

**mr Vladimir S. Puškaš**

**UTICAJ TEHNOLOŠKIH FAKTORA U  
PROIZVODNJI CRVENIH VINA NA  
SADRŽAJ I STABILNOST KATEHINA I  
NJIHOVIH OLIGOMERA**

**Doktorska disertacija**

**Novi Sad, 2010.**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b>	<b>3</b>
<b>2.1. PODELA I STRUKTURA FENOLNIH JEDINJENJA</b>	<b>4</b>
2.1.1. <i>Flavonoidi</i>	5
2.1.1.1. <i>Flavonoli</i>	6
2.1.1.2. <i>Antocijani</i>	7
2.1.1.3. <i>Flavan-3-oli i njihovi oligomeri</i>	12
2.1.2. <i>Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture</i>	16
<b>2.2. SADRŽAJ FENOLNIH JEDINJENJA U GROŽĐU</b>	<b>18</b>
<b>2.3. SADRŽAJ FENOLNIH JEDINJENJA U CRVENIM VINIMA</b>	<b>21</b>
2.3.1. <i>Maceracija</i>	21
2.3.1.1. <i>Uticao trajanja maceracije</i>	24
2.3.1.2. <i>Uticao kvašenja i potapanja klobuka</i>	26
2.3.1.3. <i>Uticao temperature maceracije</i>	27
2.3.1.4. <i>Uticao sumpor-dioksida i etanola</i>	28
2.3.1.5. <i>Uticao odnosa čvrste i tečne faze u kljuku</i>	29
2.3.1.6. <i>Uticao kvasca na fenolna jedinjenja vina</i>	31
2.3.1.7. <i>Uticao obrade vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju</i>	32
<b>2.4. FENOLNE MATERIJE I SENZORNE OSOBINE CRVENIH VINA</b>	<b>35</b>
2.4.1. <i>Boja crvenih vina</i>	35
2.4.2. <i>Ukus vina</i>	37
<b>2.5. UTICAJ FENOLNIH MATERIJA GROŽĐA I VINA NA ZDRAVLJE LJUDI</b>	<b>37</b>
<b>2.6. ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL CRVENIH VINA</b>	<b>41</b>
2.6.1. <i>Slobodni radikali i oksidativni procesi</i>	41
2.6.1.1. <i>Definicija i podela slobodnih radikala</i>	41
2.6.1.2. <i>Slobodni radikali u ljudskom organizmu</i>	42
2.6.1.3. <i>Oksidativno oštećenje primarnih biomolekula u humanom organizmu</i>	44
2.6.2. <i>Antioksidanti</i>	45
2.6.2.1. <i>Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti</i>	49
2.6.3. <i>Antioksidanti u crvenim vinima</i>	51
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>55</b>

<b>3.1 MATERIJAL</b>	<b>55</b>
<b>3.2 METODE</b>	<b>58</b>
3.2.1. <i>Sadržaj ukupnih kiselina</i>	58
3.2.2. <i>Sadržaj ukupnog sumpor- dioksida</i>	58
3.2.3. <i>Određivanje sadržaja šećera u širi</i>	59
3.2.4. <i>Određivanje boje vina</i>	59
3.2.5. <i>Sadržaj ukupnih antocijana</i>	60
3.2.6. <i>Indeks <math>A_{280}</math></i>	61
3.2.7. <i>Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja</i>	61
3.2.8. <i>Određivanje flavan-3-ola</i>	62
3.2.9. <i>HPLC analiza vina</i>	63
3.2.10. <i>Antiradikalaska aktivnost vina</i>	64
3.2.11. <i>Statistička obrada rezultata</i>	65
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	<b>66</b>
<b>4.1 UTICAJ USLOVA MACERACIJE NA BOJU I FENOLNA JEDINJENJA CRVENIH VINA</b>	<b>66</b>
4.1.1. <i>Uticao trajanja i temperature maceracije na sadržaj fenolnih jedinjenja</i>	67
4.1.2 <i>Uticao trajanja i temperature maceracije na boju crvenih vina</i>	73
4.1.3 <i>Uticao odnosa čvrste i tečne faze u kljuku na fenolna jedinjenja vina</i>	77
4.1.3.1. <i>Uticao dodatka šepurine na fenolna jedinjenja vina</i>	77
4.1.3.2. <i>Uticao dodatka semenki na fenolna jedinjenja vina</i>	85
4.1.3 <i>Uticao odnosa čvrste i tečne faze u kljuku na boju vina</i>	92
4.1.3.1. <i>Uticao dodatka šepurine u kljuk na boju vina</i>	92
4.1.3.2. <i>Uticao dodatka semenki u kljuk na boju vina</i>	96
<b>4.2. UTICAJ OBRADU VINA SREDSTVIMA ZA BISTRENJE I STABILIZACIJU NA FENOLNA JEDINJENJA I BOJU</b>	<b>99</b>
<b>4.3. ESR SPEKTROSKOPSKO ODREĐIVANJE ANTIRADIKALSKE AKTIVNOSTI VINA</b>	<b>107</b>
4.3.1. <i>Korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i antiradikalaska aktivnosti vina</i>	113
4.3.2. <i>Uticao obrade vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju na antiradikalasku aktivnost</i>	117
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	<b>119</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>122</b>



# 1. UVOD

Vino je proizvod alkoholne fermentacije šire i/ili kljuka grožđa koji se karakteriše veoma složenim hemijskim sastavom. Hemijski sastav vina zavisi od stepena zrelosti i kvaliteta grožđa, kao i agroekoloških uslova pod kojima se grožđe gaji. Posebno treba istaći značaj primenjenih tehnoloških postupaka u preradi grožđa i vinifikaciji. Tehnološki postupci primarne prerade grožđa, upotrebljena enološka sredstva, temperaturni režim alkoholne fermentacije maceracija, prisustvo kiseonika, uslovi nege i čuvanja vina, obrada i finalizacija vina, imaju značajan uticaj na senzorna svojstva i hemijski sastav vina.

Početkom XX veka zapažen je blagotvoran uticaj crvenih vina na ljudski organizam. Jedno od značajnijih istraživanja, koje je potvrdilo takva zapažanja je anketa koju je sprovedla Svetska organizacija za zdravstvo na preko 1 000 000 stanovnika iz 18 razvijenih zemalja. Anketa je obuhvatala 16 različitih faktora bitnih za ljudsko zdravlje. Nakon obrade rezultata ankete ustanovljeno je da u zemljama gde je veća potrošnja vina, smrtnost od kardiovaskularnih oboljenja je za 3 - 5 puta manja u poređenju sa zemljama gde je potrošnja vina mala. U Francuskoj je dokazano da pojava oboljenja, vezanih za konzumaciju alkoholnih pića, daleko ređa u regionima gde se vino koristi kao sastavni deo obroka, u odnosu na regione u kojima se koriste jaka alkoholna pića. Navedena istraživanja, kao i mnoga druga, su ukazala na potrebu da se ustanovi koje su to komponente vina koje ga čine, kako je Paster rekao, "najhigijenskim pićem" i koje doprinose boljem zdravstvenom stanju ljudi.

Naučnim istraživanjima ustanovljeno je da se blagotvorno delovanje vina može pripisati fenolnim jedinjenjima. Različitim *in vivo* i *in vitro* eksperimentima dokazano je da fenolna jedinjenja pozitivno deluju na krvne sudove, štite od štetnog sunčevog i radioaktivnog zračenja, deluju kao antiinflamatorni, antivirusni, antikariogeni i antikancerogeni agensi, a poseduju i značajnu antioksidativnu aktivnost.

Fenolna jedinjenja su široko rasprostranjena heterogena grupa sekundarnih biljnih metabolita. Posebnu pažnju istraživača privukli su proantocijanidoli (proantocijanidini ili kondenzovani tanini) koji se nalaze najčešće u lignoceluloznim delovima biljke. Tako se i u grozdu proantocijanidoli nalaze uglavnom u čvrstim delovima, a samo u tragovima u pulpi bobice. Posmatrajući grozd u celini, 70 - 80 % ovih komponenti skoncentrisano je u semenkama, a preostali deo, u približno istom odnosu, raspoređen je u peteljkovini i pokožici.

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 drugih agroekoloških uslova, kao i od primenjenog postupka vinifikacije. Tehnološki uslovi proizvodnje, pH, sumpor-dioksid, etanol, temperaturni uslovi, kao i udeo čvrste faze u kljuku od presudnog su značaja za ekstrakciju fenolnih jedinjenja. Odnos fenolnih jedinjenja u vinu, intenzitet i stabilnost boje crvenih vina, osim načina vinifikacije u mnogome zavise i od načina obrade, uslova čuvanja i zrenja vina.

Cilj rada je bio ispitivanje uticaja tehničko-tehnoloških uslova proizvodnje na boju i sadržaj fenolnih jedinjenja vina dobijenih od grožđa dve sorte vinove loze: Cabernet sauvignon i Merlot u toku tri godine (berbe).

U prvoj fazi (berba 2003. godine) ispitan je uticaj temperature i dužine maceracije na sadržaj fenolnih jedinjenja, flavan-3-ola, antocijana i boju vina.

U drugom delu (berba 2004. godine) ispitan je uticaj povećanog udela šepurine i semenki u kljuku na sadržaj fenolnih jedinjenja, flavan-3-ola, antocijana i boju vina. Maceracija kljuka sa povećanim udelom čvrstih delova grozda vršena je na temperaturi 30 °C u toku 6 i 9 dana.

Uticaj obrade vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju na sadržaj fenolnih jedinjenja, flavan-3-ola, antocijana i boju vina, ispitan je u vinima proizvedenim iz kljuka sa povećanim udelom šepurine i semenki u kljuku (berba 2005). Za obradu vina upotrebljena su dva organska sredstva (albumin i želatin) i dva neorganska sredstva (bentonit i polivinipolipirolidon).

Primenom elektron spin rezonantne (ESR) spektroskopije ispitana je antiradikalska aktivnost vina proizvedenih iz kljuka sa povećanim udelom šepurine i semenki. Istom metodom ispitan je uticaj obrade vina na antiradikalsku aktivnost vina.

## 2. PREGLED LITERATURE

Narodi u područjima oko Sredozemnog, Crnog i Kaspijskog mora - u Egiptu, Maloj Aziji, Mesopotamiji, Zakavkazju i severnom Iranu, gajili su vinovu lozu pre devet hiljada godina. Pisani tragovi o proizvodnji vina datiraju sa početka četvrog milenijuma p.n.e. Prema nekim autorima vino se u tom periodu proizvodilo u Egiptu, dok drugi istraživači, kolevkom vinarstva smatraju južnu Kavkaziju, severozapadne delove Turske, severne delove Iraka, Azerbejdžan. Početci savremenog vinarstva vezuju se za XIX vek ulaskom nauke u ovu oblast. Svojim delom "Studija o vinu" Pasteur je, 1866. godine, postavio temelje današnje tehnologije vina.

Vino je proizvod dobijen potpunom ili delimičnom alkoholnom fermentacijom kljuka ili šire od svežeg grožđa plemenitih sorti vinove loze. Klasifikacija vina vrši se prema različitim kvalitativnim karakteristikama: sadržaju neprevrelog šećera, sadržaju alkohola, sadržaju ugljen-dioksida, boji, geografskom poreklu. Prema boji, vina se razvrstavaju na: bela, roze i crvena (crna). Osnovne razlike između belih i crvenih vina potiču od sirovine upotrebljene za proizvodnju i načina vinifikacije. Belo vino proizvodi se postupkom vinifikacije grožđa, odnosno šire, od belih sorti vinove loze, a moguće ga je proizvesti i od grožđa crnih sorti vinove loze, kod kojih pulpa ne sadrži antocijane. Proizvodnja belih vina nakon operacija primarne prerade grožđa, koje podrazumevaju i potpuno odvajanje čvrstih delova grozda, nastavlja se alkoholnom fermentacijom grožđanog soka - šire. Roze se proizvodi pretežno od grožđa crvenih i crnih sorti vinove loze, dok se crveno (crno) vino proizvodi vinifikacijom grožđa crnih sorti vinove loze. Vinifikacija kljuka je ključna operacija za proizvodnju crvenih vina. Kljuk je izmuljano grožđe sa ili bez šepurine. U toku ove operacije mnogobrojne komponente grožđa iz čvrstih delova prelaze u vino. Najvažniju kvalitativnu razliku između belih i crvenih vina, čini veći sadržaj fenolnih jedinjenja u crvenim vinima.

Fenolna jedinjenja se u fazi maceracije ekstrahuju iz čvrstih delova grozda i utiču na boju i senzorna svojstva crvenih vina. Nakon zapažanja i nedvosmislenih potvrda o blagotvornom uticaju fenolnih jedinjenja, pre svega proantocijanidola, na ljudski organizam, posebna pažnja posvećuje se kvalitetu, sastavu i iskorišćenju fenolnog potencijala crnog grožđa.

Počeci naučnih ispitivanja na temu fiziološkog delovanja fenolnih jedinjenja mogu se vezati za 1929. godinu, kada je u Francuskoj sprovedena obimna anketa koja je obuhvatila 100 000 ljudi iz različitih regiona. Anketa je bila sprovedena sa namerom da se utvrdi značaj vina u ljudskoj ishrani na osnovu dužine života stanovništva u pojedinim regijama. Rezultati ankete su pokazali da su ljudi dugovečniji u regionima gde je vino tradicionalno piće u odnosu na regije gde je veća potrošnja jakih alkoholnih pića. Takođe je zapaženo da su posledice štetnog uticaja alkohola češće kod ljudi u regijama gde su jaka pića tradicionalna, u odnosu na vinogradarsko-vinarske regije (*Damiani, P. i sar. 1986*). Ova anketa imala je određene nedostatke, pošto nisu uzeti u obzir drugi faktori kao što su: način života, ishrane, broj stanovnika na jednog lekara itd. Greške i nedorečenosti predhodne ankete otklonjeni su anketom sprovedenom od strane Međunarodne organizacije za zdravstvo, koja je obuhvatila 18 razvijenih zemalja, i ukupno 100 miliona stanovnika. Cilj ove ankete je bio ispitivanje uticaja 16 parametara na smrtnost od kardiovaskularnih oboljenja (*World health statistics annual for 1970*). Na osnovu rezultata ankete, jedan od zaključaka je da postoji obrnuta zavisnost između smrtnosti od infarkta miokarda i konzumiranja vina (*St Leger, A.S., 1979*), odnosno, vino verovatno sadrži neke komponente koje imaju zaštitni efekat i umanjuju štetno delovanje alkohola. Mnogobrojnim istraživanjima dokazano je pozitivno fiziološko delovanje umerenog konzumiranja crvenih vina na ljudski organizam. Kasnijim detaljnim istraživanjima dokazano je da je za ovakve rezultate zaslužna fenolna jedinjenja, kojima su crvena vina bogata.

Osim kardioprotektivnog delovanja, često u literaturi pominjanog pod nazivom „Francuski paradoks“, fenolna jedinjenja ispoljavaju baktericidno, antivirusno, antikancerogeno delovanje, a imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala (*Laparra i sar. 1979, Konowalchuk i sar., 1976, Uchida i sar. 1987*).

## **2.1. PODELA I STRUKTURA FENOLNIH JEDINJENJA**

Fenolna jedinjenja predstavljaju široko rasprostranjenu grupu biljnih metabolita koja mogu biti vrlo jednostavne struktura, kao što su fenolne kiseline, ili vrlo složene strukture, odnosno, polikondenzovana jedinjenja kao što su proantocijanidoli. Zajednička karakteristika fenolnih jedinjenja je da sadrže aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa (*Robards i sar., 1999*). U grožđu i vinu nađena su različita fenolna jedinjenja: fenolne kiseline (derivati benzoeve i cimetine kiseline), flavonoli (glikozidi kampferola i kvercetina), flavan-3-oli (katehin, epikatehin i njihovi oligomeri), dihidroflavonoli (dihidrokvercetin,



dihidrokemferol, hamnozid) i antocijani (malvidin, cijanidin, peonidin, petunidin i delfinidin) (*German i sar. 1997*).

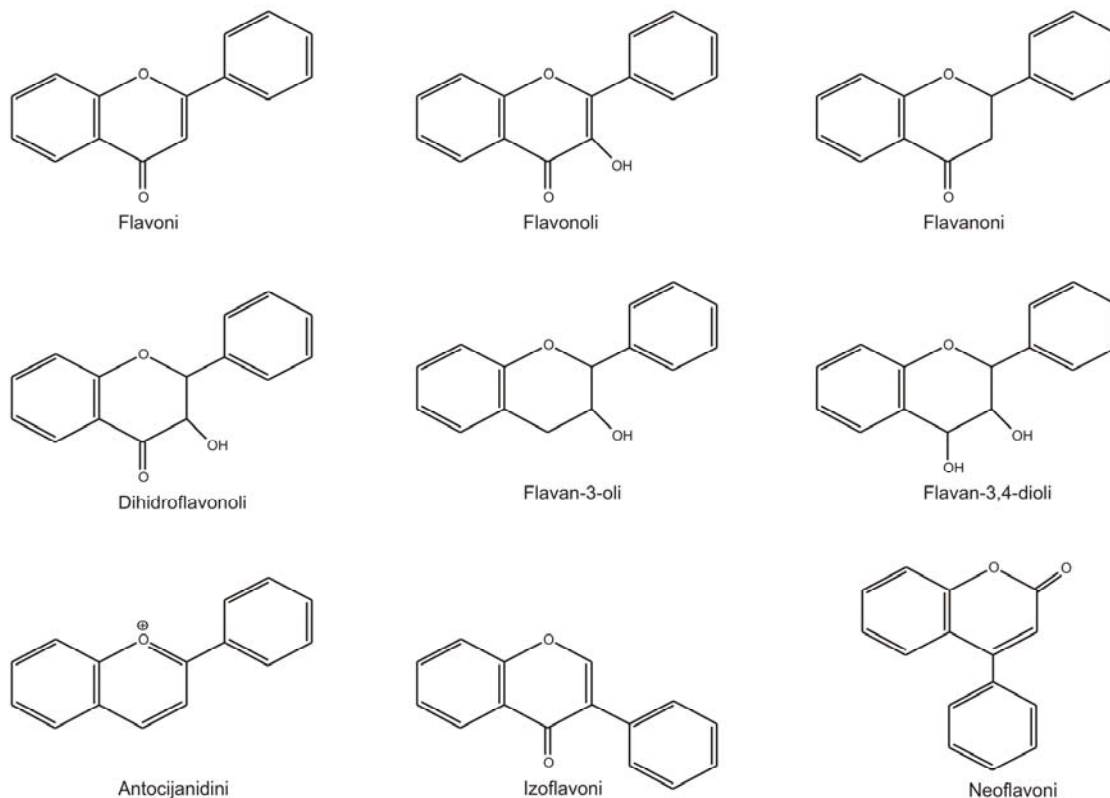
U literaturi se navode različite klasifikacije fenolnih jedinjenja, a *Spranger (1993)* je ova jedinjenja svrstao u sledeće grupe:

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

### *2.1.1. Flavonoidi*

Flavonoidi su jedinjenja sa 15 atoma ugljenika u osnovnoj C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> strukturi, od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C) (*Cook i Samman, 1996*). Ostalih šest ugljenikovih atoma čine benzenski prsten B povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji dva (flavoni, flavonoli, flavononi, dihidroflavoni, flavan-3-oli, flavan-3,4-dioli i antocijanidini), tri (izoflavoni) i četiri (neoflavoni). Strukturne formule osnovnih grupa flavonoida prikazane su na slici 1.

Različite grupe flavonoida nastaju promenom oksidacionog stanja heterocikličnog prstena i uvođenjem supstituenata na ugljenikove atome u položaje 2, 3 ili 4. Flavonoli, antocijani, flavan-3-oli i njihovi kondenzovani proizvodi (tanini ili proantocijanidoli) su najzastupljeniji flavonoidni molekuli u grožđu i vinu, dok su flavan-3,4-dioli prisutni u manjoj količini. Flavonoidi mogu biti slobodni ili polimerizovani sa drugim flavonoidima, šećerima (glikozidi) i neflavonoidima (acilovani derivati).



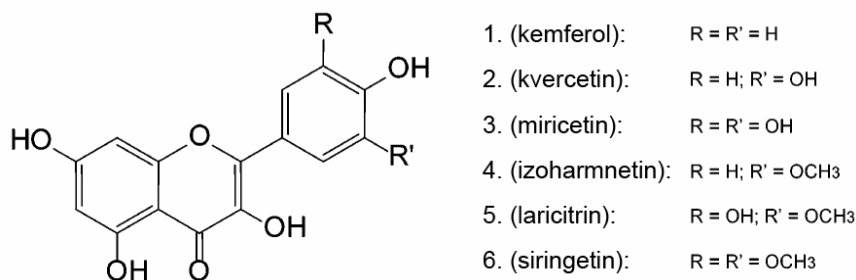
**Slika 1.** Strukture osnovnih grupa flavonoida

### 2.1.1.1. Flavonoli

Flavonoli su flavonoidi pronađeni u mnogim biljnim vrstama, uglavnom u obliku glikozida. To su pigmenti žute boje koji određuju boju belih vina, dok su u crvenim vinima maskirani antocijanima-crvenim pigmentima. Sinteza flavonola se uglavnom odvija u pokožici bobice (*Price i sar., 1995*). Ekstrakcija flavonola iz pokožice odvija se u fazi maceracije.

Hidroksilne grupe u B prstenu flavonola mogu se nalaziti na C-4, C-3' i C-4' i C-3', C-4' i C-5', pa su u grožđu i vinu prisutni kempferol, kvercetin i miricetin. Metilovanjem 3'-OH kvercetina nastaje izorhamnetin. Kempferol, kvercetin i njihovi derivati, prisutni su kako u belom tako i crnom grožđu i vinu, dok su miricetin i izorhamnetin i njihovi derivati utvrđeni samo u crnom grožđu i crvenim vinima. Struktura flavonola grožđa prikazana je na slici 2. U grožđu flavonoli egzistiraju isključivo kao 3-glikozidi, dok se u vinu nalaze i aglikoni kao rezultat hidrolize u kiseloj sredini. Glukoza je najzastupljeniji šećer na C-3 ugljenikovom atomu kempferola, kvercetina, miricetina i izorhamnetina, ali je pronađena i glukuronska kiselina (*Cheyrier i Rigaud, 1986*). U grožđu pronađene su najveće količine kvercetin-3-O-

glukozida i kvercetin-3-O-glukuronida (*Price i sar., 1995, Downey i sar., 2003*). Osim toga, 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 (*Cheyrier i sar., 2003*). Metilovani trisupstituisani flavonoli ili njihovi triglikozidi su u grožđu i vinu pronađeni tek u nekoliko uzoraka.



**Slika 2.** Strukture flavonola grožđa

Produkt metilovanja miricetina na C-3', poznat je pod nazivom laricitrin. Siringetin je dimetoksi derivat miricetina sa metoksi grupama na položajima C-3' i C-5'. Siringetin 3-glukozid i siringetin 3-(6''-acetil)glukozid po prvi put su utvrđeni u gožđu i vinu Cabernet sauvignon iz Kalifornije (*Wang i sar., 2003*).

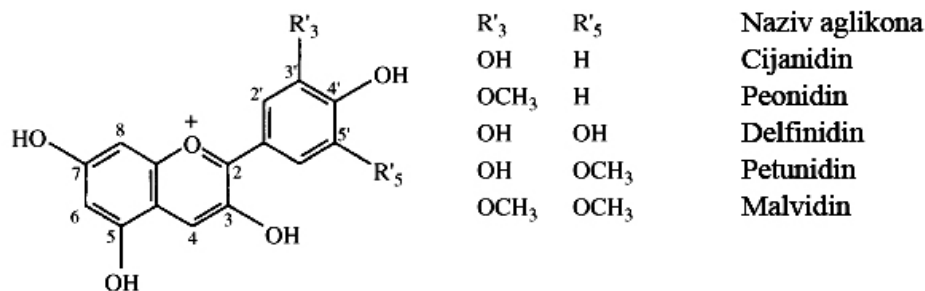
Flavonoli su važni za kvalitet crvenih vina. Reakcijama kopigmentacije stabilizuju flavilijum oblike antocijana u mldim crvenim vinima (*Boulton, 2001*). Vina proizvedena od grožđa sa debljom pokožicom (npr. Cabernet sauvignon) sadrže znatno veće količine flavonola od vina dobijenih od grožđa sa tanjom pokožicom (Grenache) (*McDonald i sar., 1998*). Na sadržaj flavonola značajan uticaj ima osunčanost grožđa. Grožđe iste sorte vinove loze može sadržati i do 10 puta više flavonola ako je bilo izloženo suncu, u odnosu na grožđe sa osenčenih delova čokota (*Price i sar., 1995, Spayd i sar., 2002*).

