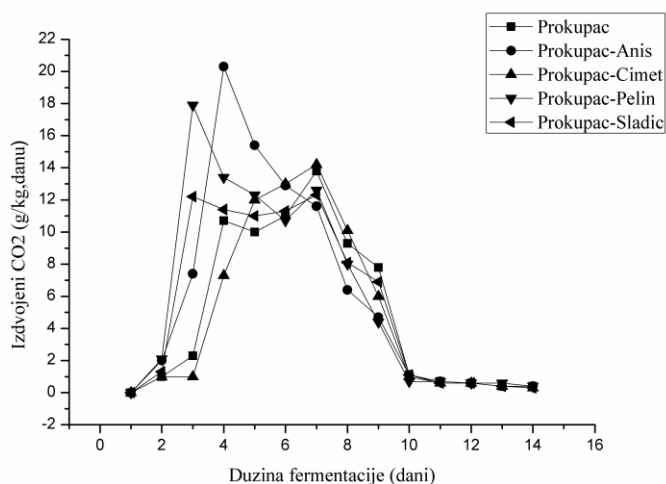
4.1.1.3. Kinetika alkoholne fermentacije kljuka Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja na 25 °C

Kinetika alkoholne fermentacije kljuka Prokupac na 25 °C prikazana je u tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Ukupna količina izdvojenog CO₂ u toku fermentacije kljuka Prokupca na 25 °C

dani	Uzorak				
	PW	PAW	PCW	PWW	PLW
	Ukupno izdvojeni CO ₂ , g				
1	0	0	0	0	0
2	1,0	2,0	1,0	2,1	13,5
3	3,3	9,4	2,0	20,0	25,7
4	14,0	29,7	9,3	33,4	37,1
5	24,0	45,1	21,3	45,7	48,1
6	35,0	58,0	34,3	56,4	59,4
7	48,8	69,6	48,5	69,0	71,7
8	58,1	76,0	58,6	77,0	79,8
9	65,9	80,7	64,6	81,4	86,7
10	67,0	81,8	65,6	82,1	87,8
11	67,7	82,5	66,2	82,8	88,4
12	68,3	83,1	66,8	83,4	89,0
13	68,7	83,5	67,2	84,0	89,4
14	69,1	83,9	67,5	84,4	89,7
15	69,4	84,2	67,8	84,7	90,0
16	69,5	84,3	67,9	84,8	90,1

Dodatak anisa, pelina i sladića kljuku Prokupca povećava brzinu oslobađanja, dok dodatak cimeta smanjuje brzinu oslobađanja CO₂, (tabela 4.4).



Slika 4.3. Brzina stvaranja ugljen-dioksida u toku alkoholne fermentacije kljuka Prokupca (temperatura 25 °C).

Promena aktuelne brzine oslobađanja CO₂ pokazuje postojanje dveju faza čiji maksimumi brzina se dešavaju između 3. i 4. dana fermentacije i 7. dana.

4.1.1.4. Uticaj temperature na brzinu fermentacije šire i kljuka Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja

Brzina oslobađanja CO₂ u toku fermentacije se sa povećanjem temperature najpre povećava a zatim opada (tabela 4.4)

Tabela 4.4. Vrednosti brzina oslobađanja CO₂ u toku eksponencijalne faze na različitim temperaturama

Uzorak	Brzina, g/dm ³ dan		
	17	22	25
PW	16,1±1,06	17,1± 0,87	9,6± 0,91
PAW	17,3±0,99	14,7±0,76	14,4±0,84
PCW	10,01±0,91	13,1±0,88	8,3±0,94
PWW	13,5±0,71	16,3±0,79	11,1±0,78
PLW	14,0±0,74	14,3±0,92	11,5±0,79

Generalno, maksimalna brzina se postiže na temperaturi od 22 °C a zatim opada. Može se reći da je sa stanovišta trajanja fermentacije i brzine oslobađanja CO₂ fermentaciju bolje voditi na nižoj temperaturi.

4.1.2. Kinetika alkoholne fermentacije Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja

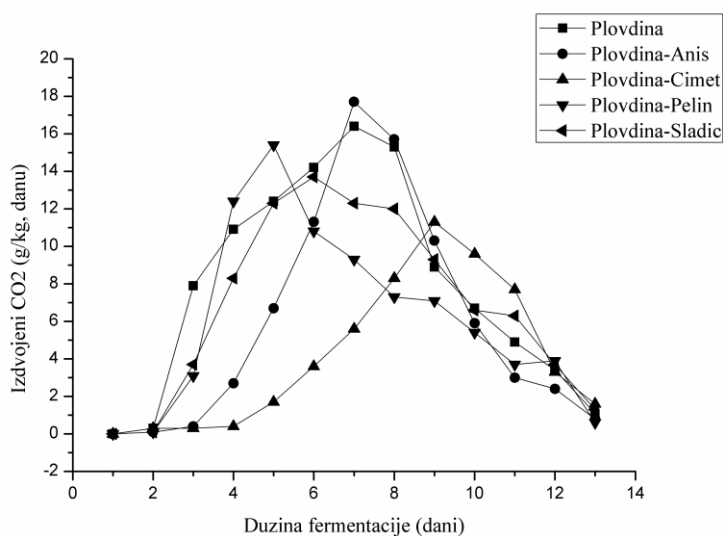
4.1.2.1. Kinetika alkoholne fermentacije šire Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja na 17 °C

Kinetika alkoholne fermentacije šire Plovdine na temperaturi 17 °C prikazana je u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Ukupna količina izdvojenog CO₂ u toku fermentacije šire Plovdine na 17 °C

Dani	Uzorak				
	P _L W	P _L AW	P _L CW	P _L WW	P _L LW
	Ukupno izdvojeni CO ₂ , g				
1	0	0	0	0	0
2	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1
3	10,9	0,5	0,6	3,2	3,8
4	21,8	3,2	1,0	15,6	12,1
5	34,2	9,9	2,7	31,0	24,4
6	48,4	21,2	6,3	41,8	38,1
7	64,8	38,9	11,9	51,1	50,4
8	80,1	54,6	20,2	58,4	62,4
9	89,0	64,9	31,5	65,5	71,7
10	95,7	70,8	41,1	70,9	78,3
11	100,6	73,8	48,8	74,6	84,6
12	104,2	76,2	52,1	78,5	88,3
13	105,3	77,0	53,7	79,1	89,6
14	106,3	77,7	55,0	79,5	90
15	107,0	78,3	56,0	79,8	90,3
16	107,4	78,7	56,4	79,9	90,4

Na osnovu vrednosti količine oslobođenog CO₂ izračunata je brzina oslobađanja CO₂ u toku eksponencijalne faze što može indirektno poslužiti kao mera brzine potrošnje šećera i brzine rasta biomase kvasca.



Slika 4.4. Brzina stvaranja ugljen-dioksida u toku alkoholne fermentacije šire Plovdina (temperatura 17 °C)

Na osnovu brzine oslobađanja CO₂ u eksponencijalnoj fazi maksimalna brzina se ostvaruje kod vina Plovdina bez dodatka lekovitog bilja tokom 5-og dana fermentacije a najmanja sa dodatkom cimeta posle 9. dana fermentacije. Dodatak anisa, cimeta, pelina i sladića doveo je do smanjenja ukupno oslobođene količine CO₂, pa je stvorena količina CO₂ za oko 13 % manja (sa dodatkom sladića), 13,3 % manja (sa dodatkom pelina), 22,8 % manja (sa dodatkom anisa) i 35,9 % manja (sa dodatkom cimeta) u odnosu na kontrolu (vino Plovdina bez dodatka lekovitog bilja).

4.1.2.2. Kinetika alkoholne fermentacije šire Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja na 22 °C

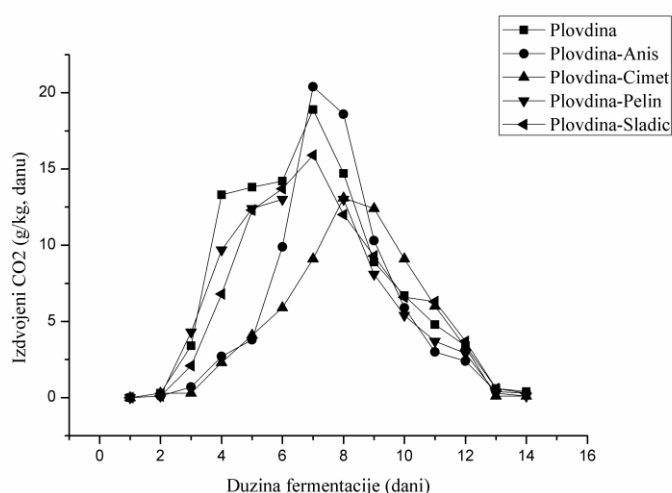
Kinetika alkoholne fermentacije šire Plovdine na temperaturi 22 °C prikazana je u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Ukupna količina izdvojenog CO₂ u toku fermentacije šire Plovdine na 22 °C

Dani	Uzorak				
	Plovdina	Plovdina+Anis	Plovdina+Cimet	Plovdina+Pelin	Plovdina+Sladić
	Ukupno izdvojeni CO ₂ , g				
1	0	0	0	0	0
2	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1
3	3,7	0,8	0,6	4,4	2,2

4	17,0	4,6	2,9	14,1	9,0
5	30,8	8,4	7,0	26,5	21,3
6	45,0	18,3	12,9	39,5	35,0
7	63,9	38,7	22,0	55,9	50,9
8	78,3	57,3	35,1	68,9	62,9
9	87,2	67,6	47,5	77,0	72,2
10	93,9	73,5	56,6	82,4	78,8
11	98,7	76,5	62,6	86,1	85,1
12	102,1	78,9	65,9	89,0	88,8
13	102,7	79,3	66,0	89,3	89,4
14	103,1	79,6	66,1	89,4	89,7

Uzorak dobijen fermentacijom šire Plovdine na temperaturi od 22 °C sa dodatkom pelina povećao je brzinu oslobađanja CO₂ u poređenju sa Plovdinom bez dodatka lekovitog bilja. Dodatak anisa, cimeta i sladića smanjio je brzinu oslobađanja CO₂, dok je najmanja brzina oslobađanja CO₂ sa dodatkom cimeta, (Slika 4.5).



Slika 4.5. Brzina stvaranja CO₂ u toku alkoholne fermentacije šire Plovdina (temperatura 22 °C)

Praćenjem brzine oslobađanja CO₂ u eksponencijalnoj fazi kinetike fermentacije šire Plovdine na 22°C, maksimalna brzina fermentacije šire Plovdine ostvarena je posle 5. dana fermentacije a najmanja brzina se ostvaruje 9. dana fermentacije u uzorku šire Plovdine sa dodatkom cimeta.

Dodatak lekovitog bilja dovodi do smanjenja ukupno oslobođene količine CO₂, pa je oslobođena količina CO₂ za 13 % manja (sa dodatkom sladića), za 13,3 % manja (sa dodatkom pelina, za 22,8% manja (sa dodatkom anisa) i 35,9% manja (sa dodatkom cimeta) u odnosu na kontrolu.

4.1.2.3. Kinetika alkoholne fermentacije kljuka Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja na 25 °C

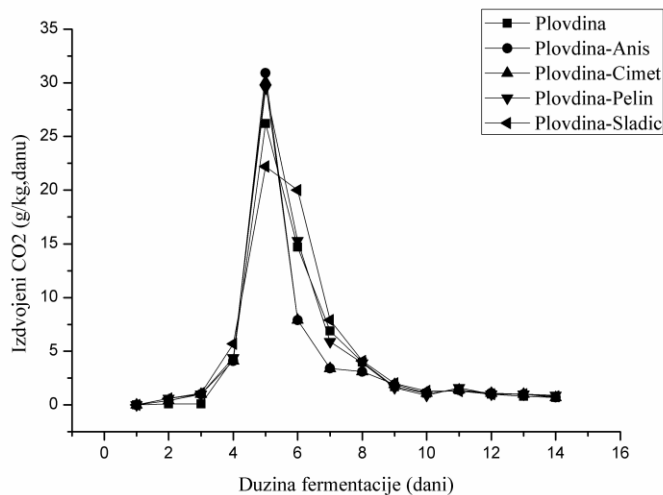
Kinetika alkoholne fermentacije kljuka Plovdine na temperaturi 25°C prikazana je u tabeli 4.7.

Tabela 4.7. Ukupna količina izdvojenog CO₂ u toku fermentacije kljuka Plovdine na 25°C

Dani	Uzorak				
	Plovdina	Plovdina+Anis	Plovdina+Cimet	Plovdina+Pelin	Plovdina+Sladić
	Ukupno izdvojeni CO ₂ , g				
1	0	0	0	0	0
2	0,1	0,4	0,4	0,6	0,6
3	0,2	1,4	1,4	1,6	1,7
4	4,5	5,5	5,5	6,0	7,4
5	30,7	36,4	35,6	35,5	29,6
6	45,4	44,3	43,5	50,8	49,6
7	52,3	47,7	46,9	56,7	57,2
8	56,3	50,8	50,0	60,6	61,3
9	58,0	52,7	51,9	62,2	63,3
10	59,1	53,8	53,0	63,1	64,6
11	60,5	55,2	54,4	64,7	65,9
12	61,5	56,3	55,5	65,7	66,9
13	62,3	57,3	56,5	66,7	67,9
14	63,0	58,0	57,2	67,6	68,7

Vrednosti brzina oslobađanja CO₂ u toku eksponencijalne faze prikazane su u tabeli 4.8.

Brzina oslobađanja CO₂ pri fermentaciji kljuka Plovdine na 25°C je smanjena u slučaju dodatka anisa i cimeta a povećana sa dodatkom pelina i sladića u odnosu na kontrolu (vino Plovdina bez dodatka lekovitog bilja).



Slika 4.6. Brzina stvaranja ugljen-dioksida na temperaturi 25 °C

Maksimalna brzina se ostvaruje posle 5. dana fermentacije kljuka Plovdine na 25 °C nezavisno od vrste dodatog lekovitog bilja.

4.1.2.4. Uticaj temperature na brzinu fermentacije šire i kljuka Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja

Sa dodatkom anisa, cimeta i pelina kljuku Plovdine pri alkoholnoj fermentaciji na 25°C došlo je do povećanja brzine oslobađanja CO₂ a sa dodatkom sladića došlo je do smanjenja brzine oslobađanja CO₂ u odnosu na vino Plovdina (kontrola), (tabela 4.8).

Tabela 4.8. Vrednosti brzina oslobađanja CO₂ u toku eksponencijalne faze na različitim temperaturama

Uzorak	Brzina, g/dm ³ dan		
	17	22	25
Temperatura, °C			
PLW	12,4± 0,86	10,6±0,93	10,2±0,94
PLAW	9,6±0,92	9,2±0,79	12, ±0,84
PLCW	6,1±0,91	6,9±0,85	11,7±0,86
PLWW	10,3±0,87	11,2±0,95	11,6±0,95
PLLW	9,5±0,97	10,2±0,91	9,7±0,96

4.2. FIZIČKO-HEMIJSKA ANALIZA VINA

4.2.1. Fizičko-hemijska analiza vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

4.2.1.1. Fizičko-hemijski parametri vina Prokupac dobijenog fermentacijom šire Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja na 17 °C i 22 °C

Nakon alkoholne fermentacije vina su posle odležavanja od 6 meseci analizirana i određeni su fizičko-hemijski parametri vina.

Rezultati fizičko-hemijske analize vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja prikazani su u tabelama 4.9; 4.10; 4.11; 4.12; 4.13; 4.14 i 4.15.

Rezultati osnovnih parametara kvaliteta vina u 2015 godini prikazani su u tabeli 4.9. Sadržaj alkohola u svim ispitivanim vinima varirao je u intervalu od 10,11 vol. % za vino Prokupac, kontrola (PW) do 10,44 vol. % za vino Prokupac sa dodatkom sladića (PLW), (berba 2015, na temperaturi od 17 °C). Na temperaturi fermentacije od 17 °C dobijena su vina sa relativno niskim sadržajem alkohola koja pripadaju kategoriji umereno jakih vina. Sadržaj ukupnih kiselina izražen kao vinska kiselina je u rasponu od 5,67 g/l do 6,60 g/l u uzorcima vina Prokupac sa dodatkom anisa (PAW) i vino Prokupac sa dodatkom sladića (PLW) respektivno. Sadržaj isparljivih kiselina izražen kao sirćetna kiselina (g/l) kretao se u intervalu od 0,24 g/l (za PAW) do 0,35 (g/l) za PWW i PLW. Sadržaj ukupnog ekstrakta bio je najniži u kontrolnom vinu PW (16,10 g/l), dok je vino sa dodatkom cimeta (PCW) imalo najveći sadržaj ukupnog ekstrakta od 18,60 g/l. Najmanji sadržaj redukujućih šećera imalo je vino Prokupac bez dodatka lekovitog bilja (0,62 g/l), a najveći sadržaj šećera imalo je vino sa dodatkom sladića (1,10 g/l). Najmanji ekstrakt bez šećera imalo je vino Prokupac (16,10 g/l) dok je najveći ekstrakt bez šećera imalo vino Prokupac sa dodatkom sladića (18,40 g/l). Sadržaj pepela u vinu Prokupac bio je najniži (2,03 g/l), sa dodatkom anisa (2,19 g/l) a najveći sadržaj pepela je imalo vino Prokupac sa dodatkom cimeta (3,20 g/l).

Nešto veće vrednosti svih parametara imala su vina dobijena fermentacijom na 22 °C. Sadržaj alkohola u svim ispitivanim vinima imao je nešto veće vrednosti i kretao se od 10,61 vol. % (PW) do 10,78 vol. % (PLW).

Salinas i saradnici (2005) su pratili tok alkoholne fermentacije i utvrdili da temperatura maceracije utiče na sadržaj alkohola u roze vinu. Na temperaturi maceracije od 10 °C i dužini maceracije od 8h, sadržaj alkohola iznosio je 11,66 vol. %, dok je na 15 °C sadržaj alkohola iznosio 12,00 vol. %.

Sadržaj ukupnih kiselina kretao se od 6,00 g/l (PW) do 7,30 g/l (PLW), a isprarljive kiseline izražene kao sirćetna kiselina (g/l) imale su vrednosti od 0,36 g/l (PWW) do 0,43 g/l (PLW).

Sadržaj šećera je bio nešto veći i iznosio je od 0,90 g/l (PW) do 1,47 g/l (PLW), a vrednosti pepela kretale su se od 2,08 g/l (PW) do 2,88 g/l (PLW).

Sa povećanjem temperature povećava se i količina ekstrakta u vinima, a takođe količina ekstrakta se povećava i dodatkom lekovitog bilja. Ovi rezultati su u saglasnosti i sa rezultatima Munteana i Gheoghita. Muntean i Gheoghit (2008) su utvrdili analizom da povećanje temperature maceracije sa 10-11 °C na 20-21 °C utiče na povećanje sadržaja ekstrakta u vinu od 17,2-18,2 (g/l). Povećanje temperature uticalo je takođe na povećanje sadržaja ukupnog ekstrakta, pepela, ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i antocijana u vinima. I dodatak lekovitog bilja uticao je na povećanje ukupnog ekstrakta, ekstrakta bez šećera, ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i antocijana. Sa povećanjem temperature povećava se brzina ekstrakcije fenolnih jedinjenja, flavonoida, i mineralnih materija, pa se i povećava njihov sadržaj u vinu a takođe se povećava i sadržaj pepela, odnosno mineralnih materija.

Tabela 4.9. Fiziko-hemijski parametri vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

Uzorak	Berba	Alkohol, vol%		Ukupne kiseline (kao vinska), (g/l)		Isparljive kiseline (kao sirćetna) (g/l)		Ukupni ekstrakt, (g/l)		Redukujući šećeri, (g/l)		Ekstrakt bez šećera, (g/l)		Pepeo, (g/l)	
		17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C
Prokupac, (PW)	2015	10,11	10,61	6,05	6,00	0,32	0,38	16,10	16,09	0,62	0,90	16,10	16,90	2,03	2,08
Prokupac-Anis, (PAW)	2015	10,36	10,61	5,67	5,70	0,24	0,39	16,30	17,70	0,76	1,40	16,30	17,30	2,19	2,60
Prokupac-Cimet,(PCW)	2015	10,28	10,70	6,12	6,00	0,33	0,48	18,60	18,90	0,95	2,10	17,80	17,90	3,20	3,27
Prokupac-Pelin,(PWW)	2015	10,36	10,70	6,50	5,80	0,35	0,36	17,30	19,00	0,68	1,20	17,30	18,80	2,36	2,65
Prokupac-Sladić,(PLW)	2015	10,44	10,78	6,60	7,30	0,35	0,43	18,40	19,60	1,10	1,47	18,40	19,30	2,38	2,88

Tabela 4.10. Ukupna fenolna jedinjenja, ukupni flavonoidi i ukupni antocijani vina Prokupac

Uzorak	Berba	Ukupna fenolna jedinjenja (mg GAE/l)		Ukupni flavonoidi (mg CTE/l)		Ukupni antocijani (mg/l)	
		17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C
Prokupac,(PW)	2015	293,3	343,4	105,6	130,5	52,8	61,2
Prokupac-Anis,(PAW)	2015	321,4	392,6	109,5	137,9	51,7	55,9
Prokupac-Cimet,(PCW)	2015	530,0	599,6	205,0	235,5	50,9	53,9
Prokupac-Pelin,(PWW)	2015	365,7	435,2	129,5	158,9	47,7	53,2
Prokupac-Sladić,(PLW)	2015	465,4	499,3	136,3	147,6	52,7	55,3

U tabeli 4.10. dat je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaj ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana u crvenom vinu Prokupac, na dve temperature fermentacije (17 i 22 °C, berba 2015). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja raste sa povećanjem temperature, za vino Prokupac na temperaturi 17 °C od 293,3 (mgGAE/l) do 530,0 (mgGAE/l) za Prokupac sa dodatkom cimeta. Na temperaturi od 22°C sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu Prokupac je bio 343,4 (mgGAE/l) a najviše fenolnih jedinjenja imalo je vino Prokupac sa dodatkom cimeta 599,6 (mgGAE/l).

Trend rasta ukupnih flavonoida (mg CTE/l) bio je sličan rastu ukupnih fenolnih jedinjenja. Najmanju količinu ukupnih flavonoida imalo je vino Prokupac na temperaturi od 17 °C (105,6 mg CTE/l) i na temperaturi od 22 °C (130,5 mg CTE/l), dok najveći sadržaj ukupnih flavonoida na 17 °C imalo je vino Prokupac sa dodatkom cimeta 205,0 (mg CTE/l), a na 22 °C je iznosio 235,5 (mg CTE/l). Uočene su značajne razlike ($p < 0,05$) u sadržaju ukupnih flavonoida između pojedinih uzoraka vina Prokupac.

Sadržaj ukupnih antocijana varirao je između ispitivanih uzoraka vina. Uočene su statistički značajne razlike između vina sa dodatkom lekovitog bilja i kontrole ($p < 0,05$). Vino Prokupac (PW) bilo je najbogatije u TAC (ukupni antocijani) u odnosu na vina sa dodatkom lekovitog bilja (PAW, PCW, PWW i PLW). Ukupni rezultati za TAC ukazali su da je dodavanje lekovitog bilja uticalo na sadržaj antocijana u uzorcima vina sa dodatkom lekovitog bilja. Ova opservacija je u skladu sa literaturom, jer se sadržaj antocijana može smanjiti usled polimerizacije, interakcije sa drugim fenolnim jedinjenjima, apsorpcije zidova ćelije kvasca, oksidacije idr, kako je navedeno u literaturi (Ricardo da Silva, 1997).

4.2.1.2. Fizičko-hemijski parametri vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja dobijenog fermentacijom kljuka na 25°C

U tabeli 4.11. dati su fizičko-hemijski parametri vina Prokupac dobijenog fermentacijom kljuka na temperaturi od 25°C.

Tabela 4.11. Fizičko-hemijski parametri vina Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja (kljuk)

Varijanta ogleđa	Berba	Alkohol, vol. %	25 °C					
			Ukupne kiseline (kao vinska), (g/l)	Ispaljive kiseline (kao sirćetna) (g/l)	Ukupni ekstrakt, (g/l)	Redukujući šećeri, (g/l)	Ekstrakt bez šećera, (g/l)	Pepeo, (g/l)
Prokupac, (PW)	2015	12,16	5,7	0,45	22,6	1,4	22,2	2,54
Prokupac-Anis, (PAW)	2015	12,25	4,8	0,41	23,5	1,3	23,2	3,30
Prokupac- Cimet,(PCW)	2015	12,52	5,6	0,46	25,3	1,6	24,7	3,72
Prokupac-Pelin, (PWW)	2015	12,52	4,8	0,48	24,1	1,5	23,6	3,16
Prokupac-Sladić, (PLW)	2015	12,87	5,3	0,44	24,6	2,4	23,2	3,07

Sadržaj alkohola varirao je u intervalu od 12,16 vol. % za vino Prokupac (PW, kontrola) do 12,87 vol. % za vino Prokupac sa dodatkom sladića (PLW). Najmanje ukupnih kiselina 4,8 (g/l) (izraženih kao vinska kiselina) imala su vina (PAW) i (PWW) dok je najveći sadržaj ukupnih kiselina imala kontrola (PW). Vrednosti isparljivih kiselina kretale su se od 0,41 (g/l, izražene kao sirćetna kiselina) za vino Prokupac sa dodatkom anisa, (PAW) do 0,48 (g/l) za Prokupac sa dodatkom pelina, (PWW). Najmanji sadržaj ukupnog ekstrakta 22,6 (g/l) imalo je vino Prokupac (PW), a najveći sadržaj ukupnog ekstrakta imalo je vino Prokupac sa dodatkom cimeta (PCW). Sadržaj redukujućih šećera kretao se u intervalu od 1,3 (g/l) za (PAW) do 2,4 (g/l) za (PLW). Sadržaj pepela povećavao se sa dodatkom lekovitog bilja, najmanji sadržaj od 2,54 (g/l) imala je kontrola (PW), a najveći 3,72 (g/l) je imalo vino Prokupac sa dodatkom cimeta (PCW).

U tabeli 4.12. date su prosečne vrednosti ukupnih fenolnih jedinjenja crvenog vina Prokupac dobijenog fermentacijom kljuka na 25 °C.

Tabela 4.12. Prosečne vrednosti ukupnih fenolnih jedinjenja vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja, dobijenog fermentacijom kljuka na 25 °C, (berba 2015).

	TPC (mgGAE/l)
Vino, 25°C	2015.
Prokupac (PW)	970,1±6,1
Prokupac-Anis (PAW)	945,3±8,9
Prokupac-Cimet (PCW)	1308,5±6,4 E
Prokupac-Pelin (PWW)	1150,0±6,9 C
Prokupac-Sladić (PLW)	1183,4±6,4 D

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost±std. devijacija

Najmanji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja imalo je crveno vino Prokupac (970,1±6,1 mgGAE/l) a najveći sadržaj vino Prokupac sa dodatkom cimeta (1308,5±6,4 mgGAE/l).

Statističkom analizom utvrđeno je da postoje značajne razlike između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u kontroli (vino Prokupac) i sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja između pojedinih vina sa dodatkom lekovitog bilja. Sa dodatkom lekovitog bilja došlo je do povećanja ukupnih fenolnih jedinjenja.

U tabeli 4.13. date su prosečne vrednosti ukupnih flavonoida u vinu Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja dobijenog fermentacijom kljuka na 25 °C, (berba 2015).

Tabela 4.13. Prosečne vrednosti ukupnih flavonoida u vinu Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja dobijenog fermentacijom kljuka na 25 °C, (berba 2015).

	TFC(mg CTE/ l)
Vino, 25°C	2015.
Prokupac (PW)	290,5±4,6 A
Prokupac-Anis (PAW)	411,7±5,8 B
Prokupac-Cimet (PCW)	513,3±5,2 D
Prokupac-Pelin (PWW)	490,0±5,2 C
Prokupac-Sladić (PLW)	496,7±4,3 C

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost±std. devijacija

Sa dodatkom lekovitog bilja dolazi do povećanja sadržaja ukupnih flavonoida. Najmanji sadržaj ukupnih flavonoida ima vino Prokupac (290,5±4,6 mg CTE/l) a najveći sadržaj ima vino Prokupac sa dodatkom cimeta (513,3±5,2 mg CTE/ l) .

Postoje značajne razlike u sadržaju ukupnih flavonoida između uzoraka, sem za vino Prokupac sa dodatkom pelina i vino Prokupac sa dodatkom sladića.

U tabeli 4.14. date su prosečne vrednosti ukupnih flavan-3-ola u vinu Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja.

Tabela 4.14. Prosečne vrednosti ukupnih flavan-3-ola u vinu Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja dobijenog fermentacijom kljuka na 25 °C, (berba 2015).

	Flavan-3-oli (mg/l)
Vino, 25°C	2015.
Prokupac (PW)	43,3±0,10 A
Prokupac-Anis (PAW)	66,6±0,02 C
Prokupac-Cimet (PCW)	200,7±0,04 D
Prokupac-Pelin (PWW)	106,7±0,04 B
Prokupac-Sladić (PLW)	50,1±0,10 A

Najmanji sadržaj flavan-3-ola imalo je vino Prokupac (43,3 mg/l) dok je najveći sadržaj flavan-3-ola imalo vino Prokupac sa dodatkom cimeta (200,7 mg/l). Postoje značajne razlike u sadržaju flavan-3-ola između pojedinih vina.

U tabeli 4.15. date su prosečne vrednosti sadržaja ukupnih antocijana u vinu Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja.

Tabela 4.15. Prosečne vrednosti ukupnih antocijana vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja dobijenog fermentacijom kljuka na 25 °C, (berba 2015).

Vino	TAC (mg/l)
Prokupac (PW)	119,4±2,09
Prokupac-Anis (PAW)	76,0±3,1
Prokupac-Cimet (PCW)	108,3±6,1
Prokupac-Pelin (PWW)	92,5±5,3
Prokupac-Sladić (PLW)	91,4±1,3

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost±std. devijacija

Najveći sadržaj antocijana imalo je vino Prokupac (kontrola) (119,4±2,09 mg/l), a najmanju količinu antocijana imalo je vino Prokupac sa dodatkom anisa (76±3.1 mg/l).

Postoje značajne razlike u sadržaju ukupnih antocijana u pojedinim vinima Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja.

Za ispitivanje stepena značajnosti srednjih vrednosti između pojedinih vina između ukupnih fenola, flavonoida, flavan-3-ola i antocijana korišćena je dvofaktorska analiza varijanse po potpuno slučajnom izboru. Postojala je značajna razlika između tretmana (sadržaja ukupnih fenola, flavonoida, flavan-3-ola i antocijana u vinima sa dodatkom aromatičnog bilja), pa su urađene jednofaktorske analize za sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, flavan-3-

ola i antocijana. Naknadno je sprovedena analiza Dankanovim testom. U svim ispitivanjima korišćen je 5%-ni nivo značajnosti.

4.2.2. Fizičko-hemijska analiza vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja

4.2.2.1. Fizičko-hemijski parametri vina Plovdina dobijenog fermentacijom šire Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja na 17 °C i 22 °C

Rezultati analize vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja prikazani su u tabelama 4.16; 4.17; 4.18 i 4.19.

Rezultati osnovnih parametara kvaliteta vina Plovdina (berba 2015) prikazani su u tabeli 4.16. Sadržaj alkohola je varirao u rasponu od 9,21 vol. % za vino Plovdina (P_LW) do 9,37 vol. % za vino Plovdina sa dodatkom sladića (P_LLW) dobijenih fermentacijom na 17 °C. Vrednosti ukupnih kiselina (izraženih kao vinska kiselina) kretale su se u intervalu od 4,12 (g/l) za vino Plovdina, kontrola (P_LW), do 5,85 (g/l) za vino Plovdina sa dodatkom sladića (P_LLW). Isparljive kiseline nalazile su se u intervalu od 0,39 (g/l) za (P_LAW) do 0,96 (g/l) za (P_LWW). Sadržaj ukupnog ekstrakta bio je najniži u kontrolnom vinu (P_LW) 16,67 (g/l), dok je vino sa dodatkom cimeta (P_LCW) imalo najveći sadržaj ukupnog ekstrakta od 19,65 (g/l). Kontrola (P_LW), imala je najmanji sadržaj pepela, dodatkom lekovitog bilja došlo je do povećanja sadržaja pepela. Najveći sadržaj pepela imalo je vino Plovdina sa dodatkom cimeta (P_LCW).

Vina dobijena fermentacijom na 22 °C prate isti trend porasta osnovnih parametra kvaliteta vina Plovdina. Najmanji sadržaj alkohola imala je kontrola (9,62 vol.%), dok je najveći sadržaj alkohola imalo vino Plovdina sa dodatkom sladića (9,87 vol. %). Sa dodatkom lekovitog bilja došlo je do povećanja ukupnih kiselina. Najmanji sadržaj ukupnih kiselina imalo je vino Plovdina (5,21 g/l), dok je najveći sadržaj imalo vino Plovdina sa dodatkom sladića (5,96 g/l). Isparljive kiseline imaju trend rasta sa dodatkom lekovitog bilja, najmanji sadržaj imalo je vino Plovdina (0,35 g/l) a najveći sadržaj vino Plovdina sa dodatkom pelina (0,57 g/l). Vrednosti ukupnog ekstrakta kreću se u rasponu od 16,93 g/l (P_LW) do 20,24g/l (P_LCW). Najmanji sadržaj šećera imalo je vino Plovdina (1,13g/l) a najveću količinu šećera imalo je vino Plovdina sa dodatkom cimeta (3,25 g/l). Sadržaj pepela se povećavao sa dodatkom lekovitog bilja, najmanji sadržaj pepela imalo je vino Plovdina (1,81 g/l) a najveći vino Plovdina sa dodatkom cimeta (2,95 g/l).