### 2.1.1.2. Antocijani

Antocijani su biljni pigmenti crvene, ljubičaste ili plave boje. Hidrolizom antocijana nastaju antocijanidini (aglikoni) i šećerna komponenta (ostatak mono- ili disaharida). Antocijanidini se izvode iz hromana, a po hemijskoj strukturi su derivati 2-fenilbenzopirilijum katjona (flavilijumkatjona).

Svi antocijanidini imaju hidroksilnu grupu na C-3 atomu, a većina antocijana su penta- ili heksa-supstituisani, pri čemu se supstituenti (hidroksilna ili metoksi grupa) nalaze na C-5, C-7, C-3', C-4' i C-5'. U prirodi se javlja mali broj aglikona, a njihove osnovne strukture su prokazane na slici 3. Na osnovu rasporeda i položaja hidroksilnih grupa u B prestenu,

razlikuju se tri osnovna jedinjenja antocijana: pelargonidin, cijanidin i delfinidin, a metilovanjem ovih hidroksilnih grupa nastaju: peonidin, petunidin i malvidin. Metilovanje hidroksilnih grupa u prstenu B osnovnih antocijana ograničeno je na hidroksilne grupe u položaju 3' i 5', a slobodna OH-grupa u položaju 4' ima značajnu ulogu u promeni boje antocijana.



**Slika 3.** Struktura antocijanidina grožđa i vina

Iako se u prirodi javlja mali broj aglikona, poznat je izuzetno velik broj glikozida. Glikozidi nastaju vezivanjem ostataka šećera preko hidroksilnih grupa na C-3, C-5 i C-7 atomu. Najčešće se šećerna komponenta nalazi na položaju 3, pri čemu može biti vezana jedna ili dve monosaharidne jedinice. Često se po jedna monosaharidna jedinica nalazi u položaju 3 i 5, a 3,7-diglikozidi i 3,5,7-triglikozidisu manje zastupljeni. Antocijani sadrže D-glukozu, D-galaktozu i L-ramnozu.

Jedna od najvažnijih karakteristika antocijana je što kiseonik u heterocikličnom prstenu može da ima pozitivno naelektrisanje. Zahvaljujući ovoj osobini antocijani se u kiseloj sredini ponašaju kao katjoni i grade soli sa kiselinama, a u alkalnoj sredini kao anjoni i grade soli sa bazama. Mnogi činioci kao što je pH sredine, kompleksiranje s metalima, prisustvo tanina i dr. Utiču na boju antocijana. Boja antocijana zavisi i od broja hidroksilnih grupa na prstenu B. Antocijani sa manjim brojem hidroksilnih grupa su crvene, a sa većim brojem, plave boje. Metilovanjem hidroksilnih grupa na prstenu B povećava se intenzitet boje (*Lajšić i Grujić-Injac, 1998*). Tako je, na primer, pelargonidin oranž-crven, cijanidin tamnocrven, a delfinidin ljubičaste boje.

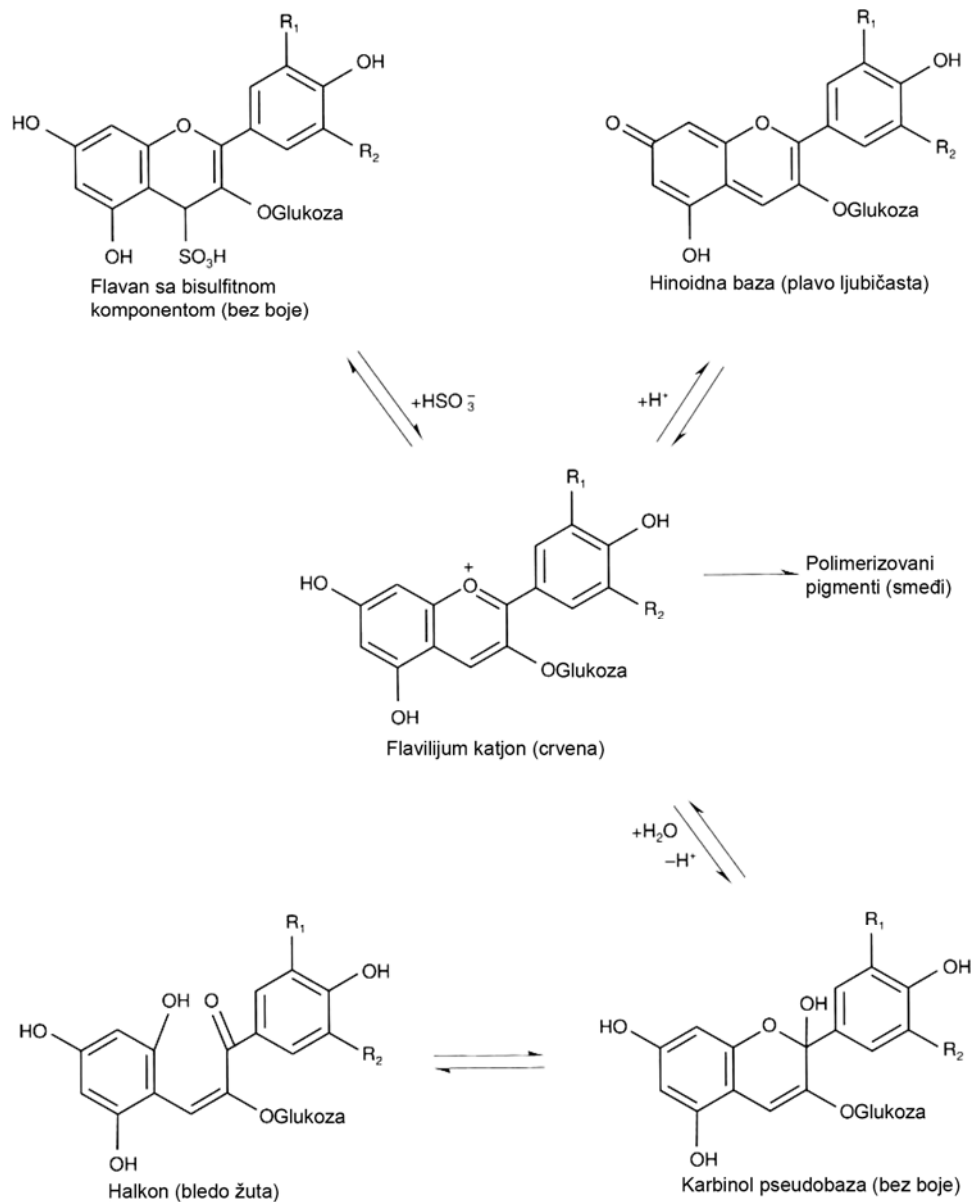
Antocijani su odgovorni za boju crnih sorti grožđa i crvenih vina. Ovi pigmenti se nalaze u spoljašnjim slojevima pokožice bobica grožđa, uglavnom u vakuolama (*Ros Barceló i sar., 1994*) ili u posebnim strukturama – antocijanoplastima (*Pecket i Small, 1980*). Kod nekih sorti (bojadisera) antocijani se javljaju i u pulpi bobica. Najznačajniji antocijani grožđa

su 3-O-glukozidi cijanidina, delfinidina, peonidina, petunidina i malvidina (*Wulf i Nagel, 1978*). Monoglikozidi se nalaze u vrstama roda *Vitis vinifera* dok su u grožđu američkih sorti vinove loze prisutni i diglikozidi.

Prerodom grožđa, tokom fermentacije i maceracije pod dejstvom ugljen-dioksida i alkohola, antocijani se ekstrahuju iz pokožice, prelaze u širu i vinu daju boju. Od prelaska bojenih materija u vino zavisi intenzitet njegove boje. S obzirom da uslovi maceracije mogu biti veoma različiti, ekstrakcija bojenih materija iz pokožice je složen proces, te se ne dobija uvek zadovoljavajući intenzitet boje crvenih vina.

Crne sorte grožđa razlikuju se po sadržaju i vrsti antocijana, što zavisi i od uslova gajenja grožđa, te se vina dobijena od grožđa istih sorti vinove loze, sa različitih geografskih područja, razlikuju po boji. Takođe, boja vina može biti različita i u zavisnosti od načina prerade kao što je trajanje i temperatura maceracije, upotrebljena količina sumpor-dioksida, eventualni dodatak bojadisera radi korekcije boje. U zavisnosti od ovih uslova, boja može varirati od nijansi bližih plavoj do nijansi bližih crvenoj boji.

Prema *Brouillard (1982)*, u kiseloj sredini (vinu) antocijani se nalaze u pet, dinamički uravnoteženih molekulskih oblika: crveno obojeni flavilijum katjoni, ljubičaste hinoidne baze, hinoidne baze, slabo obojene karbinol baze i halkona (slika 4). U normalnim uslovima prisutni su flavilijum katjoni i karbinol baze, dok se hinoidne baze i halkoni javljaju pri višim temperaturama.



**Slika 4.** Dinamička ravnoteža molekulskih oblika antocijana

Intenzitet boje crvenih vina ne zavisi samo od toga koliko će se bojjenih materija ekstrahovati iz pokožice, već i koliko će se antocijana zadržati u vinu tokom čuvanja. U zavisnosti od sorte vinove loze, sadržaj antocijana u mladim vinima iznosi od 100 mg/l (Pinot noir) do oko 1500 mg/l (Sirah, Cabernet sauvignon), a nakon nekoliko godina čuvanja u boci ili buretu, vina sadrže manje od 50 mg/l ovih jedinjenja.

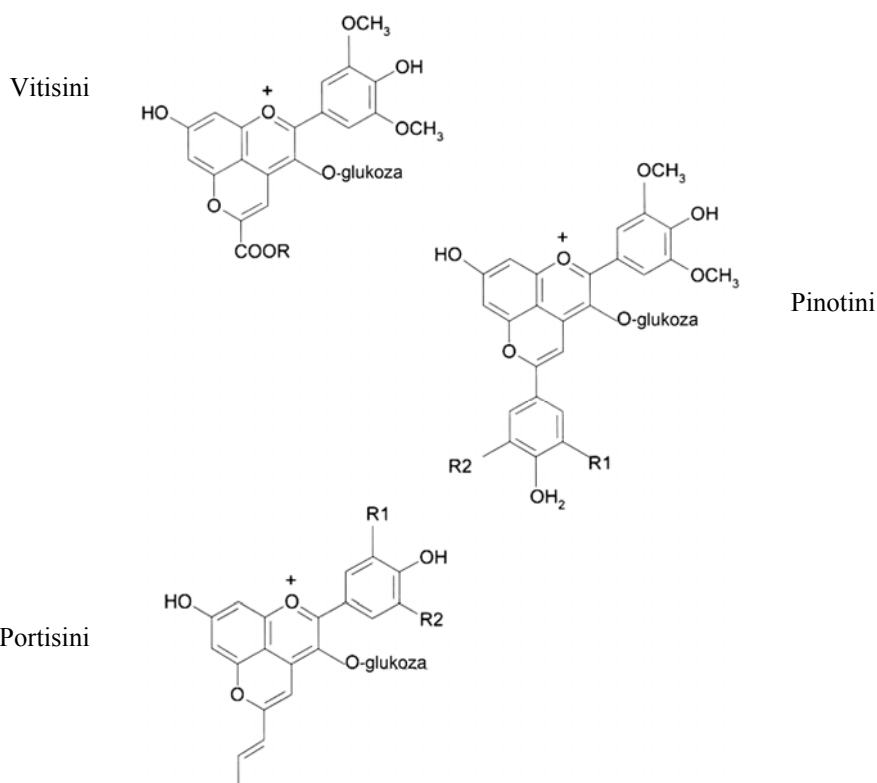
Ispitivanjem uticaja vremena čuvanja (skladištenja) vina na sadržaj antocijana i boju crvenih vina, različitih sorti vinove loze, *Jović i Bukvić (1994)* su utvrdili značajniju razliku u sadržaju antocijana, nijansi boje i indeksu hemijske starosti vina starih 1 i 2 godine, u poređenju sa vinima odležalim 2 i 3 godine. Do promene boje crvenih vina dolazi zbog

strukturnih promena antocijana (od jonizovanih antocijana, karbinola i hinoidne baze) do kondenzovanih antocijana, pa se na osnovu njihovog procentualnog učešća u boji vina može proceniti starost vina. Tokom čuvanja vina najveći deo antocijana sa taninima gradi stabilne tamnomrke komplekse, a manji deo se razlaže pod uticajem temperature, svetlosti i kiseonika ili se istaloži kao koloidna frakcija.

Takođe, antocijani reaguju sa jedinjenjima koja sadrže  $\alpha$ -dikarbonilnu grupu, kao što je diacetil ( $\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$ ), pri čemu nastaju kastavinoli, slabo obojena jedinjenja kojih nema u grožđu (*Castagnino i Vercauteren, 1996*). Do nastanka kastavinola dolazi spontano pod uobičajenim uslovima u kojima se vino čuva. U kiseloj sredini iz kastavinola se mogu regenerisati antocijani (*Ribereau-Gayon, vol 2, 1999*).

Reakcijama antocijana i nusproizvoda kvasaca, kao što su acetaldehid, piruvinska kiselina i vinilfenoli (derivati cinamične kiseline) nastaju jedinjenja koja se nazivaju piranoantocijani (*Schwarz i sar., 2003*) (slika 5). Piranoantocijani imaju piranov prsten između  $\text{C}_4$  i hidroksilne grupe na  $\text{C}_5$  atomu. Veoma su stabilni na posvetljavanje izazvano sumpor-dioksidom, i značajni su za stabilnost boje. Osim nekih portisina, koji su plavičasti, većina piranoantocijana je žuto-narandžaste boje (*Mateus i sar, 2004*).

Vitisin A nastaje već tokom alkoholne fermentacije reakcijom malvidina i piruvinske kiseline, dok reakcijom malvidina i acetaldehida nastaje vitisin B. Ovi produkti, kao i antocijani, mogu biti acilovani ili mogu formirati polimere sa taninima. Do formiranja pinotina dolazi u postfermentativnoj fazi, reakcijom antocijana i derivata cimetine kiseline, kao što je kafena kiselina. Portisini nastaju iz adukata antocijan-piruvinska kiselina i flavanola u prisustvu acetaldehida.



**Slika 5.** Tri grupe piroantocijana pronađenih u vinu

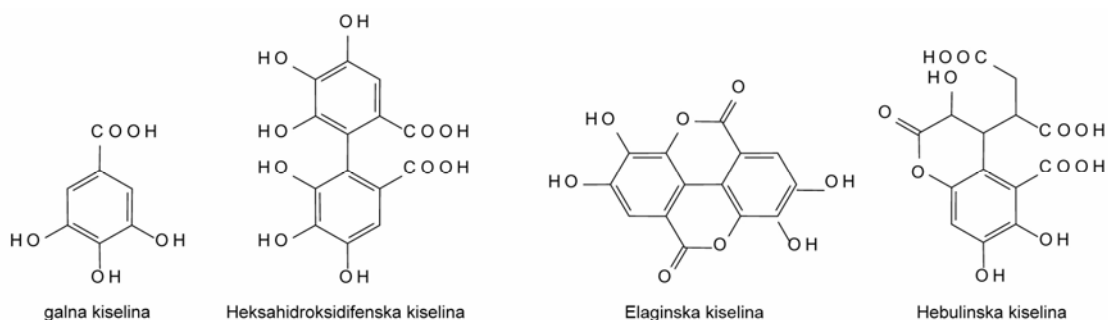
Reakcije kopigmentacije, samoasocijacije kao i nastanak raznih produkata kondenzacije, od samog početka proizvodnje vina, utiče na boju. Stabilnost boje u dužem periodu zavisi od formiranja antocijanin-tanin polimera. Ovi polimeri, u zavisnosti od hemijske prirode, mogu imati žutu, žuto-crvenu, žuto-braon, crvenu i ljubičastu nijansu (Jackson, 2008).

### 2.1.1.3. Flavan-3-oli i njihovi oligomeri

Flavan-3-oli su gradivne jedinice kondenzovanih tanina. Tanini su polikondenzovana jedinjenja velikih molekulskih masa, oporog ukusa. Na osnovu gradisnih jedinica tanini se mogu podeliti na hidrolizujuće (galotanini i elagitanini) i kondenzovane tanine.

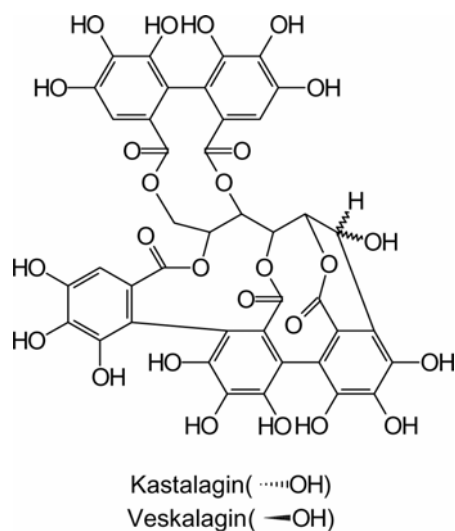
Hidrolizujući tanini su poliestri galne kiseline ili njenih derivata i centralnog molekula šećera, najčešće glukoze. Na slici 6 prikazane su strukturne jedinice galotanina i elagitanina.





**Slika 6.** Strukturne jedinice galotanina i elagitanina

Galotanini su estri galne kiseline i glukoze. Galna kiselina je prirodni sastojak semenki i pokožice grožđa i uvek je prisutna u vinu. Elagitanini su estri elaginske kiseline, heksahidroksidifenske ili hebulinske kiseline i glukoze. Ovi tanini nisu prirodni sastojci grožđa, ali predstavljaju komercijalne tanine koji se koriste kao aditivi. Elaginska kiselina se u vinu nalazi ako je vino odležavalo u drvenim sudovima ili ako su mu dodati komercijalni tanini. U hrastovini, koja se koristi za izradu buradi, od elagitanina prisutni su: vaskalagin i kastalagin (slika 7). Ova jedinjenja imaju značajnu ulogu na sazrevanje vina u drvenim sudovima, njegovu podložnost oksidaciji i boju (*Vivas i Glories, 1993, 1996, Pocock i sar., 1994*).



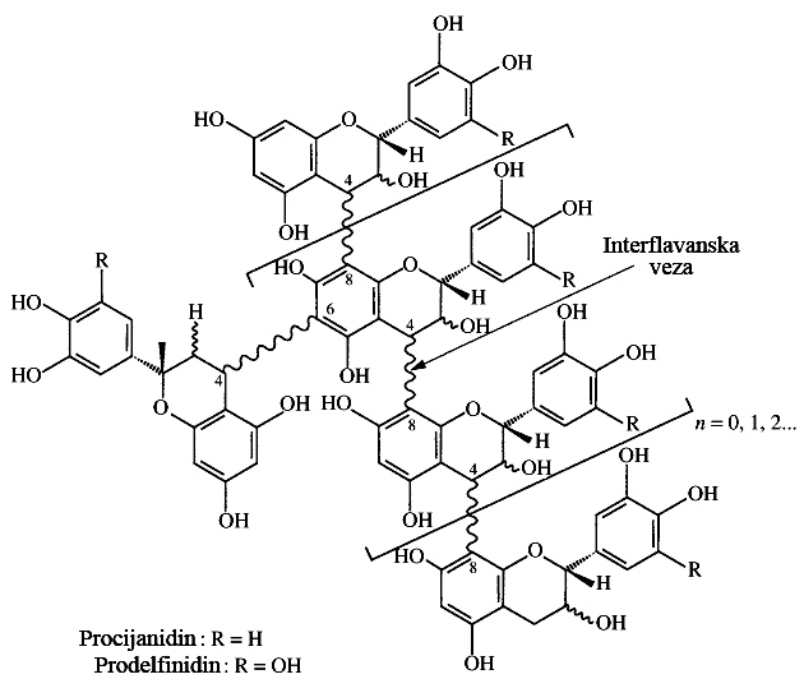
**Slika 7.** Elagitanini hrastovine

Kondenzovani tanini (proantocijanidoli ili proantocijanidini) se sastoje iz dve ili više različito vezane jedinice flavan-3-ola ili flavan-3,4-diola, pri čemu stereohemija supstituenata na C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> atomu pojedinih jedinica, kao i stereohemija međusobno povezanih jedinica ima

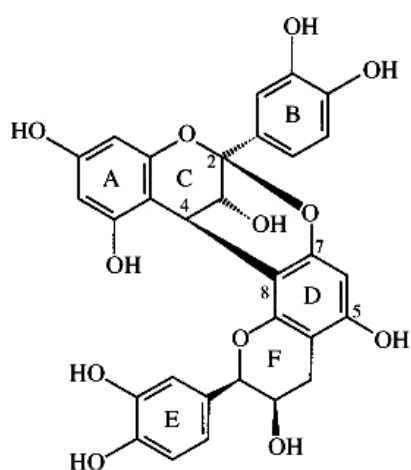


U zavisnosti od vrste ostvarene veze između monomernih jedinica, dimeri proantocijanidola mogu biti razvrstani u dve grupe (*Weinges i sar., 1968, Thomposon i sar., 1972, Vivas i sar., 1996*) (slika 9):

- proantocijanidoli B-tipa, nastaju kondenzacijom dva jedinice flavan-3-ola, vezivanjem na C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> (B<sub>1</sub> - B<sub>4</sub>) ili C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> (B<sub>5</sub> - B<sub>8</sub>).
- proantocijanidoli A-tipa, koji osim veza C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> ili C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> sadrže i epoksidnu vezu između C<sub>5</sub> ili C<sub>7</sub> gornjeg dela i C<sub>2</sub> donjeg dela flavan-3-ola.



Tip B



Tip A

**Slika 9.** Struktura dimera proantocijanidola

Trimeri proantocijanidola, takođe mogu biti razvrstani u dve grupe:

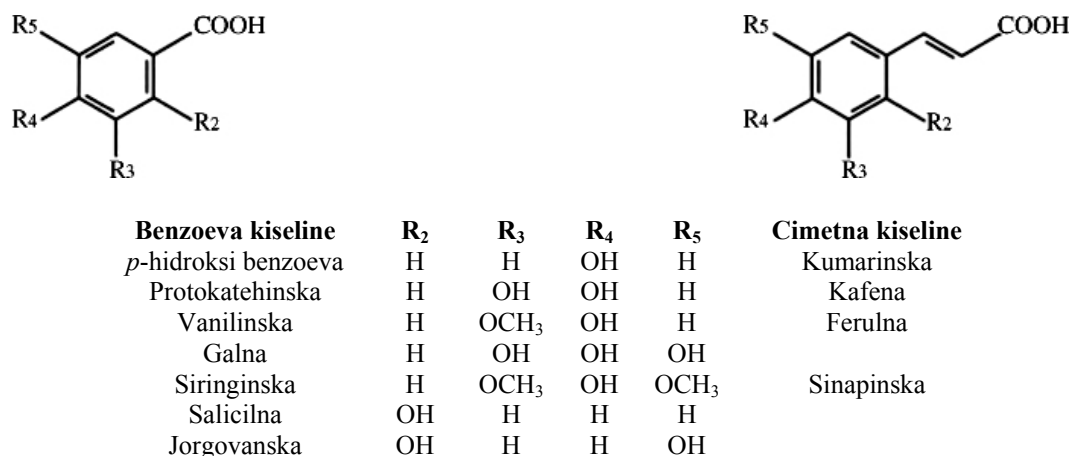
- proantocijanidoli C-tipa veze kao B-tip diemra proantocijanidola

- proantocijanidoli D-tipa sadrže jednu A-tipa i jednu B-tipa diemra proantocijanidola.

Proantocijanidoli su zastupljeni u svim čvrstim delovima grozda. Količina koja se rastvori i pređe u vino zavisi od sorte i načina vinifikacije, a kreće se u granicama 1 - 4 g/l. Sadržaj polimera veći je od sadržaja monomera katehina i epikatehina (Revilla, 1997, Bogdanović, 2000).

### 2.1.2. Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture

Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture, fenolne kiseline i stilbeni, sadrže C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> ili C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> osnovni skelet. Fenolne kiseline su derivati benzoeve i cimetne kiseline. U grožđu i vinu se od derivata benzoeve kiseline nalaze: *p*-hidroksibenzoeva kiselina, protokatehinska, vanilinska, galna, siringinska, salicilna i jorgovanska kiselina, a od derivata cimetne kiseline prisutne su: kumarinska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina (slika 10).



**Slika 10.** Fenolne kiseline groža i vina (Ribereau-Gayon, 1999)

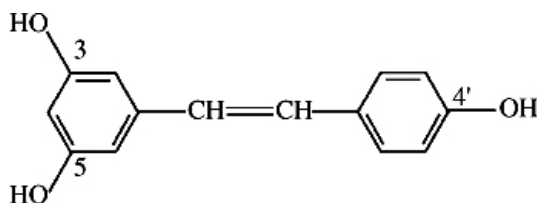
Fenolne kiseline su u grožđu prisutne u glikozidnoj formi, iz koje se mogu osloboditi kiselom hidrolizom, i u obliku estara (galotanini i elagitanini), iz kojih se oslobađaju alkalnom hidrolizom (Ribereau-Gayon, 1965). Slobodne fenolne kiseline prisutne u crvenim vinima, uglavnom su nastale reakcijama kiselom hidrolizom glikozida, alkalnom hidrolizom estara (galotanina i elagitanina) ili termičkom degradacijom kompleksa antocijana (Galvin, 1993). Estri sa vinskom kiselinom, pre svega estar kafene kiseline lako podležu oksidaciji i odgovorni su za brzo potamnjanje šire.

Hidroksicimetne kiseline su delimično zaslužne za boju crvenih vina. jer njihovom oksidacijom nastaju žuto obojena jedinjenja. Takođe iz derivata cimetne kiseline, pod

uticajem kvasaca *Brettanomyces* i nekih mlečnih bakterija (*Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus brevis*) nastaju isparljivi fenoli. Isparljivi fenoli su jedinjenja koja i u veoma malim koncentracijama daju vinu neprijatan miris.

Od stilbena u grožđu i vinu najzastupljeniji je resveratrol, 3,5,4'-trihidroksistilben (slika 11). Resveratrol je fitoaleksin koji nastaje u grožđu kao odgovor na infekciju izazvanu plesnima (*Langcake, 1981*) ili abiotski stres po dejstvom UV-zračenja (*Adrian i sar., 2000*). Pretpostavlja se da UV-B zračenje stimuliše stvaranje enzima odgovornih za biosintezu stilbena, kako bi se ćelije bobica grožđa zaštitile od oštećenja izazvanih UV zracima (*Cantos i sar., 2000*).

U pokožici, semenkama i šepurini nalaze se *trans*- i *cis*-resveratrol, pri čemu je dominantan *trans*-izomer (*Burns i sar. 2002, Pezet i sar., 1996, Melzoch i sar. 2001*), slobodan ili u obliku glikozida. Resveratrol se ekstrahuje tokom vinifikacije crvenih vina.



**Slika 11.** 3,5,4'-trihidroksistilben (resveratrol)

Ekstrakcija resveratrola u pozitivnoj je korelaciji sa koncentracijom etanola tokom alkoholne fermentacije. Takođe je zapaženo da je koncentracije resveratrola dvostruko veća nakon završene jabučno-mlečne fermentacije (46 dana) u odnosu na koncentraciju u vinu nakon alkoholne fermentacije. Kao razlog za to navodi se da je resveratrol oslobođen iz glikozidnih formi  $\beta$ -glukozidaznom aktivnošću jabučno-mlečnih bakterija.

U crvenim vinima dokazano je prisustvo *cis*- i *trans*- izomera resveratrola, pri čemu je *trans*-izomer dominantan u većini vina (*Goldberg i sar., 1995, Soleas i sar., 1995, Lamuela-Reventos i sar., 1995*). Prema istim autorima veće koncentracije resveratrola utvrđene su u vinima iz područja sa hladnijom klimom, kao što su Ontario i Bordo, u odnosu na Kalifornijska ili Australijska vina. Veće koncentracije *cis*- izomera resveratrola, utvrđene su samo u vinu Pinot noir, poreklom iz Bordoa (*Jeandet i sar., 1993*).

Resveratrol se i u vinu nalazi u slobodnoj formi i glikozidno vezan. Koncentracije aglikona su obično niže od glikozidnih oblika resveratrola, uglavnom zavisi od sorte i uslova vinifikacije (*Melzoch i sar, 2001, Gu i sar., 2000*).

## 2.2. SADRŽAJ FENOLNIH JEDINJENJA U GROŽĐU

Fenolna jedinjenja sadrže mnoge biljne vrste. Značaj fenolnih jedinjenja za biljke je u zaštiti od infekcija i obezbeđenju uslova za normalan rast. Fenolna jedinjenja igraju važnu ulogu u obezbeđenju antioksidativne i mikrobiološke zaštite oštećenih biljaka (*Karakaya i sar., 2001*).

Sadržaj fenolnih jedinjenja u grožđu zavisi od sledećih činilaca (*Singleton i sar., 1969, Ribereau-Gayon, 1982, Macheix i sar., 1990*):

- sorta,
- agroekološki uslovi,
- region,
- stepen zrelosti.

Višegodišnjim praćenjem sadržaja fenolnih jedinjenja u grožđu *Revilla i sar. (1997)*, takođe su dokazali različitosti u sadržaju fenolnih jedinjenja kod različitih stonih i vinskih sorti vinove loze, godine proizvodnje odnosno klimatskih uslova i terena. Takođe je konstatovano da su neke bele sorte bogatije po sadržaju fenolnih jedinjenja od crnih.

U periodu sazrevanja grožđa dolazi do brzog nakupljanja fenolnih jedinjenja. Fenolna jedinjenja se nakupljaju sa porastom bobice, kao sekundarni proizvod katabolizma šećera. Kondenzacijom eritrozo-4-fosfata, intermedijernog proizvoda pentozofosfatnog ciklusa, sa fosfoenol pirogrožđanom kiselinom, nastaje benzenov prsten koji predstavlja prekursor fenolnih jedinjenja. Ovaj put biosinteze poznat je kao put šikiminske kiseline, a vodi ka stvaranju benzoeve i cimetine kiseline, kao i aromatičnih aminokiselina, fanilalanina i tirozina. Kondenzacijom tri molekula acetylCoA nastalih u Krebsovom ciklusu, takođe se stvara benzenov prsten. Na putu biosinteze fenolnih jedinjenja značajan enzim je fenilalaninamonijumliaza koji eliminacijom  $\text{NH}_3$  radikala skreće fenilalanin sa puta sinteze proteina ka nastajanju transcimetnih kiselina i ostalih fenolnih jedinjenja.

Tokom sazrevanja grožđa koncentracija antocijana se povećava do pune zrelosti, a počinje da opada u fazi prezrelosti. Ova pravilnost važi za većinu sorti i regiona, s tim što maksimalne količine antocijana variraju u zavisnosti od klime i okruženja. Maksimalna koncentracija antocijana u grožđu može ne poklapa se uvek sa najpovoljnijim odnosom šećer/kiseline.

U ekstraktu semenki koncentracija tanina počinje da opada tokom sazrevanja od pojave šarka, a stepen opadanja zavisi od vremenskih uslova i očigledno je u vezi sa nakupljanjem antocijana u pokožici (*Darne, 1991*). Hipoteza o migraciji proantocijanidola od

semenki u pokožicu, opovrgnuta je ispitivanjima koja su dokazala da ne postoji razlika koncentracije proantocijanidola u pulpi i da je takva cirkulacija fiziološki nemoguća (*Amrani-Joutei, 1993, Amrani-Joutei i sar., 1994, Park i sar., 1995*). Ne dolazi do opadanja sadržaja proantocijanidola u semenkama, već usled visokog stepena polimerizacije, ekstrakcija alkoholno-vodenim rastvaračima postaje veoma otežana (*Augustin i sar., 1997*). Smanjenje količine tanina zavisi i od sorte vinove loze. Neke sorte imaju prirodno nizak sadržaj tanina (Cabernet sauvignon), dok su kod drugih utvrđene znatno veće količine (Cabernet franc, Pinot noir itd) (*Ribereau-Gayon i sar. 1999. vol 2*).

*Chochanska i sar., (1979)* i *Romeyer i sar. (1986)* su utvrdili da je sadržaj proantocijanidola u ranijim fazama porasta bobice, veći i da naglo počinje da opada, da bi se stabilizovao početkom septembra meseca. Dnevne temperature od 35 °C, i visoke noćne temperature inhibiraju sintezu antocijana (*Kliever, 1972*). Odlaganjem berbe od 15 septembra do početka oktobra nije zabeležen značajniji porast sadržaja antocijana, ali je sadržaj proantocijanidola značajno opao, naročito u semenkama (*Revilla i sar., 1997*).

Promene sadržaja antocijana i tanina pokožice i semenki u grožđu tri sorte vinove loze, tokom sazrevanja, prikazane su u tabeli 2.

**Tabela 2.** Količina antocijana i tanina pokožice i semenki u tri faze sazrevanja za tri sorte vinove loze (uzorak: 800 bobica) (*Glories, 1980*)

Sorta	Stepen zrelosti	Antocijani (mg/g)	Tanini pokožice (g)	Tanini semenki (g)
Merlot	Šarak	310	1,55	3,75
	Srednje zrelo	881	2,40	2,18
	Puna zrelost	784	2,14	1,54
Cabernet sauvignon	Šarak	350	2,10	1,95
	Srednje zrelo	822	2,10	1,00
	Puna zrelost	650	2,05	1,00
Cabernet franc	Šarak	291	1,66	2,75
	Srednje zrelo	665	2,00	2,60
	Puna zrelost	722	1,85	2,10

Između 50 i 70 % fenolnih jedinjenja semenki grožđa čine flavan-3-oli, odnosno proantocijanidoli (*Bravo, 1998*). Proantocijanidoli semenki su nižeg stepena polimerizacije u odnosu na proantocijanidole pokožice (*de Freitas, 1995., Jackson, 2008*). Proantocijanidoli semenki sadrže do 28 jedinica flavanola (*Hayasaka i sar., 2003*), dok tanini pokožice mogu sadržati oko 70 monomernih jedinica (*Labarbe i sar., 1999*). Proantocijanidoli semenki imaju izražena taninska svojstva (adstringencija). U semenkama se nalazi oko 60 % ukupnih

fenolnih jedinjenja grožđa, u šepurini oko 20 %, dok se sadržaj ovih jedinjenja u pokožici kreće u granicama 15 – 20 % (*Downey i sar., 2003*). Tokom zrenja grožđa hemijski sastav fenola se značajno menja tako da se sadržaj monomernih flavan-3-ola u semenkama smanjuje za 90 %, a proantocijanidola za 60 %. (*Kennedy i sar., 2000*).

Proantocijanidoli pokožice imaju složenu strukturu. Sadržaj dimera i trimera je relativno nizak. Ovi molekuli imaju koloidnu prirodu i tokom zrenja njihova reaktivnost opada što rezultuje gubitkom agresivnog taninskog karaktera i adstrigencije. Količina proantocijanidola ne opada sa zrenjem tj. proces kondenzacije proantocijanidola se nastavlja. U radu *Augustina i sar. (1997)* utvrđena je korelacija između proantocijanidola koji sadrže samo (-)-epikatehin i zrelosti grožđa, kao i činjenica da tokom kondenzacije proantocijanidoli postaju manje ekstraktibilni. Pokožica sadrži relativno visoke koncentracije kompleksa proantocijanidola sa polisaharidima i proteinima što vinu daje zaokružen ukus. Ostali čvrsti delovi grozda sadrže visoke koncentracije polimerizovanih proantocijanidola i kondenzovanih tanina, zbog čega je izražen utisak adstrigencije. Proantocijanidoli šepurine su nekolidne prirode, a reaktivnost im je slična proantocijanidolima semenki. Količina proantocijanidola u šepurini je visoka u fazi šarka i veoma malo varira tokom zrenja (*Voyatzis, 1984*). Svi delovi grozda sadrže podjednake količine katehina i nisko polimerizovanih proantocijanidola (*Ribereau-Gayon, 1999*).

Pod konceptom "fenolne zrelosti" grožđa podrazumeva se metod određivanja tehnološke zrelosti grožđa na osnovu odnosa fenolna jedinjenja/bojene materije. Tradicionalnim određivanjem tehnološke zrelosti, (odnos šećer/kiseline), ne postiže se uvek maksimalno iskorišćenje antioksidativnog potencijala grožđa (*de Galulejac i sar., 1998*).

Fenolna zrelost obuhvata sadržaj fenolnih jedinjenja, njihovu strukturu i mogućnost ekstrakcije tokom maceracije. Sadržaj fenolnih jedinjenja u fazi pune zrelosti grožđa, dostiže maksimalne vrednosti. U fazi "fenolne zrelosti" grožđa isticanje sadržaja ćelija pokožice je najlakše, pod blagim uslovima prerade (muljanje i maceracija). Maksimalni sadržaj antocijana i ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu dobija se od grožđa obranog u fazi pune zrelosti ili od veoma blago prezrelog grožđa (*Ribereau-Gayon, vol.2, 1999*).



## 2.3. SADRŽAJ FENOLNIH JEDINJENJA U CRVENIM VINIMA

### 2.3.1. Maceracija

Fenolna jedinjenja, pre svega antocijani i proantocijanidoli, ekstrahuju se u fazi maceracije, dajući crvenom vinu karakterističnu boju, ukus i trpkost. Tokom maceracije u tečnu fazu ekstrahuju se i druge komponente, kao što su: aromatična jedinjenja, polisaharidi, azotna jedinjenja i mineralne materije. Navedena jedinjenja se ekstrahuju iz čvrstih delova grozda-pokožice, semenki i nekada iz šepurine. Količina ekstrahovanih fenolnih jedinjenja zavisi od uslova maceracije, odnosa čvrste i tečne faze u kljuku, intenziteta muljanja grožđa, trajanja i uslova pod kojima se maceracija odigrava (temperatura, mešanje, sadržaja alkohola, prisustvo kiseonika i količina sumpor-dioksida). Stepen ekstrakcije takođe zavisi i od sorte vinove loze i zrelosti grožđa. Svega oko 20 - 30 % od ukupnih fenolnih jedinjenja grožđa ekstrahuje se u vino (*Ribereau-Gayon i sar., 1999 Vol.1*)

Proces maceracije protiče u tri faze:

- predfermentativna faza maceracije, koja traje relativno kratko vreme (nekoliko sati do nekoliko dana) i odvija se pre početka alkoholne fermentacije.

- faza maceracije koja se odvija u toku alkoholne fermentacije i traje, u zavisnosti od uslova nekoliko dana (generalno, 2 - 7).

- postfermentativna faza maceracije odvija se nakon završetka alkoholne fermentacije i traje od nekoliko dana do nekoliko nedelja. Produžena postfermentativna maceracija karakteristična je za proizvodnju vina sa potencijalom za sazrevanje i duže odležavanje.

Količina antocijana i proantocijanidola koji se ekstrahuju zavisi od njihove koncentracije u grožđu. Zdravo i zrelo grožđe daje vino sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja. Stepen ekstrakcije fenolnih komponenti zavisi od toga de li se one lakše ili teže ekstrahuju i od uslova ekstrakcije. U početnoj fazi maceracije, fenolna jedinjenja se najlakše ekstrahuju iz pokožice (*Meyer i sar., 1970*). Međurim, s obzirom da je sadržaj fenolnih jedinjenja u pokožici znatno niži nego u semenkama i šepurini, semenke i šepurina su osnovni izvor ovih jedinjenja u vinu.

Ekstrakcija antocijana započinje već u predfermentativnoj fazi maceracije, odmah nakon muljanja grožđa, a pre početka alkoholne fermentacije. Kada koncentracija alkohola dostigne određeni nivo ekstrakcija antocijana je skoro kompletno završena. Tanini pokožice ekstrahuju se zajedno sa antocijanima, ali se ekstrakcija nastavlja u dužem periodu, zbog lokacije tanina u ćelijama. Maceracijom same pokožice dobija se vino slabe fenolne strukture,

dok se uobičajenom maceracijom kljuka koji sadrži semenke i pokožicu dobija izbalansirano vino.

Značajne koncentracije fenolnih jedinjenja pronađene su u šepurini, od čega je 40 - 50 % polimerizovano (*Bourzeix i sar., 1986, Kantz i sar., 1990., Kantz i sar., 1991*). To je upravo razlog što vina proizvedena uz dodatak šepurine kljuk, sadrže veće količine fenolnih jedinjenja od vina proizvedenih bez šepurine. *Sun i sar. (1999)*, pratili su stepen ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz čvrstih delova grozda, tako što su uporedili sadržaj fenolnih jedinjenja u pokožici, semenkama i šepurini pre i posle alkoholne fermentacije sprovedene u toku 10 dana na temperaturi od 25 °C. Tokom maceracije 45 % do 50 % katehina i 42 - 54 % oligomernih proantocijanidola ekstrahovano je u vino bez značajnog uticaja prisustva odn. odsustva šepurine. Razlika u sadržaju polimernih proantocijanidola pre i nakon alkoholne fermentacije iznosila je svega 5 %. Stepem ekstrakcije katehina iz šepurine kretao se u granicama 87,4 - 90,5 %, oligomera i polimera proantocijanidola 94,7 - 95,3 % i 91,1 - 91,8 %. U nekim slučajevima prisustvo šepurine u kljuku tokom maceracije može dati vinu herbalni ukus, dok tanini poreklom iz semenki daju vinu oštrinu i grubost.

Semenke sadrže visoke koncentracije fenolnih jedinjenja i to uglavnom monomere flavan-3-ola i proantocijanidole (*Cheynier i sar., 1997, Ricardo da Silva, 1997, Singleton, 1992*). Prema nekim autorima semenke su značajan izvor proantocijanidola u vinu (*Kovač i sar., 1995., Singleton i sar., 1964*), dok drugi smatraju da je uticaj semenki na sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu mali (*Cheynier i sar., 1989., Ricardo da Silva i sar., 1993*). Tako oprečna mišljenja mogu se pripisati i različitim načinima maceracije primenjenim od strane pojedinih istraživača. Proantocijanidoli semenki postaju rastvorljivi tek kada se kutikula rastvori u etanolu, što je negde na polovini alkoholne fermentacije. Ekstrakcija ovih tanina se nastavlja u toku postfermentativne maceracije. Intenzitet boje vina raste od faze predfermentativne maceracije i u prvoj fazi korespondira ekstrakciji bojenih materija i reakcijama kopigmentacije. Etanol u drugoj fazi prekida reakcije kopigmentacije. U trećoj fazi intenzitet boje raste usled formiranja kompleksa tanin-antocijanin. Postfermentativnu maceraciju karakteriše duboka ekstrakcija kao i modifikacija strukture pigmenata (nastajanje kompleksa tanina-antocijana i reakcije polimerizacije).

Za proizvodnju vina sa potencijalom za sazrevanje, sa dobrom taninskom strukturom, tanini iz semenki su neophodni i važniji od tanina pokožice. U tom slučaju potrebno je primeniti određen stepen aeracije, temperatura u toku i nakon alkoholne fermentacije treba da bude relativno visoka. Trajanje maceracije može biti čak 3 - 4 nedelje. Ovakav postupak može se primeniti samo na zdravom, kvalitetnom grožđu obranom u fazi pune zrelosti. Ukoliko je

grožđe nedovoljno zrelo, produžena maceracija daje vinu herbalni karakter. Produženom maceracijom delimično prezrelog grožđa, grubost i hrapavost tanina iz semenki se minimalizuje.

Ekstrakcija fenolnih jedinjenja u uslovima kada je stepen zrelosti grožđa idealan, relativno je jednostavna operacija. Ako uslovi nisu idealni potrebno je primeniti određene postupke kako bi se kompenzovali nedostaci. U većini slučajeva to su sledeći postupci: pravilan izbor trajanja maceracije, podešavanje odnosa čvrste i tečne faze, sulfiteacija ili oksigenacija, primena odgovarajućih enzima ili selekcionisanih kvasaca, kontrola i regulacija temperature, kvašenje i potapanje klobuka (*Ribereau-Gayon, vol2, 1999*).

Enzimi koje sadrži grožđe ubrzavaju degradaciju ćelijskih zidova i isticanje sadržaja ćelija u širu. Primenom komercijalnih enzimskih preparata kao što su pektinaze, celulaze, hemicelulaze i proteaze, ovi procesi se ubrzavaju. Delovanjem ovih preparata favorizuje se ekstrakcija tanina u odnosu na antocijane čime se dobijaju punija i karakternija crvena vina. *Touzani i sar. (1994)* su primenom enzimskog preparata dobijenog iz *Botrytis cinerea*, oslobođenog lakaza, uspeo da favorizuje ekstrakciju antocijana, što za rezultat ima vino namenjeno za potrošnju dok je mlado.

Sastav fenolnih jedinjenja svakog dela grozda zavisi pre svega od sorte i klimatskih uslova. Proces maceracije treba da bude vođen tako da se izvrši ekstrakcija samo korisnih sastojaka, a u skladu sa sortom vinove loze kao i tipom vina koji se želi proizvesti. Produženom maceracijom dobijaju se vina izražene fenolne strukture, namenjena dugotrajnom starenju-sazrevanju. Kraća maceracija primenjuje se kod vina namenjenih za brzu potrošnju. Ako se vino proizvodi od grožđa lošijeg kvaliteta (sorta, zrelost, sanitarno stanje itd.), proces maceracije potrebno je skratiti kako bi se ograničila ekstrakcije nepoželjnih komponenti. Grubim muljanjem grožđa omogućava se ekstrakcija jedinjenja koja vinu daju gorak i herbalni ukus. Ceđenjem šire favorizuju se tanini koji vinu daju punoću ukusa.

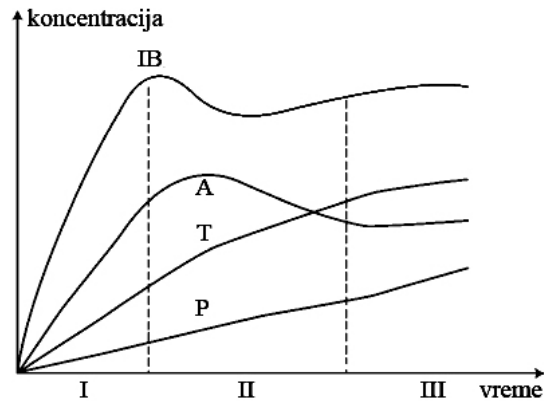
Uopšteno, ako je potrebno proizvesti vino sa izbalansiranom aromom, mekog i zaokruženog ukusa, bez agresivnosti, faza maceracije mora biti kraća, potapanje klobuka minimalno (u početnoj fazi maceracije), a temperatura ispod 30 °C. Za proizvodnju vina sa potencijalom za sazrevanje i dobrom fenolnom strukturom, proantocijanidoli semenki su neophodni i važniji od tanina pokožice. Postupak proizvodnje takvih vina zahteva određen stepen aeracije, temperatura u toku i nakon alkoholne fermentacije treba da bude relativno visoka. Trajanje maceracije može biti čak 3 - 4 nedelje. Ovakav postupak može se primeniti samo na zdravom, kvalitetnom grožđu obranom u fazi pune zrelosti. Ukoliko je grožđe nedovoljno zrelo, produžena maceracija daje vinu herbalni karakter. Produženom

maceracijom delimično prezrelog grožđa, grubost i hrapavost tanina iz semenki se minimalizuje.

Tokom procesa maceracije dolazi do značajnog gubitka ekstrahovanih jedinjenja usled adsorpcije na čvrste delove kljuka (semenke, šepurina) i ćelije kvasaca. Već u fazi maceracije dolazi do promena sadržaja ekstrahovanih fenolnih jedinjenjima. Delimično smanjenje sadržaja antocijana uzrokovano adsorpcijom antocijana na ćelije kvasaca, čvrste delove grozda, promenama strukture (stvaranjem kompleksa antocijanin-tanin) ili zbog reakcija degradacije. Antocijani mogu biti privremeno redukovani u slabije obojene oblike. Reakcija je reverzibilna, što se vidi na osnovu toga da izlaganje novog vina od zdravog grožđa, vazдушnom kiseoniku tokom 24 sata dovodi do porasta intenziteta boje. Za ovu pojavu je najverovatnije zaslužan kompleks antocijan-Fe<sup>3+</sup> (*Ribereau-Gayon, i sar, 1999, Voll*). Etanol utiče na razaranje kompleksa antocijanin-tanin, a slobodni antocijani su slabije obojeni od kompleksa, koji se ponovo formiraju tokom zrenja vina, utičući na stabilnost boje (*Somers, 1979*).

#### *2.3.1.1. Uticaj trajanja maceracije*

Utvrđena je proporcionalna zavisnost između koncentracije fenolnih jedinjenja u vinu i trajanja maceracije. Količina fenolnih jedinjenja intenzivno raste prvih nekoliko dana, a produženjem maceracije porast sadržaja ovih jedinjenja je umereniji (*Sudraud, 1963*). Pojedini delovi grozda sadrže specifična fenolna jedinjenja. U toku maceracije prvo se ekstrahuju antocijani pokožice, za čiju ekstrakciju nije neophodan etanol. Zatim, porastom sadržaja etanola, dolazi do ekstrakcije tanina iz pokožice (Slika 12). Za ekstrakciju tanina iz semenki potrebna je daleko duža maceracija (*Boulton, 1996*). Pokožica sadrži "meke" tanine koji mogu biti gorki u slučaju prezrelog grožđa. Proantocijanidoli semenki su oštrij, ali manje gorki.



**Slika 12.** Dinamika ekstrakcije različitih komponenti grožđa tokom maceracije: A - antocijani, T - tanini, P - polisaharidi, IB - intenzitet boje  
I - predfermentativna maceracije, II - fermentativna maceracija, III - postfermentativna maceracija (Ribereau-Gayon, 1999, vol2)

Maceracijom u trajanju do osam dana dobijaju se vina voćne arome i kvalitetne boje, ali ograničenog sadržaja tanina. Takva vina su namenjena brzom potrošnji. Produženom maceracijom kvalitetnog i zdravog grožđa vino se obogaćuje u taninima. Takva vina su namenjena dugotrajnijem sazrevanju (Ribereau-Gayon, 1999).