Tabela 4.16. Fizičko-hemijski parametri vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja

Varijanta ogleda	Godina berbe	Alkohol, vol%		Ukupne kis- eline (kao vinska), (g/l)		Iparljive kiseline (kao sirćetna) (g/l)		Ukupni ekstrakt, (g/l)		Redukujući šećeri, (g/l)		Ekstrakt bez šećera, (g/l)		Pepeo, (g/l)	
		17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C	17°C	22°C
		Plovdina, (P _L W)	2015	9,21	9,62	4,12	5,21	0,42	0,35	15,67	15,93	2,27	1,13	14,40	15,80
Plovdina-Anis,(P _L AW)	2015	9,29	9,85	4,95	5,34	0,39	0,36	15,80	15,97	2,77	1,87	14,10	15,10	2,17	2,25
Plovdina-Cimet,(P _L CW)	2015	9,35	9,78	5,10	5,23	0,80	0,41	17,65	17,90	3,54	3,25	15,11	15,65	2,78	2,95
Plovdina-Pelin,(P _L WW)	2015	9,04	9,43	5,02	5,44	0,96	0,49	16,38	16,86	2,56	2,01	14,82	16,85	2,11	2,06
Plovdina-Sladić,(P _L LW)	2015	9,37	9,87	5,85	5,96	0,50	0,57	16,75	17,00	3,00	2,15	14,75	15,85	2,75	2,18

U tabeli 4.17. data su ukupna fenolna jedinjenja i ukupni flavonoidi vina Plovdina dobijenog fermentacijom na 17 °C i 22 °C.

Tabela 4.17. Ukupna fenolna jedinjenja i ukupni flavonoidi vina Plovdina

Uzorak	Berba	Ukupna fenolna jedinjenja (mg GAE/l)		Ukupni flavonoidi (mg CTE/l)	
		17°C	22°C	17 °C	22 °C
		Plovdina, (P _L W)	2015	115,8	152,6
Plovdina-Anis, (P _L AW)	2015	147,4	201,7	57,1	78,6
Plovdina-Cimet, (P _L CW)	2015	298,4	451,9	110,3	180,7
Plovdina-Pelin, (P _L WW)	2015	175,6	241,6	74,3	94,1
Plovdina-Sladić, (P _L LW)	2015	215,7	358,9	67,3	104,1

Vino Plovdina dobijeno fermentacijom na temperaturi od 17 °C sadržalo je najmanje ukupnih fenolnih jedinjenja 115,8 (mg GAE/l) a najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja imalo je vino Plovdina sa dodatkom cimeta (298,4 mg GAE/l). Najmanji sadržaj ukupnih flavonoida imalo je vino Plovdina (46,3 mg CTE/l) a najveći sadržaj Plovdina sa dodatkom cimeta (110,3 mg CTE/l).

Na temperaturi od 22 °C vina su imala sličan trend rasta ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida sa dodatkom lekovitog bilja. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja kreće se u rasponu od 152,6 (mg GAE/l) za (P_LW) do 451,9 (mg GAE/l) za (P_LCW). Vrednosti ukupnih flavonoida kreću se od 61,0 mg CTE/l do 180,7 mg CTE/l.

4.2.2.2. Fizičko-hemijski parametri vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja dobijenog fermentacijom kljuka na 25°C

U tabeli 4.18. dati su fizičko-hemijski parametri vina Plovdina dobijenog fermentacijom kljuka na temperaturi od 25 °C.

Tabela 4.18. Fizičko-hemijski parametri vina Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja (kljuk)

Uzorak	Berba	Alkohol, vol. %	Ukupne kiseline (kao vinska), (g/l)	Ispaljive kiseline (kao sirćetna) (g/l)	Ukupni ekstrakt, (g/l)	Redukujući šećeri, (g/l)	Ekstrakt bez šećera, (g/l)	Pepeo, (g/l)
Plovdina,(P _L W)	2015	10,19	4,6	0,27	18,8	1,1	18,7	2,01
Plovdina-Anis, (P _L AW)	2015	10,28	4,8	0,32	19,1	1,2	18,8	2,35
Plovdina Cmet, (P _L CW)	2015	10,03	4,2	0,41	21,9	1,4	21,5	3,19
Plovdina-Pelin,(P _L WW)	2015	10,53	5,1	0,45	19,7	1,2	19,5	2,49
Plovdina Sladić,(P _L LW)	2015	11,21	5,8	0,72	20,6	1,3	20,3	2,57

Sadržaj alkohola varirao je u intervalu od 10,19 vol. % za vino Plovdina (PW, kontrola) do 11,21 vol. % za vino Plovdina sa dodatkom sladića (P_LLW). Najmanje ukupnih kiselina 4,2 (g/l) (izraženih kao vinska kiselina) imalo je vino (P_LCW) dok je najveći sadržaj ukupnih kiselina (5,8 g/l) imalo vino Plovdina sa dodatkom sladića (P_LW). Vrednosti isparljivih kiselina kretale su se od 0,27 g/l, (izražene kao sirćetna kiselina) za vino Plovdina (PW) do 0,72 (g/l) za vino Plovdina sa dodatkom sladića, (P_LLW). Najmanji sadržaj ukupnog ekstrakta (15,8 g/l) imalo je vino Plovdina (P_LW), a najveći sadržaj ukupnog ekstrakta (18,9 g/l) imalo je vino Plovdina sa dodatkom cimeta (P_LCW). Sadržaj redukujućih šećera kretao se u intervalu od 1,1 (g/l) za (P_LW) do 2,4 (g/l) za (P_LCW). Sadržaj pepela povećavao se sa dodatkom lekovitog bilja, najmanji sadržaj od 1,51 (g/l) imala je kontrola (P_LW), a najveći (1,97 g/l) Plovdina sa dodatkom sladića (P_LLW).

U tabeli 4.19. predstavljen je uporedni pregled sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, flavan-3-ola i ukupnih antocijana za vino Plovdina dobijenog fermentacijom kljuka na 25 °C sa dodatkom lekovitog bilja.

Tabela 4.19. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, flavan-3-ola i antocijana u vinu Plovdina (kljuk)

Uzorak	Godina berbe	Ukupna fenolna jedinjenja (mg GAE/l)	Ukupni flavonoidi (mg CTE/ l)	Flavan-3-oli (mg/l)	Ukupni antocijani (mg/l)
		25°C			
Plovdina, (P _L W)	2015	208,2	160,2	3,33	36,1
Plovdina-Anis, (P _L AW)	2015	247,7	157,1	5,66	29,1
Plovdina-Cimet, (P _L CW)	2015	382,3	274,4	31,30	28,7
Plovdina-Pelin, (P _W W)	2015	251,3	144,1	9,00	17,3
Plovdina-Sladić, (P _L LW)	2015	286,1	156,4	4,66	35,6

Najmanji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja imalo je vino Plovdina, kontrola, (208,2 mg GAE/l), a najveći sadržaj vino Plovdina sa dodatkom cimeta (382,3 mg GAE/l). Isti trend rasta imao je i sadržaj flavonoida. Najmanji sadržaj flavonoida imalo je vino Plovdina (160,2 mg CTE /l) a najveći sadržaj imalo je vino Plovdina sa dodatkom cimeta (274,4 mg CTE /l). Slični trend rasta imo je i sadržaj flavan-3-ola. Najmanji sadržaj imalo je vino Plovdina (3,33 mg/l) a najveći vino Plovdina sa dodatkom cimeta (31,30 mg/l). Sadržaj ukupnih antocijana se smanjivao sa dodatkom lekovitog bilja. Najveću količinu antocijana imala je kontrola, (36,1mg/l) a najmanji sadržaj imalo je vino Plovdina sa dodatkom pelina (17,3 mg/l).

4.3. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA VINA

4.3.1. Disk-difuziona metoda

Mikrobiološkom analizom vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja primenom disk difuzione metode (tabela 4.20) uočeno je da su najveću osetljivost pokazale Gram(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis*. Prokupac sa dodatkom anisa je pokazao bakteriostatsko dejstvo na Gram(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis* (zona inhibicije 14 mm, tj. 46,67 % aktivnosti hloramfenikola, odnosno 40,0 % aktivnosti streptomicina). Naša istraživanja su u skladu sa literaturnim podacima. Ispitivanja Hammar-a i saradnika (Hammer et al., 1999) su pokazala da ulje semena *Pimpinella anisum* L (anisa) inhibira rast bakterija *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimuriumi* i kvasca *Candida albicans*. Antimikrobna aktivnost ulja iz semena anisa je dokazana i u drugim studijama (Ramadan et al., 1972; Ibrahim i Ogunmodede, 1991; Shukla i Tripathi, 1987; Okuyama et al., 1995; Sokmen, 1999). Ulje anisa (0,2 %) ima in vitro antibakterijsko dejstvo prema *Salmonella enteritidis* (Fyfe et al, 1998). Ulje semena anisa ima visoku antibakterijsku aktivnost prema: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus haemoliticus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsella species* i *Proteus vulgaris* (Singh et al., 2002).

Antibiotik hloramfenikol je pokazao baktericidno dejstvo na Gram (+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis* (zona inhibicije od 30 mm), baktericidno dejstvo na Gram (-) bakteriju *E. coli* (zona inhibicije od 30 mm) i baktericidno dejstvo na kvasac *C. albicans* (zona inhibicije 33 mm).

Antibiotik Streptomicin je pokazao baktericidno dejstvo na Gram (+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis* (zona inhibicije od 35 mm), baktericidno dejstvo na Gram (-) bakterije iz roda *E. coli* (zona inhibicije od 19 mm) i baktericidno dejstvo na kvasac *C. albicans* (zona inhibicije 19 mm).

Antibiotik nistatin je pokazao samo baktericidno dejstvo na kvasac *C. albicans* (zona inhibicije 18 mm) dok je bio neaktivan prema ostalim sojevima mikroorganizama.

Vino Prokupac sa dodatkom cimeta pokazalo je baktericidno dejstvo na Gram(+) bakterije *Bacillus subtilis* (zona inhibicije 16 mm; 53,33 % aktivnosti hloramfenikola, odnosno 45,71 % aktivnosti streptomicina). U literaturi smo je opisano da ulje iz kore cimeta (*Cinnamomum verum*) pokazuje inhibitorno dejstvo prema G(+) i G(-) bakterijama: *P. aeruginosa* (33,3 mm), *B. subtilis* (29,9 mm), *P. vulgaris* (29,4 mm), *K. pneumoniae* (27,5 mm) i *S. aureus* (20,8 mm) (Prabuseenivasan et al., 2006). Etarsko ulje kore cimeta ima i antifungalnu aktivnost (u koncentracijama u rasponu od 1 % do 0,0025 %), a njegova

supstanca cinamaldehyd inhibira rast gljivica i kvasaca i njivodu produkciju mikotoksina: e.g. *Aspergillus clavus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *Candida albicans* (Kalemba & Kunicka, 2003).

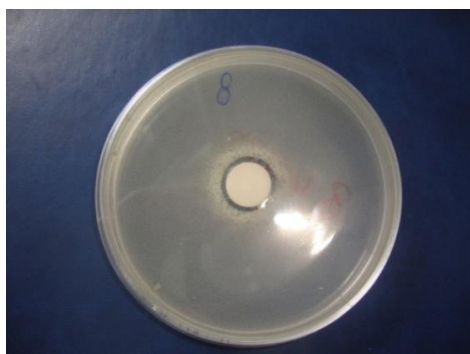
Vino Prokupac (kontrola) i vino Prokupac sa dodatkom pelina nisu pokazali anti-mikrobnu aktivnost prema Gram(+) bakterijama iz roda *Bacillus subtilis* kao ni prema ostalim sojvima ispitivanih mikroorganizama. Istarživanja Kalemba i saradnika su dokazala da je etarsko ulje iz lista pelina (*Artemisia absinthium*) pokazalo antimikrobnu aktivnost prema *C. albicans* i *S. cerevisiae* var. *Chevaleri* a nema aktivnosti prema *E. coli*, *S. aureus* i *E. hira*, (Juteau et al. 2003). Etarsko ulje *Artemisia absinthium* je otrovno za odrasle jedinke *Sitophilus granarius* (Coleoptera), (žitnog žiška). Koncentracija od 9 $\mu\text{L/L}$ vazduha izazvao je stopu smrtnosti 86,7 % nakon 48h, (53,3 % i 73,3 % nakon 12 h i 24 h respektivno). Utvrđeno je da je etarsko ulje veoma otrovno za *Rhyzopertha dominica* i blago toksičan za *Tribolium confusum* (Kalemba et al., 1993).

Vino Prokupac sa dodatkom sladića je takođe pokazalo bakteriostatsko dejstvo na Gram(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis* (zona inhibicije 14 mm; tj. 46,67 % aktivnosti hloramfenikola, odnosno 40,0 % aktivnosti streptomcina). Ovo je u skladu sa literaturnim podacima da etarsko ulje sladića, (*Glycyrrhiza glabra*) ima anti-virusni, anti-mikrobni i imunostimulativni efekat. Jedinjenja glicirizina se već dugo koriste u lečenju hroničnog virusnog hepatitisa u Kini i Japanu, ali je verovatan mehanizam anti-virusne aktivnosti ostao nepoznat (Van Rossum et al., 1999). Antimikrobna aktivnost korena sladića uočena je pri koncentraciji od 500 $\mu\text{g/ml}$. Glabardin ispoljava antimikrobnu aktivnost protiv G(+) i G(-) bakterija. Rezultati ukazuju na potencijalnu upotrebu sladića kao antituberkuloznog agensa (Gupta et al., 2008). In vitro testirana je antimikrobna aktivnost metanolnog, etanolnog, flo-roformskog, dietil-etarskog i vodenog ekstrakta sladića pomoću agar difuzionog testa i na bakterije *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus*. Dobijeni rezultati ukazuju da sladić potpuno inhibiše rast *Pseudomonas aeruginosa*. Vodeni ekstrakt sladića bio je efikasan protiv formiranja spore *Bacillus subtilis*, dok *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* nisu efikasni inhibirane (Shinwari et al., 2009).

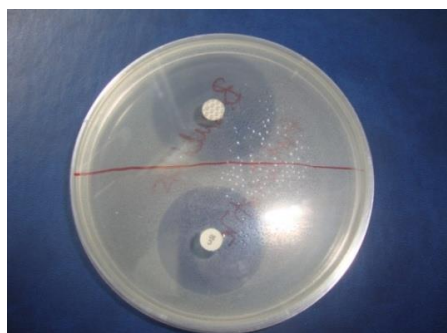
Vino Prokupac (kontrola) i vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja (anisa, cimeta, pelina i sladića) nisu pokazala antimikrobnu aktivnost, odnosno nije detektovana zona inhibicije prema G(-) bakterijama *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 i kvasac *Candida albicans* ATCC 10231. Razlika u mikrobiološkoj aktivnosti analize vina pre svega između G(+) i G(-) bakterija potiče zbog razlike u građi ćelijskog zida samih bakterija. G(+) bakterije imaju relativno prost ćelijski zid debljine od 15-50 nm izgrađen iz

polimera koji se sastoji od polisaharida peptidoglikana (oko 50 % mase ćelije) i teihoinne kiseline (30-40 % mase ćelije) međusobno povezanih u mrežastu strukturu. Ova struktura im omogućava visok osmotski potencijal (do 20 at). Ćelijski zid Gram(-) bakterija je složenije strukture. Sastoji se od peptidoglikana koji je tanji (2 nm) i spoljne membrane. Osmotski pritisak je daleko manji (oko 6 at). Ćelijski zid G(-) bakterija umesto teikoične kiseline sadrži polisaharide i lipoproteine koji čine ćelijski zid manje propustljivim i otpornijim na spoljašnje uticaje. Otuda i jače antimikrobno dejstvo uzoraka vina na G(+) bakterije u odnosu na G(-) bakterije.

Na slici 4.7. prikazano je baktericidno dejstvo vina Plovdina sa dodatkom cimeta na Gram(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis*, dok je na slici 4.8 prikazano baktericidno dejstvo antibiotika streptomicina i hloramfenikola na dejstvo Gram(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis*.



Slika 4.7. Baktericidno dejstvo vina Plovdina sa dodatkom cimeta na Gram(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis*



Slika 4.8. Baktericidno dejstvo antibiotika streptomycin i horamfenikol na Gram(+) bakterije *Bacillus subtilis*.

Tabela.4.20. Antimikrobna aktivnost vina Prokupac (disk-difuziona metoda)

Soj m.o.	<i>B. subtilis</i> ,G(+)		<i>E. coli</i> , G(-)		<i>S. typhimurium</i>		<i>C. albicans</i>	
	ATCC 6633		ATCC 8739		G(-), ATCC 14028		ATCC 10231	
Dejstvo	BC mm	BS mm	BC mm	BS mm	BC mm	BS mm	BC mm	BS mm
1.Prokupac	/	/	/	/	/	/	/	/
2.Prokupac + Anis	/	14	/	/	/	/	/	/
3.Prokupac+ Cimet	16	/	/	/	/	/	/	/
4.Prokupac + Pelin	/	/	/	/	/	/	/	/
5.Prokupac+ Sladić	/	14	/	/	/	/	/	/
6.Plovdina	/	/	/	/	/	/	/	/
7.Plovdina + Anis	/	13	/	/	/	/	/	/
8.Plovdina+Cimet	15	/	/	/	/	/	/	/
9.Plovdina +Pelin	/	14	/	/	/	/	/	/
10.Plovdina+Sladić	/	/	/	/	/	/	/	/
Streptomicin	35	/	19	/	/	/	19	/
Hloramfenikol	30	/	30	/	/	/	33	/
Nystatin	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	18	Nd.

Nd- Nije definisano

Vino dobijeno od autohtone sorte Plovdina sa dodatkom cimeta pokazalo je najveću antimikrobnu baktericidnu aktivnost prema Gram(+) bakterije *Bacillus subtilis* (zona inhibicije 15mm; 50% aktivnosti Hloramfenikola, odnosno 42,86 % aktivnosti Sseptomicina), (tabela 4.20). Plovdina sa dodatkom pelina pokazala je bakteriostatsku aktivnost prema Gram(+) bakterije *Bacillus subtilis* (zona inhibicije 14 mm; 46,67 % aktivnosti hloramfenikola, odnosno 40,0 % aktivnosti streptomicina). Plovdina sa dodatkom anisa je pokazala baktericidnu aktivnost prema *Bacillus subtilis* (zona inhibicije 13 mm; 43,33 % aktivnosti hloramfenikola, i 37,14 % od aktivnosti Streptomicina).

Iz dobijenih rezultata uočavamo da su vina Plovdina (kontrola) i Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja pokazala antimikrobnu aktivnost samo prema G(+) bakteriji *Bacillus subtilis* ATCC 6633, a nisu pokazale aktivnost prema Gram(-) bakterijama: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 i kvasacu *Candida albicans* ATCC 10231.

4.3.2. Mikrodiluciona metoda

Mikrodilucionom metodom je određena antimikrobna aktivnost vina Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja kao i Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja. Rezultati su prikazani u tabelama (4.21 i 4.22).

Tabela 4.21. Minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja izražene u $\mu\text{L/mL}$.

UZORCI	PW		PAW		PCW+ Cimet		Prokupac + Pelin		Prokupac + Sladić		Choramphenicol		Streptomycin	
	MIC/MBC ($\mu\text{L/mL}$)		MIC/MBC ($\mu\text{L/mL}$)		MIC/MBC ($\mu\text{L/mL}$)		MIC/MBC ($\mu\text{L/mL}$)		MIC/MBC ($\mu\text{L/mL}$)		MIC/MBC (mg/mL)		MIC/MBC (mg/mL)	
Sojevi	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Gram (+)														
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	250	250	250	500	250	500	250	500	250	500	1,0	8,0	1,0	1,0
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	125	500	125	>500	125	500	125	500	125	500	1,0	4,0	0,5	0,5
<i>C. perfringens</i> ATCC 19404	125	500	125	250	125	250	125	125	125	250				
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	31,25	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	15,6 3	62,5	31,2 5	62,5	2,0	4,0	4,0	4,0
<i>S. lutea</i> ATCC 9341	125	250	125	250	125	250	125	250	125	250				
Gram (-)														
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	125	125	125	125	125	125	125	125	250	500	1,0	4,0	8,0	8,0
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	125	250	250	250	250	250	125	250	125	250	4,0	8,0	4,0	4,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	500	500	500	500	500	500	250	250	500	500	128, 0	512, 0	8,0	8,0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	125	250	125	250	125	250	125	250	125	250	4,0	64,0	128,0	256, 0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	125	250	125	500	125	500	125	500	125	250	1,0	1,0	0,5	0,5

Tabela 4.22. Minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

UZORCI	Plovdina		Plovdina + Anis		Plovdina + Cimet		Plovdina + Pelin		Plovdina + Sladić		Choramphenikol		Streptomycin	
	MIC/MBC ($\mu\text{L}/\text{mL}$)		MIC/MBC ($\mu\text{L}/\text{mL}$)		MIC/MBC ($\mu\text{L}/\text{mL}$)		MIC/MBC ($\mu\text{L}/\text{mL}$)		MIC/MBC ($\mu\text{L}/\text{mL}$)		MIC/MBC (mg/mL)		MIC/MBC (mg/mL)	
Gram (+)	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	250	500	250	500	250	500	250	500	250	250	1,0	8,0	1,0	1,0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	125	>500	125	>500	125	500	125	500	125	250	1,0	4,0	0,5	0,5
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 19404	125	125	125	125	125	250	125	125	125	250				
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	31,25	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	15,6 3	62,5	31,2 5	62,5	2,0	4,0	4,0	4,0
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	125	250	125	250	125	250	125	250	125	250				
Gram (-)														
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	1,0	4,0	8,0	8,0
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	125	250	250	250	125	250	125	250	125	250	4,0	8,0	4,0	4,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	250	250	250	250	250	250	250	250	125	125	128, 0	512, 0	8,0	8,0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	125	250	125	250	125	250	125	250	62,5	250	4,0	64,0	128,0	256, 0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	125	500	125	500	125	500	125	500	125	250	1,0	1,0	0,5	0,5

Rezultati dobijeni disk-difuzionom metodom pokazali su da vina Prokupac i Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja poseduju antimikrobnu aktivnost, pa su mikrodilucionom metodom određene minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije ovih vina. U tabeli 4.21. prikazane su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja a u tabeli 4.22. prikazane su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja.

Antimikrobna aktivnost vina je testirana na Gram(+) bakterije: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Clostridium perfringens* ATCC 19404, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 i *Sarcina lutea* ATCC 9341 kao i na Gram(-) bakterije *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Proteus mirabilis* ATCC 12453 i *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

Iz tabele 4.21. vidi se da minimalne inhibitorne koncentracije Prokupca i Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja na *Staphylococcus aureus* iznose 250 µL/mL za sve uzorke vina, što znači da su svi uzorci imali podjednako antimikrobno dejstvo na bakterije *Staphylococcus aureus*. Minimalnu baktericidnu koncentraciju od 250 µL/mL *Staphylococcus aureus* pokazao je Prokupac, dok su svi ostali uzorci vina sa dodatkom lekovitog bilja pokazali MBC od 500 µl/ml.

Minimalne inhibitorne koncentracije na *Bacillus cereus* iznose za sve uzorke vina 125 µL/mL. U ovom slučaju uzorci vina su pokazala jači antibakterijski efekat prema *Bacillus cereus* u odnosu na *Staphylococcus aureus*. Minimalna baktericidna koncentracija vina Prokupac sa dodatkom anisa je veća od 500 µL/mL, dok za sve ostale uzorke MBC iznosi 500 µl/ml.

Uzorci vina Prokupac pokazali su sličan antibakterijski efekat prema Gram(+) bakteriji *Clostridium perfringens* kao prema bakteriji *Staphylococcus aureus*. Minimalna inhibitorna koncentracija za sve uzorke vina u odnosu na *Clostridium perfringens* iznosila je 125 µL/mL, a minimalna baktericidna koncentracija za Prokupac iznosila je 500 µL/mL, dok je za ostale uzorke vina iznosila 250 µl/ml.

Enterococcus faecalis je bio najosetljiviji prema vinu Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja, a najveća antimikrobna aktivnost pronađena je u vinu sa dodatkom pelina (PWW), (MIC/15,63 µL/mL) što se može pripisati kombinovanom efektu ukupnih fenolnih jedinjenja, etanola i pH. Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) za sve uzorke vina prema *Enterococcus faecalis* iznosila je 62,50 µL/mL (Tabela 4.22). Ovaj rezultat ukazuje na veći antibakterijski potencijal vina nego što je predhodno objavljeno u studiji o biljnim likerima, naročito u pogledu toga što vina imaju niži sadržaj alkohola (Karabegović i sar., 2012). Kod nekih bakterijskih sojeva zabeležene su umerene korelacije između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i antibakterijskih aktivnosti (MIC/MBC) i uzoraka vina (slika 4.10).

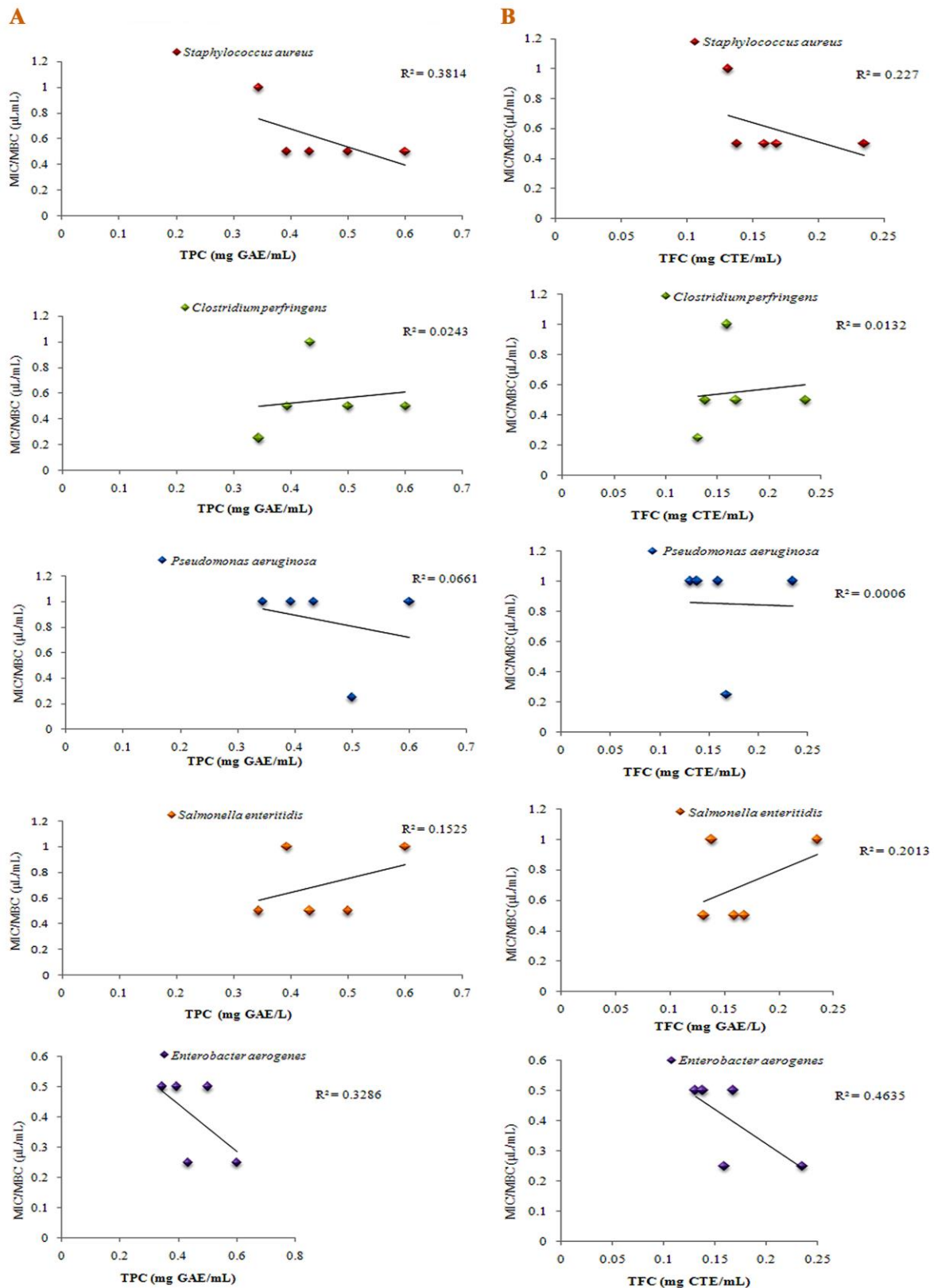
Antimikrobno dejstvo svih uzoraka vina na G(+) bakterije *Sarcina lutea* je imalo istu vrednost i MIC je iznosila 125 µl/ml a MBC je imala vrednost 250 µL/mL.

Dejstvom vina Prokupac sa dodatkom sladića na G(-) bakterije *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 MIC iznosi 250 µL/mL, a MIC za sve ostale uzorke vina iznosi 125 µL/mL. MBC vina Prokupac sa dodatkom sladića iznosi 500 µL/mL, a za ostale uzorke iznosi 125 µl/ml.

Minimalne inhibitorne koncentracije na *Salmonella enteritidis* kreću se od 125 µl/ml za Prokupac, Prokupac sa dodatkom pelina i Prokupac sa dodatkom sladića, a 250 µl/ml za

Prokupac sa dodatkom anisa i Prokupac sa dodatkom cimeta. U ovom slučaju jače antimikrobno dejstvo imaju vina Prokupac, Prokupac sa dodatkom pelina i Prokupac sa dodatkom sladića, dok slabije izraženo antimikrobno dejstvo imaju vina Prokupac sa dodatkom anisa i cimeta. MBC za sve uzorke vina iznosile su 250 µl/ml.

Na slici 4.9. predstavljen je odnos između antibakterijske aktivnosti (MIC/MBC) nekih bakterijskih vrsta i sadržaja ukupnih fenola (TPC) i ukupnih flavonoida (TFC) crvenog vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja. Kod bakterijskih sojeva *Clostridium perfringens* i *Pseudomonas aeruginosa* zabeležene su umerene korelacije između ukupnih fenola/ukupnih flavonoida i antimikrobne aktivnosti (MIC/MBC) crvenog vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja.



Slika 4.9. Odnos između antibakterijske aktivnosti (MIC/MBC) i sadržaja ukupnih fenola (TPC) i ukupnih flavonoida (TFC) vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

Minimalna inhibitorna koncentracija vina Plovdine i Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja na Gram(+) bakterije *Staphylococcus aureus* iznose 250 µl/ml za sve uzorke vina, dok se minimalna baktericidna koncentracija kretala od 250-500 µl/ml. Uzorci vina su imali jače antimikrobno dejstvo na *Bacillus cereus*, gde je MIC iznosila 125 µl/ml, a MBC je iznosila 250- 500 µl/ml a za uzorke Plovdina i Plovdina sa dodatkom anisa MBC je imala veće vrednosti od 500 µl/ml.

Dejstvom uzoraka vina na *Clostridium perfringens* određena je MIC koja za sve uzorke iznosi 125 µl/ml, dok je MBC imala vrednosti od 125-250 µl/ml.

Najosetljivija G(+) bakterija na dejstvo uzoraka vina bila je *Enterococcus faecalis*. MIC se kretala od 15,62 µl/ml za Plovdinu sa dodatkom pelina do 31,25 µl/ml za sve uzorke vina, dok je MBC bila 62, 5 µl/ml.

Za G(+) bakteriju *Sarcina lutea* određena je MIC za sve uzorke vina (Plovdine sa dodatkom aromatičnog bilja) i imala je vrednost od 125 µl/ml, a MBC je imala vrednost od 250 µl/ml.

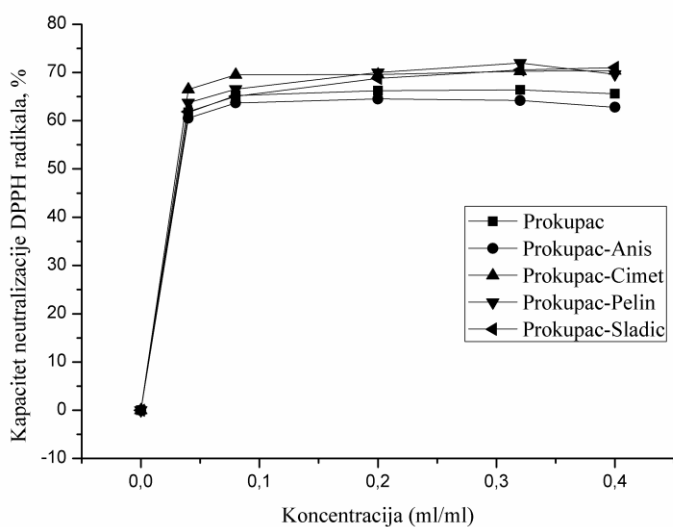
I G(-) bakterije su pokazale veću rezistentnost u odnosu na G(+) bakterije na dejstvo Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja slično kao i na dejstvo Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja.

Dejstvom uzoraka vina na G(-) bakteriju *Pseudomonas aeruginosa* dobijena je MIC od 125 µl/ml a takođe je i MBC imala istu vrednost od 125 µl/ml. *Salmonella enteritidis* je pokazala MIC od 125 µl/ml a MBC je iznosila 250 µl/ml. *Escherichia coli* je bila rezistentnija i pokazala je MIC od 125-250 µl/ml a takođe se i MBC kretala u tim vrednostima od 125-250 µl/ml. Najveće antimikrobno dejstvo od G(-) bakterija gde je MIC imala vrednosti od 62,5-125 µl/ml, vrednosti za MBC su se kretale od 125-250 µl/ml. Za *Enterobacter aerogenes* vrednosti za MIC su 125 µl/ml, dok su se vrednosti za MBC kretale od 250-500 µl/ml.

4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST VINA

4.4.1. Antioksidativna aktivnost vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

Antioksidativna aktivnost vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja određena pomoću DPPH radikala, predstavljena je na slici 4.10.