*Soleas i saradnici (1998)* ispitivali su kinetiku prelaska 16 fenolnih jedinjenja, kod različitih sorti vinove loze u toku maceracije od 23 dana, na temperaturi 20 - 22 °C. Pri tome je praćena predfermentativna faza maceracije, faza alkoholne fermentacije i period po završetku fermentacije. Utvrđeno je da se u kljuku sorte Pinot noir i Gamay brže dostižu maksimalne koncentracije fenolnih jedinjenja u odnosu na druge sorte. Katehin, kafena, ferulna, galna, vanilinska, p-kumarninska kiselina, kao i izokvercetin su detektovani drugog dana. Maksimalne koncentracije pojedinih jedinjenja su takođe zavisile od sorte vinove loze. Tako je npr. u širi Pinot noir zabeležena najveća koncentracije katehina, epikatehina, ferulne kiseline, vanilinske kiseline, a u slučaju izokvercetina, miricetina, *cis*-resveratrola, *trans*-resveratrola, prednost je imao Cabernet sauvignon.

Ispitivanjem uticaja trajanja maceracije na sadržaj fenolnih jedinjenja utvrđeno je da sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja raste produženjem maceracije do 15 dana. Produžena maceracije uticala je na uvećanje vrednosti nijanse boje. Sadržaj antocijana se povećavao do šestog dana maceracije, a zatim je počeo da opada (*Puškaš, i sar. 2005*). Produženom maceracijom do čak 64 dana od trenutka inokulacije kvasca u kljuk zabeležen je skokovit porast absorbancije na 520 nm (crvena boja) tokom prvih 4 dana, a zatim postupno opadanje (*Yokotsuka, 2000*). Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja (tanoidnih) dostiže maksimum nakon 36 dana.

*Kovač i sar. (1992)* su takođe pratili uticaj trajanja maceracije na sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu do 14 dana. Zabeležen je progresivni rast koncentracije katehina i proantocijanidola tako da suma koncentracija katehina i proantocijanidola od 2 do 7 dana maceracije raste za 230 %. Koncentracija (-)-epikatehina i proantocijanidola B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> i C<sub>1</sub> se povećava, ali koncentracija (+)-katehina i proantocijanidola B<sub>1</sub> je relativno stabilna između drugog i šestog dana maceracije. Od 7 do 14 dana maceracije koncentracije katehina i proantocijanidola se povećala za 20%.

Ekstrakcija katehina i proantocijanidola odvija se drugačije od ekstrakcije antocijana čija koncentracija posle rasta u prvih nekoliko dana, počinje da opada (Ribereau-Gayon, 1982). Produžena maceracija daje vina sa povećanim sadržajem (+)-katehina, (-)-epikatehina i dimera proantocijanidola (*Revilla i sar., 1997*).

### *2.3.1.2. Uticaj kvašenja i potapanja klobuka*

Važan uticaj na ekstrakciju fenolnih jedinjenja ima način mešanja kljuka. Mešanjem se kljuk homogenizuje čime se stvaraju uslovi za ravnomernu i potpuniju ekstrakciju fenolnih jedinjenja. U otvorenim fermentorima, klobuk se potapa mehanički-potiskivanjem. Vino u toku fermentacije može se periodično prepumpavati sa donjeg dela fermentora u gornji i kvasiti klobuk (pumping over) ili se vrši istakanje celokupne tečne faze u fermentaciji sa donjeg dela fermentora i zatim vraćanje u gornji deo, pri čemu se potapa klobuk. Za ove namene često se koriste i rotacioni fermentori ili poklopci koji klobuk stalno drže potopljenim. Tehnike mešanja kljuka, odražavaju se na teksturu i aromu vina i ekstrakciju fenolnih jedinjenja. U zatvorenim fermentorima nije moguće mehanički potapati klobuk. Pretakanje vina (pumping over) može dati slabiji rezultat, pošto se tečnost protiče kroz formirane kanale (linijom manjeg otpora) i ne dolazi u kontakt sa celokupnom čvrstom fazom (*Zoecklein, 1991*). Kontaktni postupci treba da budu blagi kako bi se umanjila ekstrakcija fenolnih jedinjenja koja vinu daju grub ukus i izraženu adstringenciju.

Prema nekim uporednim ispitivanjem utvrđeno je da se maceracijom u rotacionim fermentorima dobijaju intenzivnije obojena i manje adstringentna vina, u odnosu na tehniku „pumping over“ (*Wilson, 1993*). Maceracijom u rotacionim fermentorima takođe prema ekstrahuje se 20 – 30 % više fenolnih jedinjenja (*Zoecklein, i sar., 1991*). *Ewart i sar. (1993)*, postigli su kvalitetiju ekstrakciju fenolnih jedinjenja i bojenih materija, tehnikom istakanja vina iz fermentora i ponovnog vraćanja sa gornje strane, u odnosu na kombinaciju mehaničkog potapanja klobuka i tehnike „pumping over“.

Prepumpavanje (kvašenje) i potapanje klobuka je veoma važno radi homogenizacije kljuka i to kako u pogledu rasporeda temperature i biomase kvasaca, aeracije, tako i radi homogenizacije ekstrahovanih sastojaka. Nakon ceđenja kljuka, daleko manje razlike između samotoka i preševine u pogledu sadržaja tanina javljaju se kod vina kada je kljuk prepumpavan odn. potapan klobuk, u odnosu na vina kod kojih to nije činjeno (*Sudraud, 1963*). Takođe se primenom ovog postupka dobijaju vina sa izraženom strukturom i bez gorčine i herbalnih tonova.

Uporednim ispitivanjem načina maceracije na sadržaj antocijana, ukupnih fenolnih jedinjenja, niskomolekularnih i visokomolekularnih proantocijanidola utvrđeno je da sadržaj antocijana raste do petog (120 h) dana tradicionalnog postupka maceracije, a zatim počinje da opada. Maceracijom u rotacionom fermentoru (rototanku) maksimalan sadržaj antocijana dostignut je nakon 44 h maceracije, a zatim je beležen blagi pad. Tradicionalni postupak maceracije dao je širu (vino) sa većom maksimalnom koncentracijom antocijana od maceracije u rototanku. Visoke koncentracije niskomolekularnih i visokomolekularnih proantocijanidola u rototanku dostižu se nakon 68 h maceracije, i reda veličine su koncentracijama koje se klasičnom maceracijom postižu nakon 120 h maceracije (*Budić-Leto i sar., 2005*).

### *2.3.1.3. Uticaj temperature maceracije*

Temperatura je kod klasične maceracije jedan od najvažnijih faktora kada je u pitanju ekstrakcija fenolnih jedinjenja. Porastom temeprature znatno se ubrzava ekstrakcija fenolnih jedinjenja (*Merida i sar, 1991*). Razlog tome je degradacija ćelijskih zidova čime se ubrzava isticanje ćelijskog sadržaja. Uporednim ispitivanjem uticaja vremena i temperature maceracije zaključeno je da kod kratkotrajne maceracije (4 dana) blago raste sadržaj antocijana i nijansa boje, a intenzivnije se povećava vrednost intenziteta boje, sadržaja proantocijanidola i ukupnih fenolnih jedinjenja. Maceracijom na temperaturi 25 °C, dobijaju se vina lepe boje i sa izraženim voćnim tonovima, namenjena potrošnji dok su mlada, dok maceracijom na 28 °C dolazi do blagog gubitka voćne arome zbog isparavanja aromatičnih komponenti sa formiranim ugljen dioksidom (*Zoecklein, 1991*). Maceracijom na višim temperaturama intenzivira se ekstrakcija tanina, tako da se dobijaju vina namenjena dugotrajnom starenju. Na temperaturi maceracije od 35 °C dobijena su vina sa višim sadržajem fenolnih jedinjenja od vina koja su dobijena na nešto nižim temperaturama (20 - 30 °C). Na višim temperaturama je

takođe zabeležen najizrazitiji pad sadržaja antocijana i porast nijanse boje vina (*Puškaš i sar., 2005*).

Glories (1981), uvodi postupak postfermentativne maceracije na povišenim temperaturama (50 - 60 °C) pri čemu je tečna faza zagrevana direktno, a klobuk indirektno. Kao rezultat dobijena su vina sa visokim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana i intezitetom boje, ali loših senzornih svojstava, adstringentna, rustična. Daleko bolji efekat se dobija postfermentativnom maceracijom na umerenoj temepraturi (30 °C) u toku nekoliko dana.

#### *2.3.1.4. Uticaj sumpor-dioksida i etanola*

Osim zaštitnog, antioksidativnog i antiseptičkog dejstva sumpor-dioksida u kljuku, prisustvo ovog jedinjenja intenzivira ekstrakciju fenolnih jedinjenja, pre svega antocijana iz pokožice. Sumpordioksid razara ćelijske opne pokožice čime olakšava isticanje rastvorljivih komponenti. Sumpordioksid ima je važan ekstrakciju antocijana pri proizvodnji roze vina, koja sadrže manje količine fenolnih jedinjenja. Sulfitacijom kljuka od plesnivog grožđa ne intenzivira značajno se ekstrakcija antocijana, već se ublažava negativno delovanje fenol oksidaza, pre svega lakaze, (koju produkuje *Botritis cinerea*), na bojene materije.

Upotreba sumpor-dioksida u količini 50 mg/l daje bolje rezultate ekstrakcije fenolnih jedinjenja u odnosu na kljuk kome nije dodavan sumpor-dioksid. Sa druge strane efekti dekoloracije prilikom upotrebe sumpor-dioksida u količini od 100 mg/l su daleko izraženiji (*Dacey, 1996*). Povećanjem količine sumpor-dioksida (0, 75 i 150 mg/l), intenzivira se ekstrakcija antocijana, ali se usporavaju reakcije polimerizacije (*Dallas i sar., 1994*). Ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz semeki pojačava se dodatkom sumpor-dioksida, ali je uticaj temperature i dužine maceracije, u pogledu ekstrakcije, daleko važniji (*Oszmianski i sar., 1986*).

Sumpor-dioksid reverzibilno stupa u reakciju pri čemu se bisulfitni jon vezuje za C<sub>4</sub> flavilijum katjona, stvarajući bezbojan oblik. Veće koncentracije sumpor-dioksida u kljuku, uzrok su formiranja većih količina acetaldehida, koje kvasac stvara kao odgovor na prisustvo ovog enološkog sredstva. U toku maceracije, koja se odvija tokom alkoholne fermentacije, produkcija acetaldehida je intenzivnija kod sojeva kvasaca otpornijih na sumpor-dioksid (*Stratford i sar., 1987*). Količina acetaldehida koji se formira tokom alkoholne fermentacije u proporcionalna je količini sumpor-dioksida dodatog pre fermentacije. Formirani acetaldehid na višim temperaturama lako stupa u reakciju sa sumpor-dioksidom, čime se oslobađa



flavilijum jon i na taj način indirektno utiče na boju vina (*Somers i sar., 1987*). Količina sumpor-dioksida 50 mg/l, pre fermentacije, dala je najbolje rezultate ekstrakcije bojenih i fenolnih materija, blagi efekat dekoloracije, i umerene količine acetaldehida u odnosu na fermentaciju uz dodatak 100 mg/l (*Dacey, 1996; Somers i sar., 1987*).

Etanol koji nastaje tokom alkoholne fermentacije pozitivno utiče na ekstrakciju fenolnih jedinjenja. Negativan efekat etanola ogleda se u tome što razara kompleks tanin-antocijanin, usled čega intenzitet boje vina opada već tokom maceracije (*Ribereau-Gayon i sar., 1999, vol. 1*).

### 2.3.1.5. Uticaj odnosa čvrste i tečne faze u kljuku

Jedan od faktora koji ima veoma značajan uticaj na koncentraciju fenolnih jedinjenja u vinu i njegove senzorne karakteristike je odnos čvrste i tečne faze u kljuku (*Scudomore i sar., 1990, Auw i sar., 1996*)

Semenke i šepurina sadrže visoke koncentracije fenolnih jedinjenja i to: galne kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina i dimera B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> i B<sub>4</sub> (*Ricardo da Silva i sar., 1991, Revilla i sar., 1997*). *Kovač i sar. (1995,*) su dodavanjem dvostruke i trostruke količine semenki, u odnosu na prirodnu količinu u grožđu, postigli značajno uvećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, katehina, proantocijanidola, kao i stabilnosti boje vina. Pozitivan uticaj na intenzitet i stabilnost boje objašnjen je ekstrakcijom veće količine fenolnih jedinjenja, koji se ponašaju kao kopigmenti.

Poizvodnja crvenih vina obogaćenih dodavanjem dvostruko veće količine semenki i pokožice u kljuk, nego što ih grožđe prirodno sadrži, tradicionalna je u nekim delovima Španije. Na taj način se dobijaju crvena vina obogaćena fenolnim materijama, jake boje i sa visokim sadržajem suvog ekstrakta. Takva se vina uglavnom koriste za poravku boje i suvog ekstrakta u vinima iz severnijih delova Španije. Vina proizvedena maceracijom kljuka obogaćenog semenkama mogu imati previše naglašen taninski karakter.

*Revilla i sar. (1998)* proizveli su ogledna vina, postupkom klasične vinifikacije od grožđa dve sorte vinove loze - Merlot i Frankovka. Takođe, pod istim uslovima proizvedena su vina od kljuka obogaćenog sa 25 % semenki i 30 % semenki i pokožice. Usporedno su izvršena ispitivanja uticaja obogaćivanja kljuka čvrstim delovima grozda i uticaja ceđenja, na sadržaj fenolnih jedinjenja i senzorne karakteristike vina. Samotok Merlot proizveden od kljuka sa povećanim sadržajem semenki, sadržao je nešto više slobodnih antocijana u odnosu na samotok izdvojen iz kljuka obogaćenog semenkama i pokožicom. Sadržaj slobodnih

antocijana u preševini je bio niži. Bez obzira na niži sadržaj antocijana, nije zabeležen pad intenziteta boje. U slučaju vina Frankovka zabeleženi su suprotni rezultati. Vino dobijeno iz kljuka obogaćenog semenkama i pokožicom sadržalo je više antocijana. Ovakvi rezultati objašnjeni su sortnim razlikama. Sadržaj (+)-katehina, (-)-epikatehina i proantocijanidola B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>, u vinima Merlot i Frankovka, proizvedenim bez ceđenja (samotok) i preševina obogaćenih čvrstom fazom bio je znatno viši u odnosu na kontrolna vina. Senzornom analizom vina Merlot utvrđeno je da vina dobijena od samotoka obogaćena, fenolnim jedinjenjima imaju kompleksniju aromu i prijatan, mada naglašen, taninski karakter, dok je preševina imala tešku aromu i naglašenu adstringenciju. Vino od grožđa Frankovke obogaćenog čvrstom fazom ocenjeno je lošije od kontrolnog zbog prenaplašenog taninskog karaktera, dok je preševina iste sorte imala suviše tešku aromu i izraženu astringenciju.

U ogleđima izvedenim na veliko sa grožđem sorte Vranac, povećana količina čvrste faze u kljuku, maceracijom čitavog grozda ili dodatkom određene količine semenki u kljuk, vino se značajno obogaćuje u sadržaju katehina i proantocijanidola, pre svega B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> u toku trajanja maceracije od sedam dana. Slična je situacija i kada se uporede vina dobijena maceracijom kljuka u dužem vremenskom intervalu (14 dana). Upoređujući vina proizvedena sa istim odnosom čvrste i tečne faze, ali sa različitim trajanjem maceracije zapaža se opadanje količine katehina, proantocijanidola, antocijana kao i drugih parametara. Uzrok takvoj pojavi jesu reakcije polimerizacije čime nastaju polimeri velikih molekulskih masa (*Revilla i sar., 1992*). Antocijani i acetaldehid su takođe uključeni u ove reakcije (*Ribereau-Gayon, 1982*). Dodatkom semenki dobijaju se vina sa nižim sadržajem crvenih monomera u odnosu na crvene i braon polimere, što može biti interesantno sa aspekta stabilizacije boje crvenih vina.

Maceracija kljuka sa povećanim sadržajem semenki vodi srazmernom porastu sadržaja ukupnih fenolnih materija, (+)-katehina, (-)-epikatehina i dimera proantocijanidola, bez obzira na poreklo i sortu grožđa. Trostruko veća količina semenki u kljuku od prirodne, izaziva smanjenje sadržaja slobodnih antocijana u odnosu na kontrolno vino. To dovodi do pretpostavke da je u tom slučaju ekstrakcija bojenih materija znatno intenzivnija od reakcija stabilizacije fenolnim materijama ekstrahovanim iz semenki (*Revilla i sar., 1997*).

Neodvajanje šepurine ili vraćanje određenog procenta šepurine u kljuk može se različito odraziti na kvalitet vina. Prisustvo šepurine značajno povećava koncentraciju tanina, a ne umanjuje mnogo intenzitet boje (*Sudraud i sar., 1963*). Odvajanjem šepurine povećava se sadržaj etanola i kiselina u vinu. Prisustvo šepurine ima pozitivan uticaj na fermentaciju zbog prisutnog kiseonika, koji utiče na brzinu rasta kvasaca, ali i ograničava porast temperature (*Ribereau-Gayon i sar., 1998*). Prema istim autorima, pozitivan uticaj šepurine u

kljuku beleži se pri preradi plesnivog grožđa. Utvrđeno je da tanini šepurine mogu inhibirati lakazu poreklom iz plesni *Botritis cinerea*. Šepurinom se može obogatiti taninskim materijama, vino proizvedeno od grožđa iz mladih zasada. Potpuno ili delimično odvajanje šepurine zavisi pre svega od stepena zrelosti grožđa, kvaliteta šepurine i sorte vinove loze.

Tradicionalni način proizvodnje crvenih vina podrazumeva odvajanje šepurine pre fermentacije pošto ona može dati herbelni ton i povećanu astrignenciju vina (*Ribereau-Gayon, 1976*). Međutim u nekim starijim vinarijama vrši se maceracija uz dodatak određenog dela šepurine radi dobijanja uravnoteženih i "dugovečnih" vina. To se može objasniti visokim sadržajem flavan-3-ola u šepurini što u kombinaciji sa antocijanima daje stabilniju boju u odnosu na varijacije pH i SO<sub>2</sub>, a takođe usporava opadanje sadržaja tanina uzrokovano reakcijama polimerizacije (*Ribereau-Gayon, 1982., Singleton, 1992., Timberlake, 1976*)

Neodvajanje šepurine izazvalo je blage promene u analitičkom sastavu vina i to povećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i pepela, a smanjenje količine vinske kiseline. Senzorna ocena se znatano razlikovala tako da su najbolje ocenjena vina koja su fermentisala u prisustvu 50 % šepurine, a zatim slede varijante sa 25 % i 75 % dodate šepurine (*Kovač i sar., 1980*). Negativna strana neodvajanja šepurine je smanjenje korisne zapremine sudova i mogućnost pojave herbalnog ukusa vina (na travu, zeleno).

Povećan udeo čvrste faze (šepurina, semenke) uzrokovao je smanjenje sadržaja antocijana i porast vrednosti nijanse boje vina (*Puškaš i sar., 2005*). Takođe, povećan udeo čvrste faze daje vina sa nešto višim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja, međutim porast sadržaja fenolnih jedinjenja nije srazmeran povećanju sadržaja čvrste faze u kljuku. *Puškaš i Ružić (2000)* konstatovali su da prisustvo veće količine taninskih materija u vinu izloženom delovanju niskih temperatura štatile antocijane od velikih promena.

Neodvajanjem šepurine u fazi maceracije dobija se vino sa višim sadržajem fenolnih jedinjenja, pre svega (+)-katehina i dimera proantocijanidola, dok je povećanje sadržaja (-)-epikatehina neznatno (*Revilla i sar., 1997*).

### 2.3.1.6. Uticaj kvasca na fenolna jedinjenja vina

Uticaj vinskog kvasca na sadržaj fenolnih jedinjenja i boju crvenih vina može biti od velikog značaja (*Castino, 1982, Yoncheva i sar., 2004*). Upotrebom različitih sojeva kvasaca za fermentaciju kljuka zapažene su znatne razlike u fenolnom sastavu vina. Način delovanja kvasaca na boju i fenolna jedinjenja nije u potpunosti poznat, ali je zapaženo nekoliko mehanizama delovanja. Pre svega dejstvo fizičke prirode, odnosno adsorbcija antocijana na

ćelijske zidove (*Vasserot, 1997, Morata i sar. 2004*). Tokom starenja i zrenja vina, različiti metaboliti kvasca kao piruvinska kiselina (*Fulcrand i sar., 1998*) i acetaldehid (*Dallas i sar., 1996, Romero i Bakker, 1999, Liu i sar., 2000*), reaguju sa različitim grupama fenolnih jedinjenja javljajući se često kao veoma važni činioci stabilizacije pigmenata (vitisin A i vitisin B). Takođe, enzimatska hidroliza uzrokovana periplazmatičnom antocijanin- $\beta$ -D-glukozidazom, praćena je gubitkom boje i absorpcije na 520 nm (*Manzanares i sar., 2000*).

Pojedini sojevi utiču na povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja, monomera antocijana, intenziteta boje vina, dok je nakon fermentacije drugim sojevima utvrđen viši sadržaj flavan-3-ola i proantocijanidola. Sojevi kvasaca, sa slabije izraženim afinitetom za adsorpciju antocijana na ćelijske zidove, produkovali su vina sa višim sadržajem flavan-3-ola i monomera antocijana, što se pozitivno odrazilo na intenzitet boje (*Bartowsky i sar., 2003, Eglinton i sar., 2003, Eglinton i sar., 2004, Caridi i sar., 2004*). Prilikom selekcije kvasaca vodi se računa i o njihovom odnosu prema fenolnim jedinjenjima, zbog čega proizvođači selekcionisanih kvasaca vrše selekciju posebno za proizvodnju crvenih vina.

#### *2.3.1.7. Uticaj obrade vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju*

Bistrenje i stabilizacija vina je neophodan postupak kako bi se iz vina uklonile čestice mutnoće i materije koje vino čine nestabilnim i mogu izazvati naknadna zamućenja. Vino namenjeno tržištu mora biti kristalno bistro, stabilno i bez taloga, osim u nekim slučajevima kada se radi o veoma starim vinima (*Glories, 1974, Kovač, 1979, Mennet i sar., 1969*).

Sredstva za bistrenje i stabilizaciju vina prema poreklu dele se na: neorganska i organska.

Od neorganskih sredstava za bistrenje i stabilizaciju vina najviše su u upotrebi bentoniti. Bentoniti su hidratizani aluminijum silikati opšte formule  $Al_2O_3 \cdot 4 SiO_2 \cdot nH_2O$ . Bentoniti sadrže izmenjive katjona ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  i  $Na^+$ ) koji igraju veoma značajnu ulogu u njihovim fizičko-hemijskim osobinama. Natrijum bentonit se najviše primenjuje u enološkoj praksi. U tretmanu crvenih vina može se koristiti radi uklanjanja koloidnih frakcija bojenih materija i nestabilnih proteina.

Bentoniti uklanjaju iz vina mnoge supstance koloidne prirode, pre svega proteine. Tretman mladih crvenih vina bentonitom za rezultat ima i značajno smanjenje količine slobodnih antocijana (*Singleton, 1969*). Tanini se mogu sekundarno vezati za površinu flokula bentonita obloženih proteinima. *Revilla i sar., (1995)*, su ispitivali uticaj nekoliko vrsta mineralnih sredstava za bistrenje i stabilizaciju vina na više crvenih vina, proizvedenih od

grožđa različitih sorti vinove loze. Primenjena bistrila su smanjila sadržaj fenolnih jedinjenja u tretiranim vinima, a stepen smanjenja zavisio je od primenjenog sredstva i sortnih karakteristika vina. Natrijum bentonit je dramatično smanjio sadržaj fenolnih jedinjenja, dok je negativan uticaj kalcijum bentonita manji. Naravno, primenom većih količina bistrila, negativan efekat na fenolna jedinjenja bio je više izražen. Uopšteno, smanjenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja je manje od npr. smanjenja intenziteta boje. To je objašnjeno većim afinitetom primenjenih bistrila prema slobodnim antocijanima, katehinima i dimerima proantocijanidola.

Bentonit se pokazao kao efikasno sredstvo za uklanjanje koloidnih bojenih materija konstituisanih od flavilijum katjona (jonizovani antocijani), tanina, polisaharida i proteina. Primenom bentonita radi eliminisanja nestabilnih kompleksa i stabilizaciju vina, dolazi do značajnog gubitka boje vina i ukupnih fenolnih jedinjenja. Bez obzira na to, vina tretirana bentonitom su stabilna i na niskim temperaturama i ne menjaju se u toku nekoliko meseci (*Ribereau - Gayon i sar. vol.2, 1999*).