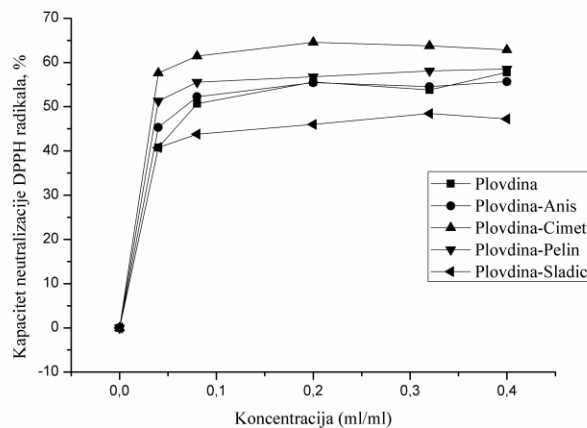
Slika 4.10. Antioksidativna aktivnost Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja

Procenat neutralisanja DPPH radikala iskazuje se vrednošću EC_{50} , odnosno koncentracijom vina koja je potrebna za neutralizaciju 50 % DPPH radikala (Villaño et al., 2007). Vrednosti EC_{50} izračunate na osnovu eksperimentalnih podataka prikazane su u tabeli 4.27.

Najveću antioksidativnu aktivnost pokazao je Prokupac sa dodatkom cimeta ($EC_{50}=0,005\pm0,0005$ mg/ml), nešto manju antioksidativnu aktivnost pokazao je Prokupac sa dodatkom sladića ($EC_{50}=0,006\pm0,0002$ mg/ml), Prokupac sa dodatkom pelina ($EC_{50} = 0,009 \pm 0,0001$ mg/ml), Prokupac sa dodatkom anisa ($EC_{50} = 0,018 \pm 0,0016$ mg/ml), a najnižu antioksidativnu aktivnost pokazao je Prokupac bez dodatka lekovitog bilja ($EC_{50} = 0,022 \pm 0,0016$ mg/ml).

4.4.2. Antioksidativna aktivnost vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja

Na slici 4.11. prikazana je antioksidativna aktivnost vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja.



Slika 4.11. Antioksidativna aktivnost vina Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja

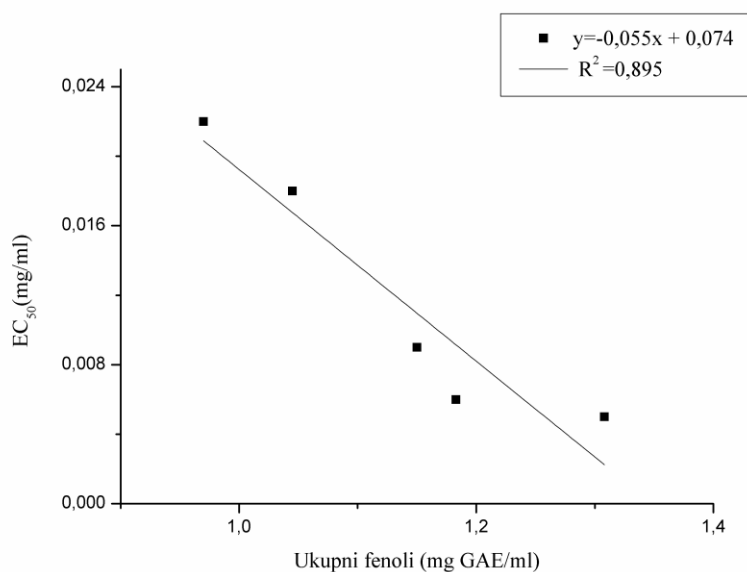
Najveću antioksidativnu aktivnost pokazala je Plovdivina sa dodatkom cimeta ($EC_{50}=0,023\pm 0,0011$ mg/ml), nešto manju Plovdivina sa dodatkom sladića ($EC_{50}=0,024\pm 0,0017$ mg/ml), zatim Plovdivina sa dodatkom pelina ($EC_{50}=0,040\pm 0,0013$ mg/ml), Plovdivina sa dodatkom anisa ($EC_{50}=0,058\pm 0,0036$ mg/ml) a najmanju antioksidativnu aktivnost pokazala je Plovdivina bez dodatka lekovitog bilja ($EC_{50}=0,067\pm 0,0006$ mg/ml).

4.5. KORELACIJA SADRŽAJA UKUPNIH FENOLNIH MATERIJA U VINU I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Antioksidativna aktivnost vina Prokupca i Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja određena pomoću 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH) i sadržaj ukupnih fenola prikazan je u tabeli 4.23.

Tabela 4.23. Sadržaj ukupnih fenolna i antioksidativna aktivnost (EC_{50}) vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

	Uk.fenoli, mg GAE/l	Uk.fenoli, mg GAE/ml	EC_{50} , (mg/ml)
Prokupac	970,0	0,97	$0,022\pm 0,0016$
Prokupac+Anis	1045,0	1,045	$0,018\pm 0,0016$
Prokupac+Cimet	1308,5	1,308	$0,005\pm 0,0005$
Prokupac+Pelin	1150,0	1,15	$0,009\pm 0,0001$
Prokupac+Sladić	1183,5	1,183	$0,006\pm 0,0002$

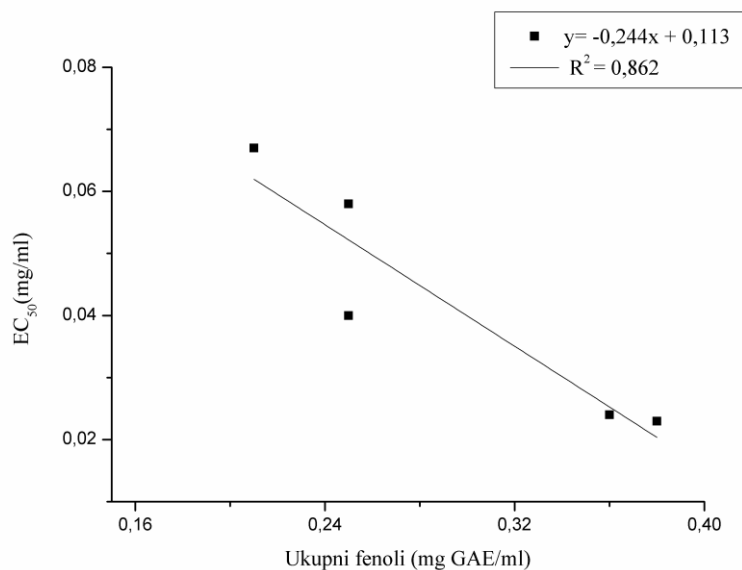


Slika 4.12. Korelacije sadržaja fenola i EC₅₀ vina Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja

U tabeli 4.24. Dat je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja.

Tabela 4.24. Sadržaj ukupnih fenolna i antioksidativne aktivnosti (EC₅₀) vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja

	Uk. fenoli, mgGAE/l vina	Uk. fenoli, mg GAE/ml vina	EC ₅₀ , (mg/ml)
Plovdina	208,0±1,20	0,21±0,001	0,067±0,0006
Plovdina+Anis	249,7±0,58	0,25±0,001	0,058±0,0036
Plovdina+Cimet	382,3±1,53	0,38±0,002	0,023±0,0011
Plovdina+Pelin	251,3±3,51	0,25±0,004	0,040±0,0013
Plovdina+Sladić	361,3±2,52	0,36±0,003	0,024±0,0017



Slika 4.13. Korelacije sadržaja fenola i EC₅₀ vina Plovdine sa dodatkom lekovitog bilja

U nizu istraživanja (Soleas et al., 1998, Minussi et al., 2003) dokazan je visok stepen pozitivne korelacije sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti vina. Da bi se utvrdila veza između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti, urađena je korelaciona analiza. Uticaj dodatka lekovitog bilja, tj. sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja na antioksidativnu aktivnost iskazan je pozitivnom korelacijom. Regresioni model je iskazan negativnim predznakom uz parametar b što pokazuje da sa porastom fenolnih jedinjenja opada vrednost EC₅₀, tj, sa porastom ukupnih fenolnih jedinjenja raste i antioksidativna aktivnost vina. Koeficijent linearne regresije vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja iznosi $R^2 = 0.895$ (slika 4.12) a vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja iznosi $R^2 = 0.862$ (slika 4.13). I u jednom i u drugom slučaju postoji relativno visoka korelacija između ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti.

4.6. SENZORNE KARAKTERISTIKE VINA

4.6.1. Senzorne karakteristike vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

Dodatak lekovitog bilja doveo je do promene sastava isparljivih komponenti vina a samim tim i do promene senzornih karakteristika vina. Evaluacija senzornih svojstava vina sa dodatkom lekovitog bilja sprovedena je od strane panela sastavljenog od dvanaest kvalifikovanih ocenjivača.

Ocenjivači su davali poene za: vizuelne opažaje, olfaktorne opažaje, gustativne opažaje i gustativno-olfaktorne opažaje. Rezultati senzorne analize vina Prokupca sa dodatkom lekovitog bilja prikazani su u tabeli 4.25.

Tabela 4.25. Senzorne karakteristike vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

<i>Red. br.</i>	<i>Vino</i>	<i>Vizuelni opažaji</i>	<i>Olfaktorni opažaji</i>	<i>Gustativni opažaji</i>	<i>Gustativno-olfaktorni opažaji</i>	<i>Ukupno bodova</i>
1.	Prokupac, (PW)	16,30	19,70	24,50	13,00	73,50
2.	Prokupac+Anis, (PAW)	14,30	18,00	21,30	11,50	65,10
3.	Prokupac+Cimet, (PCW)	16,70	22,30	26,50	13,20	78,70
4.	Prokupac+Pelin, (PWW)	14,00	18,30	16,50	7,50	56,30
5.	Prokupac+Sladić, (PLW)	9,00	19,00	17,30	8,00	53,30
	Maksimalan broj poena	20,00	30,00	30,00	20,00	100,00

Vino Prokupac sa dodatkom sladića dobilo je ocenu (9,00) za vizuelni opažaj (boju i bistrinu) zbog nepoželjne žute boje, vino sa dodatkom pelina (14,00), vino sa dodatkom anisa (14,30), dok je najvišu ocenu za boju dobilo vino sa dodatkom cimeta (16,70), od maksimalnih 20,00 bodova.

Najniži broj bodova za olfaktorni opažaj (čistoća, finoća i intenzitet) dobilo je vino Prokupac sa dodatkom anisa (18,00), vino Prokupac (19,70) a najveći broj bodova za olfaktorni opažaj dobilo je vino Prokupac sa dodatkom cimeta (22,30) od maksimalnih 30,00 boda.

Za gustativni opažaj (čistoća, struktura i harmonija), najmanji broj bodova dobilo je vino Prokupac sa dodatkom pelina (16,50), vino Prokupac je dobilo (24,50) boda, a najveći broj bodova dobilo je vino sa dodatkom cimeta (26,50) od maksimalnih (30,00) boda.

Najmanji broj bodova za gustativno-olfaktorni opažaj (održivost i podudarnost sa sortnim karakteristikama vina) dobilo je vino Prokupac sa dodatkom pelina (7,50), vino Prokupac je dobilo (13,00) boda a najveći broj bodova dobilo je vino Prokupac sa dodatkom cimeta (13,20) od maksimalnih 20,00 bodova. Najlošije ocenjeno vino tj. najmanju ukupnu ocenu dobilo je vino Prokupac sa dodatkom sladića (53,30) boda, vino Prokupac (kontrola) je ocenjen sa (73,50) boda a najveću ukupnu ocenu dobilo je vino Prokupac sa dodatkom cimeta (78,70) bodova od maksimalnih 100 boda.

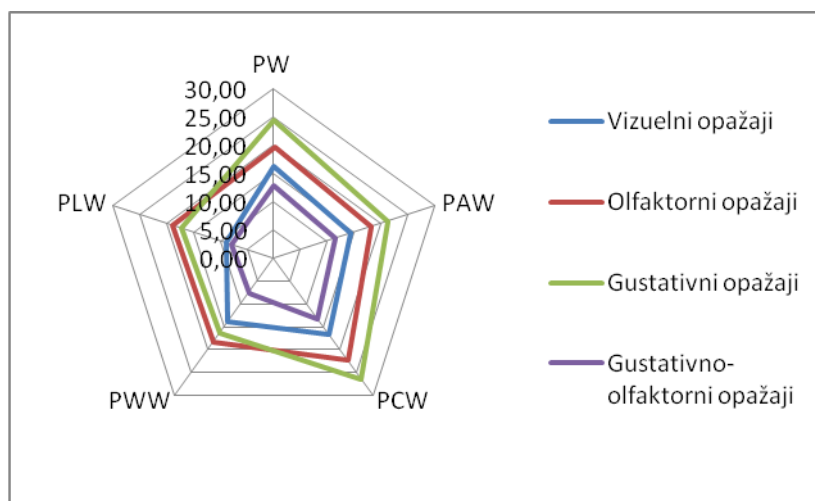
Vino Prokupac (kontrola) je rubin boje i bistro, miris voćni, diskretan, ukus voćni koji asocira na višnju, sa lepim kiselinama i blagom oporošću.

Vino Prokupac sa dodatkom anisa je rubin boje i bistro, miris je diskretan na anis, na ukusu je umereno pun i zaokružen.

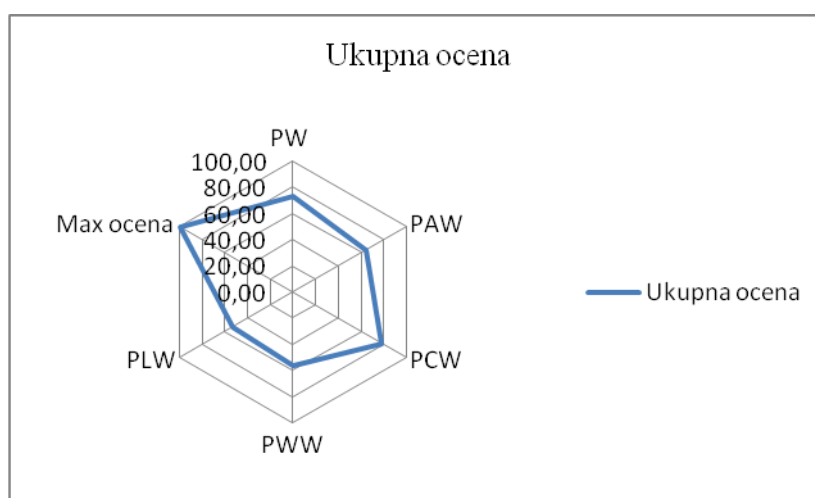
Vino Prokupac sa dodatkom cimeta je intenzivno rubin boje i bistro, na mirisu se oseća cimet, na ukusu je slatkast, umereno puno i sa umerenom postojanošću arome.

Vino Prokupac sa dodatkom pelina je rubin boje, miris diskretno začinski, na ukusu se oseća gorčina.

Vino Prokupac sa dodatkom sladića je rubin boje, bistro, sa jako naglašenim tonom lukovine, na mirisu se oseća sladić, na ukusu je slatkasto i nedostaju kiseline koje bi vino učinile harmoničnijim.



Slika 4.14. Senzorne karakteristike vina Prokupac sa dodatkom aromatičnog bilja



Slika 4.15. Ukupna ocena senzornih karakteristika vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja
Intenzitet i nijansa boje vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja dati su u tabeli 4.26.

Tabela 4.26. Intenzitet i nijansa boje vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

Assay	I	T	A ₄₂₀ , %	A ₅₂₀ , %	A ₆₂₀ , %	dA, %
PW	0,35±0,020c*	0,71±0,00b	37,43±0,35a	52,65±1,57cd	9,92±0,35a	55,00±3,360d
PAW	0,21±0,006a	0,82±0,01c	40,41±3,50ab	49,2±2,76bc	10,4±1,36a	48,61±3,320c
PCW	0,57±0,035d	0,66±0,00a	36,04±2,79a	54,59±1,59d	9,36±0,35a	58,51±2,157d
PWW	0,31±0,006b	0,93±0,01d	43,07±1,45b	46,42±2,60b	10,51±0,36a	42,01±2,150b
PLW	0,35±0,020c	1,21±0,00e	49,7±2,19c	40,97±2,79a	9,34±0,05a	28,00±1,220a

K- Prokupac, kontrola; A1-Prokupac sa dodatkom anisa; A2- Prokupac sa dodatkom cimeta, A3- Prokupac sa dodatkom pelina, A4- Prokupac sa dodatkom sladića. Vrednosti su prikazane kao: srednja vrednost ± standardna devijacija (n= 3)
a-e Vrednosti unutar redova koja imaju različita slova značajno se razlikuju (p<0,05)

Vino sa dodatkom cimeta imalo je veoma dobru boju. Viši intenzitet boje (0,566±0,038) i niska nijansa boje (0,661±0,002) bila je u skladu sa visokim udelom crvene boje i dA% (58,4±0,3) vrednošću. Ostala vina imala su niži intenzitet boje od kontrole. Utvrđene su značajne razlike u vrednosti intenziteta boje između kontrole i probe sa dodatkom anisa i pelina. Dodatak anisa, pelina i sladića uticao je na povećanje vrednosti za nijansu boje.

Kod svih ispitivanih uzoraka vina najveći udeo u boji vina ima crvena boja osim kod probe sa dodatkom sladića gde je najveći udeo žute boje. Udeo crvene komponente se pripisuje slobodnim antocijanima u formi flavilijum katjona i kombinaciji antocijana i tanina kod starijih vina (Glories Y., 1984). Udeo žute boje se pripisuje prisustvu tanina i proizvodima razgradnje antocijana i najveći je u vinu sa dodatkom sladića (49,7±0,19 %), a najmanji u vinu sa dodatkom cimeta (36,04±0,79 %), dok se udeo plave boje kreće u intervalu od 9,34±0,05% (vino sa dodatkom sladića) do 10,51±0,36 % (vino sa dodatkom pelina) i pripisuje se slobodnim antocijanima u formi hinoidne baze i kombinaciji između tanina i antocijana. Vino sa dodatkom sladića, zbog dominacije žute boje i niske vrednosti dA%, imalo je nepoželjnu boju crvenog vina.

Više vrednosti dA% ukazuju na veći udeo crvene boje. Najniža vrednost dA utvrđena je u vinu sa dodatkom sladića (28,00±0,22 %) i u istom tom vinu bio je najniži udeo crvene i najviši udeo žute boje. Kada je vrednost dA, ispod 40 %, crvena boja vina je tamna i netipična (Glories Y., (1984), Kelebek H., (2006). U ostalim uzorcima vina vrednost dA se kretala od 42,01±0,15 % (vino sa dodatkom pelina) do 58,41±0,31 % (vino sa dodatkom cimeta).

4.6.2. Senzorne karakteristike vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja

Rezultati senzorne analize vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja prikazani su u tabeli 4.27.

Tabela 4.27. Senzorne karakteristike vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja

<i>Red. br.</i>	<i>Vino</i>	<i>Vizuelni opažaji</i>	<i>Olfaktorni opažaji</i>	<i>Gustativni opažaji</i>	<i>Gustativno-olfaktorni opažaji</i>	<i>Ukupno bodova</i>
1.	Plovdina, (P _L -W)	16,10	18,80	23,50	12,00	70,40
2.	Plovdina+Anis, (P _L -AW)	14,10	17,40	20,60	10,70	62,80
3.	Plovdina+Cimet, (P _L -CW)	16,40	21,20	25,40	12,20	75,20
4.	Plovdina+Pelina, (P _L -WW)	13,90	18,10	16,10	7,20	53,20
5.	Plovdina+Sladić, (P _L -LW)	8,80	18,70	17,00	7,80	51,20
	Max. poena	20,00	30,00	30,00	20,00	100,00

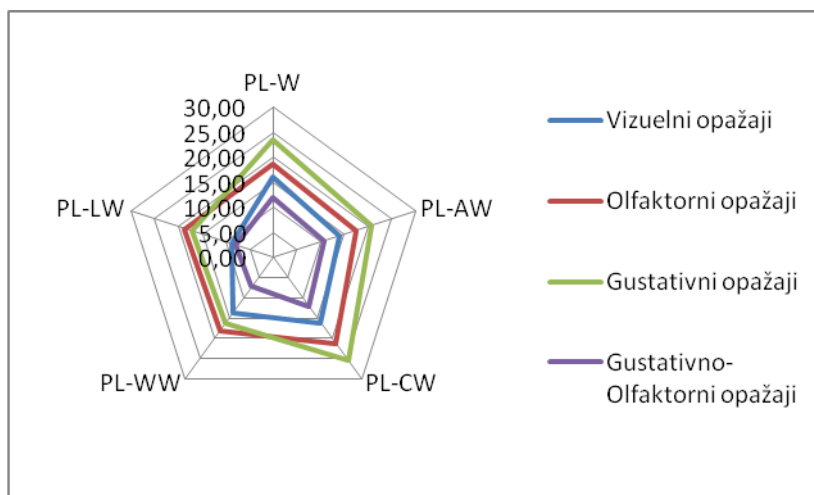
Vino Plovdina sa dodatkom sladića (P_L-LW) dobilo je najmanji broj bodova za vizuelni opažaj (8,80), vino Plovdina (P_L-W) je dobilo (16,10) bodova, dok je najveći broj bodova za vizuelni opažaj dobilo vino Plovdina sa dodatkom cimeta (16,40).

Za olfaktorni opažaj vino Plovdina sa dodatkom pelina (P_L-WW) dobilo je (18,10) bodova, vino Plovdina (P_L-W) 18,80, a najveći broj bodova dobilo je vino Plovdina sa dodatkom cimeta (21,20).

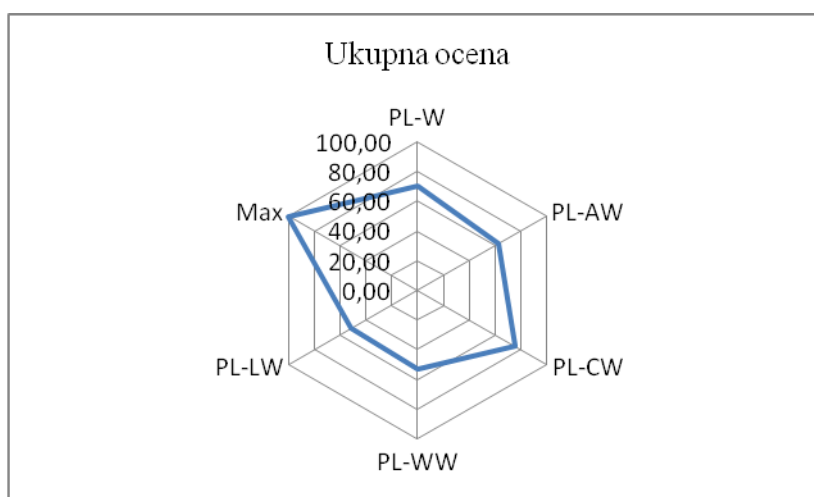
Za gustativni opažaj najmanje bodova dobilo je vino Plovdina sa dodatkom pelina (16,10), vino Plovdina je dobilo 23,50 bodova, dok je najveći broj bodova dobilo vino Plovdina sa dodatkom cimeta (25,40).

Najlošije ocenjeno vino za gustativno olfaktorni opažaj je vino Plovdina sa dodatkom pelina (7,20) bodova, vino Plovdina je dobilo 12,00 bodova, najveći broj bodova je dobilo vino Plovdina sa dodatkom cimeta (12,20).

Najmanju ukupnu ocenu dobilo je vino Plovdina sa dodatkom sladića (51,20), vino Plovdina je dobilo 70,40 boda a najbolje je ocenjeno vino Plovdina sa dodatkom cimeta, 75,20 bodova.



Slika 4.16. Senzorne karakteristike vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja



Slika 4.17. Zbirna ocena senzornih karakteristika vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja

4.7. HPLC ANALIZA VINA

4.7.1. HPLC analiza fenolnih jedinjenja crvenog vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

Polifenolna kompozicija crvenog vina napravljenog od sorte grožđa Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja prikazana je u tabeli 4.28.

Tabela 4.28. Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu Prokupac

FENOLNA JEDINJENJA (%)		PW	PAW	PCW	PWW	PLW
Neflavonoidna jedinjenja						
<i>Hidroksibenzoeve kiseline</i>						
Galna kiselina	X1	7,73	8,65	10,54	8,22	2,45
Siringinska kiselina	X2	0,74	1,75	2,45	1,73	1,81
Protokatehinska kiselina	X3	0,88	1,89	2,49	1,91	0,97
Ukupne hidroksibenzoeve kiseline		9,35	12,29	15,48	11,86	5,23
<i>Hydroksicimetne kiseline</i>						
Ferulinska kiselina	X4	0,19	0,98	1,29	0,61	1,65
Kumarinska kiselina	X5	nd	0,32	0,68	0,33	1,77
Sinapinska kiselina	X6	0,14	0,75	1,50	0,43	1,25
Kafeinska kiselina	X7	nd	0,67	0,94	0,71	nd
Ukupne hidroksicimetne kiseline		0,33	2,72	4,41	2,08	4,67
Zbir pojedinačnih neflavonoidnih jedinjenja		9,68	15,01	19,88	13,94	9,90
<i>Flavonoidi</i>						
<i>Flavan-3-oli</i>						
(+)- Katehin	X8	1,61	1,29	1,86	1,42	0,17
(-)-Epikatehin	X9	0,58	1,47	1,45	1,22	1,94
Ukupni flavan-3-oli		2,19	2,76	3,31	2,64	2,11
<i>Flavonoli</i>						
Rutin	X10	0,59	1,06	1,27	1,12	2,54
Kvercetin	X11	nd	1,09	0,10	nd	1,70
Kvercetin-3-O-galaktozid	X12	0,11	0,38	0,69	0,42	nd
Miricetin	X13	0,05	0,17	0,93	1,19	2,21
Ukupni flavonoli		0,75	2,17	2,99	2,73	6,44
<i>Flavanoni</i>						
Naringin	X14	0,14	0,45	0,59	0,35	1,09
Naringenin	X15	nd	0,03	nd	nd	1,26
Ukupni flavanoni		0,14	0,48	0,59	0,35	2,35
<i>Anthocyani</i>						
Malvidin-3-glucozid	X16	0,14	2,87	3,30	2,38	3,75
Zbir pojedinačnih fenolnih jedinjenja		3,22	8,81	10,20	8,10	14,60
Ukupno identifikovana fenolna jedinjenja		12,90	23,82	30,08	22,04	24,56

Fenolna jedinjenja su identifikovana na osnovu retencionih vremena i maksimuma apsorpcije standardnih jedinjenja (tabela 4.28). Identifikovani su derivati hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline i flavonoidi (flavan-3-oli, flavonoli, flavanoni i antocijani), što je u skladu sa analizama drugih autora (Gođevac et al., 2010). Od derivata hidroksibenzoeve kiseline identifikovani su: galna kiselina, siringinska kiselina i protokatehinska kiselina. Vino Prokupac sa dodatkom anisa, cimeta i pelina sadrži veći procenat galne kiseline (8,65 %, 10,54 % i 8,22 % respektivno) u poređenju sa vinom Prokupac bez dodatka lekovitog bilja (7,73 %), dok vino Prokupac sa dodatkom sladića ima najmanji procenat galne kiseline u odnosu na ukupnu količinu identifikovanih fenolnih jedinjenja (5,23 %). Sadržaj ukupnih hidroksibenzoevih kiselina u vinu Prokupac povećava se kada se dodaju anis, cimet i pelin.

Hidroksicimetne kiseline (ferulna i sinapinska kiselina) su takođe identifikovane u crvenom vinu Prokupac (PW). Ferulna, kumarna, sinapinska i kafena kiselina identifikovane su u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (PAW), u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta (PCW), i u vinu Prokupac sa dodatkom pelina (PWW). U vinu Prokupac sa dodatkom sladića identifikovane su ferulna, kumarna i sinapinska kiselina a nije identifikovana kafena kiselina. Sadržaj ukupnih neflavonoidnih jedinjenja u vinu Prokupac iznosio je 9,68 %. Dodatak cimeta doveo je do najvećeg povećanja od 19,88 % ukupnih neflavonoidnih jedinjenja. Dodatak lekovitog bilja doveo je do povećanja sadržaja ukupnih flavonoida. Najmanji procenat ukupnih flavonoida (3,22 %) imalo je vino Prokupac, dok je najveći procenat ukupnih flavonoida nađen u vinu Prokupac sa dodatkom sladića (14,6 %). Odnos katehina i epikatehina bio je oko 3:1. Ovaj odnos se menjao u vinu u kome je dodato lekovito bilje zbog povećanja sadržaja epikatehina. Količina ukupnih fenolnih jedinjenja se povećala sa dodatkom lekovitog bilja, tako da je vino Prokupac bez dodatka lekovitog bilja (kontrola) sadržalo najmanju količinu ukupnih fenolnih jedinjenja (12,90 %), dok je vino Prokupac sa dodatkom cimeta sadržalo najveću količinu fenolnih jedinjenja (30,08 %). Antioksidativna aktivnost je u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim fenolnim jedinjenjima, pa je vino Prokupac imalo najmanju antioksidativnu aktivnost, dok je vino Prokupac sa dodatkom cimeta pokazalo najveću antioksidativnu aktivnost.

4.7.1.1. Analiza glavnih komponenti (PCA) crvenog vina Prokupac

Cilj PCA analize je smanjenje velikog broja podataka na manji broj podataka tj, na glavne komponente. PCA analiza se koristi za smanjenje dimenzionalnosti skupa podataka, a zadržava one karakteristike podataka koje najviše doprinose varijansama (Kim, 2001).

Korelaciona matrica je urađena kako bi se utvrdio međusoban odnos parova svih varijabli i njihova međusobna korelacija. Redovi i kolone predstavljaju posmatrane varijable, a podatak na preseku određenog reda i kolone predstavlja koeficijent korelacije između varijabli u odgovarajućem redu i koloni.

U cilju proučavanja odnosa između pojedinih fenolnih jedinjenja vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja i vina Prokupac (kontrola) konstruisana je korelaciona matrica. Korelaciona matrica daje podatke o pozitivnoj i negativnoj korelaciji između pojedinih fenolnih jedinjenja u vinu. Jedinjenja slične strukture nalaze se u pozitivnoj korelaciji (galna kiselina i protokatehinska kiselina).

U tabeli 4.29 prikazani su koeficijenti korelacije između pojedinih fenolnih jedinjenja u vinima Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja.

Tabela 4.29. Korelaciona matrica fenolnih jedinjenja vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja (25°C)

	X1- Galna kiselina	X2- Siringinska kiselina	X3- Protokatehinska kis.	X4-- Ferulinska kiselina	X5- Kumarinska kiselina	X6- Sinapinska kiselina	X7- Kafeinska kiselina	X8-(+)- Katehin	X9-(-)-Epikatehin	X10- Rutin	X11- Kvercetin	X12-- Kvercetin-3-O-galaktozid	X13- Miricetin	X14- Naringin	X15- Naringenin	X16- Malvidin-3-glucozid
X1	1.00	0.21	0.76	-0.42	-0.76	-0.09	0.78	0.96	-0.47	-0.78	-0.75	0.86	-0.69	-0.69	-0.94	-0.24
X2	0.21	1.00	0.78	0.75	0.44	0.87	0.72	0.00	0.73	0.44	0.17	0.67	0.45	0.54	0.11	0.88
X3	0.76	0.78	1.00	0.20	-0.21	0.44	0.99	0.57	0.20	-0.21	-0.35	0.98	-0.13	-0.10	-0.53	0.44
X4	-0.42	0.75	0.20	1.00	0.89	0.92	0.11	-0.59	0.96	0.87	0.72	0.05	0.73	0.94	0.70	0.93
X5	-0.76	0.44	-0.21	0.89	1.00	0.71	-0.29	-0.83	0.86	0.99	0.77	-0.35	0.90	0.99	0.94	0.74
X6	-0.09	0.87	0.44	0.92	0.71	1.00	0.34	-0.25	0.80	0.66	0.42	0.35	0.56	0.78	0.43	0.85
X7	0.78	0.72	0.99	0.11	-0.29	0.34	1.00	0.59	0.14	-0.28	-0.38	0.97	-0.18	-0.18	-0.59	0.38
X8	0.96	0.00	0.57	-0.59	-0.83	-0.25	0.59	1.00	-0.67	-0.87	-0.88	0.73	-0.74	-0.80	-0.95	-0.47
X9	-0.47	0.73	0.20	0.96	0.86	0.80	0.14	-0.67	1.00	0.88	0.78	0.01	0.75	0.92	0.69	0.97
X10	-0.78	0.44	-0.21	0.87	0.99	0.66	-0.28	-0.87	0.88	1.00	0.79	-0.37	0.92	0.98	0.94	0.76
X11	-0.75	0.17	-0.35	0.72	0.77	0.42	-0.38	-0.88	0.78	0.79	1.00	-0.52	0.52	0.80	0.82	0.60
X12	0.86	0.67	0.98	0.05	-0.35	0.35	0.97	0.73	0.01	-0.37	-0.52	1.00	-0.26	-0.25	-0.66	0.26
X13	-0.69	0.45	-0.13	0.73	0.90	0.56	-0.18	-0.74	0.75	0.92	0.52	-0.26	1.00	0.86	0.82	0.68
X14	-0.69	0.54	-0.10	0.94	0.99	0.78	-0.18	-0.80	0.92	0.98	0.80	-0.25	0.86	1.00	0.89	0.83
X15	-0.94	0.11	-0.53	0.70	0.94	0.43	-0.59	-0.95	0.69	0.94	0.82	-0.66	0.82	0.89	1.00	0.51
X16	-0.24	0.88	0.44	0.93	0.74	0.85	0.38	-0.47	0.97	0.76	0.60	0.26	0.68	0.83	0.51	1.00

0,6 - 0,79 - jaka korelacija

0,8 - 1 – veoma jaka korelacija

Galna kiselina je u pozitivnoj i jakoj korelaciji sa protokatehinskom kiselinom (0,76-koeficijent korelacije), kafenom kiselinom (0,78) i veoma jakoj korelaciji sa katehinom (0,96) i kvercetin-3-O-galaktozidom (0,86).

Siringinska kiselina je u jakoj korelaciji sa protokatehinskom kiselinom (0,78), ferulinskom kiselinom (0,75), sinapinskom kiselinom (0,87), kafenom kiselinom (0,72), epikatehinom (0,73), kvercetin-3-O-galaktozidom (0,67) i u veoma jakoj korelaciji sa malvidin-3-glukozidom (0,88).

Protokatehinska kiselina je u korelaciji sa sinapinskom kiselinom, kafeinskom kiselinom, katehinom, kvercetin-3-O-galaktozidom i malvidin-3-glukozidom.

Ferulna kiselina je u korelaciji sa epikatehinom, rutinom, kvercetinom, naringinom i malvidin-3-glukozidom itd.

Kumarinska kiselina je u korelaciji sa sinapinskom kiselinom, epikatehinom, rutinom, kvercetinom, miricetinom, naringinom, naringeninom i malvidin-3-glukozidom.

Sinapinska kiselina je u korelaciji sa kafeinskom kiselinom, epikatehinom, rutinom, miricetinom, naringeninom i malvidin-3-glukozidom.

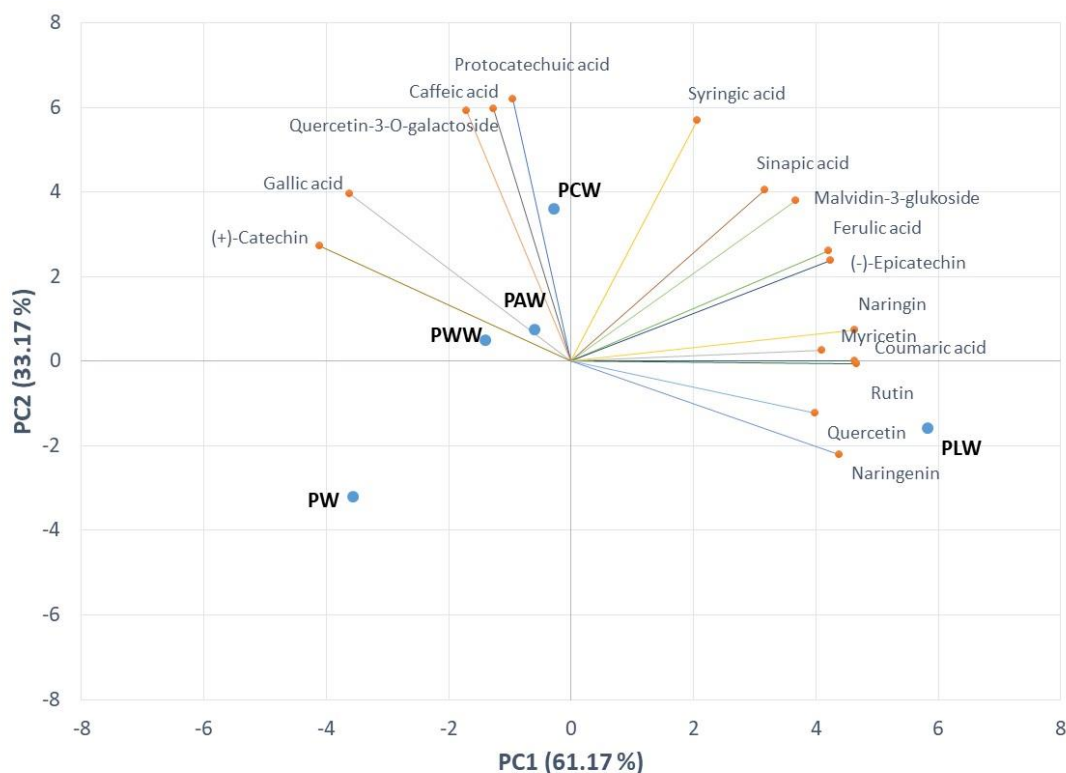
Kafeinska kiselina je u korelaciji sa katehinom, kvercetin-3-O-galaktozidom.

Katehin- sa kvercetin-3-O-galaktozidom.

Epikatehin u korelaciji sa rutinom, kvercetinom, miricetinom, naringinom, naringeninom i malvidin-3-glukozidom.

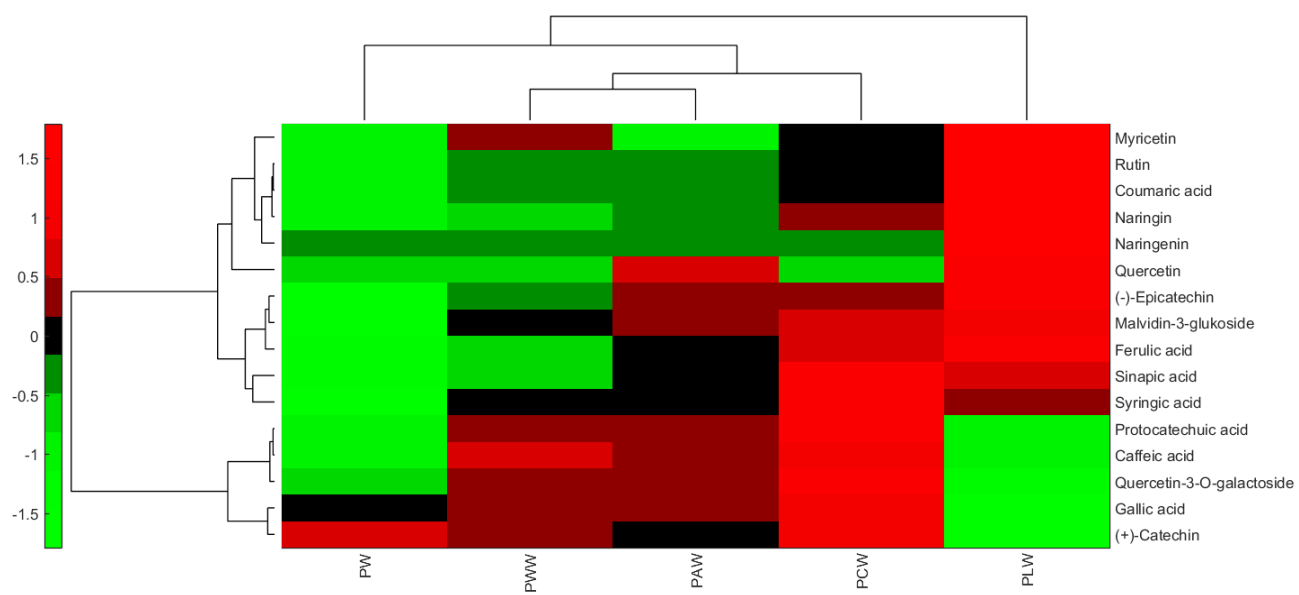
Analizom biplota sa slike 4.18. uočava se da prve dve glavne komponente (galna kiselina i siringinska kiselina) čine 94,34% sadržaja od ukupnih fenolnih jedinjenja. Naringenin i kvercetin su u pozitivnoj korelaciji, ferulna kiselina i epikatehin, sinapinska kiselina i malvidin-3-glukozid. U negativnoj korelaciji su naringenin i katehin, naringenin i galna kiselina, katehin i epikatehin i dr.

Crveno vino Prokupac sa dodatkom sladića (PLW) se dosta razlikuje po sadržaju fenolnih jedinjenja od drugih vina. Sadržaj naringenina, kvercetina i rutina je visok u vinu PLW a sadržaj katehina i galne kiseline je nizak.



Slika 4.18. Sadržaj fenolnih jedinjenja crvenog vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja pokazanog u obliku biplota

Na slici 4.19. predstavljen je klastergram fenolnih jedinjenja crvenog vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja. Iz klastergrama se vidi da crveno vino Prokupac (PW), kontrola, ima niske vrednosti identifikovanih fenolnih jedinjenja HPLC analizom sem galne kiseline i katehina. Sa dodatkom lekovitog bilja došlo je do povećanja fenolnih jedinjenja, pa vino Prokupac sa dodatkom cimeta i vino Prokupac sa dodatkom sladića ima znatno veći sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja. Vino Prokupac sa dodatkom cimeta ima veću koncentraciju katehina, galne kiseline, kvercetin-3-O-galaktozida, kafene kiseline, protokatehinske kiseline, siringinske kiseline, ferulne kiseline, malvidin-3-glukozida i epikatehina u odnosu na vino Prokupac (kontrolu). Crveno vino Prokupac sa dodatkom sladića ima veći sadržaj siringinske, sinapinske i ferulne kiseline, malvidin-3-glukozida, epikatehina, kvercetina, naringenina, naringina, kumarinske kiseline, rutina i miricetina u odnosu na crveno vino Prokupac (kontrolu).



Slika 4.19. Klastergram fenolnih jedinjenja vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

4.7.2. HPLC analiza fenolnih jedinjenja vina Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja

Tabela 4.30. Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu Plovdina

PENOLNA JEDINJENJA, (%)	P_L-W	P_L-AW	P_L-CW	P_L-WW	P_L-LW
Neflavonoidna jedinjenja					
Hidroksibenzoeve kiseline					
Galna kiselina	1,99	1,45	6,60	1,90	1,32
Siringinska kiselina	1,09	0,99	1,28	1,09	1,97
Protokatehinska kiselina	3,43	2,20	4,10	3,31	2,62
Dihidroksibenzoeva kiselina	2,17	2,29	2,70	2,43	2,67
Ukupne hidroksibenzoeve kiseline	8,68	6,93	14,68	8,73	8,58
Hidroksicimetne kiseline					
Ferulinska kiselina	3,06	1,17	1,02	1,19	1,53
Cumarinska kiselina	4,53	3,17	3,89	2,76	1,92
Sinapinska kiselina	1,77	1,73	1,42	1,69	1,39
Cafeinska kiselina	3,08	3,06	2,68	2,94	2,61
Ukupne hidroksicimetne kiseline	12,44	9,13	9,01	8,58	6,94
Zbir pojedinačnih neflavonoidnih jedinjenja	21,12	16,06	2,69	17,31	15,52
Flavonoidi					
Flavan-3-oli					
(+)-Katechin	2,33	2,58	2,97	2,70	1,94
(-)-Epikatehin	2,15	2,15	2,76	2,41	2,56
Ukupni flavan-3-oli	4,48	4,73	5,73	5,11	4,50
Flavonoli					
Rutin	1,86	0,61	0,93	0,86	1,98
Hiperozid	2,52	1,93	1,60	2,00	2,14
Miricetin	0,73	0,55	0,55	0,49	1,64
Ukupni flavonoli	5,11	3,09	3,08	3,35	5,76
Flavanoni					
Naringin	2,92	2,97	2,64	3,08	4,64
Naringenin	0,00	0,21	0,15	0,30	1,43
Ukupni flavanoni	2,92	3,18	2,79	3,38	6,07
Anthocijanini					
Malvidin-3-glukozid	0,00	0,91	0,00	0,00	0,6
Zbir pojedinačnih fenolnih jedinjenja	33,63	27,97	35,29	29,15	32,45

HPLC-DAD analizom vina Plovdina identifikovano je 16 fenolnih jedinjenja na osnovu retencionih vremena i maksimuma apsorbanse standardnih jedinjenja (tabela 4.30.). Identifikovani su derivati benzoeve i cimetine kiseline (neflavonoidna jedinjenja) i flavonoidi (flavan-3-oli, flavonoli, flavanoni i antocijani). Od hidroksibenzoevih kiselina identifikovane su: galna kiselina, siringinska, protokatehinska i dihidroksibenzoeva kiselina. Sa dodatkom aromatičnog bilja povećavao se i sadržaj ukupnih hidroksibenzoevih kiselina. Najmanji sadržaj ukupnih hidroksibenzoevih kiselina imalo je vino Plovdina (8,68% od ukupno identifikovanih fenolnih jedinjenja), zatim vino Plovdina sa dodatkom anisa (6,93%), vino Plovdina sa dodatkom sladića (8,58%), vino sa dodatkom pelina (8,73%) i vino Plovdina sa dodatkom cimeta imalo je najveći sadržaj ukupnih hidroksibenzoevih kiselina (14,68%).

Od hidroksicimetnih kiselina identifikovane su: ferulna, kumarna, sinapinska i kafena kiselina. Dodatkom lekovitog bilja došlo je do promene u sadržaju hidroksicimetnih kiselina. Vino Plovdina sa dodatkom cimeta sadržalo je 9,01% ukupnih hidroksicimetnih kiselina, dok je vino Plovdina (kontrola) sadržalo 12,44% ukupnih hidroksibenzoevih kiselina.

Od flavan-3-ola identifikovani su: katehin i epikatehin. Najmanji sadržaj flavan-3-ola bio je u vinu Plovdina (4,48%) dok je najveći sadržaj flavan-3-ola imalo vino Plovdina sa dodatkom cimeta (5,73%). Sa dodatkom lekovitog bilja došlo je i do promene sadržaja (+)-katehina u odnosu na (-)-epikatehin. U vinu Plovdina taj odnos je u korist katehina (2,33: 2,15 %) dok je u vinu sa dodatkom sladića taj odnos u korist epikatehina (1,94:2,56 %).

U vinima Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja došlo je i do promene u sadržaju flavanona (naringina i naringenina). Najmanji sadržaj je u vinu Plovdina sa dodatkom anisa (2,79%) dok je najveći sadržaj u vinu Plovdina sa dodatkom sladića (6,07 %).

Vino Plovdina sa dodatkom cimeta sadržalo je najveći procenat identifikovanih fenolnih jedinjenja (35,29 %), dok je vino Plovdina sa dodatkom anisa sadržalo najmanji procenat od identifikovanih ukupnih fenolnih jedinjenja (27,97 %).

4.7.3. Aromatski profil vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja

GC/MC analizom vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja identifikovane su sledeće grupe jedinjenja: organske kiseline, acetati, alkoholi, aldehidi, ketoni, etil-estri i terpeni. Pojedinačna jedinjenja iz ovih grupa za vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja data su u tabelama od 4.31 do 4.35. U vinu Prokupac identifikovano je ukupno 26 jedinjenja, u vinu Prokupac sa dodatkom anisa identifikovano je 33 jedinjenja, u vinu Prokupac sa dodatkom

cimeta 30 jedinjenja, u vinu Prokupac sa dodatkom pelina identifikovano je ukupno 41 jedinjenje i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića identifikovano je 29 jedinjenja.

Tabela 4.31. Hemijski sastav vina Prokupac (originalna tabela)

No.	t_{ret} , min	Compound	Molecular formula	Aroma descriptor	LRI ^{exp}	LRI ^{lit}	Method of identification	Area%
1	2.93	Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	Sour ^a	646	-	MS	0.1
2	3.05	Ethyl acetate	C ₄ H ₈ O ₂	Fruity, sweet ^b	652	-	MS	4.9
3	3.19	Isobutanol	C ₄ H ₁₀ O	Fusel, alcohol ^c	658	650	RI, MS	3.5
4	3.38	Methylolacetone	C ₄ H ₈ O ₂	-	666	-	MS	0.9
5	4.86	Isopentyl alcohol	C ₅ H ₁₂ O	Cheese ^b	731	731	RI, MS	22.8
6	4.92	2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	734	724	RI, MS	11.9
7	5.07	1-Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	Fruity, balsamic ^c	741	762	RI, MS	7.6
8	5.14	(S)-(-)-2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	744	-	MS	2.9
9	5.84	[R,R]-2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	Butter ^c	775	-	MS	tr
10	5.98	[S,S]-2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	Butter ^c	781	785	RI, MS	tr
11	7.86	3-Methylpentanol	C ₆ H ₁₄ O	-	864	833	RI, MS	0.4
12	7.96	n-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	Herbaceous, resinous ^d	868	863	RI, MS	0.6
13	8.06	Isopentyl acetate	C ₇ H ₁₄ O ₂	Banana, Fruity, Pear ^b	872	869	RI, MS	tr
14	8.15	2-Methyl butyl acetate	C ₇ H ₁₄ O ₂	Pungent ^d	876	875	RI, MS	tr
15	10.55	Hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	Cheese, rancid, fatty ^c	980	967	RI, MS	0.8
16	11.00	Ethyl hexanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂	Fruity, anise ^c	1000	994	RI, MS	2.0
17	13.64	Phenyl ethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	Flowery, pollen, perfumed ^c	1119	1106	RI, MS	16.9
18	14.77	n-Nonanol	C ₉ H ₂₀ O	Fat, green ^a	1172	1165	RI, MS	1.7
19	14.87	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	Rancid, harsh, cheese, fatty acid ^c	1177	1167	RI, MS	2.6
20	14.95	Diethyl succinate	C ₈ H ₁₄ O ₄	Light fruity ^c	1181	1176	RI, MS	tr
21	15.31	Ethyl octanoate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Pineapple, pear, floral ^c	1198	1196	RI, MS	10.4

22	16.57	2-Phenyl ethyl acetate	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Pleasant, floral ^c	1262	1254	RI, MS	0.3
23	18.56	Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Fatty, unpleasant ^c	1367	1364	RI, MS	0.9
24	19.13	Ethyl decanoate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Fruity, fatty, pleasant ^c	1397	1395	RI, MS	4.5
25	21.23	Methyl p-tert-butylphenyl acetate	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	-	1517	1497	RI, MS	0.9
26	22.55	Ethyl dodecanoate	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Flowery, fruity ^c	1596	1594	RI, MS	0.4
							Total identified (%)	97.0
Grouped components (%)								
Acids (1, 15, 19, 23)							4.4	
Acetates (2, 13, 14, 22, 25)							6.1	
Alcohols (3, 5-12, 17, 18)							68.3	
Ketones (4)							0.9	
Ethyl esters (16, 20, 21, 24, 26)							17.3	

*t*_{ret.}: Retention time; RI^{lit.}: Linear retention indices from literature (Adams, 2007); LRI^{exp.}: Experimentally determined linear retention indices using a homologous series of n-alkanes (C₈-C₂₀) on the HP-5MS column. MS: constituent identified by mass-spectra comparison; RI: constituent identified by retention index matching; tr = trace amount (<0.05%).

^a Reported in <http://www.flavornet.org/flavornet.html>, ^b Farenzena and Tombesi, 2015; ^c Jiang et al., 2013; ^d Comuzzo et al., 2006.

Tabela 4.32. Hemijski sastav vina Prokupac sa dodatkom anisa (originalna tabela)

No.	t_{ret} , min	Compound	Molecular formula	Aroma descriptor	RI ^{exp}	RI ^{lit}	Method of identification	Area%
1	3.39	Ethyl acetate	C ₄ H ₈ O ₂	Fruity, sweet ^b	669	-	MS	tr
2	3.51	2-Butanol	C ₄ H ₁₀ O	-	674	-	MS	0.2
3	4.36	Isopentyl alcohol	C ₅ H ₁₂ O	Cheese ^b	646	-	MS	13.5
4	4.43	2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	712	724	RI, MS	7.0
5	5.07	1-Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	Fruity, balsamic ^c	741	762	RI, MS	2.0
6	5.14	(S)-(-)-2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	744	-	MS	0.7
7	5.46	[R,R]-2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	Butter ^c	758	-	MS	0.2
8	5.98	[S,S]-2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	Butter ^c	781	785	RI, MS	tr
9	7.65	3-Methyl-pentanol	C ₆ H ₁₄ O	-	854	833	RI, MS	0.3
10	7.96	n-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	Herbaceous, resinous ^d	868	863	RI, MS	0.1
11	10.16	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	Almond ^c	964	952	RI, MS	0.2
12	10.51	Hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	Cheese, rancid, fatty ^c	979	967	RI, MS	tr
13	10.89	Ethyl hexanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂	Fruity, anise ^c	995	994	RI, MS	0.3
14	11.00	Ethyl 3-methyl pentanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂	-	1000	-	MS	0.2
15	11.64	p-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	Solvent, gasoline, citrus ^a	1029	1020	RI, MS	0.3
16	11.72	1,8-Cineole	C ₁₀ H ₁₈ O	Mint, sweet ^a	1032	1026	RI, MS	0.7
17	13.06	Fenchone	C ₁₀ H ₁₆ O	-	1092	1083	RI, MS	0.4
18	13.10	p-Cymenene	C ₁₀ H ₁₂	-	1094	1089	RI, MS	1.1
19	13.63	Phenyl ethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	Flowery, pollen, perfumed ^c	1118	1106	RI, MS	4.5
20	14.78	n-Nonanol	C ₉ H ₂₀ O	Fat, green ^a	1173	1165	RI, MS	1.1
21	14.82	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	Rancid, harsh, cheese, fatty acid ^c	1175	1167	RI, MS	0.4
22	15.02	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	Turpentine, nutmeg, must ^a	1185	1174	RI, MS	1.1
23	15.30	Ethyl octanoate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Pineapple, pear, floral ^c	1198	1196	RI, MS	2.5
24	15.43	Methyl chavicol	C ₁₀ H ₁₂ O	Licorice, anise ^a	1205	1195	RI, MS	9.4
25	16.05	neoiso-Dihydrocarveol	C ₁₀ H ₁₈ O	-	1235	1226	RI, MS	0.4

26	16.53	(Z)-Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	-	1260	1249	RI, MS	1.6
27	16.57	2-Phenyl ethyl acetate	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Pleasant, floral ^c	1262	1254	RI, MS	tr
28	17.25	(E)-Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	-	1296	1282	RI, MS	46.0
29	17.69	Anisyl formate	C ₉ H ₁₀ O ₃	-	1320	1330	RI, MS	0.3
30	18.54	Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Fatty, unpleasant ^c	1365	1364	RI, MS	0.4
31	19.13	Ethyl decanoate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Fruity, fatty, pleasant ^c	1397	1395	RI, MS	2.3
32	21.23	Methyl p-tert-butylphenyl acetate	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	-	1515	1497	RI, MS	0.5
33	22.56	Ethyl dodecanoate	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Flowery, fruity ^c	1596	1594	RI, MS	0.3
					Total identified (%)			98.0
Grouped components (%)								
Acids (12, 21, 30)							0.8	
Acetates (27, 32)							0.7	
Alcohols (3-10, 19, 20)							29.4	
Aldehydes (11)							0.2	
Ethyl esters (13, 14, 23, 31, 33)							5.6	
Terpenes (15-18, 22, 24-26, 28, 29)							61.3	

*t*_{ret.}: Retention time; RI^{lit}-Retention indices from literature (Adams, 2007); RI^{exp}: Experimentally determined retention indices using a homologous series of n-alkanes (C₈-C₂₀) on the HP-5MS column. MS: constituent identified by mass-spectra comparison; RI: constituent identified by retention index matching; tr = trace amount (<0.05%).

^a Reported in <http://www.flavornet.org/flavornet.html>, ^b Farenzena and Tombesi, 2015; ^c Jiang et al., 2013; ^d Comuzzo et al., 2006.

Table 4.33. Hemijski sastav vina Prokupac sa dodatkom cimeta (originalna tabela)

No.	t_{ret} , min	Compound	Molecular formula	Aroma descriptor	RI ^{exp}	RI ^{lit}	Method of identification	Area%
1	3.06	Ethyl acetate	C ₄ H ₈ O ₂	Fruity, sweet ^b	652	-	MS	1.6
2	3.20	Isobutanol	C ₄ H ₁₀ O	Fusel, alcohol ^c	658	650	RI, MS	1.9
3	4.88	Isopentyl alcohol	C ₅ H ₁₂ O	Cheese ^b	733	731	RI, MS	24.1
4	4.94	2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	735	724	RI, MS	10.4
5	5.07	1-Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	Fruity, balsamic ^c	741	762	RI, MS	5.2
6	5.14	(S)-(-)-2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	744	-	MS	1.7
7	5.89	[R,R]-2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	Butter ^c	777	-	MS	tr
8	5.98	[S,S]-2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	Butter ^c	781	785	RI, MS	tr
9	7.87	3-Methyl-pentanol	C ₆ H ₁₄ O	-	864	-	MS	0.4
10	7.96	n-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	Herbaceous, resinous ^d	868	863	RI, MS	0.4
11	8.51	Styrene	C ₈ H ₈	Balsamic, gasoline ^a	892	-	MS	2.1
12	10.16	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	Almond ^c	964	952	RI, MS	0.2
13	10.54	Hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	Cheese, rancid, fatty ^c	980	967	RI, MS	0.5
14	11.00	Ethyl hexanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂	Fruity, anise ^c	1000	997	RI, MS	1.3
15	11.81	1,8-Cineole	C ₁₀ H ₁₈ O	Mint, sweet ^a	1036	1026	RI, MS	0.5
16	12.60	Acetophenone	C ₈ H ₈ O	Must, flower, almond ^a	1072	1059	RI, MS	0.7
17	13.28	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	Flower, lavender ^a	1102	1095	RI, MS	0.5
18	13.63	Phenyl ethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	Flowery, pollen, perfumed ^c	1119	1106	RI, MS	8.0
19	14.80	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	Camphor ^a	1174	1165	RI, MS	3.8
20	14.87	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	Rancid, harsh, cheese, fatty acid ^c	1177	1167	RI, MS	tr
21	15.03	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	Turpentine, nutmeg, must ^a	1185	1174	RI, MS	1.6
22	15.30	Ethyl octanoate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Pineapple, pear, floral ^c	1198	1196	RI, MS	7.3
23	16.09	Hydrocinnamyl alcohol	C ₉ H ₁₂ O	-	1236	1224	RI, MS	13.7
24	16.58	2-Phenyl ethyl acetate	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Pleasant, floral ^c	1262	1254	RI, MS	0.6

25	17.19	(E)-Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	-	1293	1282	RI, MS	5.5
26	18.36	2-Phenyl ethyl propanoate	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	-	1356	1351	RI, MS	3.9
27	18.54	Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Fatty, unpleasant ^c	1365	1364	RI, MS	0.4
28	18.76	Hydrocinnamyl acetate	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	-	1375	1366	RI, MS	0.2
29	19.13	Ethyl decanoate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Fruity, fatty, pleasant ^c	1397	1395	RI, MS	1.6
30	21.23	Methyl p-tert-butylphenyl acetate	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	-	1517	1497	RI, MS	0.5
					Total identified (%)			98.6
Grouped components (%)								
Acids (13, 20, 27)							0.9	
Acetates (1, 24, 30)							2.7	
Alcohols (2-10, 18)							52.1	
Aldehydes (12)							0.2	
Ketones (16)							0.7	
Ethyl esters (14, 22, 26, 29)							14.1	
Terpenes (15, 17, 19, 21, 23, 25, 28)							25.8	
Miscellaneous (11)							2.1	

t_{ret} : Retention time; RI^{lit}-Retention indices from literature (Adams, 2007); RI^{exp}: Experimentally determined retention indices using a homologous series of n-alkanes (C₈-C₂₀) on the HP-5MS column. MS: constituent identified by mass-spectra comparison; RI: constituent identified by retention index matching; tr = trace amount (<0.05%).

^a Reported in <http://www.flavornet.org/flavornet.html>, ^b Farenzena and Tombesi, 2015; ^c Jiang et al., 2013; ^d Comuzzo et al., 2006.

Tabela 4.34. Hemijski sastav vina Prokupac sa dodatkom pelina (originalna tabela)

No.	t_{ret} , min	Compound	Molecular formula	Aroma descriptor	RI ^{exp}	RI ^{lit}	Method of identification	Area%
1	3.11	Ethyl acetate	C ₄ H ₈ O ₂	Fruity, sweet ^b	654	-	MS	2.5
2	3.24	Isobutanol	C ₄ H ₁₀ O	Fusel, alcohol ^c	660	650	RI, MS	2.2
3	3.38	Methylolacetone	C ₄ H ₈ O ₂	-	666	-	MS	0.4
4	3.51	2-Butanol	C ₄ H ₁₀ O	-	672	-	MS	0.4
5	4.90	Isopentyl alcohol	C ₅ H ₁₂ O	Cheese ^b	733	731	RI, MS	21.3
6	4.97	2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	736	724	RI, MS	9.2
7	5.06	1-Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	Fruity, balsamic ^c	740	762	RI, MS	6.5
8	5.13	(S)-(-)-2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	743	-	MS	2.0
9	5.88	[R,R]-2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	Butter ^c	776	-	MS	tr
10	5.98	[S,S]-2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	Butter ^c	781	785	RI, MS	tr
11	7.89	3-Methyl-pentanol	C ₆ H ₁₄ O	-	865	-	MS	0.5
12	7.96	n-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	Herbaceous, resinous ^d	868	863	RI, MS	0.6
13	8.08	Isopentyl acetate	C ₅ H ₁₂ O	Banana, Fruity, Pear odor ^e	873	869	RI, MS	tr
14	8.15	2-Methylbutyl acetate	C ₅ H ₁₂ O	Fruity ^a	876	875	RI, MS	tr
15	10.16	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	Almond ^c	964	952	RI, MS	0.3
16	10.54	Hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	Cheese, rancid, fatty ^c	980	967	RI, MS	0.7
17	10.83	Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	Balsamic, must, spice ^a	992	988	RI, MS	0.5
18	10.99	Ethyl hexanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂	Fruity, anise ^c	999	994	RI, MS	1.4
19	11.64	p-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	Solvent, gasoline, citrus ^a	1028	1020	RI, MS	0.4
20	11.74	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	Lemon, orange ^a	1033	1024	RI, MS	0.3
21	12.60	n-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	Chemical, metal, burnt ^a	1071	1063	RI, MS	0.6
22	13.28	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	Flower, lavender ^a	1102	1095	RI, MS	2.2
23	13.64	Phenyl ethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	Flowery, pollen, perfumed ^c	1119	1106	RI, MS	11.7
24	13.73	trans-Thujone	C ₁₀ H ₁₆ O	-	1123	1112	RI, MS	4.7
25	14.07	iso-3-Thujanol	C ₁₀ H ₁₈ O	-	1138	1134	RI, MS	0.6
26	14.48	Nerol oxide	C ₁₀ H ₁₆ O	Oil, flower ^a	1159	1154	RI, MS	1.0

27	14.73	Lavandulol	C ₁₀ H ₁₈ O	Herb	1171	1165	RI, MS	3.9
28	14.77	n-Nonanol	C ₉ H ₂₀ O	Fat, green ^a	1172	1165	RI, MS	tr
29	14.84	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	Rancid, harsh, cheese, fatty acid ^c	1176	1167	RI, MS	1.4
30	15.03	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	Turpentine, nutmeg, must ^a	1185	1174	RI, MS	5.5
31	15.30	Ethyl octanoate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Pineapple, pear, floral ^c	1198	1196	RI, MS	0.2
32	15.42	Methyl chavicol	C ₁₀ H ₁₂ O	Licorice, anise ^a	1204	1195	RI, MS	0.4
33	15.95	β-Citronellol	C ₁₀ H ₂₀ O	Rose ^a	1231	1223	RI, MS	2.1
34	15.99	Nerol	C ₁₀ H ₁₈ O	Sweet ^a	1233	1227	RI, MS	0.6
35	16.07	Hydrocinnamyl alcohol	C ₉ H ₁₂ O	-	1237	1224	RI, MS	1.0
36	16.58	2-Phenyl ethyl acetate	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Pleasant, floral ^c	1262	1254	RI, MS	0.3
37	17.19	(E)-Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	-	1293	1282	RI, MS	3.5
38	18.36	2-Phenyl ethyl propanoate	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	-	1356	1351	RI, MS	0.5
39	18.53	Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Fatty, unpleasant ^c	1364	1364	RI, MS	0.4
40	19.13	Ethyl decanoate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Fruity, fatty, pleasant ^c	1397	1395	RI, MS	1.2
41	21.23	Methyl p-tert-butylphenyl acetate	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	-	1517	1497	RI, MS	0.7
					Total identified (%)			91.7
Grouped components (%)								
Acids (16, 29, 39)							2.5	
Acetates (1, 13, 14, 36, 41)							3.5	
Alcohols (2, 4-12, 21, 23, 28)							55.0	
Aldehydes (15)							0.3	
Ketones (3)							0.4	
Ethyl esters (18, 31, 38, 40)							3.3	
Terpenes (17, 19, 20, 22, 24-27, 30, 32-35, 37)							26.7	

t_{ret} : Retention time; RI^{lit}-Retention indices from literature (Adams, 2007); RI^{exp}: Experimentally determined retention indices using a homologous series of n-alkanes (C₈-C₂₀) on the HP-5MS column. MS: constituent identified by mass-spectra comparison; RI: constituent identified by retention index matching; tr = trace amount (<0.05%).

^a Reported in <http://www.flavornet.org/flavornet.html>, ^b Farenzena and Tombesi, 2015; ^c Jiang et al., 2013; ^d Comuzzo et al., 2006; ^e Monson, 2011.