Upotrebom bentonita za bistrenje mladih vina sorti Cabernet sauvignon i Frankovka, utvrđeno je veliko smanjenje intenziteta boje, polimera i jonizovanih antocijana do 40 %, bezbojnih antocijana do 20 % i ukupnih fenolnih materija do 15 %. Upotreba bentonita u većim količinama dovodi do određenog posmeđivanja vina. Tretman mladih vina želatinom uzrokuje manje promene fenolnog sastava vina. Takođe, smanjuje se udeo žute boje u intenzitetu, a povećava udeo crvene (*Stanković i sar., 2002*). Prema *Zoeklinu (1988)* bentonit uklanja više boje nego želatin kod mladih vina, dok je potpuno suprotno kod starih.

Polivinilpolipirolidon (PVPP) je sintetičko sredstvo sa visokim afinitetom prema fenolnim jedinjenjima. PVPP je beli prah, nerastvoran u vodi i vinu, sa izraženom adsorptivnom sposobnošću. Primena polivinilpolipirolidona se zasniva na redukciji količine fenolnih jedinjenja u vinu, sa ciljem "omekšavanja" adstringentnih crvenih vina. Osim toga PVPP se primenjuje radi sprečavanja potamnivanja belih vina i pojave mrke boje kod crvenih vina (*Ribereau-Gayon i sar., vol. 2, 1999*).

Obradom vina sa 25 g/hl polivinilpolipirolidona (PVPP), koji se koristi u zaštiti vina od oksidacije i omekšavanju ukusa crvenih vina bogatih u taninima, ustanovljeno je smanjenje intenziteta boje za oko 2%, antocijana za 5,8 % i taninskih materija za 8 % (*Ribereau-Gayon i sar., 1976*).

Organska sredstva koja se najčešće primenjuju u proizvodnji vina su: želatin, riblji mehur, albumin i belance jajeta, obrano mleko i kazein, natrijum alginat.

Želatin se proizvodi hidrolizom kolagena iz kože svinja i životinjskih kostiju. Želatini se dele prema sposobnosti želiranja (između 50 i 300 Bloom-a) i rastvorljivosti. Želatini za enološku primenu prema načinu dobijanja, dele se u tri grupe (*Lagune, 1994. u Ribereau-Gayon, vol. 2, 1999*):

1. Toplo rastvorljivi želatin, je želatin sa sadržajem proteina 30 - 50 %, visokih molekulske masa (oko  $10^5$ ) i visokog naboja.

2. Tečni želatin, proizveden hemijskom hidrolizom ima molekulske masu ispod  $10^5$  i slabijeg naboja.

3. Hladno rastvorljivi želatin proizvodi se enzimskom hidrolizom, male je molekulske mase (znatno ispod  $10^5$ ) i veoma je niskog naboja.

Želatin visokog naboja, koristi se za "omekšavanje" crvenih vina sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja, dok se za tretman manje robustnih vina upotrebljava želatin sa nižim nabojem, koji deluje samo na agresivne (reaktivne) tanine (*Ribereau-Gayon, tom 2, 1999*).

Veliko sniženje intenziteta boje i količine slobodnih antocijana zabeleženo je pri upotrebi želatina, dok je bentonit na ove parametre uticao blaže. Razlog za takvo ponašanje može se naći u činjenici da su tretirana vina bila stara 18 meseci. Takođe, zapaženo je da su vina obogaćena proantocijanidolima i taninima iz obrađene hrastovine, imala stabilniju boju (*Radić i sar. 2002*).

Albumin je sredstvo proteinske prirode, koje se u enologiji koristi veoma dugo. Preporučuje se za "omekšavanje" vina sa visokim sadržajem tanina i smanjenje adstrigencije. Najbolje rezultate daje kada se koristi sveže belance jajeta. Sušeni i sprášeni albumin daje nešto drugačije rezultate usled nestajanja nekih proteina visokih molekulske masa tokom procesa obrade (*Ikonomou-Potiri, 1985 u Ribereau-Gayon, tom 2, 1999*).

Uporednim tretmanima vina Na-bentonitom (0,5 g/l), želatinom (0,05 g/l) i PVPP-om (0,5 g/l) ustanovljeno je smanjenje sadržaja (+)-katehina, (-)-epikatehina i dimera proantocijanidola pod uticajem želatina, a naročito PVPP-a, dok uticaj Na-bentonita nije bio toliko intenzivan (*Revilla i sar., 1997*). Gubitak katehina i proantocijanidola pod uticajem sredstava za bistrenje zavisi i od početne koncentracije ovih jedinjenja. Kod vina bogatijih u ovim jedinjenjima relativni gubitak je manji u odnosu na vina koja su siromašna u fenolnim jedinjenjima (*Revilla i sar., 1995, Revila i sar., 1993*).

## 2.4. FENOLNE MATERIJE I SENZORNE OSOBINE CRVENIH VINA

Osim sorte vinove loze i agroekoloških uslova, način vinifikacije bitno utiče na senzorni kvalitet crvenih vina, pošto različiti delovi grozda sadrže različite grupe fenolnih materija. Pokožica sadrži relativno visoke količine kompleksno vezanih tanina sa polisaharidima i proteinima što doprinosi zaokruženosti ukusa vina. Sa druge strane semenke i šepurina sadrže visoke koncentracije polimerizovanih proantocijanidola i kondenzovanih tanina koji izazivaju intenzivan osećaj adstrigencije.

### 2.4.1. Boja crvenih vina

Intenzitet crvene boje vina zavisi pre svega od količine antocijana. Pošto slobodni antocijani nisu stabilni, polimerizacija je od presudne važnosti za kvalitet i stabilnost boje. Osim reakcija kopigmentacije, stabilnost boje veoma zavisi od reakcija kondenzacije sa flavan-3-olima i proantocijanidolima kao i formiranja piranoantocijana. Takođe, boja vina potiče od produkata oksidacije i polimerizacije flavonoida.

Kao što je već rečeno, u mladim crvenim vinima antocijani se nalaze u dinamičkoj ravnoteži pet molekulskih oblika. Crvena boja vina primarno zavisi od udela flavilijum katjona. Udeo flavilijum katjona u velikoj meri zavisi od pH vrednosti i količine slobodnog sumpor-dioksida u vinu. Niže pH vrednosti usporavaju hidrolizu antocijana, porastom pH rapidno se uvećava udeo flavilijum katjona. Tako npr. pri pH vrednosti uobičajenoj za crvena vina (pH=3.4 – 3.6), svega 20 – 25 % antocijana je u obliku flavilijum katjona. Osim intenziteta boje, antocijani utiču i na nijansu boje. Plavo-ljubičasta boja vina pri višim pH vrednostima potiče od blagog porasta udela hinoidne baze. Na boju crvenih vina značajno utiče udeo slobodnog sumpor-dioksida. Ravnoteža između vezanog i slobodnog sumpor-dioksida zavisi od pH. Pri nižim pH vrednostima povećava se udeo slobodnog sumpor-dioksida, dok se pri višim pH vrednostima ravnoteža pomera na suprotnu stranu. Malvidin je najzastupljeniji antocijan u grožđu većine sorti vinove loze. Podložnost antocijana oksidaciji zavisi u mnogome od prisustva *orto*-difenola u na B prstenu. Malvidin teže podleže reakcijama neenzimatske i enzimatske oksidacije zbog prisustva hidroksilne grupe u *orto*-položaju (Jackson, 2008).

Antocijani podležu reakcijama samoasocijacije i kopigmentacije sa drugim organskim komponentama, pre svega flavonoidima i neflavonoidima, ali i aminokiselinama (prolin i arginin), organskim kiselinama i polisaharidima. Ove reakcije povećavaju vrednosti

inetniziteta boje. Visoke temperature intenzivno destabilizuju reakcije samoasocijacije, što dovodi do ozbiljnog gubitka boje tokom zrenja (starenja) vina. Na niskim temperaturama favorizuju se reakcije kopigmentacije.

Pored antocijana, izuzetnu ulogu u formiranju boje crvenih vina igraju u druga fenolna jedinjenja. Osim stabilnosti polimerizovanih oblika, i otpornosti prema reakcijama oksidacije i dekoliracije sumpor-dioksidom, polimerizovani oblici su bitni za intenzitet boje. Pri pH vrednosti 3,4 svega 20 % slobodnih antocijana je obojeno, dok je pri istoj pH obojeno čak 60 % polimerizovanih antocijana (*Jackson, 2008*).

Osim reakcija samoasocijacije i kopigmentacije, na boju vina značajno utiče formiranje polimera antocijanin-tanin, koji u zavisnosti od hemijske prirode vinu daju žutu, žuto-crvenu, žuto-braon, crvenu ili ljubičastu nijansu (tabela 3).

**Tabela 3.** Boja i molekulske mase nekih fenolnih jedinjenja vina (*Jackson, 2008*)

Naziv*	Boja	Molekulska masa
A <sup>+</sup>	crvena	500
AOH	bez boje	
AO	ljubičasta	
AHSO <sub>3</sub>	bez boje	
P	bez boje	600
T	žuta	1000 - 2000
T- A <sup>+</sup>	crvena	1000 - 2000
T-AOH	bez boje	
T-AO	ljubičasta	
T-AHSO <sub>3</sub>	bez boje	
KT	žuto crvena	2000 - 3000
VKT	žuto braon	3000 - 5000
TP	žuta	5000

A – antocijanin; P-procijanidin; T- Tanin; KT-kondenzovani tanin; VKT-visoko kondenzovani tanin; TP-tanin kondenzovan sa polisaharidima

Uticaj fenolnih jedinjenja na kvalitet vina je izuzetno velik obzirom da je to grupa jedinjenja koja crvenim vinima pre svega daje odgovarajući karakter i boju. Fenolna jedinjenja su, pre svega nosioci boje crvenih vina, a takođe i specifičnog ukusa, trpkosti, adstrignencije, reskog mirisa, ponekad i gorčine. Značaj fenolnih jedinjenja može biti izraženiji od drugih grupa jedinjenja kojih u vinu ima u daleko većim koncentracijama (alkohol, vinska kiselina itd.).



#### 2.4.2. *Ukus vina*

Katehin i njegovi polimeri su glavni nosioci ukusa crvenih vina. Izvori gorčine i astrigencije su pre svega monomeri katehina. Proantocijanidoli daju utisak hrapavosti i suvoće u ustima. Galna kiselina ekstrahovana iz semenki daje vinu grub ukus, za razliku od tanina pokožice. Uticaj antocijana u crvenim vinima na ukus vina je znatno manji nego uticaj tanina. Polimerizacija antocijana sa taninima povećava rastvorljivost tanina u vinu (*Singleton i sar., 1992*).

Tanini reaguju sa proteinima stvarajući vodonične mostove između hidroksilnih grupa i peptidnih veza. Reakcije sa proteinima pljuvačke utiču na senzorni kvalitet vina i stvaraju utisak adstrigencije. Proantocijanidoli velikih molekulskih masa ne deluju na receptore ukusa na jeziku, niti talože proteine pljuvačke (*Jackson, 2008*).

Hidrolizujući tanini više doprinose pojavi gorčine i adstrigencije od kondenzovanih tanina (*Pocock i sar., 1994*). Međutim, s obzirom na niže koncentracije, ova jedinjenja imaju manji uticaj na ukus vina u odnosu na kondenzovane tanine i njihove oligomere. U svakom slučaju vina koja su odležavala u drvenim sudovima, moraju se neko vreme čuvati u neutralnim sudovima ili bocama, kako bi došlo do promena hidrolizujućih tanina i harmonizacije ukusa. Fenolna jedinjenja daju punoću ukusa, a utiču indirektno na percepciju slatkih i kiselih ukusa. Izbalansiranost ukusa crvenih vina je od izuzetne važnosti. Percepcija slatkog ukusa koji potiče od alkohola, polisaharida, šećera (ako ga vino sadrži), mora biti uravnotežena sa kiselošću (ukupne kiseline), adstrigencijom i gorčinom (fenolna jedinjenja). Oporost, gorčina i adstrigencija vina se nikada ne posmatra odvojeno od ukusa drugih sastojaka vina.

## 2.5. UTICAJ FENOLNIH MATERIJA GROŽĐA I VINA NA ZDRAVLJE LJUDI

Polazeći od činjenice da alkohol doprinosi patološkim promenama u kardiovaskularnom sistemu *St Leger, 1979*. godine formulisao je hipotezu po kojoj vino verovatno sadrži neke komponente koje umanjuju štetno delovanje alkohola, unetog sa vinom, u odnosu na druga alkoholna pića. *Masquelier i sar., (1979)* su pristupili izolovanju pojedinih komponenti i ispitivanju njihovog delovanja na organizme životinja i ljudi, da bi 1982. godine saopštili da pozitivno fiziološko delovanje ispoljavaju određena jedinjenja iz grupe polifenola, kasnije nazvanih "proantocijanidoli". Teza izneta na stručnom skupu u Kaliforniji koja kasnije

prerasta u tzv. "Francuski paradoks" (*Renaud i sar., 1992*) podstakla je mnogobrojna istraživanja u celom svetu. Suština "Francuskog paradoksa" je u tome da se kod Francuza beleži daleko manji stepen obolevanja od kardiovaskularnih bolesti bez obzira na visok unos animalnih masti (meso, sirevi, maslac), u odnosu na druge razvijene zemlje. To je protumačeno time da se u Francuskoj redovno uz obrok konzumira crveno vino. *Doll (1990) i Gey (1990)* su ukazali na to da umereno konzumiranje crvenih vina smanjuje rizik pojave kardiovaskularnih oboljenja za 25 - 60 %.

Pošto je neophodno da neko jedinjenje dospe u tkiva kako bi ispoljilo delovanje, potrebno je bilo utvrditi ponašanje proantocijanidola u organizmu. Kako je utvrđeno da je aminokiselina prolin osnovni centar vezivanja proantocijanidola za proteinsku strukturu (*Hagerman i Butler, 1981*), a pljuvačka je bogata ovom aminokiselinom, predpostavljeno je da se proantocijanidoli vezuju u ustima i ne dospevaju u tkiva. *Masquelier (1989)* je ustanovio da se u pljuvački zadržava samo deo oligomera, dok monomeri i dimeri proantocijanidola prolaze nesmetano. Praćenjem izotopa C<sup>14</sup> proantocijanidola utvrđeno je da se sat vremena nakon oralnog unošenja proantocijanidoli raspoređuju po celom organizmu (*Laparra, 1977*). Novija istraživanja su potvrdila da flavonoidi prolaze kroz želudac nepromenjeni i veoma brzo dospevaju u krvotok (*Passamonti i sar., 2003*). Fenolne kiseline i resveratrol takođe veoma brzo prolaze kroz intestinalni trakt i dospevaju u plazmu (*Simonetti i sar., 2001, Soleas i sar., 2001*). Vreme za koje antocijani i jednostavni flavonoli dospevaju u mozak, nakon konzumiranja, meri se minutama (*Passamonti i sar., 2005., Youdim i sar., 2004*).

Pozitivan uticaj proantocijanidola ogleda se u ekonomisanju vitamina C u organizmu (*Laparra i sar., 1979*). Ova jedinjenja sprečavaju degradaciju vitamina C u organizmu što smanjuje potreban unos ovog vitamina.

Inhibicijom enzimskih sistema, proantocijanidoli uzrokuju smanjeno stvaranje histamina koji izaziva lučenje želudačnih kiselina i na taj način preventivno deluje u pogledu pojave čira na želucu (*Barral, 1985*). Dokazano je izvesno inhibirajuće dejstvo proantocijanidola na proteolitičke enzime koji su odgovorni za destrukciju vezivnog tkiva (*Gavinet-Jeannin i sar., 1988*).

Proantocijanidoli sprečavaju ukrštanje kolagenih vlakana, kao posledice narušavanja disulfidnih mostova proteinskih molekula. Time sprečavaju denaturaciju i pojavu smanjene propustljivosti krvnih sudova (*Masquelier i sar., 1981*). *Barral je (1985)* utvrdio da uštedom vitamina C proantocijanidoli indirektno utiču na smanjenje nivoa holesterola u krvi. Jedinjenja iz grupe flavonola pokazuju antioksidativnu moć u sprečavanju oksidacije LDL

(Low Density Lipoproteins), čime preventivno deluju na pojavu arterioskleroze. (Puig, 1993). Resveratrol, kvercetin, katehin, epikatehin i druga fenolna jedinjenja inhibiraju stvaranje naslaga u krvnim sudovima (Keli i sar., 1994). Sinergistično delovanje više fenolnih jedinjenja pojačava pozitivan efekat na kardiovaskularni sistem, u odnosu na pojedinačne fenole (Wallerath, i sar., 2005). Fenolna jedinjenja nemaju poznatu nutritivnu funkciju, ali igraju važnu ulogu u očuvanju ljudskog zdravlja zbog visokog antioksidativnog potencijala (Hertog i sar., 1995, Hollman i sar., 1996).

Značajno svojstvo proantocijanidola u „hvatanju“ slobodnih radikala utvrđeno je sredinom 80-tih godina XX veka (Masquelier, 1987). efikasnost proantocijanidola kao hvatača slobodnih radikala povećava se sa stepenom polimerizacije (Uchida i sar., 1987). Nasuprot ovim rezultatima, Ricardo da Silva i sar. (1991) nisu zapazili neku proporcionalnu zavisnost između sposobnosti hvatanja  $O_2^{\cdot-}$  i  $\cdot OH$  radikala i stepena polimerizacije od monomera do trimera. Esterifikacijom proantocijanidola galnom kiselinom na poziciji 3', raste kapacitet kao hvatača slobodnih radikala, a najefikasniji u tom pogledu je proantocijanodol B<sub>2</sub>3'-o-galat.

Ispitivanjem različitih katehinskih derivata grožđa utvrđeno je da su dimeri efikasniji hvatači slobodnih radikala od monomera i da je ta efikasnost višestruko veća od vitamina C (Masquelier, 1987).

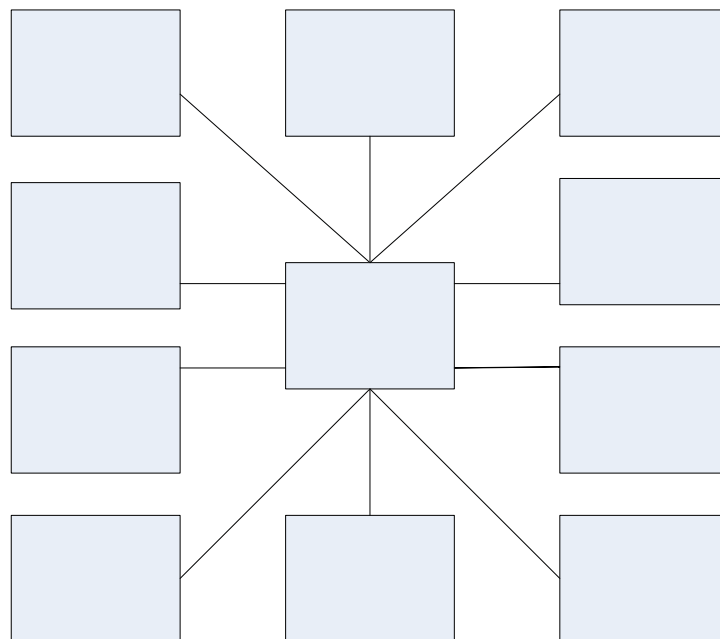
Antivirusno i antibakterijsko dejstvo proantocijanidola raste sa stepenom polimerizacije (Masquelier i sar., 1979). Dokazano je da flavonoidi i polifenolne komponente vina: ferulat, etilgalat, ferulna kiselina, galna kiselina, kafena kiselina, kurkumin i o-tokoferilsukcinil. o-etil-ferulat inhibiraju do 80 % HIV pojava oblika i time inhibiraju lipoperoksidaciju ćelija (Edeas, 2001). Modifikacije antocijana tokom alkoholne fermentacije pojačavaju njihovu toksičnost za viruse, protozoe i bakterije. I druga fenolna jedinjenja vina ispoljavaju antimikrobno delovanje. Tako *p*-kumarinska kiselina deluje na gram-pozitivne bakterije, kao na primer *Staphylococcus* i *Streptococcus* dok druga fenolna jedinjenja vina inhibiraju gram-negativne bakterije kao što su: *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus*, i *Vibrio* (Masquelier, 1988). Mehanizmi antimikrobnog delovanja fenolnih jedinjenja nisu u potpunosti razjašnjeni. Poznato je međutim, da je delovanje kvercetina usmereno na DNK, dok je delovanje epigalokatehina, kao antimikrobnog agensa, usmereno na ćelijske membrane. Antimikrobno delovanje fenolnih jedinjenja pojačano je nepovoljnim uslovima za razvoj mikroorganizama (niska pH, etanol)

Polifenoli i drugi antioksidanti u vinu smanjuju rizik od kancera (Hertog i sar., 1995). DNK polimer koji se nalazi u nukleusu svake ćelije može biti značajno oštećen slobodnim

radikalima. Hidroksil radikal napada guanin stvarajući 8-H-guanin. U uslovima nedostatka antioksidativnih rezervi, kada su mnoge aminobaze oštećene, nastaje DNK sa greškom. U fazi ćelijske deobe formira se izmenjena ćelija. Smatra se da na ovaj način, najverovatnije nastaju ćelije kancera. Epidemiološka ispitivanja, sprovedena na životinjama, ukazuju da vino sadrži komponente koje štite organizam od kancera (*Shang i sar., 2009*).

Mnogobrojna istraživanja pozitivnog uticaja fenolnih jedinjenja na ljudski organizam ukazuju na pozitivan efekat ovih jedinjenja na vid (*Fraser-Bell i sar., 2006*). Predpostavlja se da antiinflamatornim delovanjem kao i opuštajućim dejstvom na mišiće, fenolna jedinjenja vina ublažavaju pojavu artritisa. Konzumiranje vina usporava stvaranje kamena u bubrezima (*Curhan i sar., 1998*).

Uticaj proantocijanidola na ljudski organizam, šematski je prikazan na slici broj 13.



**Slika 13.** Moguća delovanja proantocijanidola (*Masquelier, 1992*)

Zapažena su određena pozitivna svojstva resveratrola na zdravlje ljudi. Preventivno delovanje resveratrola u pogledu kardiovaskularnih bolesti (*Arichi i sar., 1982, Orallo i sar., 2002, Hung i sar., 2002*), metabolizma arahidonske kiseline (*Kimura i sar., 1985*) i stvaranja naslaga na unutrašnjosti krvnih sudova (*Shan, 1988, Wang i sar., 2002*), a takođe i u pogledu kancerogenih bolesti (*Jang i sar., 1997, Athar i sar., 2007*). Ustanovljeno je da je *trans-resveratrol* potencijalni hemopreventivni agens za rak dojke (krvnih sudova) (*Wang i sar., 1998*) i rak prostate (*Shankar i sar., 2007*). Razlog ovakvog delovanja resveratrola jesu, najverovatnije njegova antioksidativna svojstva (*Olas i Wachowicz, 2002, Stivala i sar., 2001*).

## 2.6. ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL CRVENIH VINA

### 2.6.1. Slobodni radikali i oksidativni procesi

#### 2.6.1.1. Definicija i podela slobodnih radikala

Slobodni radikali su su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nespareni elektroni uzrok su njihove visoke i neselktivne reaktivnosti i nestabilnosti. Slobodni radikali mogu biti pozitivno (radikal katjon) i negativno naelektrisani (radikal anjon). Nespareni elektron se može nalaziti na atomima različitih elemenata, pa se slobodni radikali dele na slobodne radikale (reaktivne slobodnoradikalske vrste) kiseonika, hlora, azota itd.

Reaktivne vrste se dele na reaktivne slobodnoradikalse i neradikalske (oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale). Najvažnije reaktivne vrste kiseonika (ROS - od engl. reactive oxygen species), hlora (RCS - od engl. reactive chlorine species) i azota (RNS - od engl. reactive nitrogen species) date su u tabeli 4 (*Halliwell i Whiteman, 2004*).

**Tabela 4.** Najvažnije reaktivne slobodnoradikalske i neradikalske vrste

Slobodnoradikalske vrste	Neradikalske vrste
Reaktivne vrste kiseonika	
superoksid anjon radikal, $O_2^{\bullet-}$	vodonik peroksid, $H_2O_2$
hidroksil radikal, $OH^{\bullet}$	hipobromna kiselina, $HOBr$
hidroperoksil radikal, $HO_2^{\bullet}$	hiphlorna kiselina, $HOCl$
peroksil radikal, $RO_2^{\bullet}$	ozon, $O_3$
alkoksil radikal, $RO^{\bullet}$	singletni kiseonik, $^1\Delta_g O_2$
karbonatni radikal, $CO_3^{\bullet-}$	organski peroksid, $ROOH$
ugljenoksidni radikal, $CO_2^{\bullet-}$	peroksininitrit, $ONOO^{\bullet-}$
	peroksininitritna kiselina, $ONOOH$
Reaktivne vrste hlora	
Atomski hlor, $Cl^{\bullet}$	hiphlorna kiselina, $HOCl$
	nitril (nitronijum) hlorid, $NO_2Cl$
	hloramini
Reaktivne vrste azota	
azotmonoksidni radikal, $NO^{\bullet}$	azotasta kiselina, $HNO_2$
azotdioksidni radikal, $NO_2^{\bullet}$	nitrozo katjon, $NO^+$
	nitroksidni anjon, $NO^{\bullet-}$
	azot(IV)-oksid, $N_2O_4$
	azot(III)-oksid, $N_2O_3$
	peroksininitrit, $ONOO^{\bullet-}$
	peroksininitritna kiselina, $ONOOH$
	nitronijum (nitril) katjon, $NO_2^+$
	alkilperoksininitriti, $ROONO$
	nitril (nitronijum) hlorid, $NO_2Cl$

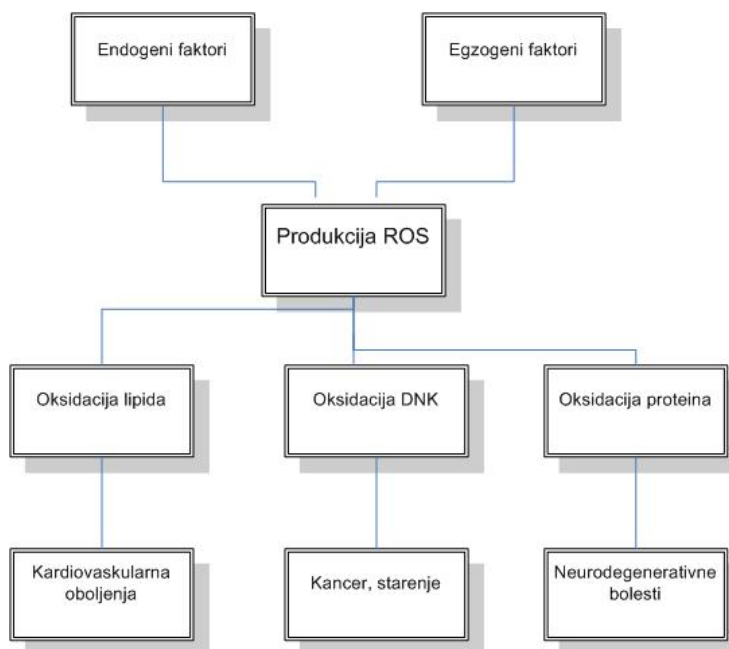
Reaktivni slobodni radikali mogu nastati brojnim reakcijama koje se uglavnom svode na četiri osnovna tipa: termolizu, fotolizu, oksido-redukcijske procese i iradijaciju visoke energije (Piletić i sar., 1993).

#### 2.6.1.2. Slobodni radikali u ljudskom organizmu

U normalnim uslovima, nastajanje toksičnih oblika kiseonika i drugih slobodnih radikala u ravnoteži je sa antioksidativnim sistemom odbrane organizma. Stanje u kome je ravnoteža između prooksidanata i antioksidanata pomeren u stranu prooksidanata, naziva se oksidativni stres (Halliwell, 1999., Zirojević i sar., 2002)

Nastajanje reaktivnih vrsta kiseonika i drugih slobodnih radikala u biološkim sistemima može biti indukovano različitim endogenim (prooksidativni enzimski sistemi, proces ćelijske respiracije, fagocitoze, itd) i egzogenim (zračenje, kontaminiran vazduh, itd) faktorima (Bagchi i Puri., 1998).

Oksidativni stres dovodi do oksidativnih oštećenja primarnih biomolekula i nastanka mnogih oboljenja, kao što su: arteroskleroza, kancer, kardiovaskularna oboljenja, astma, artritis, gastritis, dermatitis, dijabetes, bolesti jetre, bolesti bubrega, zapaljenski procesi, Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest itd (slika 14) (Kow, 1999, Lee i sar., 2004)



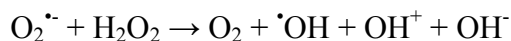
**Slika 14.** Povezanost produkcije slobodnih radikala i nastanka mnogih oboljenja

Neki slobodni radikali nastaju i u toku normalnog metabolizma. Preko 90% kiseonika iz vazduha u organizmu sisara redukuje se do vode primanjem četiri elektrona od transportnog sistema elektrona u respiratornom lancu mitohondrija (Acworth, 2003). Do intenzivne

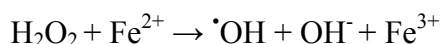
produkcije slobodnih radikala (superoksid anjon radikala i vodonik peroksida) dolazi i u procesu fagocitoze, u procesu respiratorne eksplozije u fagocitnim ćelijama, kao odgovor imunog sistema na prisustvo bakterija i virusa (*Dorđević, 2000*)

*Superoksid anjon radikal* ( $O_2^{\cdot-}$ ) odnosno njegov protonovani oblik, perhidroksilni radikal ( $HO_2^{\cdot-}$ ), nastaje jednoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika, a može se dobiti i jednoelektronskom oksidacijom vodonik peroksida. Značajne količine proizvode se i u reakcijama katalizovanim nekim oksidazama (npr. ksantin oksidazom) (*Ohara i sar., 1993*), kao i u procesu fagocitoze (*Choi i sar., 2006*)

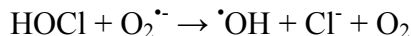
*Hidroksil radikal*, ( $\cdot OH$ ) je najreaktivniji od svih ROS i najodgovorniji za citotoksične efekte kiseonika. Brzo reaguje sa biomolekulima, pa je njegov poluživot izuzetno kratak ( $10^{-9}$  s). Hidroksil radikal se u ćelijama stvara kada postoje uslovi za Haber-Vajsovu reakciju:



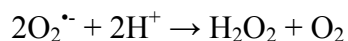
ili Fentonovu reakciju:



Takođe, nastaje dejstvom  $\gamma$ -zračenja na molekul vode, u procesu fagocitoze, troelektronskom redukcijom iz molekuskog kiseonika u respiratornom lancu mitohondrija, kao i iz hipohlorne kiseline (*Mimić-Oka i sar., 1999*):



*Vodonik peroksid* ( $H_2O_2$ ) nije slobodni radikal, ali se ubraja u reaktivne vrste kiseonika (*Wu i Cederbaum., 2003*). Najstabilniji je, odnosno najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. Nastaje direktno dvoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili njegovom enzimskom mutacijom, dejstvom superoksid dismutaze:



Proces stvaranja vodonik peroksida odvija se na nivou peroksizoma, mitohondrija, mikrozoma i ćeljkse membrane (*Gatellier i sar., 1995*).

*Singletni kiseonik* ( $^1O_2$ ) je izrazito reaktivan, nastaje enzimskim putem, u prisustvu mieloperoksidaza i laktoperoksidaza (*Kanofsky i sar., 1988*) i fagocitoze (*Steinbeck i sar., 1992*).

*Peroksil i alkoksil radikali* ( $RO_2^{\cdot}$  i  $RO^{\cdot}$ ) nastaju u lančanoj, slobodnoradikalskoj reakciji lipidne oksidacije (*Mimić-Oka i sar., 1999*).

### 2.6.1.3. Oksidativno oštećenje primarnih biomolekula u humanom organizmu

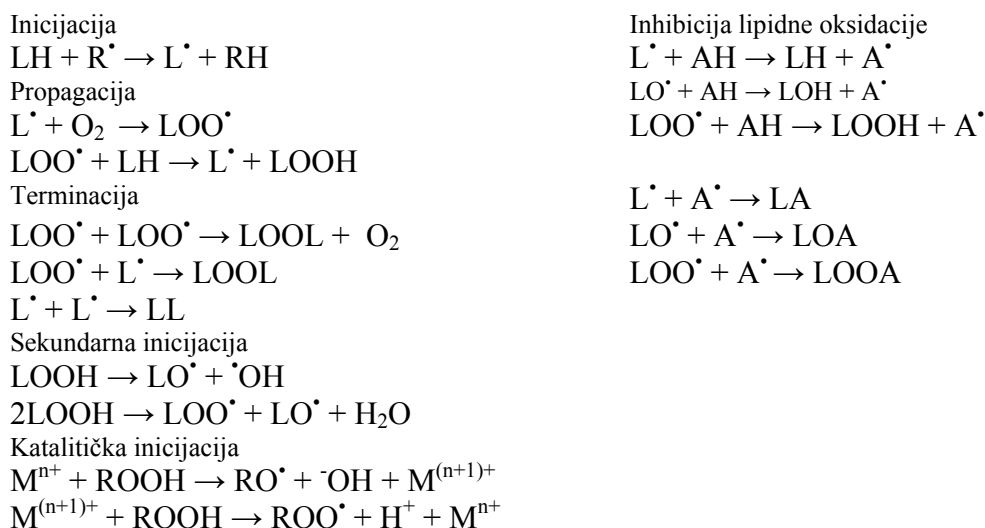
Oksidativni stres dovodi do oštećenja primarnih biomolekula: proteina, lipida, nukleinskih kiselina i ugljenih hidrata, što može biti uzrok čitavog niza poremećaja u metabolizmu i izazvati disfunkciju i smrt ćelija (*Malešević, 2002.*).

Proteini su prirodni makromolekuli koji se sastoje od dugih nerazgranatih nizova ostatka aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. Neki proteini učestvuju u izgradnji strukture (keratin, elastin, kolagen, lipoproteini, itd), dok drugi imaju različite uloge u funkcionisanju organizma: hemoglobin (prenos kiseonika), antitela (zaštita od virusa i bakterija), fibrinogen (koagulacija), aktin i miozin (kontrakcija mišića), itd. (*Piletić i sar., 1993*). Oksidacija proteina može dovesti do izmene u signalnom transdukcijom mehanizmu, transportnom sistemu, enzimskoj aktivnosti i drugim procesima (*Hosseinian, 2006*).

Lipidi su biološki veoma značajna jedinjenja koja se dele na: proste lipide (čiji se molekuli sastoje samo od ostataka masnih kiselina i alkohola - najčešće glicerola), i složene lipide (koji uključuju derivate fosforne kiseline - fosfolipide, ostatke ugljenih hidrata - glikolipide, kao i sterole). Lipidi su osnovna komponenta bioloških membrana, utiču na njihovu propustljivost, učestvuju u predaji nervnih impulsa, ostvaruju kontakt između ćelija, čine energetske rezervu, štite organizam od mehaničkih povreda, formiraju termoizolacioni sloj (*Piletić i sar., 1993*). Oksidacija lipida je proces oksidativnog oštećenja koje zahvata ćelijske membrane, lipoproteine i druge molekule koji sadrže lipide, u uslovima oksidativnog stresa. Polinezasićene masne kiseline u fosfolipidima i glikolipidima, kao i holesterol u biološkim membranama, predstavljaju osnovni supstrat za oksidativno oštećenje lipida (*Abuja i sar., 2001*). Lipidna oksidacija u biološkim sistemima može se odigravati enzimskim (delovanjem lipoksigenaza) i neenzimskim putem. Intenzivan proces lipidne oksidacije nađen je kod aterogeneze, kancerogeneze, neurodegenerativnih i drugih oboljenja (*Girrotti, 1998*). Lipidna oksidacije predstavlja i najvažniji proces koji dovodi do kvarenja masti i ulja, što dovodi do smanjenja nutritivne vrednosti, pojave neprijatnog ukusa i mirisa i nastajanja toksičnih proizvoda.

Lipidna oksidacija je proces u kome slobodnoradikalske i neradikalske vrste kiseonika reaguju sa lipidima izazivajući oksidativnu destrukciju nezasićenih odn. polinezasićenih masnih kiselina. Mehanizam kompleksne lančane reakcije lipidne oksidacije koja se odvija u tri faze, kao i mehanizam delovanja antioksidanata, prikazani su na slici 15. (*Yanishlieva-Maslarova, 2001*).





**Slika 15.** Mehanizam lančane reakcije lipidne oksidacije i mehanizam delovanja antoksidanata

Dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) su primarni molekuli - nosioci naslednih informacija. Različiti tipovi slobodnih radikala deluju različitim mehanizmima i pokazuju različitu toksičnost prema DNK. Reaktivni hidroksil radikali mogu izazvati oštećenja na bazi i na šećernoj komponenti. Inicijacija oštećenja šećerne komponente odigrava se abstrakcijom vodonika, vezanog za ugljenig dezoksiriboze, a posledica je prekid u strukturi DNK i oslobađanje baze i malondialdehida (MDA). Njačešći tipovi oštećenja DNK su: prekid lanca, izmene baza, oduzimanje baza, interakcija sa lipidnim peroksidima (npr. MDA), interakcija sa proteinima, itd. Slobodni radikali mogu dovesti do promena u strukturi DNK i do genetskih grešaka (mutacija), pa mogu biti odgovorni za nastanak kancerogenog fenotipa i niza degenerativnih procesa, ukoliko zahvate specifične protoonkogene (*Dorđević i sar., 2000*).

### 2.6.2. Antioksidanti

Najšire prihvaćena definicija bioloških antioksidanata jeste ona koju je dao *Halliwell (1990)*, a prema kojoj su antioksidanti "supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata".

Antioksidanti mogu ispoljavati svoju aktivnost različitim mehanizmima zahvaljujući njihovoj sposobnosti da: deluju kao "hvatači" (skevindžer) slobodnih radikala, odnosno deluju kao donori elektrona ili H-atoma peroksil ili hidroksil radikalima ili akceptori elektrona ili H-atoma ugljenikovih slobodnih radikala (*Bragadóttir, 2001*), kompleksiraju jone metala (čime je onemogućena kataliza reakcije stvaranja inicijatora oksidacije lipida, npr.  $^{\bullet}OH$ ) (*Vaya i*

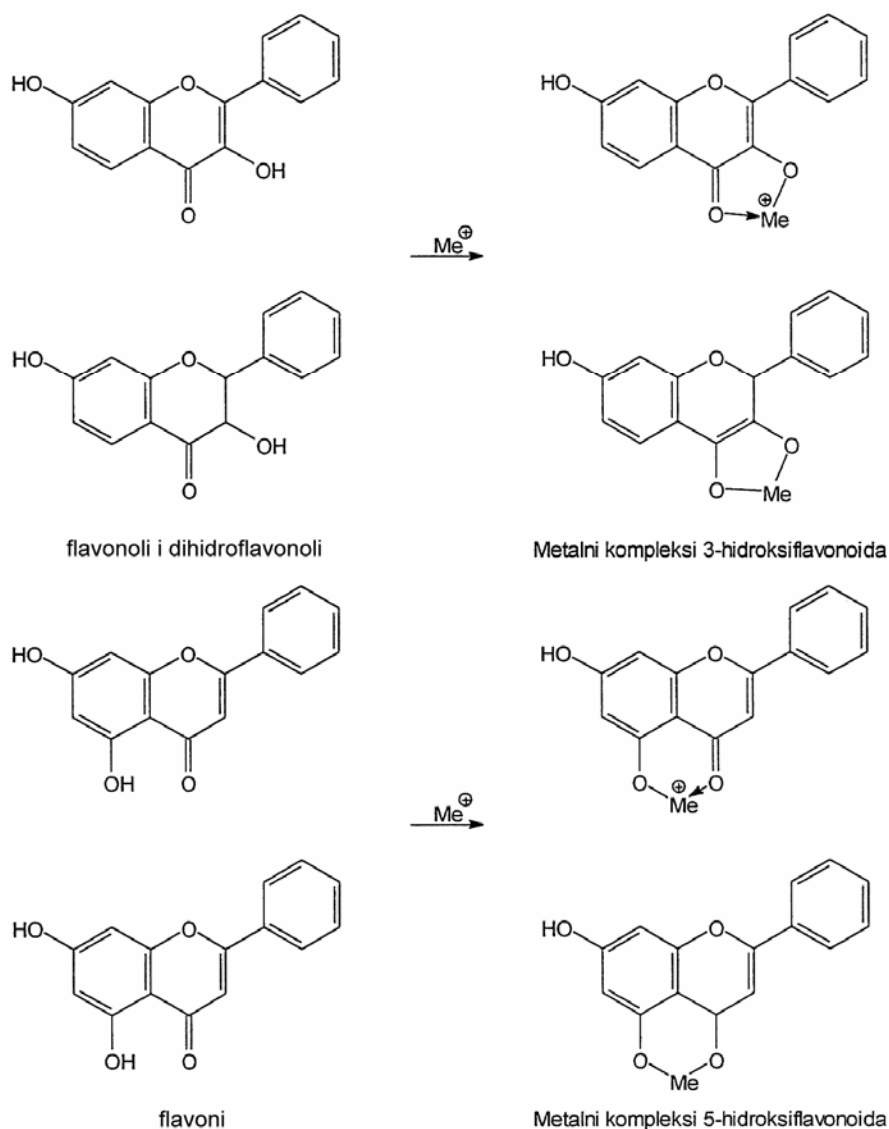
sar., 2001), razgrađuju hidroperoksied, eliminišu dejstvo singletnih oblika kiseonika (Pokorny, 2001), pokazuju sinergetske efekte, itd.

*Shi i sar. (2001)* klasifikovali su antioksidante prema nivou i načinu delovanja u ljudskom organizmu na: preventivne antioksidante, "skevindžer" antioksidante i "reparacione" antioksidante. Preventivni antioksidanti sprečavaju nastanak slobodnih radikala i iniciranje lančane reakcije peroksidacije: dekompozicijom vodonik peroksida i lipidnih hidroperoksida (enzimski antioksidanti: katalaza, glutation peroksidaza, glutation-S-transferaza), kompleksiranjem jona metala (albumin, ceruloplazmin, mioglobin, transferin, itd) i eliminacijom ROS (superoksid dismutaza). "Skevindžer" antioksidanti poseduju sposobnost da "hvataju" slobodne radikale i tako inhibiraju inicijaciju i prekidaju propagaciju reakcije lipidne oksidacije, pa se nazivaju i "prekidači" lančanih radikalskih reakcija. Prema rastvorljivosti ovi antioksidanti se dele na hidrosolubilne (vitamin C, mokraćna kiselina, bilirubin, albumin, glutation, neki polifenoli) i liposolubilne (vitamini E i A, karotenoidi, neki polifenoli) (*Vaya i sar., 2001*). "Reparacioni" antioksidanti deluju posebnim mehanizmima, obnavljajući ili uklanjajući oštećene vitalne biomolekule koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa. U "reparacione" antioksidante ubrajaju se fosfolipaze, proteaze, enzimi koji obnavljaju DNK, transferaze, itd.

Prema mestu nastajanja antioksidanti značajni za ljudski organizam dele se na: endogene i egzogene. Endogeni antioksidanti predstavljaju antioksidante koji nastaju u ljudskom organizmu, dok se egzogeni unose putem hrane ili lekova. Neki endogeni antioksidanti za svoju funkciju unošenje minerala (koenzima: Se (koenzim glutation peroksidaze), Cu, Zn, Mn (koenzim superoksid dismutaze). Endogeni antioksidanti su: enzimski sistemi (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza), mokraćna kiselina, bilirubin, tioli (glutation, lipolna kiselina, N-acetil cistein), NADPH, NADH, koenzim Q10 (ubihinon), proteini koji kompleksiraju jone metala (albumin-bakar, ceruloplazmin-bakar, feritin-gvožđe, mioglobin-gvožđe, transferin-gvožđe). U egzogene antioksidante ubrajaju se vitamin C, vitamin E, karotenoidi ( $\beta$ -karoten), oksikarotenoidi (likopen), polifenolna jedinjenja (flavonoidi, fenolne kiseline, proantocijanidoli, itd) (*Percival, 1998*).

Fenolna jedinjenja su jedna od najvažnijih grupa prirodnih egzogenih antioksidanata, čija je aktivnost uslovljena strukturnim karakteristikama. Strukturne karakteristike značajne za procenu antioksidativnog potencijala flavonoida su: prisustvo hidroksilnih grupa na C<sub>3</sub> i C<sub>5</sub>-atomima, prisustvo dvostruke veze između C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub>-atoma, prisustvo keto grupe na C<sub>4</sub>-atomu, broj hidroksilnih grupa, prisustvo šećernog ostatka, prisustvo metoksi grupa, itd (*Pietta, 2000, Heim, 2002*). Flavonoidi mogu ispoljavati antioksidativne osobine zahvaljujući

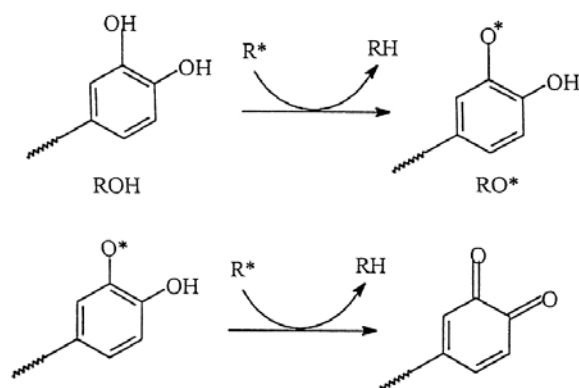
mehanizmu heliranja tragova jona metala, koje omogućavaju 3' i 4'-hidroksi grupe, 3-hidroksi i 4-oksi grupe, kao i 4-oksi grupa i 5-hidroksi grupa (slika 16) (Hudson i sar., 1983, Pokorny, 2001).



**Slika 16.** Helirajući mehanizam flavonoida

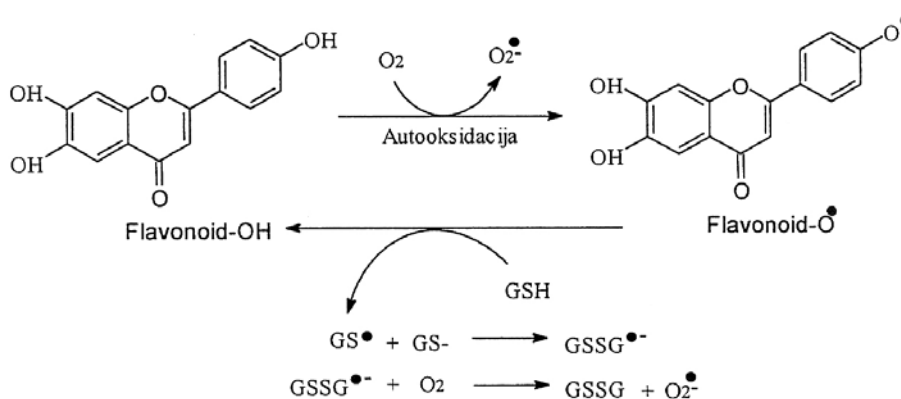
Flavonoidi pokazuju antioksidativnu aktivnost kako u hidrofilnim, tako i u lipofilnim sistemima. Zahvaljujući nižem redoks potencijalu flavonoida (0,23 - 0,75V), oni mogu redukovati slobodne radikale ( $R^{\bullet}$ ) koji imaju veći redoks potencijal (2,13 - 1,0V) kao što su superoksid anjon radikal, peroksil, alkoksil, hidroksil radikal, odavanjem atoma vodonika.

Aroksil radikal koji pri tome nastaje može reagovati sa drugim radikalom, pri čemu nastaje stabilna hinonska struktura (slika 17) (Pietta, 2000).



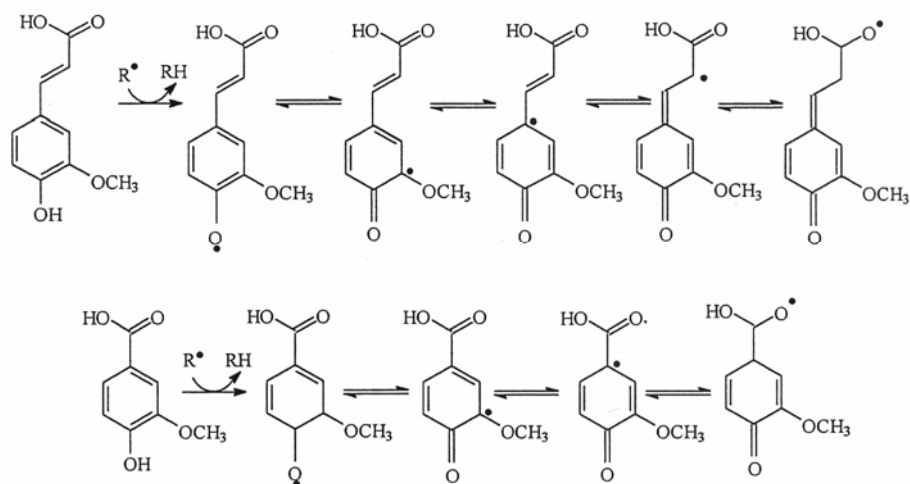
**Slika 17.** Mehanizam odavanja atoma vodonika flavonoida

Flavonoidi pod uslovima oksidativnog stresa mogu delovati prooksidativno, pa umesto "hvatanja", mogu formirati slobodne radikale. Mehanizam prooksidativnog delovanja flavonoida dat je na slici 18 (Rietjens i sar., 2002).