Tabela 4.35. Hemijski sastav vina Prokupac sa dodatkom sladića (originalna tabela)

No.	t_{ret} , min	Compound	Molecular formula	Aroma descriptor	RI ^{exp}	RI ^{lit}	Method of identification	Area%
1	3.12	Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	Sour ^a	655	-	MS	tr
2	3.39	Methylolacetone	C ₄ H ₈ O ₂	-	667	-	MS	0.2
3	3.51	2-Butanol	C ₄ H ₁₀ O	-	672	-	MS	0.6
4	4.49	Isopentyl alcohol	C ₅ H ₁₂ O	Cheese ^b	715	731	RI, MS	26.9
5	4.56	2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	718	724	RI, MS	16.6
6	5.10	1-Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	Fruity, balsamic ^c	741	762	RI, MS	7.0
7	5.14	(S)-(-)-2-Methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	743	-	MS	2.5
8	5.58	[R,R]-2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	Butter ^c	763	-	RI, MS	0.4
9	5.98	[S,S]-2,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	Butter ^c	781	785	RI, MS	tr
10	7.71	3-Methyl-pentanol	C ₆ H ₁₄ O	-	857	-	MS	0.5
11	7.96	n-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	Herbaceous, resinous ^d	868	863	RI, MS	0.8
12	10.16	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	Almond ^c	964	952	RI, MS	tr
13	10.33	1-Octen-3-one	C ₈ H ₁₄ O	-	971	972	RI, MS	tr
14	10.56	Hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	Cheese, rancid, fatty ^c	981	967	RI, MS	0.6
15	10.91	Ethyl hexanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂	Fruity, anise ^c	996	994	RI, MS	0.7
16	11.00	Ethyl 3-methyl pentanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂	-	1000	-	MS	1.4
17	12.61	n-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	Moss, nut, mushroom ^a	1072	1063	RI, MS	0.7
18	13.64	Phenyl ethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	Flowery, pollen, perfumed ^c	1119	1106	RI, MS	19.4
19	14.78	n-Nonanol	C ₉ H ₂₀ O	Fat, green ^a	1172	1165	RI, MS	2.2
20	14.88	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	Rancid, harsh, cheese, fatty acid ^c	1178	1167	RI, MS	4.7
21	15.30	Ethyl octanoate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Pineapple, pear, floral ^c	1198	1196	RI, MS	5.8
22	16.07	Hydrocinnamyl alcohol	C ₉ H ₁₂ O	-	1237	1224	RI, MS	0.5
23	16.58	2-Phenyl ethyl acetate	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Pleasant, floral ^c	1262	1254	RI, MS	tr
24	17.19	(E)-Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	-	1293	1282	RI, MS	2.5
25	18.37	2-Phenyl ethyl propanoate	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	-	1356	1351	RI, MS	0.6
26	18.57	Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Fatty, unpleasant ^c	1367	1364	RI, MS	1.3
27	19.13	Ethyl decanoate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Fruity, fatty, pleasant ^c	1397	1395	RI, MS	1.6

28	21.24	Methyl p-tert-butylphenyl acetate	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	-	1517	1497	RI, MS	1.0
29	22.71	5-Oxy-isobornyl isobutanoate	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	-	1605	1603	RI, MS	0.5
					Total identified (%)			99.0
Grouped components (%)								
Acids (1, 14, 20, 26)							6.6	
Acetates (19, 23, 28)							3.2	
Alcohols (3-11, 17, 18)							75.4	
Aldehydes (12)							tr	
Ketones (2, 13)							0.2	
Ethyl esters (15, 16, 21, 25, 27)							10.1	
Terpenes (22, 24, 29)							3.5	

t_{ret} : Retention time; RI^{lit}-Retention indices from literature (Adams, 2007); RI^{exp}: Experimentally determined retention indices using a homologous series of n-alkanes (C₈-C₂₀) on the HP-5MS column. MS: constituent identified by mass-spectra comparison; RI: constituent identified by retention index matching; tr = trace amount (<0.05%).

^a Reported in <http://www.flavornet.org/flavornet.html>, ^b Farenzena and Tombesi, 2015; ^c Jiang et al., 2013; ^d Comuzzo et al., 2006.

U vinu Prokupac (kontroli) identifikovane su: sirćetna kiselina sa relativnim udelom od 0,1%, heksanska kiselina sa relativnim udelom od 0,8 %. Najveći relativni udeo imala je oktanska kiselina (kaprilna kiselina) od 2,6 % i dekanska kiselina sa relativnim udelom od 0,9%. Relativni udeo ukupno identifikovanih organskih kiselina u vinu Prokupac iznosio je 4,4%. U vinu Prokupac sa dodatkom anisa identifikovana je heksanska kiselina u tragovima a oktanska i dekanska kiselina su identifikovane sa relativnim udelom od 0,4 %. Relativni udeo ukupno identifikovanih organskih kiselina je 0,8 %. Sadržaj heksanske kiseline u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta iznosio je 0,5 %, oktanska kiselina identifikovana je u tragovima a sadržaj dekanske kiseline iznosio je 0,4 %. Relativni udeo ukupno identifikovanih organskih kiselina u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta iznosio je 0,9 %. Najveći sadržaj heksanske kiseline je bio u vinu Prokupac sa dodatkom pelina 0,7 %, sadržaj oktanske kiseline 1,4 % a dekanske kiseline 0,4%. Relativni udeo ukupno identifikovanih organskih kiselina u vinu Prokupac sa dodatkom pelina iznosio je 2,5 %. Sirćetna kiselina u vinu Prokupac sa dodatkom sladića identifikovana je u tragovima, heksanska kiselina sa 0,6 %. Oktanska kiselina sa najvećim relativnim udelom od 4,7 % i dekanska kiselina sa relativnim udelom od 1,3 %. Vino Prokupac sa dodatkom sladića imalo je najveći ukupni sadržaj organskih kiselina sa relativnim udelom od 6,6 %.

Od acetatnih jedinjenja najzastupljeniji je etil acetat u vinu Prokupac (kontrola) sa najvećim relativnim udelom od 4,9 %, u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta etil acetat je identifikovan sa relativnim udelom od 1,6 %, a u vinu Prokupac sa dodatkom pelina 2,5 %. U

vinu Prokupac je izopentil acetat identifikovan u tragovima kao i u vinu Prokupac sa dodatkom pelina dok u ostalim uzorcima vina nije detektovan. U kontroli (vino Prokupac) je identifikovan 2 metil butil acetat u tragovima kao i u vinu Prokupac sa dodatkom pelina. U vinu Prokupac identifikovan je metil p-ter-butil acetat sa relativnim udelom od 0,9%, u vinu Prokupac sa dodatkom anisa sa relativnim udelom 0,5 % kao i u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta, u vinu Prokupac sa dodatkom pelina sa 0,7% dok je u vinu Prokupac sa dodatkom sladića metil p-ter-butil acetat identifikovan sa relativnim udelom od 1,0 %. Sadržaj ukupnih acetata (u %) se smanjivao sa dodatkom lekovitog bilja. Najveći relativni udeo ukupnih acetata imalo je vino Prokupac (6,1 %) a najmanji vino Prokupac sa dodatkom anisa (0,7 %).

Od ukupnih alkohola u vinu Prokupac identifikovan je izobutanol (relativni udeo 3,5%), u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta (relativni udeo 1,9 %), u vinu Prokupac sa dodatkom isobutanola (relativni udeo 2,2 %). Identifikovan je izopentil alkohol u vinu Prokupac (sa relativnim udelom od 22,8 %), u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (sa relativnim udelom od 13,5 %), u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta (sa relativnim udelom od 24,1 %), u vinu Prokupac sa dodatkom pelina (sa relativnim udelom od 21,3 %) i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića (26,9 %). Alkohol 2-metil-1-butanol identifikovan je u svim uzorcima. U vinu Prokupac sa relativnim udelom od 11,9 %, u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (7,0 %), u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta (10,4 %), u vinu Prokupac sa dodatkom pelina (9,2 %) i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića (16,6 %). Alkohol 1-pentanol je identifikovan u svim uzorcima i njegov relativni odnos se menjao u uzorcima. U vinu Prokupac (7,6%), u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (2,0%), u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta (5,2%), u vinu Prokupac sa dodatkom pelina (6,5%) i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića (7,0%). (S)-(-)-2-metil-1-butanol u vinu Prokupac je identifikovan sa relativnim udelom od 2,9%, u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (0,7 %), u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta (1,7 %), u vinu Prokupac sa dodatkom pelina (9,2 %) i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića (2,5 %). U tragovima je identifikovan [R,R]-2,3-butandiol u Vinu Prokupac (kontroli), u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta, u vinu Prokupac sa dodatkom pelina, u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (0,2 %) a u vinu Prokupac sa dodatkom sladića njegov udeo je iznosio 0,4 %. U svim uzorcima je identifikovan u tragovima [S,S]-2,3-butandiol. U svim uzorcima je identifikovan 3-metil-pentanol i njegova vrednost se kreće od 0,3 % relativnog udela za vino Prokupac sa dodatkom anisa do 0,5 % za vina Prokupa sa dodatkom pelina i sa dodatkom sladića. N-heksanol je takođe identifikovan u svim vinima sa relativnim udelom od 0,1 % za vino Prokupac sa dodatkom anisa do 0,8 % za vino Prokupac sa dodatkom sladića. Pentil etil alkohol je identifikovan u vinu Prokupac (16,9 %), u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (4,5 %), u vinu Prokupac sa dodat-

kom cimeta (8,0 %) , u vinu Prokupac sa dodatkom pelina (11,7 %) i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića (19,4 %). N-heksanol je identifikovan u vinu Prokupac (1,7 %) i u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (1,1 %) dok u ostalim vinima nije identifikovan. N-Octanol je identifikovan samo u uzorku vina sa dodatkom sladića (relativni udeo od 0,7 %) i fenil etil alkohol (relativni udeo od 19,4 %) dok kod ostalih uzoraka vina ovi alkoholi nisu identifikovani. Relativni udeo ukupno identifikovanih alkohola u vinu Prokupac je iznosio 68,3 %, u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (29,4 %), u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta (52,1 %), u vinu Prokupac sa dodatkom pelina (55,0 %) i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića (75,4 %).

Od aldehida identifikovan je benzaldehid u vinu Prokupac sa dodatkom anisa i u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta (0,2 % relativni udeo), u vinu Prokupac sa dodatkom pelina (0,3 %), u vinu Prokupac sa dodatkom sladića je identifikovan u tragovima, dok nije identifikovan u kontroli (vino Prokupac). Od ketona metilacetona je identifikovan u vinu Prokupac (0,9 %), u vinu Prokupac sa dodatkom pelina (0,4 %) i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića (0,2 %). U vinu Prokupac sa dodatkom cimeta identifikovan je acetofenon (0,7 %) a u vinu Prokupac sa dodatkom sladića identifikovan je 1-oktan-3-on u tragovima dok kod drugih uzoraka vina nije identifikovan.

Iz grupe jedinjenja etil estara identifikovan je etil heksanoat u svim uzorcima vina čiji se relativni udeo kretao od 0,3 % za vino Prokupac sa dodatkom anisa do 2,0 % za vino Prokupac (kontrola). Dietil sukcinat je identifikovan u tragovima samo u kontroli. Etil-3-metil-pentanoat je identifikovan u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (0,2%) i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića (1,4 %). Etil oktanoat je identifikovan u svim uzorcima vina, a vrednosti se kreću od 0,2 % u vinu sa dodatkom pelina do 10,4 % za kontrolu. Etil dekanat je zastupljen u svim uzorcima vina, vrednosti se kreću od 1,6 % za vino Prokupac sa dodatkom sladića i vino Prokupac sa dodatkom cimeta do 4,5 % za vino Prokupac (kontrola). Etil dodekanat je identifikovan u kontroli (0,4 %) i u vinu Prokupac sa dodatkom anisa (0,3 %). Relativni udeo ukupnih etil estara u vinu Prokupac iznosi 17,3%, relativni udeo vina Prokupac sa dodatkom anisa 5,6 %, sa dodatkom cimeta 14,1 %, sa dodatkom pelina relativni udeo ukupnih etil estara iznosio je 3,3% a za vino Prokupac sa dodatkom sladića 10,1 %.

U vinu Prokupac nisu identifikovani terpeni, dok su identifikovani u vinima sa dodatkom lekovitog bilja. U vinu Prokupac sa dodatkom anisa relativni udeo ukupnih terpena iznosio je 61,3 %, u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta relativni udeo ukupnih terpena iznosio je 25,8 %, u vinu sa dodatkom pelina relativni udeo ukupnih terpena je 26,7 % a u vinu Prokupac sa dodatkom sladića udeo ukupnih terpena iznosio je 3,5%. U vinu Prokupac sa dodatkom anisa identifikovani su sledeći terpeni: p-cimen (0,3 %), 1,8-cineol (0,7 %), Fen-

chone (0,4%), p-cimemen (1,1 %), terpinen-4-ol (1,1 %), metil kavikol (9,4 %), neoiso-dihidrokarveol (0,4 %), (Z)- anetol (1,6 %), E- anetol (46,0 %) i anisil format (0,3 %). U vinu Prokupac sa dodatkom cimeta identifikovani su terpeni: 1,8- cineol (0,5%), linalol (0,5 %), borneol (3,8 %), terpinen-4-ol (1,6 %), hidrocinaamil alkohol (13,7 %), (E)-Anetol, hidrocinaamil acetat (0,2 %). U vinu Prokupac sa dodatkom pelina identifikovan su terpeni: (mircen (0,5 %), p-cimen (0,4 %), limonen (0,3 %), trans-tujon (4,7 %), iso-3-tujanol (0,6 %), nerol oksid (1,0 %), lavandulol (3,9 %), terpinen-4-ol (5,5 %), metil cavicol (0,4 %), β -citronelol (2,1 %), nerol (0,6 %), hidroksicinaamil alkohol (81,0 %), (E)-anetol (3,5 %). U vinu Prokupac sa dodatkom sladića identifikovani se terpeni: (hidrocinaamil alkohol (0,5 %), (E)-anetol (2,5 %) i 5-oksi-izobornil izobutanoat (0,5 %).

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu ispitivanja koja su izvršena u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti zaključci koji se odnose na kinetiku alkoholne fermentacije, fizičko-hemijske karakteristike vina, kao i na karakterizaciju bioaktivnih komponenti vina Prokupac i Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja.

- Dodatak lekovitog bilja menja brzinu fermentacije šire Prokupca i Plovdine. Maksimalna brzina fermentacije šire Prokupca ostvarena je sa dodatkom anisa posle 5. dana fermentacije a najmanja brzina posle 8. dana fermentacije sa dodatkom cimeta. Maksimalna brzina fermentacije šire Plovdine ostvarena je posle 5. dana fermentacije a najmanja brzina posle 9. dana fermentacije u uzorku šire Plovdine sa dodatkom cimeta.
- Sadržaj alkohola u vinu Prokupac (temperatura fermentacije 17 °C) menja se sa dodatkom lekovitog bilja. Najmanji sadržaj alkohola imalo je vino Prokupac (10,11 vol %), a najveći sadržaj Prokupac sa dodatkom sladića (10,44 vol. %). Isti trend povećanja sadržaja alkohola imala su vina Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja (temperatura fermentacije šire na 22 C°). Vino Prokupac je imalo najmanji sadržaj alkohola (10,61 vol. %) a vino Prokupac sa dodatkom sladića imalo je najveći sadržaj alkohola (10,78 vol. %). Fermentacijom kljuka na 25 °C dobijeno je vino Prokupac (kontrola) sa sadržajem alkohola od 12,16 vol. %, a vino Prokupac sa dodatkom sladića 12,87 vol. %.
- Sadržaj ukupnih kiselina (izraženih kao vinska kiselina) kretao se od 6,05 g/l za vino Prokupac do 6,60 g/l za vino Prokupac sa dodatkom sladića na temperaturi fermentacije šire od 17 °C. Sadržaj ukupnih kiselina imao je nešto veće vrednosti za temperaturu alkoholne fermentacije šire od 22 °C, za vino Prokupac je imalo vrednosti od 6,0 g/l do 7,30 g/l za vino Prokupac sa dodatkom sladića. Sadržaj ukupnih kiselina u vinu Prokupac dobijenog alkoholnom fermentacijom kljuka na 25 °C iznosio je 5,7 g/l a 4,8 g/l za vino Prokupac sa dodatkom pelina.
- Na temperaturi od 17 °C vrednosti sadržaja isparljivih kiselina (kao sirćetna kiselina u g/l), kreću se od 0,32 g/l za vino Prokupac (kontrola) do 0,35 g/l za vino

Prokupac sa dodatkom sladića. Sa povećanjem temperature na 22 °C došlo je do povećanja isparljivih kiselina od 0,38 g/l za vino Prokupac (kontrola) do 0,48 g/l za vino Prokupac sa dodatkom cimeta. Isparljive kiseline u vinu Prokupac na 25°C imale su vrednosti od 0,45 g/l (kao sirćetna kiselina) do 0,41 g/l za vino Prokupac sa dodatkom anisa.

- Ukupni ekstrakt se povećavao sa dodatkom lekovitog bilja. Najmanju vrednost na (na 17°C) imalo je vino Prokupac 16,10 g/l a najveću (8,60 g/l) vino Prokupac sa dodatkom cimeta. Isti trend sadržaja ukupnog ekstrakta javlja se sa povećanjem temperature alkoholne fermentacije. Najmanji ekstrakt (16,09 g/l) imalo je vino Prokupac a najveći (19,60 g/l) vino Prokupac sa dodatkom sladića. Ukupni ekstrakt za kljuk Prokupca kretao se od 22,6 g/l do 25,3 g/l za Prokupac sa dodatkom cimeta.
- Sadržaj šećera se na temperaturi od 17 °C kretao od 0,62 g/l za kontrolu do 1,10 g/l za Prokupac sa dodatkom sladića. Na temperaturi od 22 °C vino Prokupac je sadržavalo 0,9 g/l šećera, a Prokupac sa dodatkom cimeta 4,1 g/l. Najmanje redukujućih šećera imalo je vino Prokupac sa dodatkom anisa dobijeno fermentacijom kljuka a najviše šećera imalo je vino Prokupac sa dodatkom sladića.
- Ekstrakt bez šećera na temperaturi od 17 °C kretao se od 16,10 g/l za Prokupac do 18,40 g/l za vino Prokupac sa dodatkom sladića. Na temperaturi od 22 °C ekstrakt bez šećera imao je vrednost od 16,90 g/l za vino Prokupac do 19,30 g/l za vino Prokupac sa dodatkom sladića. Vino Prokupac dobijeno fermentacijom kljuka na 25 °C imalo je 22,2 g/l ekstrakta bez šećera, a najveći ekstrakt bez šećera imalo je vino sa dodatkom cimeta (24,7 g/l).
- Sadržaj pepela se povećavao sa dodatkom lekovitog bilja od 2,03 g/l za vino Prokupac do 3,20 g/l za vino Prokupac sa dodatkom cimeta. Na temperaturi od 22 °C vrednosti su se kretale od 2,08 g/l za kontrolu do 3,27 g/l za vino Prokupac sa dodatkom cimeta. Od vina dobijenih fermentacijom kljuka na 25 °C najmanju količinu pepela imalo je vino Prokupac (2,54 g/l) a najveću količinu vino Prokupac sa dodatkom cimeta (3,72 g/l).
- Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i ukupnih flavonoida na temperaturama od 17 °C, 22 °C se povećavao sa dodatkom lekovitog bilja i sa povećanjem temperature.

Najmanji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida imalo je vino Prokupac na temperaturi od 17 °C (kontrola), [293,9 (mg GAE/l) , 105,6 (mg CTE/ l)] respektivno, dok najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida imalo je vino Prokupac sa dodatkom cimeta [530,0 (mg GAE/l), 205,0 (mg CTE/ l)] respektivno. Sadržaj antocijana se smanjivao sa dodatkom lekovitog bilja. Najveći sadržaj antocijana imalo je vino Prokupac (52,8 mg/l) a najmanji vino Prokupac sa dodatkom cimeta (50,9 mg/l).

- Vino Prokupac dobijeno fermentacijom kljuka na 25 °C sa dodatkom lekovitog bilja imalo je veće vrednosti ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i antocijana u odnosu na vina dobijena fermentacijom na 17 °C i 22 °C. Za ukupna fenolna jedinjenja vrednosti su se kretale od 970,1 (mgGAE/l) za vino Prokupac do 1308,5 (mgGAE/l) za vino Prokupac sa dodatkom cimeta. Flavonoidi se kretali u granicama od 290,5 (mgCTE/l) za Prokupac do 513,3 (mgCTE/l). Flavan-3-oli su imali isti trend rasta i vrednosti se kretale od 43,3 (mg/l) za vino Prokupac do 200,7 (mg/l) za vino Prokupac sa dodatkom cimeta. Najveći sadržaj antocijana imalo je vino Prokupac (119,4 mg/l) a najmanji vino Prokupac sa dodatkom anisa (76,0 mg/l). Antocijani su se smanjivali sa dodatkom lekovitog bilja kao posledica polimerizacije, interakcije sa drugim fenolnim jedinjenjima, apsorpcije na zidove ćelije kvasca idr.
- Porast sadržaja alkohola sa povećanjem temperature zapažen je i u vinu Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja. Sadržaj alkohola u vinu Plovdina dobijenog alkoholnom fermentacijom šire na temperaturi od 17 °C iznosio je 9,21 vol. % a najveći sadržaj alkohola od 9,37 vol. % imalo je vino Plovdina sa dodatkom sladića. Na temperaturi od 22 °C sadržaj alkohola se kretao od 9,62 vol. % za vino Plovdina do 9,87 vol. % za vino Plovdina sa dodatkom sladića. Sadržaj alkohola u vinu Plovdina dobijenog alkoholnom fermentacijom kljuka na 25 °C iznosio je 10,19 vol. %, dok je Plovdina sa dodatkom sladića imala najveći sadržaj alkohola od 11,21 vol. %.
- Sadržaj ukupnih kiselina (izraženih kao vinska kiselina) kretao se od 4,12 g/l za vino Plovdina do 5,85 g/l za vino Plovdina sa dodatkom sladića na temperaturi fermentacije šire od 17 °C. Sadržaj ukupnih kiselina imao je nešto veće vrednosti na temperaturi alkoholne fermentacije šire od 22 °C. Vino Plovdina (kontrola) je imalo najmanje ukupnih kiselina (5,21 g/l) a najviše kiselina (5,96 g/l) vino Plovdina sa dodatkom sladića. Vino Plovdina sa dodatkom cimeta dobijenog alkoholnom fermentac-

ijom kljuka na 25 °C imalo je najmanje ukupnih kiselina (4,2 g/l) a najviše (5,8 g/l) vino Plovdina sa dodatkom sladića.

- Na temperaturi od 17 °C vrednosti isparljivih kiselina (izraženih kao sirćetna kiselina u g/l), kreću se od 0,39 g/l za vino Plovdina sa dodatkom anisa do 0,96 g/l za vino Plovdina sa dodatkom pelina. Sa povećanjem temperature na 22°C došlo je do povećanja isparljivih kiselina: od 0,35 g/l za vino Plovdina (kontrola) do 0,57 g/l za vino Plovdina sa dodatkom sladića. Isparljive kiseline na 25°C u vinu Plovdina (dobijenog fermentacijom kljuka) imale su vrednosti od 0,27 g/l do 0,72 g/l za vino Plovdina sa dodatkom sladića.
- Ukupni ekstrakt se povećavao sa dodatkom lekovitog bilja. Najmanji ukupni ekstrakt imalo je vino Plovdina 15,67 g/l a najveći od 17,65 g/l vino Plovdina sa dodatkom cimeta (dobijenih fermentacijom na 17 °C). Isti trend rasta ukupnog ekstrakta imala su vina dobijena alkoholnom fermentacijom na 22°C. Sadržaj ekstrakta se kretao od 15,93 g/l za vino Plovdina (kontrola) do 17,90 g/l za vino Plovdina sa dodatkom cimeta. Ukupni ekstrakt za vino Plovdina dobijeno fermentacijom kljuka kretao se od 18,8 g/l do 21,9 g/l za vino Plovdina sa dodatkom cimeta.
- Sadržaj šećera se na temperaturi od 17 °C kretao od 2,27 g/l za kontrolu do 3,54 g/l za vino Plovdina sa dodatkom cimeta. Na temperaturi od 22 °C vino Plovdina je sadržao 1,13 g/l šećera, a vino Plovdina sa dodatkom cimeta 3,25 g/l. Vino dobijeno fermentacijom kljuka Plovdine (kontrola) na 25 °C imalo je najmanje šećera (1,1g/l) šećera dok je najviše šećera (1,4 g/l) imalo vino Plovdina sa dodatkom cimeta.
- Ekstrakt bez šećera na temperaturi od 17 °C kretao se od 14,40 g/l za vino Plovdina do 15,11 g/l za vino Plovdina sa dodatkom cimeta. Na temperaturi od 22 °C ekstrakt bez šećera imao je vrednost od 15,10 g/l za vino Plovdina sa dodatkom anisa do 15,85 g/l za vino Plovdina sa dodatkom sladića. Vrednosti ekstrakta bez šećera za vina dobijenih fermentacijom kljuka Plovdine na 25 °C bile su nešto veće i kretale su se od 15,7 g/l za kontrolu do 18,5 g/l za vino Plovdina sa dodatkom cimeta.
- Sadržaj pepela se povećavao sa dodatkom lekovitog bilja od 1,78 g/l za vino Plovdina dobijenog fermentacijom na 17 °C do 2,78 g/l za vino Plovdina sa dodatkom cimeta. Na temperaturi od 22°C vrednosti su se kretale od 1,81 g/l za kontrolu do 2,95

g/l za vino Plovdina sa dodatkom cimeta. Veće vrednosti pepela imala su i vina dobijena fermentacijom kljuka na 25 °C. Najmanje vrednosti pepela imala je kontrola (2,01 g/l) a najveće vrednosti vino Plovdina sa dodatkom cimeta (3,19 g/l).

- Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i ukupnih flavonoida povećavao se sa povećanjem temperature u vinu Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja. Najmanji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida imalo je vino Plovdina na temperaturi od 17 °C (kontrola), [115,8 (mg GAE/l) i 46,3 (mg CTE/ l)], respektivno, dok najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida imalo je vino Plovdina sa dodatkom cimeta [289,4(mg GAE/l) i 110,3 (mg CTE/ l)] respektivno. Na temperaturi od 22 °C najmanji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida imalo je vino Plovdina [152,6 (mg GAE/l) i 61,0 (mg CTE/ l)], respektivno, dok najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida imalo je vino Plovdina sa dodatkom cimeta [451,9 (mg GAE/l) i 180,7 (mg CTE/ l)] respektivno.
- Najmanji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja imalo je vino Plovdina dobijeno alkoholnom fermentacijom kljuka na 17 °C (kontrola) a najveći sadržaj vino Plovdina sa dodatkom cimeta (382,3 mg GAE/l). Najmanji sadržaj flavonoida imalo je vino Plovdina (160,2 mg CTE /l) a najveći sadržaj imalo je vino Plovdina sa dodatkom cimeta (274,4 mg CTE /l). Slični trend rasta imo je i sadržaj flavan-3-ola. Najmanji sadržaj imalo je vino Plovdina (3,33 mg/l) a najveći vino Plovdina sa dodatkom cimeta (31,30 mg/l). Sadržaj ukupnih antocijana se smanjivao sa dodatkom lekovitog bilja. Najveću količinu antocijana imala je kontrola, (36,1mg/l) a najmanji sadržaj imalo je vino Plovdina sa dodatkom pelina (17,3 mg/l).
- Mikrobiološkom analizom disk-difuzionom metodom najveću osetljivost pokazale su Gram(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis*.Vino Prokupac sa dodatkom anisa je pokazao bakteriostatsko dejstvo na Gram(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis* (46,67 % aktivnosti hloramfenikola, odnosno 40,0 % aktivnosti streptomicina). Vino Prokupc sa dodatkom sladića je takođe pokazao bakteriostatsko dejstvo na Gram(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis* (46,67 % aktivnosti hloramfenikola, odnosno 40,0 % aktivnosti streptomicina). Vino Prokupac sa dodatkom cimeta pokazalo je baktericidno dejstvo na G(+) bakterije iz roda *Bacillus subtilis* (zona inhibicije 16 mm; 53,3 % aktivnosti hloramfenikola, odnosno 45,71 % aktivnosti streptomicina). Vino dobijeno

od Prokupca sa dodatkom pelina nije pokazalo antimikrobnu aktivnost prema Gram(+) bakterijama iz roda *Bacillus subtilis*. Vino dobijeno od Prokupca sa dodatkom aromatičnog bilja (anisa, cimeta, pelina i sladića) nisu pokazala antimikrobnu aktivnost, odnosno nije detektovana zona inhibicije prema G(-) bakterijama *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* i kvasac *Candida albicans*.

- Najjače antimikrobno dejstvo pokazali su uzorci vina prema G(+) bakteriji *Enterococcus faecalis*. Minimalna inhibitorna koncentracija kretala se od 15,63 µl/ml za vino Prokupac sa dodatkom pelina, a 31,25 µL/mL za sve ostale uzorke vina Prokupac (sa dodatkom anisa, cimeta i sladića). Minimalna baktericidna koncentracija iznosila je 62,5 µl/ml za sve uzorke vina. Vino Prokupac sa dodatkom pelina imao je najjače antimikrobno dejstvo prema *Enterococcus faecalis*.
- Najveću antioksidativnu aktivnost (iskazana kao EC₅₀) pokazalo je vino Prokupac sa dodatkom cimeta (EC₅₀=0,005±0,0005 mg/ml), nešto manju antioksidativnu aktivnost vino Prokupac sa dodatkom sladića (EC₅₀=0,006±0,0002mg/ml), vino Prokupac sa dodatkom pelina (EC₅₀=0,009±0,0001 mg/ml), vino Prokupac sa dodatkom anisa (EC₅₀=0,018±0,0016 mg/ml), a najnižu antioksidativnu aktivnost pokazalo je vino Prokupac bez dodatka lekovitog bilja (EC₅₀=0,022±0,0016 mg/ml).
- Najveću antioksidativnu aktivnost pokazalo je vino Plovdina sa dodatkom cimeta (EC₅₀=0,023±0,0011mg/ml), nešto manju vino Plovdina sa dodatkom sladića (EC₅₀=0,024±0,0017mg/ml), zatim vino Plovdina sa dodatkom pelina (EC₅₀=0,040±0,0013 mg/ml), vino Plovdina sa dodatkom anisa (EC₅₀=0,058±0,0036 mg/ml) a najmanju antioksidativnu aktivnost pokazalo je vino Plovdina bez dodatka lekovitog bilja (EC₅₀=0,067±0,0006 mg/ml).
- Koeficijent korelacija između ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti vina sa dodatkom lekovitog bilja iznosi R² = 0,895 (za vina od Prokupca) i R² = 0,862 (za vina od Plovdine).
- Dodatak lekovitog bilja doveo je do promene sastava isparljivih komponenti vina a samim tim i do promene senzornih karakteristika vina.

Najmanju ukupnu ocenu dobilo je vino Prokupac sa dodatkom sladića, (53,30) bodova a najveću ocenu je dobilo vino Prokupac sa dodatkom cimeta, (78,70) bodova.

- Vino Plovdina sa dodatkom sladića je dobilo najnižu ukupnu ocenu (51,20) boda zbog karakteristične žute boje vina, a najveću ocenu je dobilo vino Plovdina sa dodatkom cimeta, (75,20) bodova.
- U vinu Prokupac sa dodatkom lekovitog bilja identifikovane hidroksibenzoeve kiseline (galna kiselina, siriginska kiselina, protokatehinska kiselina), hidroksicimetne kiseline (ferulna kiselina, kumarna kiselina, sinapinska kiselina i kafena kiselina), flavan-3-oli (katehin i epikatehin), rutin, kvercetin i hiperozid. U vinu Prokupac identifikovane su i komponente naringin i naringenin, kao i malvidin-glukozid. Hidroksibenzoeve kiseline su dominantnije u odnosu na hidroksicimetne kiseline, a najdominantnija je galna kiselina kao hidroksibenzoeva kiselina.
- U vinu Plovdina sa dodatkom lekovitog bilja identifikovane su hidroksibenzoeve kiseline (galna kiselina, siriginska kiselina, protokatehinska kiselina), hidroksicimetne kiseline (ferulna kiselina, kumarna kiselina, sinapinska kiselina i kafena kiselina), flavan-3-ol katehin, zatim su identifikovani rutin, miricetin i hiperozid. U vinu Plovdina identifikovane su i komponente naringin i naringenin, kao i malvidin-glukozid. Hidroksibenzoeve kiseline su dominantnije u odnosu na hidroksicimetne kiseline, a najdominantnija je galna kiselina kao hidroksibenzoeva kiselina.
- Vina sa dodatkom lekovitog bilja imala su bolje senzorne karakteristike, povećan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, povećanu antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost.
- Dodatak lekovitog bilja doveo je do promene u sastavi isparljivih jedinjenja u vinu (arome vina).
U vinu Prokupac identifikovano je ukupno 26 jedinjenja, u vinu Prokupac sa dodatkom anisa identifikovano je 33 jedinjenja, u vinu Prokupac sa dodatkom cimeta 30 jedinjenja, u vinu Prokupac sa dodatkom pelina identifikovano je ukupno 41 jedinjenje i u vinu Prokupac sa dodatkom sladića identifikovano je 29 jedinjenja.

Najmanji ukupni relativni udeo isparljivih kiselina imalo je vino Prokupac sa dodatkom anisa (0,8%) a najveći relativni udeo vino Prokupac sa dodatkom sladića (6,6%). Relativni udeo ukupnih acetata se menjao sa dodatkom lekovitog bilja. Najmanji sadržaj ukupnih acetata imalo je vino Prokupac sa dodatkom anisa (0,7 %) dok je najveći sadržaj imalo vino Prokupac – kontrola (6,1 %).

Najveći relativni udeo alkohola imalo je vino Prokupac sa dodatkom sladića (75,4 %) a najmanji relativni udeo vino Prokupac sa dodatkom anisa (29,4 %).

Od aldehida identifikovan je samo benzaldehid u vinima Prokupac sa dodatkom anisa, sa dodatkom cimeta, sa dodatkom pelina. U tragovima je identifikovan benzaldehid u vinu Prokupac sa dodatkom sladića, dok nije identifikovan u vinu Prokupac.

Najveći procentni udeo etil estara imalo je vino Prokupac (17,3 %) a najmanji procentni udeo vino Prokupac sa dodatkom pelina (3,3 %).

U vinu Prokupac nisu identifikovani terpeni, dok je najveći procentni udeo terpena imalo vino Prokupac sa dodatkom anisa (61,3 %).

6. LITERATURA

Acar J.F., Goldstein F.W. (1996), Disk susceptibility test. In: Lorian V. (Ed.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1-51.

Acworth I. N. (2003), *The Handbook of Redox Biochemistry*, Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA.

Adams J.B. (1973), Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100. deg., *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24: 747-762.

Adams, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Ed. Allured Publishing Corporation, Illinois, 2007.

Akhtar A., Deshmukh A.A., Bhonsle A.V. (2008a), In vitro Antibacterial activity of *pimpinella anisum* fruit extracts againsts some pathogenic bacteria. *Veterinary World*, 1 (9): 272-274.

Akhtar Y., Yeoung Y.R., Isman M.B. (2008b), Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta*. *Phytochemistry Reviews*, 7:77-88.