**Slika 18.** Mehanizam prooksidativnog delovanja flavonoida

Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina zavisi od broja hidroksilnih grupa u molekulu i sa povećanjem broja hidroksilnih grupa raste i antioksidativna aktivnost derivata fenolnih kiselina. Karboksilna grupa u molekulima derivata benzojeve kiseline, zbog svojih elektronakceptorskih osobina, umanjuje sposobnost odavanja atoma vodonika iz hidroksilnih grupa. Hidroksi derivati cimetine kiseline poseduju veću antioksidativnu aktivnost od odgovarajućih hidroksi derivata benzojeve kiseline (Rice-Evans i sar., 1996). Mehanizam antioksidativnog delovanja derivata benzojeve i cimetine kiseline prikazan je na slici 19 (Zhou i sar., 2006).



**Slika 19.** Nastajanje i formiranje mogućih rezonantnih struktura fenolksi radikala derivata cimetine i benzoeve kiseline

#### 2.6.2.1. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti se mogu podeliti na više načina: prema sistemu ispitivanja (*in vivo* i *in vitro*), prema metodi detekcije (hemiluminiscentne, spektrofotometrijske, fluorometrijske, spektroskopske-ESR), prema direktnosti određivanja (direktne i indirektne). Najvažnije podele metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti su prema prisustvu lipida u sistemu i prema mehanizmu reakcije koja se odigrava između antioksidativnih jedinjenja i slobodnih radikala na koje se antioksidativna aktivnost određuje (*Sanchez-Moreno, 2002, Aruoma, 2003*). Prema prisustvu lipida u sistemu, metode se dele na: metode koje se zasnivaju na merenju "skevindžer" sposobnosti slobodnih radikala, a koje se izvode u sistemima ne sadrže lipide i metode koje se izvode u biološkim model sistemima koji sadrže lipide, a koje se zasnivaju na merenju stepena inhibicije oksidacije lipidnog ili lipoproteinskog supstrata.

Pri određivanju antioksidativne aktivnosti različitim metodama moguće su razlike u rezultatima, kao posledica: fizičke strukture ispitivanog uzorka, prirode supstrata koji se oksiduje, prisustva drugih komponenata, načina inicijacije procesa oksidacije, kao i vrste slobodnih radikala na koje se antioksidativna aktivnost određuje. Treba imati u vidu da određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* ne odražava u potpunosti ćelijske fiziološke uslove, ne uzima u obzir biološku dostupnost (apsorptivnost) i metabolizam antioksidanata (*Liu i Finley, 2005.*).

Metodama za određivanje antioksidativne aktivnosti kao skevindžer sposobnosti slobodnih radikala meri se sposobnost donacije atoma vodonika ili prenosa elektrona sa

potencijalnog antioksidanta na slobodni radikal u sistemu koji ne sadrži lipide. Ove metode se mogu klasifikovati na: klasična određivanja antioksidativne aktivnosti, određivanje antioksidativne aktivnosti na stabilne radikale i određivanje antioksidativne aktivnosti na nestabilne radikale (*Becker i sar., 2004*).

Određivanje antioksidativne aktivnosti na stabilne radikale podrazumevaju određivanja antioksidativne aktivnosti na stabilne DPPH radikale, Fremijeve soli (kalijum-nitrozodisulfonat) ili galvinoksil (2,6-di-*terc*-butil- $\alpha$ -(3,5-di-*terc*-butil-4-okso-2,5-cikloheksadien-1-iliden)-*p*-toliloksi) radikale spektrofotometrijski ili elektron spin rezonantnom spektroskopijom (ESR). Skevindžer aktivnost stabilnog radikala kao što je DPPH radikal-hromogen (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) detektuje se spektrofotometrijski na 516 nm i primenjuje se široko za komparaciju antioksidativne aktivnosti homologe serije antioksidanata. Stehiometrijski odnos DPPH radikala u odnosu na antioksidant zavisi od tipa antioksidanta. Za askorbinsku kiselinu, Trolox,  $\alpha$ -tokoferol i neka polifenolna jedinjenja stehiometrijski odnos radikala u odnosu na antioksidant je 2 : 1, za ruzmarinsku kiselinu (obziroma da sadrži više hidroksilnih grupa) 3 : 1, dok neki derivati cimetne kiseline "hvataju" i veći broj DPPH radikala po molekulu. ESR spektroskopija je relativno nova metoda kojom je moguće direktno određivanje koncentracije slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost se određuje na osnovu relativnog smanjenja intenziteta ESR signala slobodnih radikala u prisustvu antioksidanta, u odnosu na intenzitet ESR signala kada antioksidant nije prisutan (*Becker i sar., 2004*).

Nedostatak metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti na stabilne slobodne radikale je nepostojanje stabilnih slobodnih radikala u biološkim sistemima. Kako se kao reakcioni intermedijeri u oksidativnim procesima javljaju hidroksil i peroksil radikali, određivanje antioksidativne aktivnosti je potrebno izvesti i na nestabilne radikale. Nestabilni radikali imaju vrlo kratko vreme života, pa je njihova direktna detekcija praktično nemoguća. Oni se mogu detektovati jedino ako im se, na poseban način, tokom dužeg perioda potrebnog za ESR merenje, koncentracija održava konstantnom. Metode pomoću kojih se to postiže su:

- "Spin trapping" metoda kojom se nestabilni slobodni radikali "hvataju" pomoću određenih organskih jedinjenja (trapova) i nastaju stabilni radikali (spin adukti) koji se mogu detektovati ESR spektroskopijom. Najčešće korišćeni "spin trapovi" su: *terc*-nitrozobutan (tNB), N-*terc*-butil- $\alpha$ -fenilnitron (PBN), 5,5-dimetilpirolin-N-oksidi (DMPO), 2,4,6-tri-*terc*-butilnitrozobenzen (BNB) i  $\alpha$ -(4-piridil-1-oksidi)-N-*terc*-butilnitron (4-POBN) (*Čanadanović-Brunet, 1997*),

- Tehnika konstantnog protoka - regenerativni postupak kojim se stvara stacionarno stanje tj. održava se koncentracija slobodnih radikala konstantnom u toku određenog vremenskog perioda,

- Tehnika zaustavljenog protoka za slobodne radikale čije je vreme poluživota 0,1s ili duže,

- "Fleš" fotoliza ili pulsna radioliza.

Kod FRBR (eng. Fenton reaction based radical) metode za određivanje antioksidativne aktivnosti se primenjuje detekcija hidroksil radikala posle reakcije sa DMPO spin trapom. Ova metoda se zasniva na kompetitivnosti reakcija u kojima antioksidant "hvata" hidroksil radikale sa reakcijama koje se odigravaju između hidroksil radikala i dodatog spin trapa.

### 2.6.3. Antioksidanti u crvenim vinima

Crvena vina ispoljavaju snažan biološki efekat koji se, pre svega, pripisuje visokim sadržajima flavonoida (*Cao i sar., 2000*). Postoji visok stepen pozitivne korelacije između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, kao i pojedinačno udela galne kiseline, (-)-epikatehina, (+)-katehina i antioksidativnog potencijala vina (*Rosana Minussi i sar, 2003, Campodonico i sar. 1998, Fogliano i sar, 1999, Henn, 1998, Sanchez-Moreno i sar., 1999a, Sato i sar., 1996*). Vino, kao bogat izvor fenolnih jedinjenja, ispoljava snažan *in vitro* inhibitorski efekat na oksidaciju lipoproteina niske gustine (LDL) (engl. low-density lipoprotein) (*Frankel i sar, 1995*). Veoma visok inhibitorski efekat, vina Merlot, na oksidaciju LDL, utvrđen je od strane *Faustino i sar.,(2004)*.

Najizraženiju aktivnost u pogledu hvatanja slobodnih radikala ima galna kiselina, zatim taninska kiselina, kafena kiselina, kvercetin, rutin, ferulna kiselina, a najnižu aktivnost poseduju DL- $\alpha$ -tokoferol i resveratrol (*Sanchez-Moreno, 1999b*). Testiranjem 17 fenolnih jedinjenja vina pojedinačno samo njih sedam je pokazalo pozitivnu korelaciju koncentracije i antioksidativne aktivnosti (*Soleas i sar, 1997*). Pri tome najviši antioksidativni potencijal pokazale su vanilinska i galna kiselina. Visok stepen pozitivne korelacije fenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala ekstrakata semenki grožđa pokazan je i u istraživanjima *Taha i sar (2008)* i *Mandić i sar., (2008)*.

Pošto je većina fenolnih kiselina u vinu prisutna u obliku estara, *Pascale i sar. (1998)* su elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom uporedno određivali antioksidativni potencijal fenolnih kiselina i njihovih estara prema superoksid anjon radikalima ( $O_2^{\cdot-}$ ) i hidroksil ( $\cdot OH$ ) radikalima. Između ostalog, utvrđeno je da etil-galat ispoljava nešto veću

aktivnost prema  $O_2^{\cdot-}$  od galne kiseline, a vanilin znatno viši potencijal pokazuje prema  $O_2^{\cdot-}$  u odnosu na vanilinsku kiselinu. Kada je u pitanju  $\cdot OH$  radikal, potencijal vanilina i vanilinske kiseline je približno izjednačen. Snimanjem  $O_2^{\cdot-}$ , utvrđeno je da kafena kiselina i etil-kafeat 100 % inhibiraju ESR signal. Smanjenjem koncentracije ovih supstanci deset puta, etil-kafeat i dalje inhibira ESR signal 100 %, dok je u slučaju kafene kiseline inhibicija ESR signala opala na 61 %.

Prema *Ghiselli i sar., (1998)* najviši stepen antioksidativne aktivnosti pokazuju antocijani, međutim u tumačenju ovih rezultata autori nisu uzeli u obzir sinergistično delovanje različitih grupa fenolnih jedinjenja. *de Gaulejac i sar., (1999)* su utvrdili da frakcija antocijana pokazuje veći antioksidativni potencijal u odnosu na frakciju proantocijanidola, ali antioksidativni efekat se pojačava sinergističnim delovanjem antocijana i proantocijanidola iz vina i pokožice, u odnosu na čiste antocijane. Usku povezanost sadržaja antocijana, u ekstraktima grožđa i različitim vinima, i antioksidativnog potencijala konstatovali su u svojim istraživanjima mnogi autori (*Meyer i sar., 1997, Sato i sar., 1996, Sanches-Moreno i sar., 2000*). Mlada crvena vina, proizvedena postupkom karbonske maceracije, bogatija su monomerima antocijana, a siromašnija u taninima. Ta vina su bolji izvor antioksidanata od starijih vina (*Pellegrini i sar., 1998*).

Drugi istraživači tvrde da je korelacija između sadržaja antocijana i antioksidativnog potencijala crvenih vina niska (*Frankel i sar., 1995., Burns i sar., 2000*), a kao snažni antioksidanti navode se flavanoli crnog grožđa (*Teissedre, i sar., 1996., Meyer i sar., 1997*) i crvenih vina (*Frankel i sar., 1995., Sato i sar., 1996, Simoneti i sar., 1997., Burns i sar., 2000*) koji uvek ispoljavaju pozitivnu korelaciju između sadržaja u vinu i antioksidativnog potencijala.

Autori *Anis i sar. (2002)* utvrdili su nešto viši stepen korelacije između antioksidativnog potencijala vina i sadržaja flavonola nego u odnosu na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, dok je stepen korelacije antioksidativnog kapaciteta vina i sadržaja antocijana iznosio svega 0,468. To je ponovo pokazalo zavisnost antioksidativnog potencijala od sadržaja katehina, epikatehina i proantocijanidola. Takođe je utvrđen nizak stepen korelacije sadržaja antocijana, ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonola i inhibitornog delovanja istih na stvaranje hidroksil radikala.

Za visok antioksidativni potencijal crvenih vina, prema *Kerry i sar. (1997)* najzaslužniji su pre svega monomeri katehina, proantocijanidoli, monomeri antocijana i fenolne kiseline. Ispitivanjem antioksidativnog delovanja epikatehina konstatovano je da (-)-epikatehin pod dejstvom slobodnih radikala biva konvertovan u antocijanima slična



jedinjenja, koja takođe ima antioksidativnu funkciju (*Kondo i sar., 1999*). Visok antioksidativni potencijal epikatehina utvrdili su i *Valls-Belles i sar. (2002)* koji su za inicijaciju procesa oksidacije koristili *tert*-butylhydroperoksid. Dimeri epikatehina ispoljili su snažniju antioksidativnu aktivnost u odnosu na antioksidativnu aktivnost dimera katehina (*Muselik i sar., 2007*).

Antioksidativno delovanje proantocijanidola poslužilo je kao objašnjenje pojave "Francuskog paradoksa" (*Frankel i sar, 1995*). Ova pojava je mnogo puta objašnjavana i opisivana i to kako primenom vina (*Maxwell, 1994*), tako i mnogih čistih komponenti pronađenih u vinu (*Urizzi i sar, 1999, Paganga i sar, 1996*). Veće antioksidativno delovanje antioksidanti ispoljavaju u kombinaciji nego svaki pojedinačno (*Meyer, 1998, Vivas i sar., 1997, Teisedre i sar., 1996*). Antioksidativno delovanje vitamina C i E višestruko se povećava u prisustvu katehina (*Cedric i sar., 1999*).

Produženo trajanje maceracije kljuka od grožđa sorte Plavac mali uticalo je na porast količine antocijana i proantocijanidola uključujući i katehin što je rezultiralo većim antioksidativnim kapacitetom vina (*Piljac i sar., 2005*). Veći antioksidativni potencijal u vinima od iste sorte grožđa zabeležen je u starijim vinima (berba 2001) u odnosu na nova vina (berba 2003), što je objašnjeno razlikama u kvalitetu grožđa kao i kondenzovanih tanina tokom sazrevanja vina.

Uporednim ispitivanjem antioksidativnih aktivnosti mladih vina, proizvedenih postupkom karbonske maceracije, i vina proizvedenih tradicionalnim postupkom, ustanovljeno je da se tradicionalnim postupkom dobijaju vina sa nižom antioksidativnom aktivnošću (*Pellegrini i sar.2000*).

Ispitivanjem antioksidativnog potencijala vina od istog grožđa, koje je sazrevalo u flaši odnosno hrastovom buretu ustanovljen je značajan porast antioksidativnog potencijala vina iz bureta. Tako da je vino od grožđa sorte Tempranillo imalo za čak 55 %, a Cabernet sauvignon za 47 % viši antioksidativni potencijal nakon odležavanja u buretu od američkog hrasta, u odnosu na ista vina čuvana u boci. Porast antioksidativnog potencijala u vinima čuvanim u buretu od francuskog hrasta je bio znatno niži (6 -15 %) (*Bartolome i sar., 2004*). Isti autori su utvrdili visok stepen korelacije između antioksidativnog potencijala ekstrakta pokožice i vina proizvedenog od istog grožđa.

Vino je veoma specifična namirnica koja sadrži alkohol (etanol) i antioksidante u određenom odnosu, tako da dolazi do sinergijskog delovanja. Delovanjem alkohol dehidrogenaze (ADH) etanol se transformiše do acetaldehida, u sledećem koraku aldehid dehidrogenaza (AldDH) transformiše etanal do acetata produkujući NADH u svakom koraku

(ukupno dve reduktivne jedinice po jednom detoksifikovanom molekulu etanola). Na taj način  $\text{NAD}^+$  je regenerisan i vraća se u proces detoksifikacije etanola. Prednosti ovog sinergijskog delovanja su "recikliranje" antioksidanasa, minimalna produkcija pro-oksidanasa i dostupnost antioksidanasa u reduktivnom stanju.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 MATERIJAL

U ispitivanjima je, kao sirovina, korišćeno grožđe dve crne vinske sorte: Cabernet sauvignoni i Merlot. Grožđe je poreklom iz oglednih vinograda Departmana za voćarstvo i vinogradarstvo, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Vinogradi pripadaju fruškorskom vinogorju i nalaze se u Sremskim Karlovcima.

Prerada grožđa, u laboratorijskim uslovima, izvršena je neposredno nakon berbe. Mikroviniifikacija je vršena u količini od po 5 kg kljuka po svakom pojedinačnom ogledu. U grožđu je određen sadržaj šećera i ukupnih kiselina. Kljuk je sulfitisan sa 100 mg/kg SO<sub>2</sub>, dodatkom 10 %-nog rastvora kalijummetabisulfita. Alkoholna fermentacija izvršena je komercijalnim kvascem *Saccharomyces cerevisiae*, koji je rehidriran i inolukiran u kljuk u količini 0,2 g/kg. Tokom maceracije mešanje kljuka vršeno je dva puta na dan.

Ogledna vina grupe **A**, proizvedena su sa ciljem ispitivanja uticaja dužine maceracije i temperature, na boju vina i sadržaj fenolnih jedinjenja. Grožđe Cabernet sauvignon i Merlot, berbe 2003, prerađeno je u laboratorijskim uslovima, a vina proizvedena postupkom mikroviniifikacije. Maceracija je izvršena na klasičan način prema šemi prikazanim u tabeli 5.

**Tabela 5.** Šema ogleda **A** za vina Cabernet sauvignon (Cs) i Merlot (M)

Oznaka uzorka	Temperatura maceracije (°C)	Trajanje maceracije (dani)
A1	20	3
A2		6
A3		9
A4		12
A5		15
A6	25	3
A7		6
A8		9
A9		12
A10		15
A11	30	3
A12		6
A13		9
A14		12
A15		15
A16	35	3
A17		6
A18		9
A19		12
A20		15

Ogledna vina grupe **B**, proizvedena su sa ciljem ispitivanja uticaja dodatka šepurine u kljuk, na fenolna jedinjenja i boju vina. Vina Cabernet sauvignon i Merlot, berbe 2003, 2004. i 2005, proizvedena su u laboratorijskim uslovima, postupkom mikroviniifikacije Maceracija je izvršena na klasičan način. Maceracija je trajala 6 odnosno 9 dana i vršena je na temperaturi 30 °C. Odnos čvrste i tečne faze u kljuku menjan je vraćanjem, jednog dela ili celokupne količine, predhodno odvojene šepurine. Šema ogleda **B** prikazana je u tabeli 6.

**Tabela 6.** Šema ogleda **B** za vina Cabernet sauvignon (Cs) i Merlot (M)

Oznaka uzorka	Trajanje maceracije (dani)	Šepurina vraćena u kljuk (%)
B1		0
B2	6	25
B3		50
B4		100
B5		0
B6	9	25
B7		50
B8		100

Ogledna vina grupe **C**, proizvedena su sa ciljem ispitivanja uticaja dodatka semenki u kljuk, na fenolna jedinjenja i boju vina. Vina Cabernet sauvignon i Merlot, berbe 2003, 2004. i 2005, proizvedena su u laboratorijskim uslovima, postupkom mikroviniifikacije Maceracija je izvršena na klasičan način. Maceracija je trajala 6 odnosno 9 dana i vršena je na temperaturi 30 °C. Odnos čvrste i tečne faze u kljuku menjan je dodavanjem semenki od grožđa iste sorte vinove loze. Šepurina je odvojena u potpunosti. Šema ogleda **C** prikazana je u tabeli 7.

**Tabela 7.** Šema ogleda **C** za vina Cabernet sauvignon (Cs) i Merlot (M)

Oznaka uzorka	Trajanje maceracije (dani)	Dodatak semenki (%)
C1		0
C2	6	100
C3		200
C4		300
C5		0
C6	9	100
C7		200
C8		300

Po završetku faze maceracije kljuk je isceden na laboratorijskoj cednici, dobijeno vino odvajano u staklene balone na koje je montiran vranj, kako bi se sprečio prodor vazduha u prostor iznad površine vina. Nakon završetka faze tihog doviranja i taloženja grubog taloga, vino je otočeno. Prvo pretakanje vina obavljeno je nakon mesec dana. Tokom pretakanja vina proveren je sadržaj sumpor-dioksida i izvršene su potrebne korekcije tako da se sadržaj

ukupnog sumpor-dioksida u svim vinima kretao oko 80 mg/l, a slobodnog 20 - 25 mg/l. Nakon pretakanja vino je razliveno u staklene boce koje su zatvorene krunskim zatvaračima. Do analize vina su čuvana na temperaturi oko 10 - 12 °C. Analize uzoraka novih vina vršene su oko dva meseca nakon pretakanja.

Mlada vina **B** i **C**, su nakon drugog pretakanja, obrađena sredstvima za bistrenje i stabilizaciju vina.

Upotrebljena su dva organska i dva neorganska sredstva za bistrenje i stabilizaciju vina. Od organskih sredstava za bistrenje vina upotrebljeni su:

- Albumin ALBUCLAR, u količini 0,2 g/l

ALBUCLAR, albumin proizveden u Italiji (Gruppo Vason) posebnim postupkom kako bi se sačuvale karakteristike proteina belanceta. Prema deklaraciji proizvođača, ovo enološko sredstvo ima odličnu rastvorljivost i visok afinitet prema taninima. Preporučuje se, prvenstveno za tretman crvenih vina.

- Želatin GELAXINA ORO, u količini 0,2 g/l

GELAXINA ORO, želatin visoke čistoće, italijanskog proizvođača Gruppo Vason. Sposobnost želiranja iznosi 100 Blooma. Gelaxina ORO ima visoku sposobnost flokulacije za polifenolna jedinjenja.

Od neorganskih sredstava za bistrenje i stabilizaciju, upotrebljeni su:

- Na-bentonit, PLUSGRAN, u količini 0,75 g/l

PLUSGRAN, aktivirani granulirani Na-bentonit velike sposobnosti eliminacije proteina, proizvođača Gruppo Vason iz Italije. Ovaj bentonit proizveden je od montmorilontnih minerala iz nalazišta u području Mediterana. Karakteristike minerala i postupak aktiviranja omogućuju dobijanje bentonita visoke sposobnosti eliminacije proteina. Podesan je za stabilizaciju vina u završnim fazama pripreme za flaširanje.

- Polivinilpolipirolidon (PVPP) u količini 0,2 g/l

PVPP visoke čistoće i adsorptivne sposobnosti, proizvođača Gruppo Vason, odlikuje se visokom i specifičnom sposobnošću adsorpcije fenolnih materija, a naročito tanina podložnih oksidaciji. Potpuno je hemijski inertan i pogodan za primenu u enologiji. Proizvođač navodi da PVPP u tretmanu crvenih vina uzrokuje minimalno smanjenje intenziteta boje. Preporučuje se za eliminisanje žuto-narandžastih nijansi kod crvenih vina i smanjenje sadržaja tanina kod mladih crvenih vina.

Nakon obrade sredstvima za bistrenje i stabilizaciju, vina su otočena sa formiranog taloga.

Nabrojana enološka sredstva upotrebljena su u skladu sa enološkom praksom i preporukama proizvođača. Upotrebljene su količine koje odgovaraju prosečnim količinama koje se uobičajeno koriste u praksi.

## 3.2 METODE

### 3.2.1. Sadržaj ukupnih kiselina

Sadržaj ukupnih kiselina određen je volumetrijski, metodom potenciometrijske titracije (*Recueil d OIV, 1990*) i izražen u g/l, kao vinska kiselina. Metoda potenciometrijske titracije zasniva se na neutralizaciji kiselina i njihovih kiselih soli, do pH = 7,00. Metoda je pogodna za određivanje u svim uzorcima šire i vina, bez obzira na boju.

Postupak:

U čašu zapremine 100 ml odpipetira se 10 ml šire i doda oko 50 ml destilovane vode. Čaša se stavi na magnetnu mešalicu i u nju se uroni elektroda pH metra. Magnetna mešalica se uključi pre početka titracije. Rastvor natrijum-hidroksida (0,1 M) dodaje se iz birete dok se ne dostigne vrednost pH = 7,00, što je završna tačka titracije.

Izračunavanje:

Sadržaj ukupnih kiselina u širi ( g/l), preračunat na vinsku kiselinu, po obrascu:

$$\text{ukupne kiseline (g/l)} = V (\text{NaOH}) \cdot F (\text{NaOH}) \cdot 0,75$$

gde je:

- V (NaOH) - utrošak rastvora natrijum-hidroksida za titraciju, izražen u ml,
- F (NaOH) - faktor molariteta rastvora natrijum-hidroksida,
- 0,75 - faktor koji se izvodi iz mase vinske kiseline koja reaguje sa 1 ml korišćenog rastvora natrijum-hidroksida i zapremine šire koja se titriše. Sa 1 ml rastvora natrijum-hidroksida, koncentracije 0,1 M, reaguje sa 0,0075 g vinske kiseline.