Alonso Y. (2004), The biopsychosocial model in medical research: the evolution of the health concept over the last two decades. *Patient Education and Counseling*, 53(2), 239-244.

Arbeiter L. (1999), Vpliv tehnoloških lasnosti sevov *Saccharomyces cerevisiae* na kakovost vina. Diplomsko delo. Ljubljana, biotehnoška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 9-13.

Amarine M.A., Joslyn M.A. (1970), *Table Wines The Technology of Their Produkcion*. 2nd. Ed. Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles, pp: 997.

Amerine M.A., Roessler E.B. (1983), *Wines: Their sensory evaluation* (Freeman W.H., New York). Bartik, T.J., 1987, The estimation of demand parameters in hedonic price models, *Journal of Political Economy*, 95: 81-88.

Ates D.A., Erdogrul O.T. (2003), Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, 27: 157-162.

Avicenna A. (1988), Drugs and decoctions used in epilepsy. In: Sharafkandi, A. (Translator), Ghanoon Dar Teb. Soroosh Press, Tehran, pp: 456-459.

Auw J.M., Blanco V., Keefe S.F., Sims C.A. (1996), Effect of Processing on the Phenolics and Colour of Cabernet sauvignon, Chamburcin and Noble Wines and Juices. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(3): 279-286

Bardi L., Cocito C. and Marzona, M. (1999), *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *International journal of food microbiology*, 47(1), 133-140.

- Bartowsky, E. (2003), Lysozyme and winemaking. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 473a: 101-104.
- Barnett J.A., Entian, K.D. (2005), A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast*, 22, 835–894.
- Baskabady M.H., Ramazani-Assari M. (2001), Relaxant effect of *Pimpinella anisum* on isolated guinea pig tracheal chains and its possible mechanism (s), *Journal of Ethnopharmacology*, 74(1): 83-88.
- Beeridge M.V., Tan A.S., McCoy K.D., Wang R. (1996), The biochemical and cellular basis of cell proliferation assay that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4: 15–20.
- Bevan E.,A. & Makower, M. (1963), The physiological basis of the killer-character in yeast. Proceedings of the 11th International Congress of Genetics 1, 203 (abstract).
- Boulton R.B., Singelton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. (1996), Principles and Practices of Winemaking, 224-228, Chapman and Hall, New York.
- Bourzeix M., Weyland D., Heredia N. (1986), Etude des catechins et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres derives de la vigne, *Bull OIV*, 59, 1171-1254.
- Brand-Villiams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1994), Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Departement Science de l' Aliment, ENSIA 1 , avenue des Olympiades, 91305 massy (France). 1994; 28(6).
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995), Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Broennum-Hansen K., Flink J.M. (1985), Anthocyanin colorants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). 3. Storage stability of the freeze dried product. *Journal of Food Technology* 20: 725-733.
- Brouillard R. (1982), Chemical structure of anthocyanins. In *Anthocyanins as Food Colors*. P.Markakis (ed.), Academic Press Inc., New York, 1-38.
- Brouillard R. (1982), *Anthocyanins as Food Colors*. (P. Markakis, Ed.) (pp. 1–38). New York London: Academic Press.
- Burkhardt G., Reichling J., Martin R., Becker H. (1986), Terpene hydrocarbons in *Pimpinella anisum* L. *Pharmaceutisch Weekblad*. 8(3):190–193.
- Burns J.W., Katkin E.S. (1993), Psychological, situational, and gender predictors of cardiovascular reactivity to stress: a multivariate approach. *Journal of Behavioral Medicine*, 16 (5): 445–65.
- Bureau S. M., Baumes R. L., Razungles A. J. (2000), Effects of vine or bunch shading on the glycosylated flavour precursors in grapes of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah. *J. Agric. Food. Chem.*, 48:1290-1297.

- Cabrita L., Fossen T., Andersen O.M. (2000), Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry* 68, 101-107.
- Cabib E., Roberts R., Bowers B. (1982), Synthesis of the Yeast Cell Wall and its Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 51, 763–793.
- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., Akpulat H.A. (2003), Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol exstarcts of *Achillea millefolium* subsp. *Mullefolium* Afan. (Asteraceae), *Journal of Ethnopharmacology* , 87, 215-220.
- Caridi A., Cufari A., Lavino R., Palumbo R., Tedesco I. (2004), Influence of Yeast on Polyphenol Composition of Wine, *Food Technology and Biotechnology*, 42 (1), 37-40.
- Castro-Vasquez L., Perez Coello M. S., Cabezudo M. D. (2002), Effects of enzyme treatments and skin extraction on varietal volatile in Spanish wines made from Chardonay, Muscat, Airen and Macabeo grapes. *Anal. Chim. Acta.* 1:1-6.
- Cheynier V., Riguard J., Souquet J.M. (1989), Effect of pomace contact and hyperoxidation of the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 40(1), 36-42.
- Chalier P., Angot B., Delteil D., Doco T., Gunata Z. (2007), Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolation from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem.*, 100:22-30.
- Cheynier V., Prieur C. (1997), The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins, In: *Proceedings of ACS Symposium Series 661, Wine: Nutritionaland Therapeutic Benefits*, T. R. Watkins (Ed.), 81-93, 1997.
- Cheynier V., Moutounet M., Sarni Manchado P. (2003), Los compuestos fenolicos, In: *Enologia Fundamentos Cientificos y Technologicos*, 2nd ed.; Flanzy, C., Ed AMV Ediciones and Ediciones Mundi-Prensa; Madrid, Spain, pp 120-121.
- Christopher G., Sutherland D., Smith A. (2005), Effects of caffeine in non-withdrawn volunteers. *Human Psychopharmacology*, 20(1): 47-53.
- Ciriacy M. (1996), Alcohol dehydrogenases. In F.K. Zimmerman, K.D. Entian (Eds.), *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications* (pp. 213–224). Boca Raton: CRC Press.
- Cook N.C., Samman S. (1996), Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7, 66–76.
- Crabtree H.D. (1929), Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal.*, 23 (3): 536–545.

Craciunescu O., Gaspar, A., Toma, L., Utoiu, E., Moldovan, L. (2012), Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. Ethanolic extracts. *Chemistry Central Journal*. 6:97.

Czochanska Z, Foo L.Y., Porter L.J. (1979), Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry*, 18, 1819-1822.

Dao L.T, Takeoka G.R., Edwards R.H., Berrios J.D.J. (1998), Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3564-3569.

Daničić M., (1985), Praktikum iz tehnologije vina, Poljoprivredni fakultet, Beograd.

Darriet P., Bouchilloux P., Poupot C., Bugatet Y., Clerjeau M., Sauris P., Medina B., Dubourdieu D. (2001), Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma of Sauvignon blanc, Cabernet sauvignon and Merlot wines. *Vitis*, 40:93-99.

Dorman H.J.D., Bachmayer O., Kosar M., Hiltunen R. (2004), Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Species Grown in Turkey, *J. Agric. Food Chem*, 52, 762-770.

Downey M. O., Harvey J. S., Robinson S. P. (2003), Synthesis of flavonoids and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.), *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9: 110-121.

Duh P.D., Tu Y.Y., Yen G.C. (1999), Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT – Food Science and Technology*, 32, 269-277.

Ebeler. S. E., Thorngate J. H. (2009), Wine chemistry and flavor: Looking into the crystal glass. *J. Agric. Food. Chem.* 57:8098-8108.

Edeas M., Lindenbaum A. (2001), Protective effects of various flavonoids compounds on HIV infection. XXV Congress Mondial de la Vigne et du Vin. Wine and Health, 57 – 61.

Edwards, C. G., Beelman, R. B., Bartley, C. E., and McConnell, A. L. (1990), Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(1), 48-56.

Eglinton J., Henschke P., Hřj P., Pretorius, I. (2003), Winemaking properties and potential of *Saccharomyces bayanus* wine yeast—harnessing the untapped potential of yeast biodiversity. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*. 18(6) 16-19.

Eglinton J., Griesser M., Henschke P., Kwiatkowski M., Parker M., Herderich M. (2004), Yeast-mediated formation of pigmented polymers in red wine. Waterhouse A.L., Kennedy J.A., (eds.) Red wine color: exploring the mysteries. Washington, DC: American Chemical Society. 7–21. (ACS Symposium series; 886).

Eriksson O.E., Winka K. (1997), Supraordinal taxa of Ascomycota, Myconet 1 1-16.

Fang Y.Z., Yang S., Wu G. (2002), Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.

Fleet G.H. (1993), The microorganisms of winemaking—isolation, enumeration and identification. In: Fleet G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 1–27.

Flanzy M. (1998), *Enologie, Fondements scientifiques et technologies*, Lavoisier, Tech et Doc, Paris.

Flanzy C., (1998), “Oenologie: Fondements Scientifiques et Technologiques,” Tec & doc-Lavoisier.

Francis J. (1989), Food colorants: anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28, 273-314.

Feldmann H. (2005), *Yeast Molecular Biology*, A short compendium on basic features and novel aspects, Adolf-Butenandt Institute, University of Munich.

Ferreira V., López R. and Cacho, J. F. (2000), Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(11), 1659-1667.

Francis I. L. and Newton J. L. (2005), Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 114-126.

Frankel E. N., Waterhouse A.L., Kinsella J. E. (1993), Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 341, 1103-1104.

Frankel E.N., Heinonen I.M., Meyer A.S. (1998), Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46; 4107–4112.

Flamini R. (2003), Mass spectrometry in grape and wine chemistry; Part I: Polyphenols, *Mass Spectrometry Reviews*. 22(4), 218-50.

Fyfe L., Armstrong F., Stewart J. (1998), Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* by combinations of plant oils and derivatives of benzoic acid: the development of synergistic antimicrobial combinations. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 9, 195-199.

Gachons C. P., Leuwen C., Tominaga T., Soyer J. P., Gaudillere J. P., Dubourdieu D. (2005), Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc in field conditions. *J. Sci. Food. Agric.*, 85:73-85.

Garcia-Palazon A., Suthanthangjai W., Kajda P., Zabetakis I., (2004), The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria ananassa*), *Food Chemistry*. 88: 7-10.

- García-Alonso M., Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C. (2003), Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*. 84, 1; 13-18
- Gancedo J.M. (1988), La regulation du metabolisme des sucres chez la levure. In P. Bidan, J.R. Bonneville (Eds.), Application `a l'oenologie des progr`es r`ecents en microbiologie et en fermentation. (133–143). Paris: OIV.
- Gancedo J.M. (1992), Carbon catabolite repression in yeast. *European Journal of Biochemistry*. 206; 297–313.
- Gerschman R., Gilbert D.L., Nye S.W., Dwyer P., Fenn W.O. (1954), Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common. *Science*. 1954; 119(3097): 623-6.
- German J.B., Frankel E.N., Waterhouse A.L., Hansen R.J., Walzem R.L. (1997), Winephenolics and targets of chronic disease. In: Watkins T.R., ed. Wine: Nutritional and therapeutic benefits, Washington DS, 196-214.
- Gerschman R., Gilbert D., Nye S.W., Dwyer P., Fenn W.O. (2001), Oxygen poisoning and Xirradiation: a mechanism in common, *Nutrition*, 17, 162.
- Gay-Lussac J. L. (1815), Sur l'analyse de l'alcohol et de l'e'ther sulfurique, et sur les produits de la fermentation. *Annali di Chimica*. 95, 311–318.
- Giusti M.M., Rodriguez-Saona L.E., Wrolstad R.E. (1999), Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 4631-4637
- Glories Y., La couleur des vins rouges. 2. Partie: (1984), Mesure, origine et interpretation. *Conn. Vigne Vin*, 18(4), 253-273.
- Glories Y., La couleur des vins rouges. 1. Partie. (1984), Les equilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance de La Vigne et Du Vin*. 1984;18(3): 195 -217.
- Gould K., Davies K., Winefield C. (2009), Anthocyanins: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142: 231-255.
- Godjevac D., Tešević V. Vajs V. Milosavljević S., Stanković M. (2009), Antioxidant properties of raspberry seed extracts on micronucleus distribution in peripheral blood lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 47 (11): 2853–2859.
- Grujić-Injac B., Lajšić S. (1998), Hemija prirodnih proizvoda, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Gülçin İ, Oktay M, Kireççi E, Küfrevioğlu I. (2003), Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*. 83, 371-382.
- Guttridge M.C, Halliwell, B. (1999), Free Radicals in Biology and Medicine 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, UK.

Gürbüz O, Göcmen D, Dağdelen F, Gürsoy M, Aydın S, Sahin D. (2007), Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*.100, 518-25.

Gupta V.K., Fatima A., Faridi U., Negi A.S., Shanker K, Kumar J.K., Rahuja N., Luqman S., Sisodia B.S., Saikia D., Darokar M.P., Khanuja S.P. (2007), Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. *Journal of Ethnopharmacology*. 116 (2): 377-80.

Guth H. (1997), Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3022-3026.

Halliwell B., Gutteridge M.C. (1989), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, p, 213.

Halliwell B.(1990), How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Research Communications*. 9(1): 1-32.

Halliwell B. Zhao K., Whiteman M. (1999), Nitric oxide and peroxynitrite: the ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radical Research*. 31, 651–669.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2000), *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition. Oxford Science Publications. New York, Oxford University Press.

Halliwell B. (2001), *Free Radicals and other reactive species in Disease*. Encyclopedia of life sciences. National University of Singapore, Singapore.

Halliwell B., Whiteman M. (2004), Measuring reactive species and oxidativetdamage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142, 231-255.

Hammer K. A., Carson C. F., Riley T.V. (1999), Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. - *Journal of applied microbiology* 86(6), 985-990.

Harborne J. B. (1989), *Flavonoids. V, Natural products of woody plants I. Chemicals extraneous to the ligno-celulosic cell wall*. Rowe J.W. (Ur.), Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 533-570.

Harborne J.B., Williams C.A. (1992), Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry*. 2000; 55(6): 481-504.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002), Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition Biochemistry*.2002; 13: 572-584.

Heinisch J., Rodicio R. (1997), Fructose -1,6-bisphosphate aldolase, triosephosphate isomerase glyceraldehyde dehydrogenases, and phosphoglycerate mutase. In: Zimmermann FK., Entian KD (eds). *Yeast sugar metabolism*. Technomics, Lancaster, pp 119-140.

Hohmann S. (1996), Pyruvate decarboxylases. In F.K. Zimmerman K.D., Entian (Eds.), *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications* (pp. 187–212). Boca Raton: CRC Press.

Horecker B.L. (2002), The Pentose Phosphate Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 277; 47965–47971.

Ibrahim Y.K.E., Ogunmodede MS. (1991), Growth and survival of *Pseudomonas aeruginosa* in some aromatic waters. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 66:286-8.

Ivanova D., Gerova D., Chervenkov T., Yankova T. (2005), Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*. 4(96): 145-150.

Iwashina T. (2000), The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*. 113: 287–299.

Jackman R.L., Yada R.Y., Tung M.A., Speers R.A. (1987), Anthocyanins as food colorants - review. *Journal of Food Biochemistry*. 11: 201-247.

Jackson R.S. (2000), *Wine science, principles and applications*. Academic press. New York.

Janahmadi M., Farajnia S., Vatanparast J., Abbasipour H., Kamalinejad M. (2008), The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* L. (Umbelliferae) induces neuronal hyperexcitability in snail partly through attenuation of after-hyperpolarization. *Journal of Ethnopharmacology*. 120(3): 360-365.

Jayaprakasha G.,K., Rao L.J., Sakariah K.K. (1997), Chemical composition of the volatile oil from the fruits of *Cinnamomum zeylanicum* blume. *Flavour and Fragrance Journal*. 12 (5): 331-333.

Jović S., Zirojević T., Petrović A. (2002), Fenolna jedinjenja vina i mogućnost prevencije bolesti prouzrokovane oksidativnim stresom, VI Savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta, 55 – 60.

Jović S. (2003), Organske kiseline u vinu. *Vino*, 6, 10 -13.

Judzentiene A., Buzelyte J. (2006), Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from North Lithuania. *Chemija*. 17, 12-15.

Juteau F., Jerkovic I., Masotti V., Milos M., Mastelic J., Besiere J.M. Viano J. (2003), Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Medica*. 69, 158-161.

Kader F., Rovel B., Girardin M., Metche M. (1997), Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Partial purification and characterization of blueberry polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 73: 513-516.

Kalođera Z., (2009), Fitofarmacija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, zavod za farmakognoziju, Zagreb.

- Kalemba D., Kunicka, A. (2003), Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10, 813-829.
- Kalemba J.G., Kurowska A., Majda T., Mielniezuk Z. (1993), Analysis of essential oils in aspects of their influence to insects. *Chemia. Zeszyty Naukowe Politechniki Lodzkiej*. 589: 5-14.
- Karimzadeh F., Hosseini M., Mangend D., Alavi H., Hassanzadeh G.R., Bayat M., Jafarian M., Kaze H., Gorij A. (2012), Anticonvulsant and neuroprotective effects of *Pimpinella anisum* in rat brain. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12, 76.
- Karting T., Moeckel, H., Mauny B. (1975), Uber das Vorkommen von cumarinen und Sterolen in Gewebekulturen aus Wurzeln von *Anethum graveolens* und *Pimpinella anisum*. *Planta Medica*. 27, 1-4.
- Kantz K., Singleton V.L. (1990), Isolation and determination of polymeric polyphenols using sephadex of grape tissue extracts. *American Journal of Enology and Viticulture*. 4: 223-228.
- Keršek E., (2004), Ljekovito bilje u vinu i rakiji, Grafički zavod Hrvatske d.o.o, Zagreb.
- Kelebek H., Canbas A., Selli S., Saucier C., Jourdes M., Glories Y. (2006), Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Bogazkere and Okuzgozu. *Journal of Food Engineering*. 77: 1012-1017.
- Kišgeci J. (2002), Ljekovito bilje, gajenje, sakupljanje, upotreba, Partenon, Beograd.
- Kyo M., Manabu G., Tokio F., Kei Y. (1988), Toxicity of allyl isothiocyanate and cinnamic aldehyde assessed using cultured human KB cells and yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 40, 339-342.
- Kim D., O. Chun Y. Kim, Moon H., Lee C. (2003), Quantification of phenolics and their antioxidant capacity in fresh plums, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. New York. 51, 6509-6515.
- Kim, K. (2001) Face Recognition using Principle Component Analysis. *IEEE Signal Processing Letters*, 9: 40-42.
- Krifi B., Chouteau F., Boudrant J., Metche M. (2000), Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *International Journal of Food Science and Technology*. 35, 275-283.
- Kurkcuoglu M. Sargin N., Baser K.H.C. (2003), Composition of volatiles obtained from spices by microdistillation. *Chemistry of Natural Compounds*. 39(4): 355-357.
- Kähkönen MP, Heinämäki J, Ollilainen V, Heinonen M. (2003), Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83, 1403-1411.

- Kirk P., (2015), *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen (1883), In: Index Fungorum Partnership (2015), Index Fungorum. Accessed through: World Register of Marine Specie at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=147593> on 2017-04-19
- Kovač V, Bourzeix M, Heredia N, Alonso E. (1991), *Vinogr. Vinarst.* 25: 10–15.
- Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T. (1999), A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science.* 3;286(5446):1960-2.
- Kopjar M. (2007), Utjecaj dodatka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda. *Doktorski rad.* Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku.
- Kosalec I., Pepeljnjak S., Kuštrak D.(2005), Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., *Apiaceae*). *Acta Pharmaceutica.* 55, 377–385.
- Kopjar M., Jakšić K., Piližota. (2011), Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of blackberry juice during storage. *Journal of Food Processing and Preservation* 3(1), 9-15.
- Košmerl T., Jakončič M., Kralj Cigić I., Strlič M., Prosen H. (2008), Aroma compound in „sur lies“ produced and aged Chardonay wines. 31th Congresso mondiale della vigna e del vino, 6a Assemblea Generale dell OIV, Verona.
- Lagunas R. (1993), Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews.* 1993; 16: 229–242.
- Lea P.J., Leegood R.C. (1999), *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Chichester.
- Lee D.W., Brammeier S., Smith A.P. (1987), The selective advantages of antocyanins in developing leaves of mango and cacao. *Biotropica.* 1987; 19: 40-49.
- Lagunas R., Dominguez C., Busturia A., S´aez, M.J. (1982), Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *Journal of Bacteriology.* 152: 19–25.
- Lagunas R., Gancedo C. (1983), Role of phosphate in the regulation of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry.* 137, 479–483.
- Lopez R., Aznar M., Cacho J., Ferreira V. (2002), Quantitative determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 966:166-177.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. (1990), *Fruit Phenolics*, CRC Press. Boca Raton. Florida.
- Maujean A., Gom´erieux T. and Garnier J.M. *Bull. OIV.* 1988. 61: 683.

Maier J. A., Barenghi L., Bradamante S., Pagani F. (1994), Modulators of oxidized LDL-induced hyperadhesiveness in human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 204: 673–677.

Markham K.R. (1982), Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London, UK.

Markakis P., Livingstone, G.E. Fillers, G.R. (1957), Quantitative aspects of strawberry-pigment degradation. *Journal of Food Science*. 22: 117-130

Markakis P. (1982), Anthocyanins as Food Colors, *Academic Press*, New York. 28(4): 209-244.

Marais J. and Pool H. J. (1980.), Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis-Berichte ueber Rebenforschung mit Dokumentation der Weinbauforschung (Germany, FR)*.

Matsufuji H., Otsuki T., Takeda T., Chino M., Takeda M. (2003), Identification of reaction-products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 3157-3161.

Mazza G., Brouillard R. (1987), Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*. 25, 207-225.

Mas A., Guillamon J.M., Torija M.J., Beltran G., Cerezo A.B., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla CM. (2014), Bioactive Compounds Derived from the Yeast Metabolism of Aromatic Amino Acids during Alcoholic Fermentation. *BioMed Research International*. 2014; 898045.

Maury C., Sarni-Manchado P., Lefebvre S., Cheynier V., Moutonet, M. (2001), Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 52, 140–145.

McDonald M.S., Hughes M., Burns J., Lean, M.E.J., Matthews, D., Crozier, A. (1998), Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 368-375.

McDougall GJ., Fyffe S., Dobson P., Stewart D. (2005), Anthocyanins from red wine-Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*. 2005; 66: 2540-8.

Meijer, M.M.C., Boonstra, J., Verkleij, A.J., Verrips, C.T. (1998), Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 24102–24107.

Milijić U., V. Puškaš. (2012), Lekovito bilje u Bermetu, srpskom aromatizovanom vinu, *Acta agriculturae serbica*. 17(34), 83 - 92.

Mitić M. (2011), Kinetika degradacije fenolnih jedinjenja hidrosil radikalima, Doktorska disertacija, PMF, Niš.

Minussi C.R., Rossi M., Bologna L., Cordi L., Rotilio D., Patore M.G., Duran N.(2003), Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food chemistry*, 82,

409-416.

Miklosy E. I., Kerény Z., (2004), Comparison of the volatile aroma components in noble rot- ted grape berries from two different locations of the Tokaj wine district in Hungary. *Anal. Chim. Acta*, 513:177-181.

Monagas M., Bartolome B., Gomez-Cordoves C. (2005), Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit Rev. Food Science and Nutrition*. 45(2): 85-118.

Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.E., Frei B., Wrolstad R.E. (2002), Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: Vaccinium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 519-525.

Meyen, 1838 in The Catalogue of Life Partnership.. *Saccharomyces cerevisiae*, Catalogue of Life. Checklist Dataset <https://doi.org/10.15468/rffz4x> accessed via GBIF.org on 2017; 12-27.

Merida J., Moyano L., Millan C., Medina M.(1991), Extraction of phenolic compounds in controlled macerations of Pedro Ximenez grapes, *Vitis* 30,117-127.

Morata A., Gomez-Cordovez, C., Suarez, J. (2003), Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls of *Saccharomyces* during the fermentation of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (14): 4084–4088.

Mohammed A.A., Abbas R.J. (2009), The effect of using fennel seeds (*Foeniculum vulgare* L.) on productive performance of broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*. 8, 642-644.

Muntean C., Gheorghita M.,(2008),The influence of some technological factors on the maceration process in the rose wine technology. *Bulletin UASVM, Horticulture*. 65 (1): 342-345.

Nobile Del M.A., D'Amato, D., Altieri, C., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. (2003), Modeling the yeast Growth-Cycle in a model wine system. *Journal of Food Science*. 68: 2080–2085.

Ozcan M.M., Chalchat J.C. (2006), Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage. *Annals of Microbiology*. 56, 353–358.

Orav A., Raal A., Arak E. (2008), Essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. from various European countries. *Natural Product Research*. 22, 227-232.

Ohara A., Forman J.H., Brigelius R.-Phyllis F., Balaman K. H., Mann E.G., Radil R., Robertsill J., Vina J., Davies J.A. K (2015), Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology, *Free Radical Biology and Medicine*. 78(1): 233-235.

OIV-Compendium of International methods of wine and must analysis edition 2012 volume 2, included. Resolutions adopted in Porto (Portugal). 2011; 24.

Okuyama T., Matsuda Masuda Y., Baba M., Masubuchi H., Adachi M., Okada Y., Hashimoto T., Zou L.B., Nishino H. (1995), Studies on cancer bio-chemioprevention on natural resources. X. Inhibitory effect of spices on TPA-enhanced 3H-choline incorporation in phospholipid of C3H10T1/2 cells and on TPA-induced ear edema. *Zhonghua Yaoxue Zashi*. 47(5), 421-430.

Park I.K., Choi K.S., Kim D.H. (2008), Fumigant activity of plant essential oils and compounds from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum* L.) and garlic (*Allium sativa*) oil against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Scioridae). *Pest Management Science*. 62(8):723-728.

Pasteur L.(1861), Influence de l'oxygène sur le développement de la levûre et la fermentation alcoolique. *Bulletin de la Soci'et'e de Paris (R'esum'e de S'eance du 28 juin 1861)*. 28(6): 79–80.

Peynaud E., Domercq S. (1959), A review of microbiological problems in winemaking in France. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1, 69–77

Parish M., Wollan D., Paul R. (2000), Micro-oxygenation – a review. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*. 438a, 47–50.

Pifferi P.G., Cultrera R. (1974), Enzymic degradation of anthocyanins. Role of sweet cherry polyphenol oxidase. *Journal of Food Science*. 39: 786-791.

Pietta P.G. (2000), Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63, 1035-1042.

Piletić M.V., Milić B.Lj., Đilas S.M.(1993), *Organska hemija II deo, Prometej*, Novi Sad.
Picon PD, Picon RV, Costa AF,

Picon P.D., Picon R.V., Costa A.F., Sander G.B., Amaral K.M., Aboy AL, Henriques AT. (2010), Randomized clinical trial of a phytotherapeutic compound containing *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Sambucus nigra*, and *Cassia augustifolia* for chronic constipation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10: 17.

Pourgholami M.H., Majzoub S., Javadi M., Kamalinejad M., Fanaee G.H.R. Sazzah M. (1999), The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 66(2): 211-215.

Price S.F., Breen P.J., Valladao M., Watson B.T. (1995), Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine, *American Journal of Enology and Viticulture*., 46, 187-194.

Pretorius I.S. (2000), Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast*.16, 675-729.

Prabuseenivasan S., Jayakumar M. and Ignacimuthu S. (2006), In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.

Parr S., Bolwell. (2000), Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 985-101.

- Polakis E.S., Bartley, W., Meek, G.A. (1965), Changes in the activities of respiratory enzymes during the aerobic growth of yeast on different carbon sources. *Biochemical Journal*, 97, 298–302.
- Prosen H., Janeš L., Strlič M., Rusjan D., Kočar D. (2007a), Analysis of free and bound aroma compounds in grape berries using headspace solid-phase microextraction with GC-MS and a preliminary study of solid-phase extraction with LC-MS. *Acta. Chim. Slov*, 54:25-32.
- Puchades R., Lemieux L., R.E. Simard, (1991), Chemiluminescent Assay for Glycerol in Wine Using Flow-Injection, *Journal of Food Science*, 56(4), 1097–1100.
- Puškaš V., Kovač V., Dodić J., Dodić S. (2005), Effect of fermentation conditions on content of phenolic compounds in red wine, *Acta Periodica Technologica*. 36: 61-69.
- Radovanović V. (1986), Tehnologija vina, Gradska knjiga, Beograd.
- Rainieri S., Zambonelli C., Kaneka Y. (2003), *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96: 1-9.
- Racker E. (1974), History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003; 5: 17–23.
- Rajeshwari U, Shobha I, Andallu B.(2011), Comparison of aniseeds and coriander seeds for antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activities. *Spatula DD*. 1(1): 9–16.
- Rapp A. (1988), Wine aroma substances from gas chromatographic analysis. In H.F. Linskens, & J.F. Jackson (Eds), *Wine analysis*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier
- Rathi B., Bodhankar S., Mohan V.(2013), Thakurdesai P. Ameliorative Effects of a Polyphenolic Fraction of *Cinnamomum zeylanicum* L. Bark in Animal Models of Inflammation and Arthritis, *Scientia Pharmaceutica*. 81: 567–589.
- Revilla E., Alonso E., Kovac V. (1997), The content of catechin and procyanidins in grapes and wines as affected by agroecological factors and technological practices. In *Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits*; Watkins, T. R., Ed.; *Journal of the American Chemical Society*: Washington, 69-80.
- Revila E., Bourzeix M., Alonso, E. (1991), Analysis of catechins and proanthocyanidins in grape seeds by HPLC with photodiode array detection. *Chromatographia*. 31, 465-468.
- Renije L.A. (2008), Journal Devoted to Scientific and Technological Aspects of Industrially Relevant Polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 74(4): 858.
- Ribéreau-Gayon P., Stonestreet, E. (1965), Determination of Anthocyanins in Red Wine. *Bulletin de la Societe Chimique de France*. 9, 2649-2652.

Ribereau-Gayon P, Peynaud, E., Ribereau-Gayon, P. (1982), *Sciences et Techniques de L'eau*, Dunod, Paris.

Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. *Traite' d' Oenologie 2*. (1988), Chimie du vin –stabilisation et treatments, Dunod, Paris.

Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D.(1999), *Handbook of Enology vol 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, John Wiley & sons LTD, New York.

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A.(1999), *Handbook of Enology, Vol. 1*, John Wiley & sons LTD, New York.

Ribereau-Gayon P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2000), Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathways of wine yeasts. In P. Ribereau-Gayon (Ed.), *Handbook of Enology, Vol 1* Chichester, John Wiley & sons, Ltd 51–74.

Ribereau-Gayon Y. Glories. (2005), *Handbook of Enology Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2nd Edition* P. Faculty of Enology Victor Segalen University of Bordeaux II, France.

Ribereau-Gayon, P., Glories Y., Maujean A., & Dubourdieu D. (2006), Varietal aroma. *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, Volume 2, 2nd Edition*, 205-230.

Ricardo da Silva J. M.; Bourzeix, M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (1991), Procyanidin composition of Chardonnay, Mauzac and Grenache blanc grapes. *Vitis*. 30, 245-252.

Ricardo da Silva J.M. (1997), Anthocyanins and proanthocyanidins in grape and wines. Their primordial role in enology. In: *Proceedings of the First Symposium in Vitis Analytica Scientia*. 101-113, Bordeaux, France.

Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999), Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chem* 66, 401-436.

Robinson R, Leon A.(2005), Comparison of the stability of certain anthocyanins and anthocyanidins in the presence of dilute solutions of ferric chloride.

Rossetto M., Vanzani P., Zennaro L., Mattivi F., Vrhovsek U., Scarpa M., Rigo A. (2004), Stable free radicals and peroxy radical trapping capacity in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6151-6155.

Rodrigues V. M., P. T. V. Rosa, Marques M. O. M., Petenate A. J., Meireles M. A. A. (2003), Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum* L) using CO₂: solubility, kinetics, and composition data, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(6), 1518–1523.

Rodríguez V. M.J., Alberto M.R., Manca de Nadra M.C. (2007), Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 18, 93-101.

- Rodopulo A.K., (1983), Fundamentals of Biochemistry of Winemaking. 1st Ed., *Light and Food Industry*, Moscow, pp: 240.
- Ružić N., Puškaš V., Kocić S. (2000), Uticaj vinskog kvasca na sadržaj triptofana u vinu, V savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića (sa međunarodnim učešćem), Beograd, Poslovna zajednica VRENJE. 4(6), 175- 182.
- Rusjan D., (2010), Aromas in grape and wine. Methodologies and results in grapevine research. pp. 411-442
- Salinas M.R., Lorenzo C. Pardo F, Zalacain A. Alonso G.L. (2005), Effect of Red Grapes Co-winemaking in Polyphenols and Color of Wines. Article in *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(19):7609-16.
- Savić S. (2003), Ekološki uslovi i autohtone vrste vinove loze u Crnoj Gori. Plantaže, Podgorica.
- Sablaylorles J.M., Barre P. (1986), Evaluation des besoins en oxygen de fermentations alcooliques en conditions oenologiques sil'ees. *Sci. Aliments*. 6, 373–383.
- Salehi Surmaghi M.H. (2010), *Medicinal Plants and Phytotherapy*. Vol. 1. Tehran, Iran, Donyay Taghziah Press.
- Sanchez-Palomo E., Diaz-Maroto H. M. C., Gonzales-Vinas M. A., Perez-Coelo M. S. (2005), Aroma enchacement in wines from different grape varieties usin exogenous glucosidases. *Food. Chem*, 92:627-635.
- Schaaf-Gersteenschal ager, I., Miosga, T.(1996), The pentose phosphate pathway. In F.K. Zimmerman, K.D. Entian (Eds.), *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications* Boca Raton: CRC Press. 271–284.
- Schneider R., Razungles A., Augier C., Baumes R. (2001), Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv MerlotB as precursors of odorant in Muscated wines. *J. Chromatogr. A*. 936:145-157.
- Schulte K.E., Rucker G., Backe, W.(1970), Polyacetylene aus Pimpinella-Arten, *Archiv der Pharmazie* 303, 912-919.
- Seabra R. M., Dopico-Garsia M. S., Figue A., Guerra L.(2008), Principal components of phenolics to characterize red Vinho Verde grapes: Anthocyanins or non-coloured compounds, *Talanta*. 75, 1190-1202.
- Shukla H.S., Tripathi S.C. (1987), Antifungal substance in the essential oil of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*. 51:1991-3.
- Shahidi F., Wanasundara P.K.J. (1992), Phenolic antioxidants. *Critical Reviews on Food Science and Nutrition*. 32, 67-103.

Shi H., Noguchi N., Niki E. (2001), Introducing natural antioxidants, In: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., (Eds.) Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England. 22 - 70.

Singh G., Kapoor I.P.S., Singh P., de Heluani C.S., Catalan C.A.N. (2008), Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and oleoresins from anise seeds (*Pimpinella anisum* L.). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2(3): 122–130.

Singleton V.L., Rossi J. (1965), Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*. 16. 144-158.

Singeton V.L., Timberlake C.F., Lea A.G.H. (1978), The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29: 403-410.

Singleton V.L., Trousdale E. (1992), Anthocyanin-tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*., 43, 63-70.

Siemann E. H., Creasy L. L. (1992), Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *American Journal of Enology Viticulture*. 43, 49-52.

Sies H., Cadenas E., (1985), Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity., *International Library of Ethics, Law, and the New Medicine*. 23, 217-37

Singh G., Kapoor I.P.S., Pandey S.K., Singh U.K., Singh R.K. Studies on essential oil: Part 10; Antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytotherapy Research*. 2002; 16: 680-682.

Soleas G.J., Tomlinson G., Goldberg, M.D. (1998), Kinetics of polyphenol Release into Wine Must During Fermentation of Different Cultivars, *Journal of Wine Research*. 9 (1), 27 -41.

Sousa M.P., Matos M.E.O., Matos F.J.A., Machado M.I.L., Craveiro A.A. (1991), Constituintes Químicos Ativos de Plantas Mediciniais Brasileiras, Edições UFC/Laboratório de Produtos Naturais, Fortaleza. 414.

Sokmen A., Jones B.M., Ertkurk M. (1999), The in vitro antibacterial activity of Turkish Medicinal Plants. *J. Ethnopharmacol.* 67(1), 79-86.

Sovak M. (2001), Grape Extract, Resveratrol, and Its Analogs: A Review. *Journal of Medicinal Food*. 4(2):93-105.

Spranger M.I.M. Phenolic compounds. In: Doneche B. (Ed.), (1993), Les acquisitions recentes en chromatographic du Vin, Institut d Oenologie. Universitet de Bordeaux. 87-99.ž

Spillman P. J., Sefton M. A., Gawel R. (2004), The contribution of volatile compounds derived during oak barrel maturation to the aroma of a Chardonnay and Cabernet sauvignon wine. *Aust. J. Grape. Wine. Res.*, 10:227-235.

Sudraud P. (1963), Etude experimental de la vinification en rouge, These Docteur-Ingenier, Faculte des Sciences de Bordeaux.

Sullivan J.C., Pollack D.M., Pollock J.S. (2002), Altered nitric oxide synthase 3 distribution in mesenteric arteries of hypertensive rats. *Hypertension*. 39: 597-602.

Sun W.C., J.X. Han W.Y. Yang D.A. Deng X.F. Yue. (1992), Antitumor activities of 4 derivaties of artemisic acid and artemisinin B In vitro. *Acta pharmacologica Sinica*. 13: 541-543.

Sujatha G., Kumari B.D.R. (2009), Micropropagation, Encapsulation and Growth of *Artemisia vulgaris* Node Explants for Germplasm Preservation. *South African Journal of Botany*, 74: 93-100.

Shinwari Z.K., I. Khan, Naz S., Hussain A. (2009), Assessment of antibacterial activity of three plants used in Pakistan to cure respiratory diseases. *African Journal of Biotechnology*. 8(24), 7082-7086.

Siracusa L., Saija A., Cristani M., Cimino F., D'Arrigo M., Trombetta D., Rao F., Giuseppe Ruberto G. Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves — Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity *Fitoterapia*. 20011; 82: 546–556.

Starr M.S., Francis F.J. (1968), Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice, *Food Technology*. 22, 1293-1295.

Strack D. (1997), Phenolic metabolism. In: Dey PM., Harborne JB (Eds.), *Plant biochemistry*. Academic Press, New York, pp. 387–437.

Swiegers J. H. et al. (2005), "Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour." *Australian Journal of grape and wine research* 11.2:139-173.

Tsai S.C., Avigan J, Steinberg D. (1969), Studies on the alpha oxidation of phytanic acid by rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 25: 244(10) 2682-92.

Tas A. (2009), Analgesic effect of *Pimpinella anisum* L. Essential oil extract in mice. *Indian Veterinary Journal*. 86(2): 145-147.

Timberlake F., Bridle P. (1966), Flavylum salts, antocyanidins and anthocyanins. Structural transformations in acid solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 18: 473.

Tucakov J. (1997), Lečenje biljem, Izdavačka kuća "Rad", Beograd.

Ullah H. (2012), Fruit yield and quality of anise (*Pimpinella anisum* L.) in relation to agronomic and environmental factors. Doctoral thesis, Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences and Environmental Management Justus Liebig University Giessen, Germany.

- Valko M., Leibfriz D., Moncol J., Cronin M.T., Maur M., Telser J. (2007), Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39, (44-84).
- Van Rossum T.G., Vulto A.G., Hop W.C. (1999), Intravenous glycyrrhizin for the treatment of chronic hepatitis C: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase I/II trial. *J Gastroenterol Hepatol*. 14:1093-1099.
- Van der Walt J.P. (1970), *Saccharomyces* Meyen emend. Reess. In *The Yeast: a Taxonomic Study*, 2nd edn, Lodder E (ed.). Elsevier. Amsterdam. 555–718.
- Vasserot Y., Caillet J.B., Maujean A. (1997), Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of some Physicochemical Parameters, *American Journal of Enology and Viticulture*. 48: 433-437.
- Verret, C.O., Voilley, A. Lubbers, S. (2001), The effect of glycerol on the perceived aroma of a model wine and a white wine. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*. 34, 262–265.
- Veit M., Beckert C., Hohne C., Bauer K, Geiger H. (1995), Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the Equisetum subgenus Equisetum. *Phytochemistry*. 38, 881– 891.
- Von Elbe J.H., Schwartz S.J. (1996), Colorants. In Food Chemistry. O.R. Fennema (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York.
- Villaño D., Fernandez-Pachan M.S., Moza M.L., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. (2007), Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta*. 71 (1): 230-235.
- Wagner H., Blatt S., Zgainski E.M. (1984), Plant Drug analysis. New York: Springer-Verlag.
- Walter H.L., Memory P.F., Elvin L. Medical Botany 2nd ed. (2003), Plants affecting human health, John Wiley and Sons Inc. p. 345
- Wilska-Jeszka J, Korzuchowska A. (1996), Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation. Influence on the color of strawberry and chokeberry juices. *European Food Research and Technology*. 203, 38-42.
- Wrolstad R.E., Skrede G., Lea P., Enersen G. (1990), Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. *Journal of Food Science*. 55: 1064-1065.
- Waterhouse D.F., Cahill R.A., Sheehan F., McCreery C. (2008), Prediction of calculated future cardiovascular disease by monocyte count in an asymptomatic population. *Vascular Health and Risk Management*. 4(1): 177-187.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V., (1999), Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985–990.

Halliwell B., Gutteridge J.M. (1990), Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85.

Xu H., Fabricant D.S, Piersen C.E.Bolton J.L., Pezzuto J.M., Fong. H., Totura S., Farnsworth. N.R. Constantinou.A.L. (2002), A preliminary RAPD-PCR analysis of *Cimicifuga* species and other botanicals used for women's health. *Phytomedicine.* 9, 757–762.

Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F. (2001), Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials, *Analytical Sciences.* 1, 599-604.

Zamora F. (2009), *Biochemistry of Alcoholic Fermentation, Wine Chemistry and Biochemistry* Springer Science Business Media.

Zargari A. (1989), *Medicinal Plants*, vol. 2. Tehran University, Tehran. 502-507.

Zhishen J., Mengheng T., Jianming, W. (1999), The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry.* 64, 555-559.

Živković J., Menković N., Šavikin K., Gočevac D., Zdunić G. (2014), Phenolic composition and free radical scavenging activity of wine produced from the Serbian autochthonous grape variety Prokupac-A model approach, *Journal of the Serbian Chemical Society.* 79 (1): 11-24 (2014).

^a <http://www.flavornet.org/flavornet.html>

^b Farenzena, S. and Tombesi, N., Volatile profile of Malbec wine from Buenos Aires province (Argentina), *International Food Research Journal*, 22(6): 2691-2696 (2015).

^c Jiang Bb, Xi Z., Luo M. and Zhang Z., Comparison on aroma compounds in Cabernet Sauvignon and Merlot wines from four wine grape-growing regions in China, *Food Research International*, 51(2): 482-489 (2013).

^d Comuzzo P., Tat L., Tonizzo A. and Battistutta F., Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility, *Food Chemistry* 99: 217–230 (2006).

^e Monson S., Profile of Missouri Norton wine aroma using solid phase microextraction of headspace, gas chromatography – olfactometry, mass spectrometry, Thesis for: Master of Science, 2011, DOI: 10.13140/RG.2.2.33783.01443.

BIOGRAFIJA

Svetlana Lakićević, rođ. Jovanović

Datum rođenja: 07.08.1962.

Adresa: Niš

Telefon: +381 069 870 25 29

E-mail: s_lakicevic@yahoo.com

Radno iskustvo

OBRAZOVANJE

Naslov disertacije: Kinetika alkoholne fermentacije i karakterizacija vina dobijenog od šire sa dodatkom lekovitog bilja

Oblast: Tehnološko inženjerstvo

Magistar tehničkih nauka: 2006

Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu

Naslov magistarske teze: Ekstarkcija i metanoliza ulja iz semena duvana (*Nicotiana tabacum* L) tipa Otlja

Oblast: Hemijsko inženjerstvo

Diplomirani inženjer biohemijskog inženjerstva

Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu

Naslov diplomskog rada-

Oblast: Biohemijsko inženjerstvo

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu M21

- V.B. Veljković, S.H. Lakićević, O.S. Stamenković, Z.B. Todorović, M.L. Lazić Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids • SHORT COMMUNICATION, Fuel 85 (2006) 2671-2675

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu M22

- Svetlana H. Lakićević, Jelena B. Popović Djordjević, Boris Pejin, Aleksandra S. Djordjević, Saša M. Matijašević & Miodrag L. Lazić (2018) An insight into chemical composition and bioactivity of 'Prokupac' red wine, Natural Product Research, DOI: 10.1080/14786419.2018.1516219

Rad u vodećem časopisu od nacionalnog značaja M51:

- Svetlana H. Lakićević, Ivana T. Karabegović, Nada Č. Nikolić, Goran M. Petrović, Aleksandra S. Djordjević, Miodrag L. Lazić, THE KINETICS OF ALCOHOLIC FERMENTATION, PHENOLIC CONTENT, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE WINE OBTAINED FROM PLOVDINA GRAPE WITH THE ADDITION OF AROMATIC HERBS, Advanced technologies, 7 (2) (2018) 11-18.
- Ivana Stanisavljević, Svetlana Lakićević, D. Veličković, M. Lazić, V. Veljković, The extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds, CI&CEQ 13 (2007) 41-50.

Sapoštenje na međunarodnom naučnom skupu štampano u izvodu M34:

- M. L. Lazić, Ivana T. Stanisavljević, Svetlana Lakićević, V. B. Veljković, The Kinetics of Maceration of Oil from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Seeds, 29th International Conference on Solution Chemistry, August 21st - 25th, 2005, Portorož, Slovenia, Book of abstracts, p. 90, AP 27, ISBN 961-6286-63-3
- Svetlana Lakićević, Saša Stojičević, Ivana Karabegović, Nada Nikolić, Miodrag Lazić, The antioxidant activity of the wine obtained by fermentation with the addition of aromatic plants, International Conference on Natural Products Utilization From Plants to Pharmacy Shelf, ICNPU 2013, 3-6 November 2013, BANSKO, Bulgaria 2013, Book of Abstracts, PP 85, p. 163.

Naučna knjiga i monografija od nacionalnog značaja M42

- Lakićević S., (2008), Biodizel iz semena duvana. Zadužbina Andrejević, Beograd

Radovi saopšteni na skupu od nacionalnog značaja štampani u izvodu M64

- Lakićević S., Stojićević S., Karabegović I., Nikolić N., Stanković S., Mošić I., Lazić M. (2015), The phenolic content and antioxidant activity of the red wine obtained by fermentation of must with the addition of aromatic plants, XI Simpozijum Savremene tehnologije i privredni razvoj, Leskovac, Zbornik izvoda radova, 39 (BPT-1), Tehnološki fakultet, Leskovac, 23-24. oktobar 2015, Leskovac.
- Svetlana Lakicevic, Ivana Karabegovic, Nada Nikolic, Snežana Stankovic, Ivana Mošić, Miodrag Lazić (2017), Effects of aromatic herbs addition on the phenolic content and sensory characteristics of the Prokupac wine, XII Simpozijum Savremene tehnologije i privredni razvoj, Leskovac, Zbornik izvoda radova, (BFT 21), Tehnološki fakultet, Leskovac, 23-24. oktobar 2017, Leskovac.

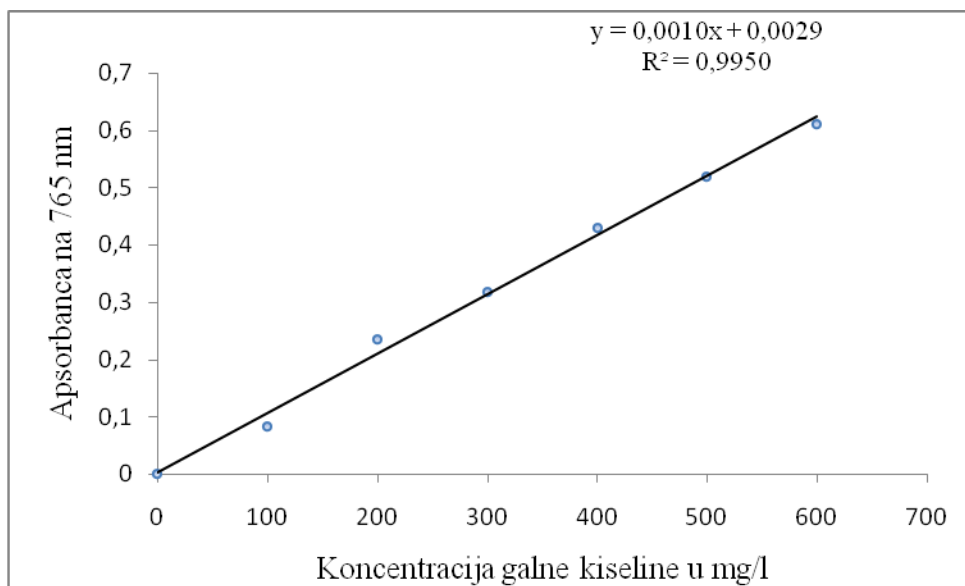
Tehnička rešenja M81

- Veljković, V., Lazić, M., Todorović, Z., Stamenković, O., Lakićević, S., Stanisavljević, I. (2007): Laboratorijski tehnološki postupak za dobijanje metil estara masnih kiselina ulja semena duvana, ev. br. 06-2102 od 05.12.2007., Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Veljković V., Lazić M., Stamenković O., Stanisavljević I., Lakićević S.(2006): Laboratorijski tehnološki postupak za dobijanje ulja iz semena duvana, ev. br. 06-1827 od 11.12.2006., Tehnološki fakultet, Leskovac

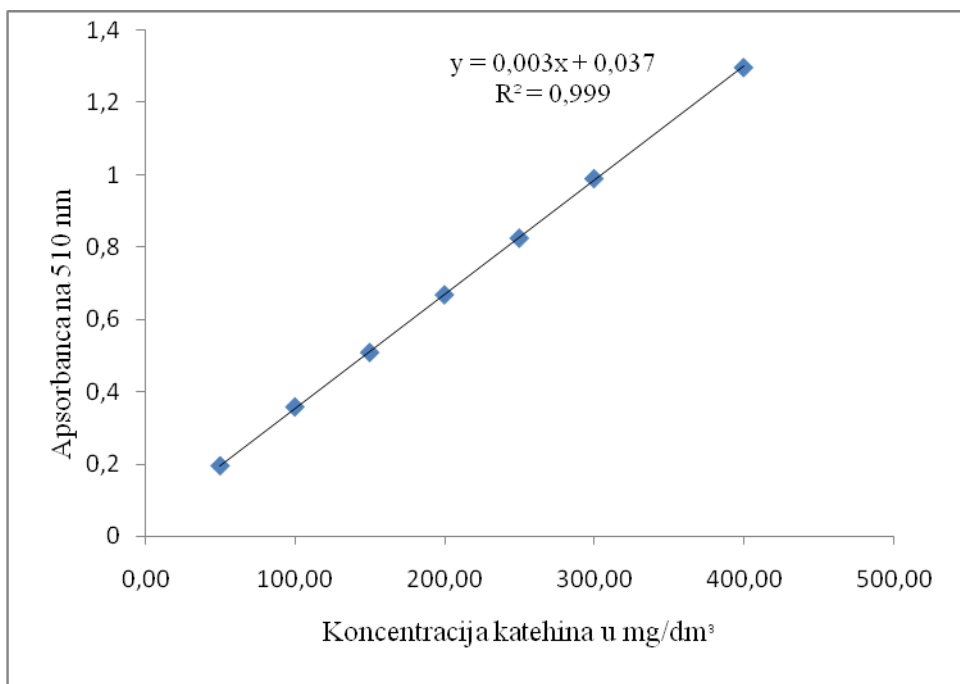
7. PRILOG

Tabela 7.1. Serija standarda za pripremu kalibracione krive galne kiseline

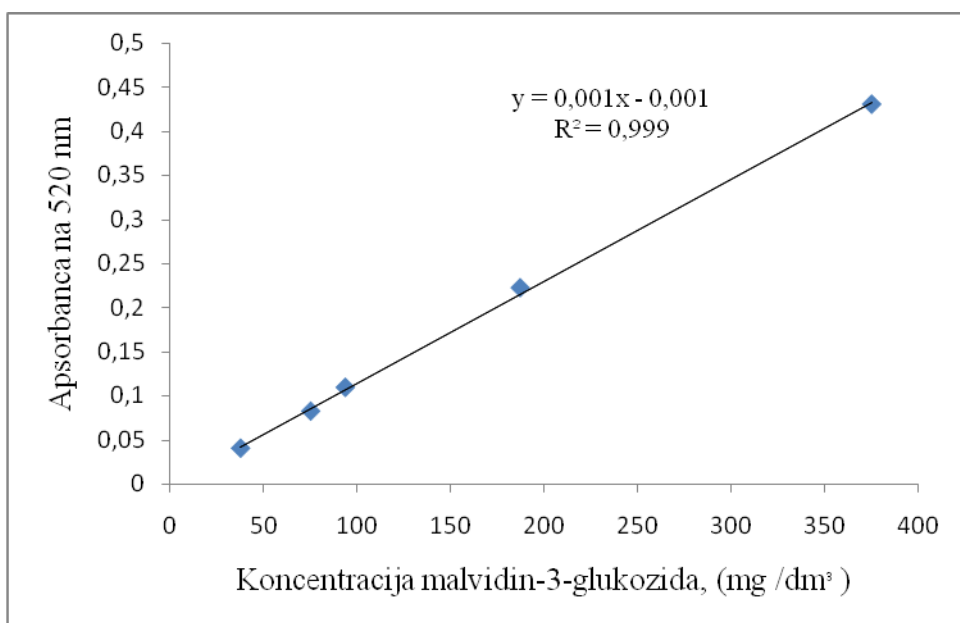
V _{st. ras.} , ml	V _{H₂O} , ml	Reagens FC, ml	V _{Na₂CO₃} , ml	Koncentracija galne kiseline, mg/l
0,1	7,9	0,5	1,5	100
0,2	7,8	0,5	1,5	200
0,3	7,7	0,5	1,5	300
0,4	7,6	0,5	1,5	400
0,5	7,5	0,5	1,5	500
0,6	7,4	0,5	1,5	600



Slika 7.1. Kalibraciona kriva standardnog rastvora galne kiseline na 765nm



Slika 7.2. Kalibraciona kriva standardnog rastvora rutina, mg/ dm³



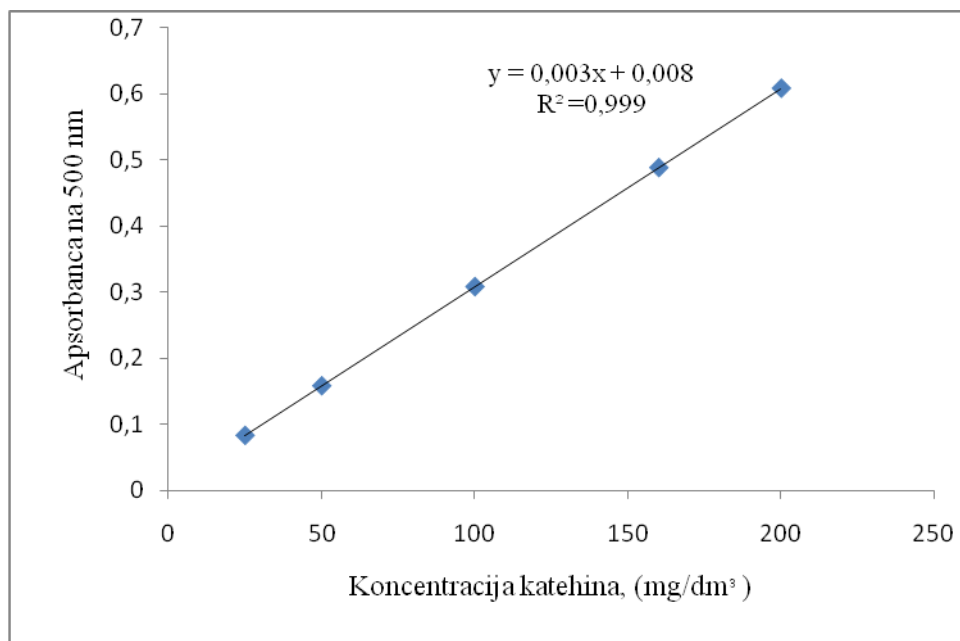
Slika 7.3. Kalibraciona kriva standardnog rastvora malvidin-3-glukozid

Tabela 7.2. Šema pripreme uzorka za određivanje flavan-3-ola

	Epruveta A	Epruveta B	Epruveta C
1. Vino, ml	1,0	0,0	1,0
2. Destilovana voda, ml	0,0	1,0	0,0
3. Hlorovodonična kiselina, konc., ml	2,0	2,0	2,0
4. p- vanilin (1% rastvor u apsolutnom alkoholu), ml	1,0	1,0	0,0
5. 96% (v/v), etanol, ml	1,0	1,0	2,0

Tabela 7.3. Šema pripreme standardnih rastvora katehina

	V osnovnog rastvora, ml	V apsolutnog alkohola, ml	Koncentracija, mg/l
1.	3,125	46,875	25
2.	6,25	43,75	50
3.	12,50	37,50	100
4.	20,00	30,00	160
5.	25,00	25,00	200



Slika 7.4. Kalibraciona kriva standardnog rastvora katehina, (mg/l)

Tabela 7.4. Izdvojeni CO₂ (g) pri alkoholnoj fermentaciji Prokupca na 17°C, za svaka 24 h po 1 kg šire

Broj dana	Prokupac	Prokupac+ Anis	Prokupac+ Cimeti	Prokupac+ Pelin	Prokupac+ Sladić
1	0	0	0	0	0
2	3,7	8,3	0,8	6,8	8,3
3	7,6	16,6	1,3	12,3	10,8
4	14,9	25,2	3,7	14,0	14,0
5	17,0	21,5	10,7	15,4	15,0
6	25,0	20,3	15,3	19,7	22,3
7	21,7	17,6	16,6	16,9	19,4
8	17,0	10,7	14,7	8,0	11,4
9	7,4	3,3	10,7	2,7	7,3
10	3,8	1,6	4,6	1,9	3,1
11	2,1	1,0	2,4	1,3	1,7
12	1,6	1,0	1,7	1,1	1,4
13	0,7	1,0	1,0	1,1	1,3
14	0,8	0,6	0,8	1,0	1,0
15	0,7	0,2	0,7	0,5	0,5
16	0,6	0,2	0,4	0,3	0,3

Tabela 7.5. Izdvojeni CO₂ (g) pri alkoholnoj fermentaciji Prokupca na 22°C, za svaka 24 h po 1 kg šire

Broj dana	Prokupac	Prokupac+ Anis	Prokupac+ Cimeti	Prokupac+ Pelin	Prokupac+ Sladić
1	0	0	0	0	0
2	4,6	2,1	1,1	2,6	1,7
3	13,7	5,4	11,7	11,4	6,0
4	33,5	36,6	17,3	34,9	19,8
5	25,3	33,3	22,6	24,7	29,7
6	16,2	16,6	13,7	14,0	20,7
7	7,0	3,4	2,0	8,0	10,7
8	2,1	1,6	1,3	2,6	1,4
9	1,1	1,0	0,3	1,3	0,8
10	1,1	1,0	0,7	1,6	1,3
11	0,7	0,8	0,4	1,0	0,7
12	0,6	0,7	0,4	0,8	0,6
13	0,4	0,6	0,3	0,7	0,4
14	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3
15	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Tabela 7.6. Izdvojeni CO₂ (g) pri alkoholnoj fermentaciji Prokupca na 25 °C, za svaka 24 h po 1 kg kljuka, (količina izdvojenog CO₂ u toku jednog dana fermentacije)

Broj dana	Prokupac	Prokupac+ Anis	Prokupac+ Cimeti	Prokupac+ Pelin	Prokupac+ Sladić
1	0	0	0	0	0
2	1,0	2,0	1,0	2,1	1,3
3	2,3	7,4	1,0	17,9	12,2
4	10,7	20,3	7,3	13,4	11,4
5	10,0	15,4	12	12,3	11,0
6	11,0	12,9	13	10,7	11,3
7	13,8	11,6	14,2	12,6	12,3
8	9,3	6,4	10,1	8,0	8,1
9	7,8	4,7	6,0	4,4	6,9
10	1,1	1,1	1,0	0,7	1,1
11	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6
12	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
13	0,4	0,4	0,4	0,6	0,4
14	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3
15	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
16	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabela 7.7. Izdvojeni CO₂ (g) pri alkoholnoj fermentaciji, za svaka 24 h po 1 kg šire Plovdine na 17 °C (količina izdvojenog CO₂ tokom jednog dana fermentacije)

Broj dana	Plovdina	Plovdina+ Anis	Plovdina+ Cimeti	Plovdina+ Pelin	Plovdina+ Sladić
1	0	0	0	0	0
2	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1
3	7,9	0,4	0,3	3,1	3,7
4	10,9	2,7	0,4	12,4	8,3
5	12,4	6,7	1,7	15,4	12,3
6	14,2	11,3	3,6	10,8	13,7
7	16,4	17,7	5,6	9,3	12,3
8	15,3	15,7	8,3	7,3	12,0
9	8,9	10,3	11,3	7,1	9,3
10	6,7	5,9	9,6	5,4	6,6
11	4,9	3,0	7,7	3,7	6,3
12	3,4	2,4	3,3	3,9	3,7
13	1,1	0,8	1,6	0,6	1,3
14	1,0	0,7	1,3	0,4	0,4
15	0,7	0,6	1	0,3	0,3
16	0,4	0,4	0,4	0,1	0,1

Tabela 7.8. Izdvojeni CO₂ (g) pri alkoholnoj fermentaciji šire Plovdine na 22°C, za svaka 24 h po 1 kg (količina izdvojenog CO₂ tokom jednog dana fermentacije)

Broj dana	Plovdina	Plovdina+ Anis	Plovdina+ Cimet	Plovdina+ Pelin	Plovdina+ Sladić
1	0	0	0	0	0
2	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1
3	3,4	0,7	0,3	4,3	2,1
4	13,3	2,7	2,3	9,7	6,8
5	13,8	3,8	4,1	12,4	12,3
6	14,2	9,9	5,9	13	13,7
7	18,9	20,4	9,1	16,4	15,9
8	14,7	18,6	13,1	13	12
9	8,9	10,3	12,4	8,1	9,3
10	6,7	5,9	9,1	5,4	6,6
11	4,8	3,0	6,0	3,7	6,3
12	3,4	2,4	3,3	2,9	3,7
13	0,6	0,4	0,1	0,3	0,6
14	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3

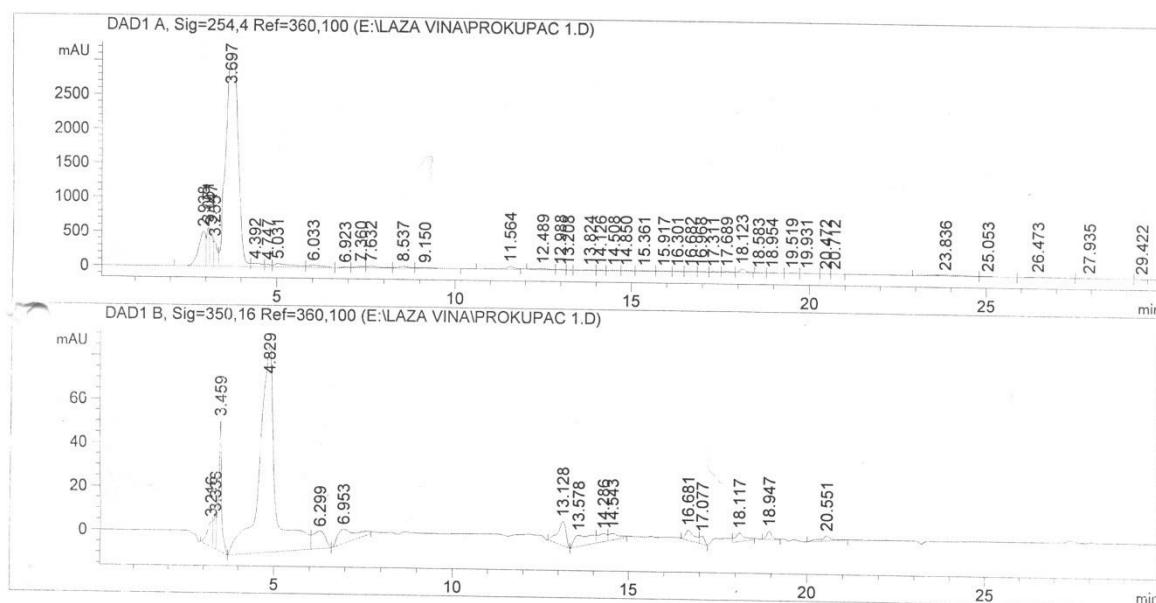
Tabela 7.9. Izdvojeni CO₂ (g) pri fermentaciji po 1 kg kljuka Plovdine na 25°C, za svaka 24 h (količina izdvojenog CO₂ tokom jednog dana fermentacije)

Broj dana	Plovdina	Plovdina+ Anis	Plovdina+ Cimet	Plovdina+ Pelin	Plovdina+ Sladić
1	0	0	0	0	0
2	0,1	0,4	0,4	0,6	0,6
3	0,1	1,0	1,0	1,0	1,1
4	4,3	4,1	4,1	4,4	5,7
5	26,2	30,9	30,1	29,5	22,2
6	14,7	7,9	7,9	15,3	20
7	6,9	3,4	3,4	5,9	7,9
8	4,0	3,1	3,1	3,9	4,1
9	1,7	1,9	1,9	1,6	2,0
10	1,1	1,1	1,1	0,9	1,3
11	1,4	1,4	1,4	1,6	1,3
12	1,0	1,1	1,1	1,0	1,0
13	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0
14	0,7	0,7	0,7	0,9	0,8



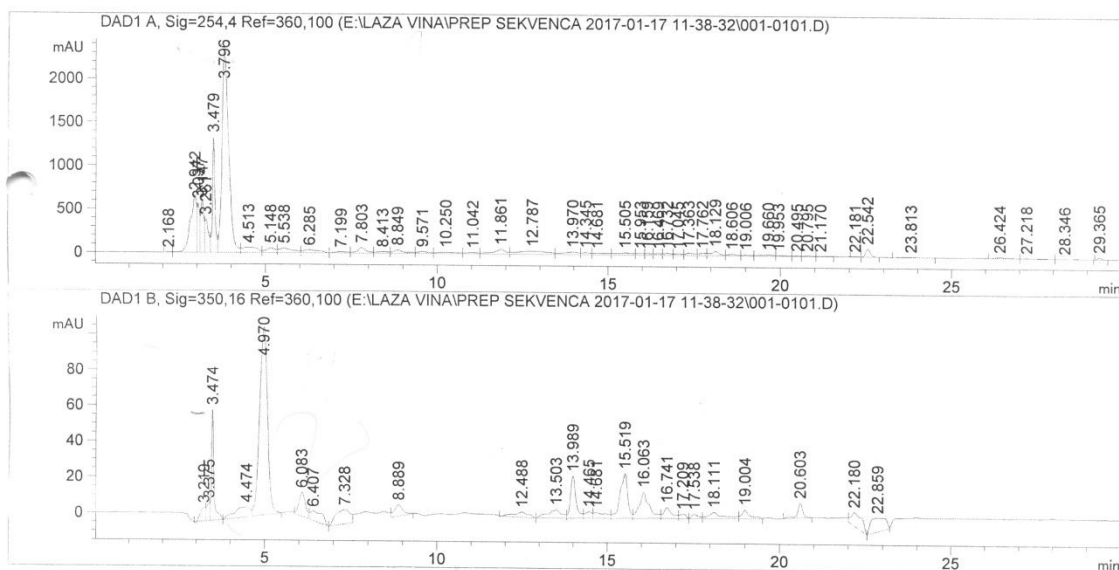
Slika 7.5. Uticaj dodatka aromatičnog bilja na boju vina Prokupac 1-Prokupac, 2-Prokupac sa anisom, 3- Prokupac sa cimetom, 4-Prokupac sa pelinom , 5- Prokupac sa sladićem).

HPLC analiza Prokupca i Plovdine sa dodatkom aromatičnog bilja



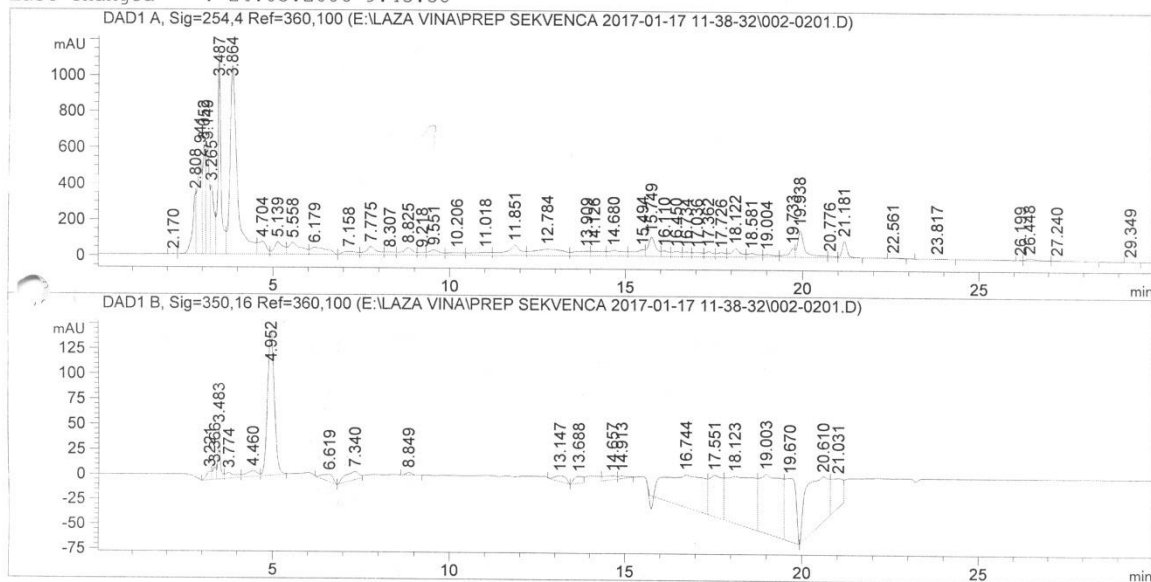
Slika 7.6. HPLC hromatogram vina Prokupac

triggera



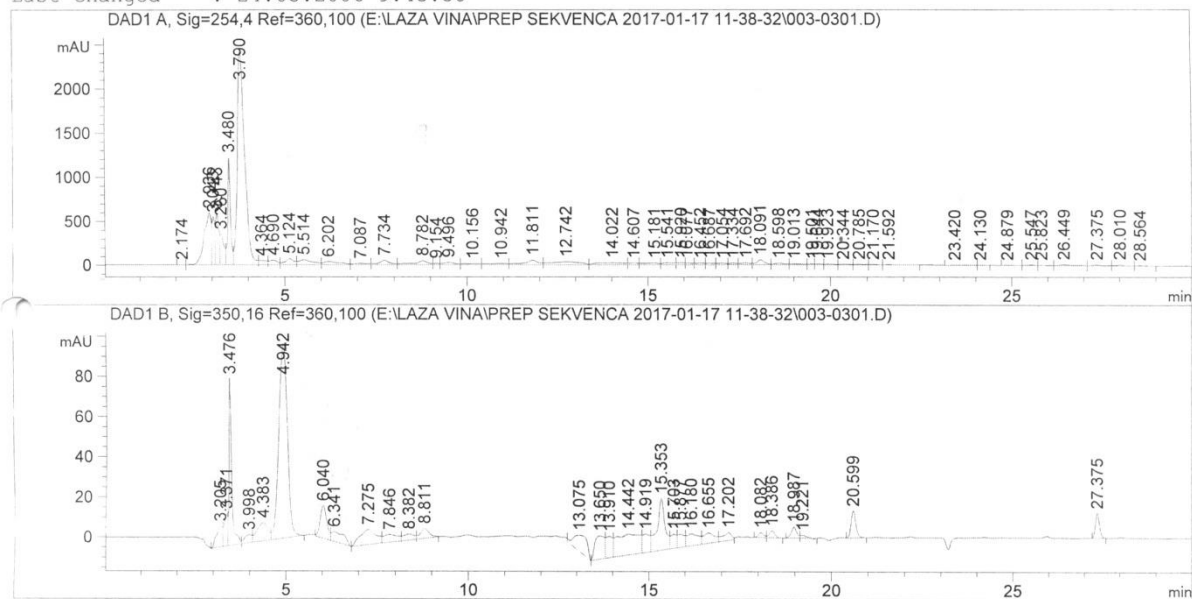
Slika 7.7. HPLC hromatogram vina Prokupac sa dodatkom Anisa

Last changed : 24.05.2006 9:43:58

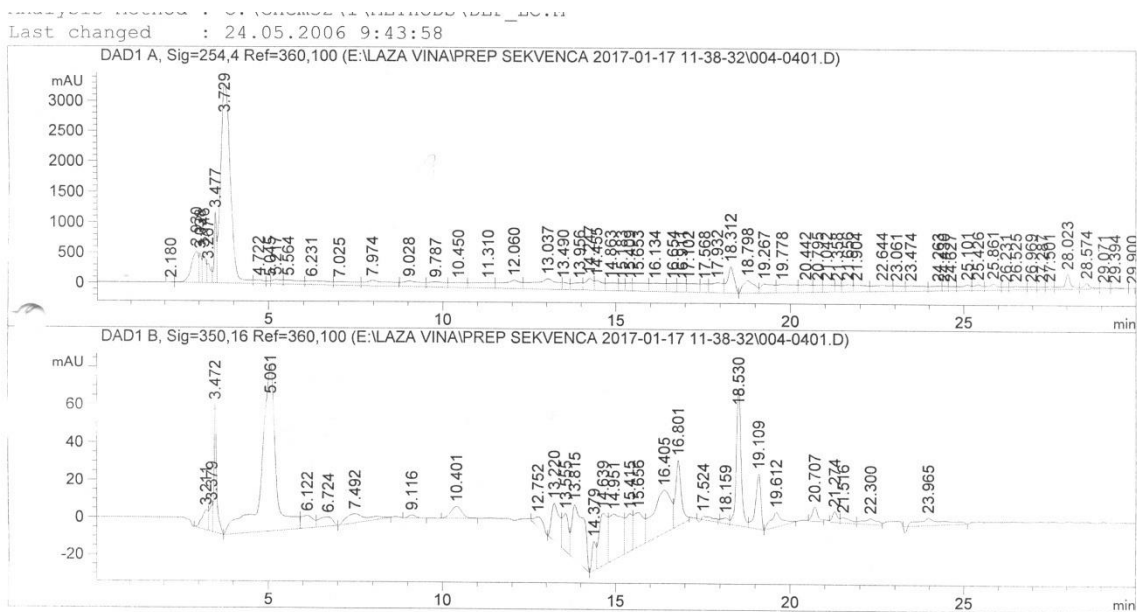


Slika 7.8. HPLC hromatogram vina Prokupac sa dodatkom Cimeta

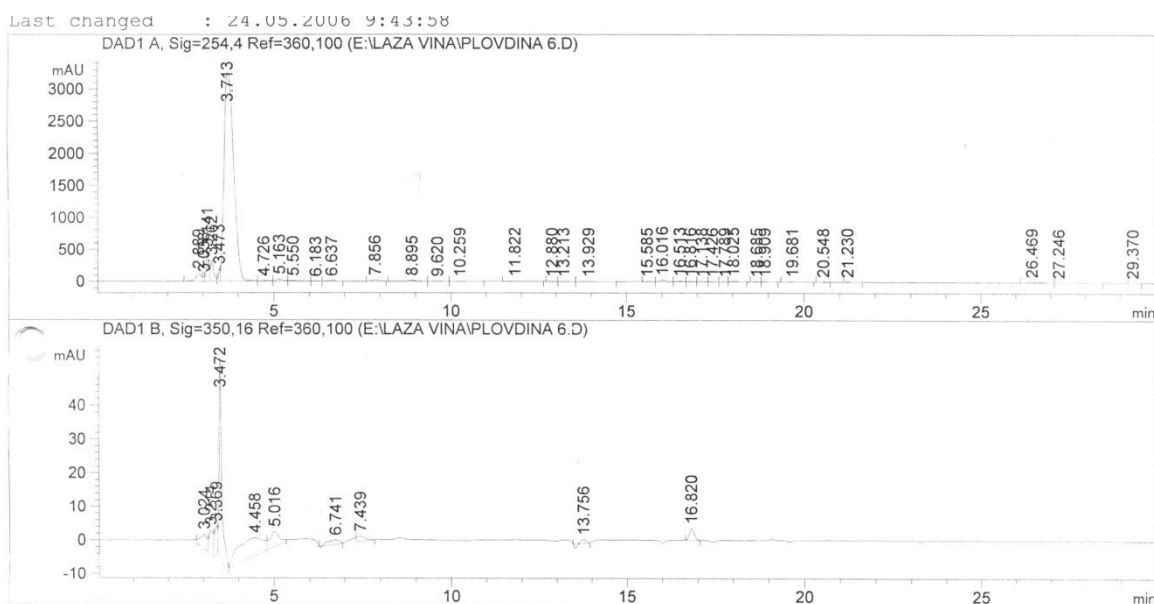
Analysis Method : C:\Chem32\1\METHODS\DEF_LC.M
 Last changed : 24.05.2006 9:43:58



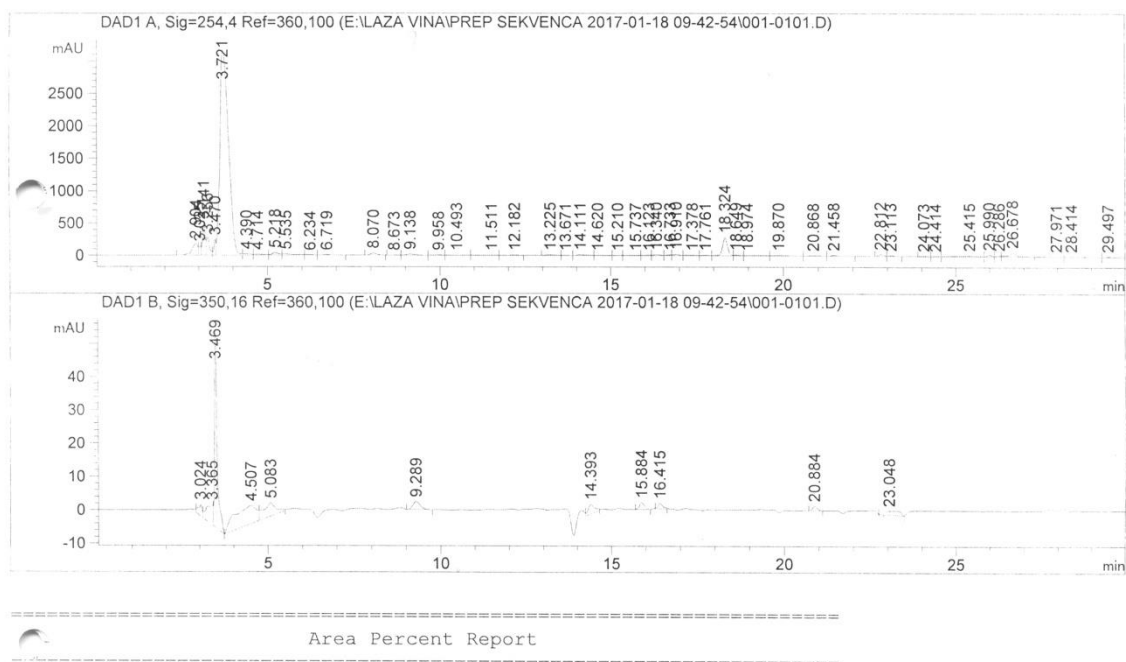
Slika 7.9. HPLC hromatogram vina Prokupac sa dodatkom Pelina



Slika 7.10. HPLC hromatogram vina Prokupac sa dodatkom Sladića

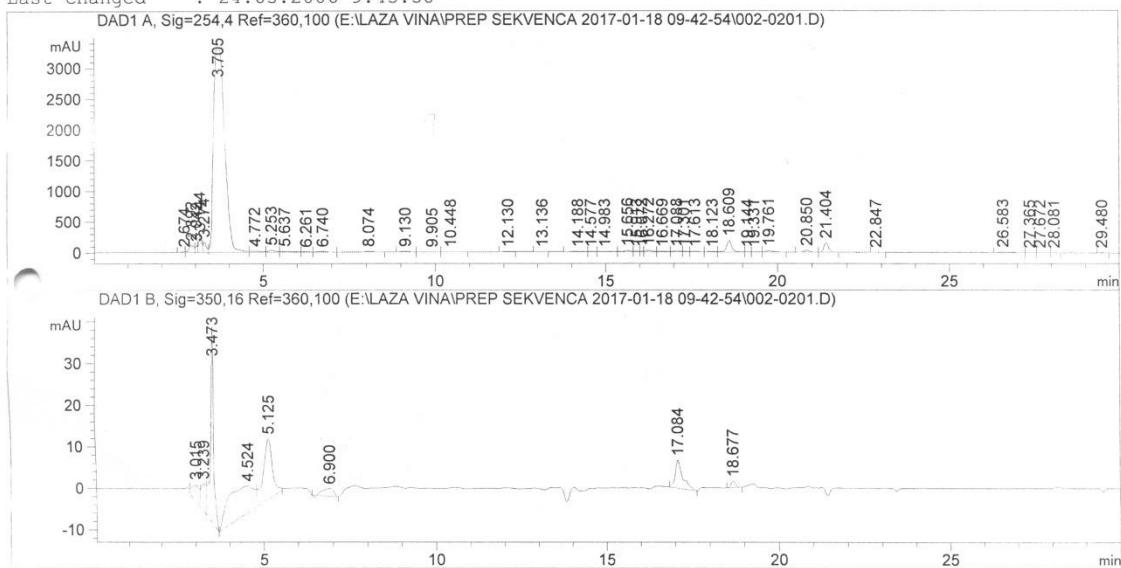


Slika 7.11. HPLC hromatogram vina Plovdina



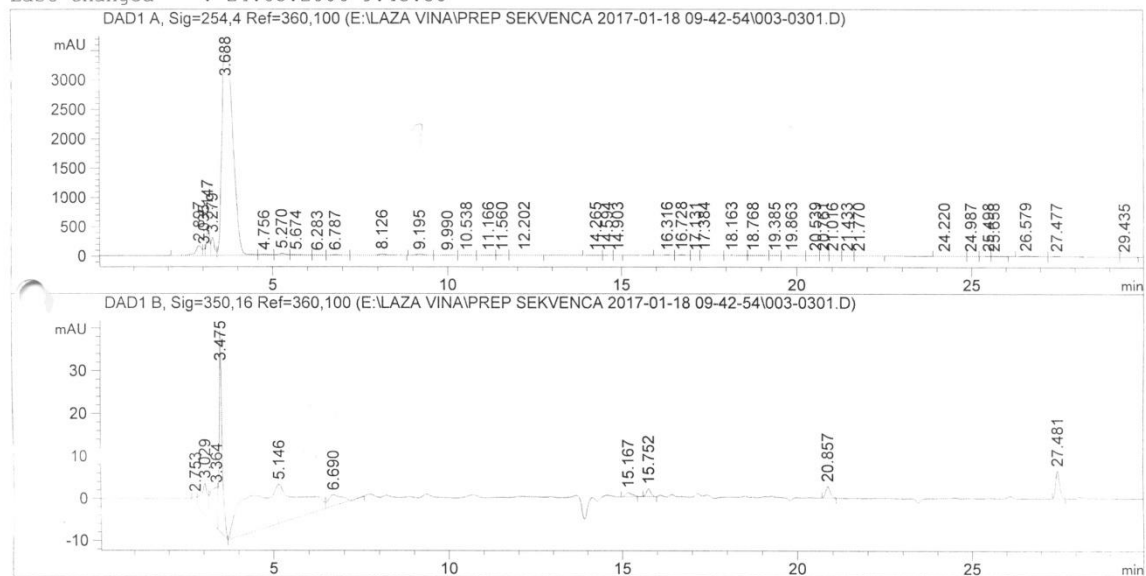
Slika 7.12. HPLC hromatogram vina Plovdina sa dodatkom Anisa

Analysis Method : C:\CHEM2\1\METHODS\DEF_DEF.M
 Last changed : 24.05.2006 9:43:58



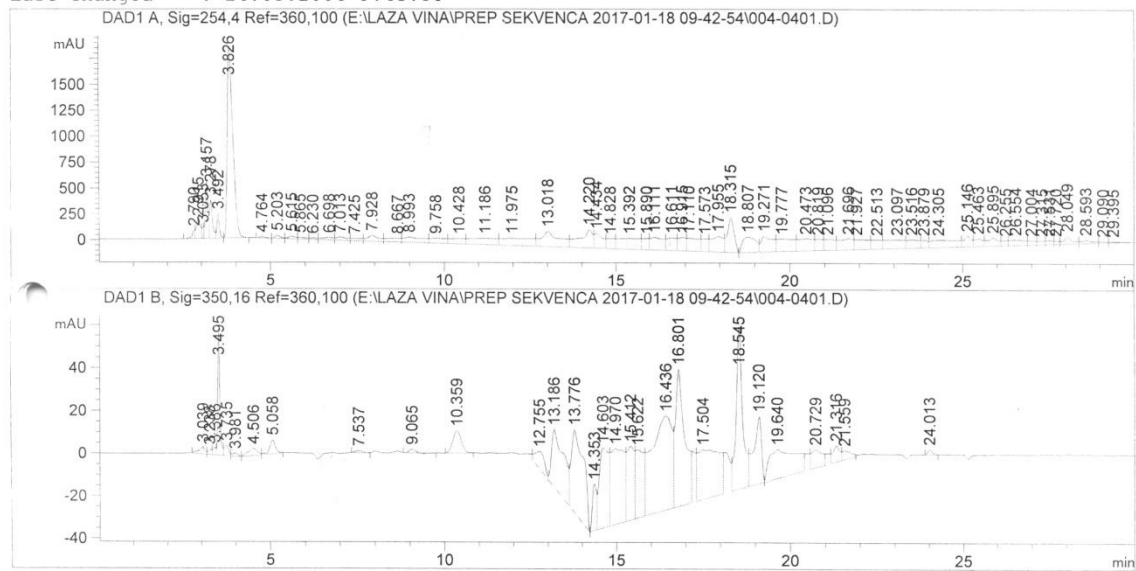
Slika 7.13. HPLC hromatogram vina Plovdiva sa dodatkom Cimeta

Analysis Method : C:\CHEM2\1\METHODS\DEF_DEF.M
 Last changed : 24.05.2006 9:43:58

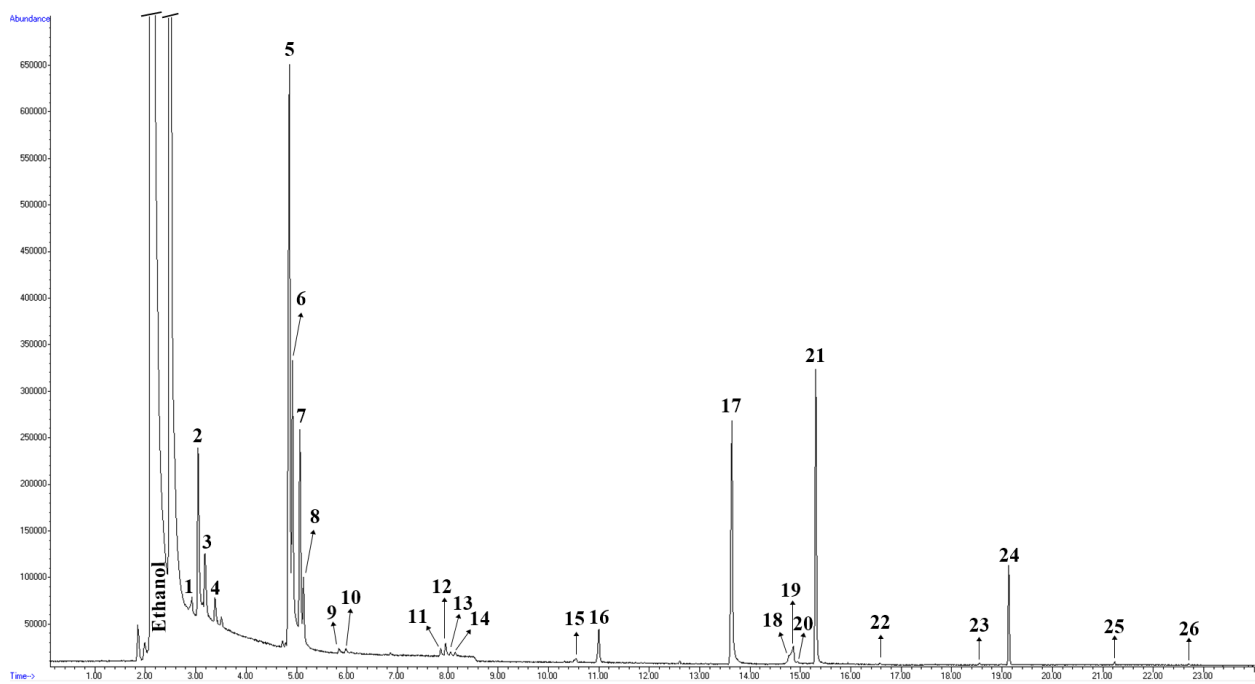


Slika 7.14. HPLC hromatogram vina Plovdiva sa dodatkom Pelina

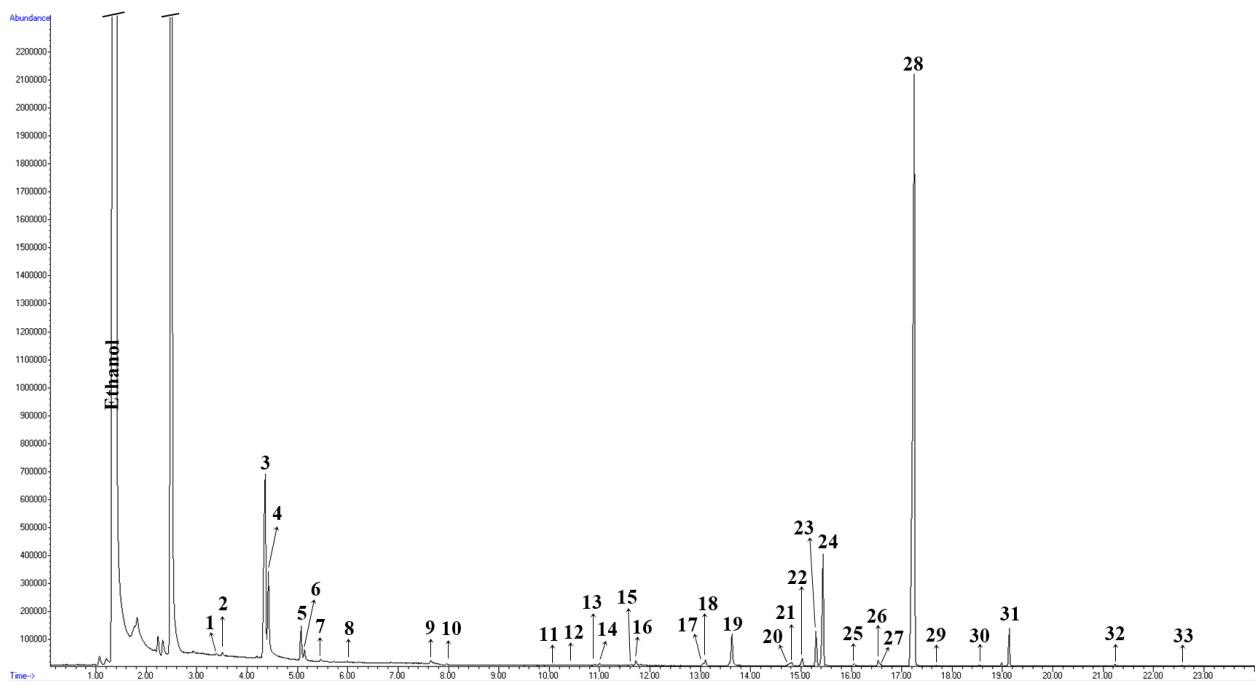
Last changed : 24.05.2006 9:43:58



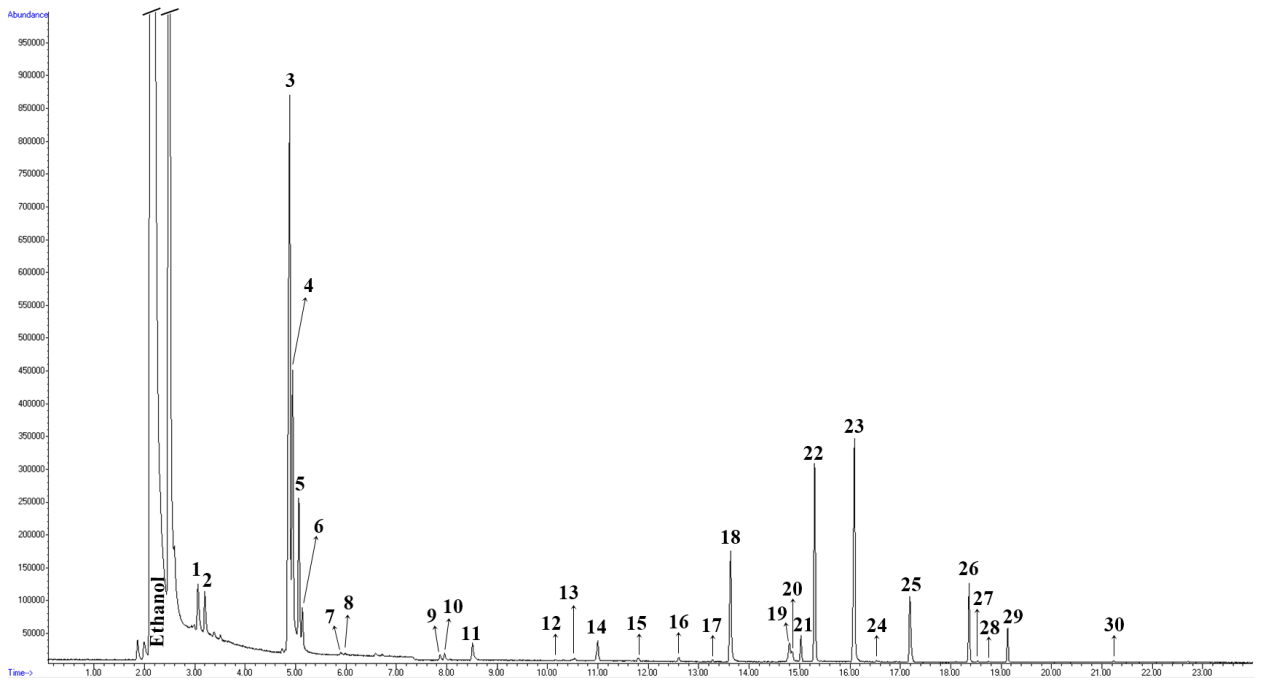
Slika 7.15. HPLC hromatogram vina Plovdina sa dodatkom sladića



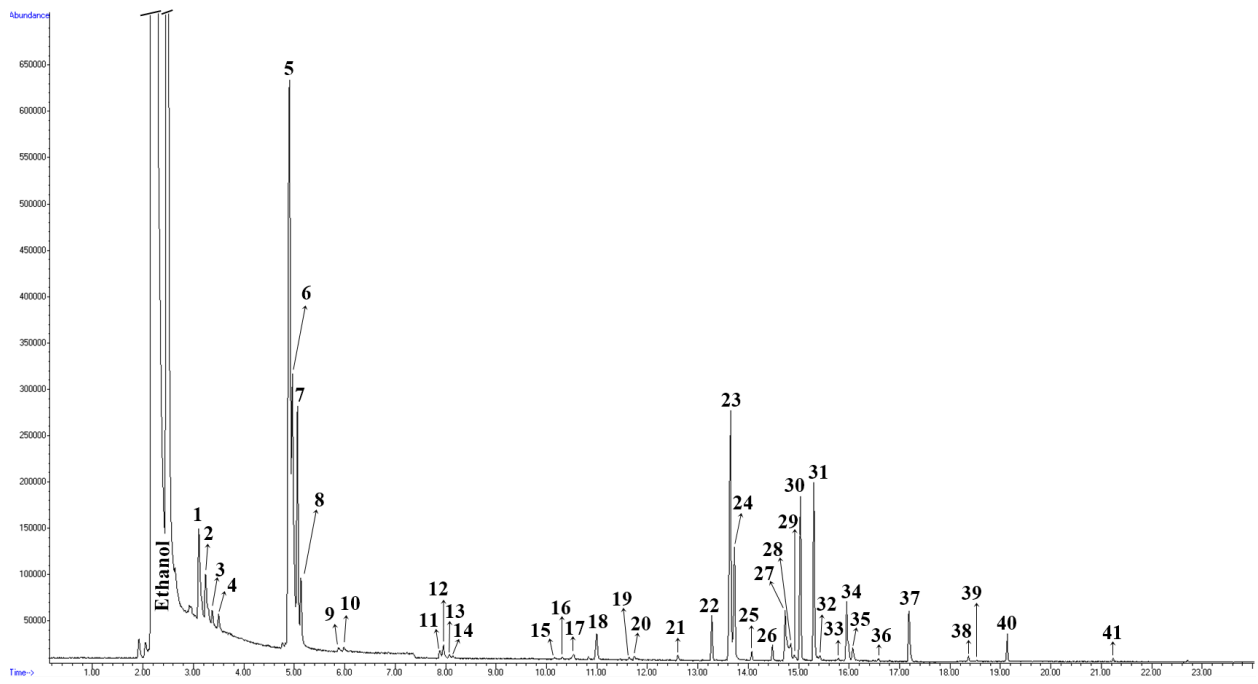
Slika 7.16. TIC hromatogram vina Prokupac



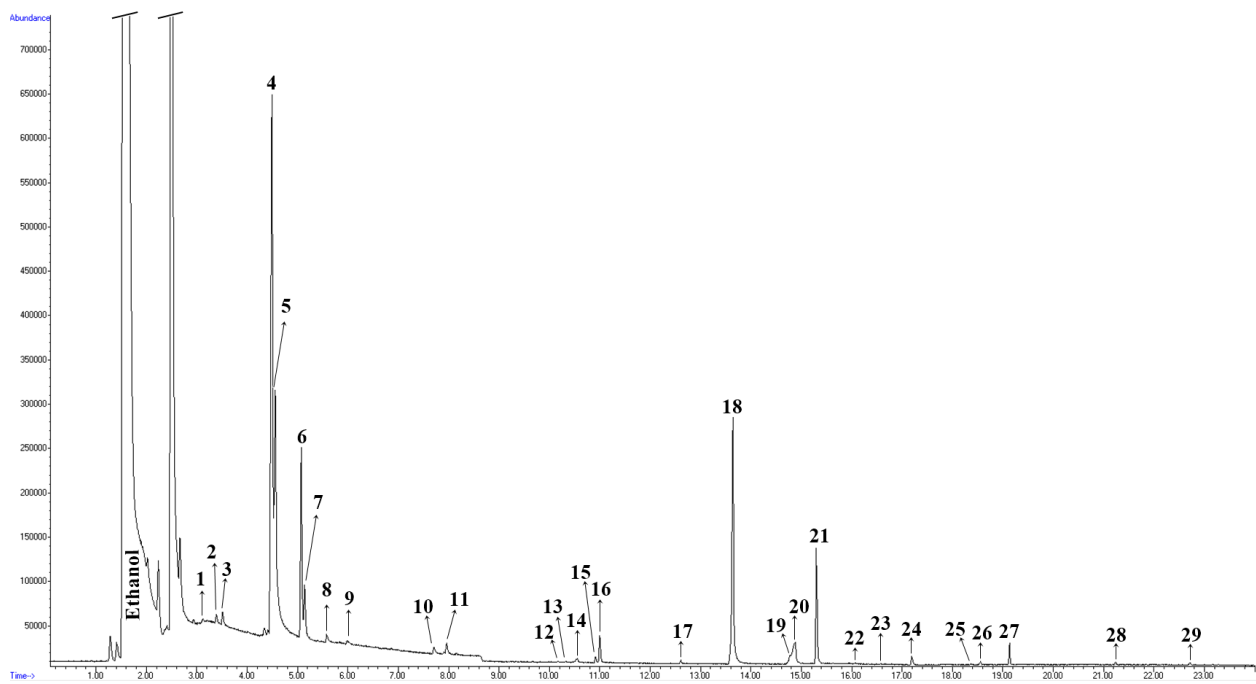
Slika 7.17. TIC hromatogram vina Prokupac anis



Slika 7.18. TIC hromatogram vina Prokupac cimet



Slika 7.19. TIC hromatogram vina Prokupac pelin



Slika 7.20. TIC hromatogram vina Prokupac sladić



ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

КИНЕТИКА АЛКОХОЛНЕ ФЕРМЕНТАЦИЈЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ВИНА ДОБИЈЕНОГ ОД ШИРЕ СА ДОДАТКОМ ЛЕКОВИТОГ БИЉА

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Светлана Х. Лакићевић



**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације

**КИНЕТИКА АЛКОХОЛНЕ ФЕРМЕНТАЦИЈЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА
ВИНА ДОБИЈЕНОГ ОД ШИРЕ СА ДОДАТКОМ ЛЕКОВИТОГ
БИЉА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Светлана Х. Лакићевић



ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

КИНЕТИКА АЛКОХОЛНЕ ФЕРМЕНТАЦИЈЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ВИНА ДОБИЈЕНОГ ОД ШИРЕ СА ДОДАТКОМ ЛЕКОВИТОГ БИЉА

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Светлана Х. Лакићевић