### 3.2.2. Sadržaj ukupnog sumpor- dioksida

Sadržaj ukupnog sumpor-dioksida određen je jodometrijskom titracijom prema metodi opisanoj u *Recueil d OIV (1990)*. Prvo se jodometrijskom titracijom određuje slobodni sumpor-dioksid. Nakon dvostruke alkalne hidrolize, jodometrijski određi vezani sumpor-dioksid. Pošto jod oksidiše druge materije iz vina, u istom uzorku vina potrebno je izvršiti korektivnu titraciju kako bi se utvrdila količina joda koja se utroši za njihovu oksidaciju. Slobodni sumpor-dioksid se veže u potpunosti etanalom, a zatim izvrši titracija jodom.

Postupak:

U erlenmajer od 500 ml, sa brušenim čepom, odmeri se 50 ml vina, doda 5 ml rastvora skroba (1 % m/V), 30 mg kompleksona III i 3 ml sumporne kiseline (razblažene 1 : 10). Odmah po dodatku kiseline vrši se titracija rastvorom joda (0,02 M) do promene boje. Utrošak joda je V. U isti erlenmajer odmeri se zatim 8 ml rastvora natrijum-hidroksida (4 M), erlenmajer začepi, nakon 5 minuta odmeri se 10 ml razblažene sumporne kiseline i izvrši titracija istim rastvorom joda (utrošak V'). Nakon druge titracije rastvoru u erlenmajeru doda se 20 ml natrijum hidroksida (4 M) i začepi. Po isteku 5 minuta u erlenmajer se odmeri 200 ml hladne destilovane vode, promućka, doda 30 ml sumporne kiseline (1 : 10) i titriše jodom do promene boje (utrošak V'').

Korektivna titracija vrši se tako što se u erlenmajer od 300 ml odmeri 50 ml vina, doda 5 ml rastvora etanala (koncentracije 7 g/l), zatvori i ostavi da stoji 30 minuta. Po isteku predviđenog vremena, u erlenmajer se doda rastvor skroba i 3 ml razblažene sumporne kiseline i izvrši titracija jodom (utrošak V''').

Izračunavanje:

Sadržaj ukupnog sumpor-dioksida u vinu (mg/l) izračunava se po obrascu:

$$\text{ukupni SO}_2 \text{ (mg/l)} = 12,8 \cdot (V + V' + V'' - V''')$$

### 3.2.3. *Određivanje sadržaja šećera u širi*

Sadržaj šećera u širi određen je pomoću ručnog refraktometra (*Jazić, Ružić, 1982*). Ručni refraktometar je optički instrument čiji se rad zasniva na merenju veličine ugla pod kojim se svetlost prelama pri prolasku kroz sloj šire. Ugao prelamanja svetlosti zavisi od gustine šire, odn. količine šećera. U vidnom polju nalazi se skala po Oechle-u na kojoj se sadržaj šećera očitava izražen u Oechle-ovim stepenima (°Oe). Radi lakšeg praćenja, očitane vrednosti sadržaja šećera preračunate su u procenite (% m/V), po obrascu:

$$\% \text{ šećera (m/V)} = 0,266 \cdot \text{°Oe} - 3$$

### 3.2.4. *Određivanje boje vina*

Boja vina sastavljena je od tri komponente: žute ( $\lambda=420$  nm), crvene ( $\lambda=520$  nm) i plave ( $\lambda=620$  nm). Spektrofotometrijskim merenjem absorbancija na ove tri talasne dužine izračunava se šest parametara: intenzitet boje, nijansa boje (*Recueil d OIV, 1990*), udeo žute, crvene i plave boje u intenzitetu boje, kao i oblik spektra (*Glories, 1984*).

Postupak:

Za spektrofotometrijsko merenje absorbancije na talasnim dužinama 420, 520 i 620 nm koriste se kivete debljine sloja 1 mm. Vino čija se boja meri mora biti bistro. Ako vino

nije potpuno bistro, potrebno je pre merenje ukloniti čestice mutnoće centrifugiranjem. Merenje se vrši u odnosu na kontrolnu kivetu koja se puni destilovanom vodom.

Izračunavanje:

Intenzitet boje predstavlja ukupnu boju vina prikazanu kao suma absorbancija:

$$IB = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

Nijansa boje izračunava se kao odnos absorbancija:

$$NB = A_{420} / A_{520}$$

Učešće pojedinih boja u intenzitetu:

$$\text{žuta boja: } A_{420} (\%) = (A_{420} / IB) \cdot 100$$

$$\text{crvena boja: } A_{520} (\%) = (A_{520} / IB) \cdot 100$$

$$\text{plava boja: } A_{620} (\%) = (A_{620} / IB) \cdot 100$$

Oblik spektra definisan je ( $dA$  %) vrednošću, koja se izračunava po sledećem obrascu:

$$dA (\%) = [1 - (A_{420} + A_{620}) / 2 \cdot A_{520}]$$

### 3.2.5. Sadržaj ukupnih antocijana

Određivan je spektrofotometrijski (*Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1965, Rivas-Gonzalo i sar., 1992*). Metoda se zasniva na svojstvu antocijana da pri  $pH = 1$  povećava ju absorbanciju na  $\lambda = 520$  nm, a da se obezbojavaju dodatkom sumpor-dioksida. Boja koja ostaje nakon dodatka sumpor-dioksida potiče od polimernih pigmenata.

Postupak:

1 ml vina doda se 1 ml 96 % - nog etanola koji sadrži 0,1 % (v/v) hlorovodonične kiseline i 20 ml 2 % -ne (v/v) hlorovodonične kiseline. U dve odvojene epruvete udmeri se po 10 ml ove smeše. U prvu epruvetu se zatim doda 4 ml destilovane vode, a u drugu 4 ml 15 % -nog (m/v) rastvora natrijum - metabisulfita. Nakon 15 minuta meri sa absorbancija na talasnoj dužini  $\lambda = 520$  nm u odnosu na destilovanu vodu. Za merenje se koriste staklene kivete debljine sloja 10 mm. Absorbancija  $A_1$  odnosi se na smešu kojoj je dodavana destilovana voda, a  $A_2$  je absorbancija smeše kojoj je dodavan natrijum - metabisulfit.

Izračunavanje:

Sadržaj antocijana se izračunava po sledećem obrascu:

$$\text{antocijani (mg/l)} = 875 (A_1 - A_2)$$



### 3.2.6. Indeks $A_{280}$

Količina tanoidnih materija određena je spektrofotometrijski prema metodi Ribereau-Gayon (1971). Metoda se zasniva na direktnom merenju absorbancije uzorka vina, razblaženog destilovanom vodom, u UV oblasti spektra, na talasnoj dužini  $\lambda = 280$  nm.

Postupak:

Uzorak crvenog vina razblaži se destilovanom vodom u odnosu 1 : 100. Absorbancija tako razblaženog vina meri se spektrofotometrijski, u kvarcnim kivetama debljine sloja 10 mm, na talasnoj dužini  $\lambda=280$  nm.

Izračunavanje:

Indeks tanoidnih jedinjenja (Indeks  $A_{280}$ ) izračunava se množenjem očitane vrednosti absorbancije sa faktorom razblaženja, po obrascu:

$$\text{Indeks } A_{280} = A_{280} \cdot 100$$

### 3.2.7. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen je spektrofotometrijski, po metodi Folin-Ciocalteu (*Singleton i sar., 1999*). Metoda se zasniva na oksidaciji fenolnih jedinjenja pomoću reagensa odn. rastvora Folin-Ciocalteu. Rastvor Folin-Ciocalteu sadrži smešu fosfovolframove ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) i fosfomolibdenske kiseline ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Ovaj reagens oksidiše fenolna jedinjenja, a sam se redukuje u smešu volfram-oksida ( $W_8O_{23}$ ) i molbden-oksida ( $Mo_8O_{23}$ ). Rastvor postaje intenzivno plave boje čiji intenzitet je srazmeran količini fenolnih jedinjenja. Plava boja oksida je stabilna. Intenzitet bolje se meri spektrofotometrijski, na talasnoj dužini:  $\lambda = 750$  nm.

Postupak:

U odmerni sud od 100 ml unosi se 1 ml crvenog vina, razblaženog destilovanom vodom u odnosu 1:5. Nakon toga se u odmerni sud dodaje 50 ml destilovane vode, 5 ml rastvora Folin-Ciocalteu (razblaženog 1:3) i 20 ml rastvora natrijum-karbonata (20 % m/V). Sud se dopuni do oznake, homogenizuje i ostavi 30 minuta kako bi se reakcija odigrala. Paralelno se postavlja slepa proba na isti način osim što se umesto vina koristi destilovana voda. Absorbancija se meri na talasnoj dužini  $\lambda = 750$  nm, u odnosu na slepu probu. Merenje se vrši u staklenim kivetama debljine sloja 10 mm. Očitane vrednosti absorbancija se interpoliraju na klibracionu krivu, sačinjenu po istom postupku, sa rastvorima galne kiseline poznatih koncentracija. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja izračunava se množenjem

vrednosti očitane sa klibracione krive sa razblaženjem vina. Rezultat se izražava u g/l, galne kiseline.

### 3.2.8. Određivanje flavan-3-ola

Sadržaj ukupnih flavan-3-ola u vinima, određen je spektrofotometrijski prema vanilinskoj metodi opisanoj od strane *Revilla i sar., 1991*, korišćenjem (+)-katehina kao standarda. Uzorci crvenih vina su rzblaživani u odnosu (1:10). Nakon toga su u serije od po tri epruvete odmeravani razblaženi uzorci i reaktivi, po sledećoj šemi:

	epruveta A	epruveta B	epruveta C
vino (razblaženo, 1:10)	1,0 ml	0,0 ml	1,0 ml
redestilovana voda	0,0 ml	1,0 ml	0,0 ml
HCl (35 %)	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
p-vanilin (1 %-ni rastvor u apsolutnom etanolu)	1,0 ml	1,0 ml	0,0 ml
96 % alkohol	1,0 ml	1,0 ml	2,0 ml

Nakon 30 minuta, izmerene su absorbancije  $A_A$ ,  $A_B$  i  $A_C$ , na talasnoj dužini  $\lambda = 500$  nm, u odnosu na kontrolnu kivetu u kojoj se nalazila redestilovana voda. Absorbancije su merene u staklenim kivetama, debljine sloja 10 mm. Za svaki uzorak izračunata je absorbanca A:

$$A = A_A - A_B - A_C$$

Interpolacijom vrednosti A na kalibracionu krivu, očitavan je sadržaj flavan-3-ola za svaki uzorak vina, a rezultati su iskazanu u g (+) katehina / l vina. Kalibraciona kriva konstruisana je na sledeći način: osnovni rastvor (+)-katehina napravljen je rastvaranjem 0,02 g (+)-katehina u 50 ml apsolutnog etanola, što je ekvivalentno sadržaju od 0,4 g/l. Razblaživanjem osnovnog rastvora apsolutnim alkoholom, dobijena je serija rastvora sledećih koncentracija (+)-katehina: 0 mg/ml; 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml; 0,16 mg/ml; 0,2 mg/ml i 0,4 mg/ml, što je ekvivalentno sadržaju od: 0 g/l, 0,05 g/l, 0,1 g/l, 0,16 g/l, 0,2 g/l i 0,4 g/l (+)-katehina. Absorbancija A ovih rastvora (+)-katehina određena je po predhodno opisanom postupku.

### 3.2.9. HPLC analiza vina

Sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina određivan je metodom visokopritisne tečne hromatografije. Frakcionizacija fenolnih jedinjenja izvršena je po sledećem postupku: tačno odmerena zapremina vina (25 ml) uparena je na rotacionom vakuum uparivaču do zapremine oko 15 ml. Temperatura uparavanja kretala se u intervalu 35 - 40 °C. Nakon uparavanja podešena je pH vrednost na pH = 7 upotrebom 1 M i 0,1 M natrijum-hidroksida. Vino (pH = 7) kvantitativno je preneto u odmernu tikvicu od 25 ml koja je zatim dopunjena bidestilovanom vodom (pH = 7). Fenolne komponente su zatim razdvojene primenom ekstrakcije na čvstoj fazi upotrebom dve vezane SEP PAK C<sub>18</sub> kolonice (Waters Associates, Milford, MA, SAD), predhodno ispirane sa 10 ml metanola zakišeljelog sa 1 % hlorovodonične kiseline, 10 ml čistog metanola i na kraju bidestilovanom vodom (pH = 7). U gornju kolonicu unet je 1 ml pripremljenog vina i zatim vršeno ispiranje bidestilovanom vodom (10 ml) u manjim alikvotima. Vodom se ispiraju fenolne kiseline. Ispiranje se vrši pod blagim vakuumom, podešenim tako da protok bude oko 20 kapi u minuti. Nakon ispiranja kolonice su sušene propuštanjem azota. Rastvaranje neutralnih fenolnih jedinjenja izvršeno je sa 20 ml etil-acetata, pod blagim vakuumom (20 kapi u minuti), rastvarač uparen pod vakuumom, na temperaturi 30 °C, a suvi ostatak rastvoren sa 1 ml smeše metanola i bidestilovane vode. Rastvor je do momenta analize čuvan u zamrzivaču (-18 °C).

Sadržaj fenolnih jedinjenja u uzorcima je određen tečnom hromatografijom visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu Liquid Chromatograph HP 1090 (Hewlett-Packard, USA). Korišćena je kolona Zorbax SB-C18, 5 µm, 3.0 x 250 mm i.d. zaštićena predkolonom Zorbax SB-C18, 5 µm, 4.6 x 12.5 mm i.d. (Agilent, USA). Detekcija razdvojenih pikova je izvršena pomoću detektora sa serijom dioda (Diode Array Detector, DAD) na 277 nm, a absorpcioni spektri komponenata su snimljeni u opsegu od 210 do 400 nm. Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A - 1 % glacijalna sirćetna kiselina u vodi (v/v) i B – acetonitril. Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0-20 min, 95-87 % A; 20-30 min, 87 % A; 30-45 min, 87-10 % A; 45-65 min. 10 % A. Kolona je uravnotežena na početne uslove, 95 % A, 10 min. Protok mobilne faze je iznosio 0,300 ml/min. Ručno je injektovano 10 µl rastvora uzorka. Kolona je termostatirana na sobnoj temperaturi (22 °C).

Fenolne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. Korišćeni su standardi (+)-katehina i (-)-epikatehina. Za potvrdu identifikacije

komponente je utvrđena i čistoća pika. Kvantifikacija komponenata je izvršena metodom spoljašnjeg standarda. Za svaki pojedinačni standard je pripremljen osnovni rastvor standarda koncentracije 1,0 mg/ml, rastvaranjem u 10 % rastvoru metanola u vodi (v/v). Od ovog rastvora je pripremljena serija razblaženih rastvora standarda koncentracija u opsegu 0,005 – 0,200 mg/ml. Konstruisana je kalibraciona kriva, za svaki standard, na osnovu dobijenih površina pikova u zavisnosti od koncentracije standarda. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su koncentracije komponenti u uzorcima. Za komponente vina za koje nije bio dostupan standard, kvantifikacija je izvršena na osnovu kalibracione krive za (+)-katehin.

### 3.2.10. Antiradikalska aktivnost vina

Antiradikalska aktivnost vina na stabilne DPPH<sup>•</sup> radikale i reaktivne hidroksil radikale, ispitana je elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom.

ESR spektralna analiza DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala određena je u reakcionoj smeši dobijenoj mešanjem 200 µl 12 % etanola i 400 µl 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH<sup>•</sup> (slepa proba). Uticaj vina na transformaciju DPPH<sup>•</sup> radikala analiziran je u rastvoru koji je dobijen mešanjem 15 µl uzorka vina, 185 µl 12 % etanola i 600 µl 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH<sup>•</sup>. Smeša je intenzivno mešana u toku 2 minuta i prenetu u Bruker ER-160FC kvarcnu kivetu za vodene rastvore. ESR spektri snimani su na ESR spektrometru Bruker 300E pod sledećim uslovima: frekvencija modulacije - 100 kHz, amplituda modulacije - 0,256 G, vremenska konstanta - 40,96 ms, vremenski opseg merenja - 327,68 ms, centar polja - 3440,00 G, ukupan opseg merenja - 100,00 G, frekvencija mikrotalasnog područja - 9,45 GHz, snaga mikrotalasnog područja - 7.96 mW, jačina struje  $5 \cdot 10^5$ , temperatura merenja - 23 °C.

Antiradikalska aktivnost ( $AA_{DPPH^{\bullet}}$ ) vina definisana je izrazom:

$$AA_{DPPH^{\bullet}} = (h_0 - h_x) / h_0 \cdot 100 (\%)$$

gde je:  $h_0$  - visina drugog pika ESR signala slepe probe;  $h_x$  - visina drugog pika ESR signala uzorka

ESR spektralna analiza hidroksil radikala izvršena je na sledeći načina: u Fentonovom modelu sistemu koji je dobijen mešanjem 100 µl 10 mM FeCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O, 400 µl 80 mM DMPO (5,5-dimetilpirolin-N-oksida), 100 µl 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 200 µl 12 % etanola ispitano je nastajanje hidroksil radikala, nakon reakcionog perioda od 5 minuta (slepa proba). Da bi se ispitaio uticaj uzoraka vina na stvaranje i transformaciju hidroksi radikala uzorci vina su dodavani u

Fentonov model sistem u zapremini 200  $\mu\text{l}$ . ESR spektralna određivanja hidroksi radikala u svim ispitivanim model sistemima koji su se nalazili u Bruker ER-160FC kvarcnoj kivetici za vodene rastvore, izvršena su na ESR spektrometru Bruker 300E pod sledećim uslovima: frekvencija modulacije - 100 kHz, amplituda modulacije - 0,512 G, vremenska konstanta - 81,92 ms, vremenski opseg merenja - 163,84 ms, centar polja - 3440,00 G, ukupan opseg merenja - 100,00 G, frekvencija mikrotalasnog područja - 9,64 GHz, snaga mikrotalasnog područja - 20 mW, jačina struje  $2 \cdot 10^4$ , temperatura merenja - 23 °C.

Antiradikalska aktivnost ( $AA_{\text{OH}}$ ) vina definisana je izrazom:

$$AA_{\text{OH}} = (h_0 - h_x)/h_0 \cdot 100 (\%)$$

gde je:  $h_0$  - visina drugog pika ESR signala slepe probe;  $h_x$  - visina drugog pika ESR signala uzorka

### *3.2.11. Statistička obrada rezultata*

Statistička obrada podataka u ovim ispitivanjima izvedena je korišćenjem programa STATISTICA 8.0, 2009).

## 4. REZULTATI I DISKISIJA

### 4.1. UTICAJ USLOVA MACERACIJE NA BOJU I FENOLNA JEDINJENJA CRVENIH VINA

U ispitivanjima je, kao sirovina, korišćeno grožđe dve crne vinske sorte vinove loze: Cabernet sauvignon i Merlot. Ove sorte vinove loze su rasprostranjene u svetu i kod nas, i zastupljene su u svim vinogradarskim regionima. Obe sorte daju srednje prinose. Prema vremenu sazrevanja ubrajaju se u sorte III epohe, što znači da uz odgovarajuće agrotehničke mere i agroekološke uslove sazrevaju u prvoj polovini meseca oktobra.

U fruškogorskim vinogradima sorte Cabernet sauvignon i Merlot daju osrednje prinose grožđa i relativno dobro nakupljaju šećer. Prosečan sadržaj šećera u grožđu Cabernet sauvignon u vinogradu Departmana za voćarstvo i vinoigradarstvo je 21,1 %, a sadržaj kiselina 9,8 g/l. Grožđe Merlot iz istih vinograda u proseku je nakupljalo 19,7 % šećera i 9,1 g/l kiselina. Prosečne vrednosti su izračunate na osnovu podataka prikupljenih 18 godina (*Cindrić i sar., 2000*).

U tabeli 8. prikazane su vrednosti osnovnih pokazatelja kvaliteta grožđa koje je prerađeno u tri serije ogleda.

**Tabela 8.** Sadržaj šećera i kiselina u grožđu upotrebljenom u proizvodnji oglednih vina

	berba 2003.		berba 2004.		berba 2005.	
	Cabernet s.	Merlot	Cabernet s.	Merlot	Cabernet s.	Merlot
Sadržaj šećera, %	23,00	25,20	21,00	20,00	20,50	21,00
Ukupne kiseline, g/l	5,90	5,60	9,10	7,60	9,00	7,00

Agroekološki uslovi imaju izražen uticaj na kvalitet i zdravstveno stanje grožđa. Osim nakupljanja šećera za proizvodnju crvenih vina, važan činilac je fenolna zrelost grožđa. U praksi fenolnu zrelost grožđa u vinogradu je teško pratiti, i uglavnom se momenat berbe određuje na osnovu sadržaja šećera tj. odnosa količine šećera i ukupnih kiselina. Usled varijacija agroekoloških uslova, srednjih temperatura i količina padavina, dolazi do velikih oscilacija u kvalitetu crvenih vina. Te oscilacije su prilično izražene pojedinih godina (berbi), kada su srednje mesečne temperature niže, a količina padavina iznad proseka. Vina proizvedena od grožđa koje nije dostiglo fenolnu zrelost imaju niži intenzitet boje, a pre svega

niži sadržaj fenolnih jedinjenja. Sadržaj fenolnih jedinjenja u tim vinima je ponekad na granici prihvatljivog za crvena vina. U tom smislu ispitana je mogućnost promene uslova maceracije, pre svega dužine i temperature na kojoj se maceracija odvija, na sadržaj fenolnih jedinjenja i boju crvenih vina Cabernet sauvignon i Merlot. Akcenat je stavljen na uticaj odnosa čvrste i tečne faze u kljuku na sadržaj fenolnih jedinjenja i boju crvenih vina.

U tabeli 9. prikazane su vrednosti srednjih mesečnih temperatura i količine padavina u toku četiri meseca (juni - septembar). Podaci se odnose na tri godine (berbe) tokom kojih je vršena mikroviniifikacija grožđa. Vidi se da postoje velike razlike u količini padavina tokom tri posmatrane godine. Naročito velike količine padavina zabeležene su u junu i julu 2004 godine kao i u avgustu 2005 godine. U avgustu 2003 godine zabeležene su najviše prosečne temperature i najniža količina padavina. Prosečne temperature i količine padavina u septembru 2003 i 2005 godine ne razlikuju se mnogo. Međutim, berba 2003. je počela znatno ranije zbog visokih avgustovskih temepratura.

**Tabela 9.** Prosečne mesečne temperature i količina padavina za period juni - septembar u oglednim vinogradima (*podaci Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu*)

Godina↓	Mesec→	juni	juli	avgust	septembar
berba 2003.	temperatura, °C	23,9	22,7	25,4	17,3
	padavine, l/m <sup>2</sup>	54,1	64,6	25,4	79,3
berba 2004.	temperatura, °C	19,9	22,1	21,8	16,6
	padavine, l/m <sup>2</sup>	102,2	107,3	48,5	43,5
berba 2005.	temperatura, °C	19,7	22,0	20,2	17,6
	padavine, l/m <sup>2</sup>	109,0	87,3	142,2	74,6

#### 4.1.1. Uticaj trajanja i temperature maceracije na sadržaj fenolnih jedinjenja

U tabeli 10. prikazan je uticaj dužine i temperature maceracije na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana i flavan-3-ola, u zavisnosti od vremena trajanja i temperature maceracije u vinima Cabernet sauvignon.

**Tabela 10.** Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana, flavan-3-ola i tanoidnih materija u vinu Cabernet sauvignon u zavisnosti od dužine i temperature maceracije

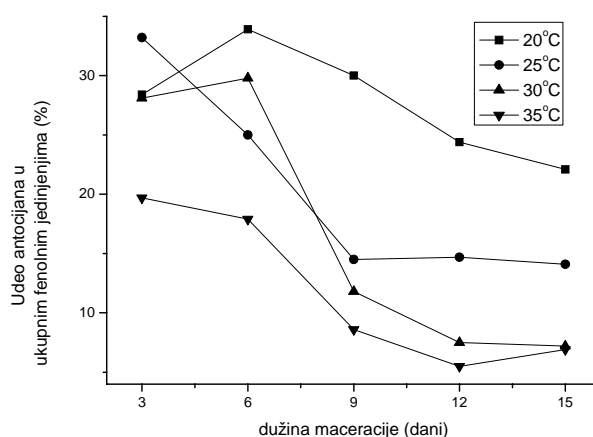
Vino	Uk. fenolna jedinjenja (g/l)	Antocijani (g/l)	Flavan-3-oli (g/l)	A <sub>280</sub>
20 °C				
Cs-A1 <sub>2003</sub>	1,323	0,376	0,161	28,2
Cs-A2 <sub>2003</sub>	1,689	0,573	0,466	36,5
Cs-A3 <sub>2003</sub>	1,599	0,481	0,510	33,4
Cs-A4 <sub>2003</sub>	1,739	0,425	0,444	37,0
Cs-A5 <sub>2003</sub>	1,815	0,402	0,618	36,3
25 °C				
Cs-A6 <sub>2003</sub>	1,681	0,558	0,564	35,9
Cs-A7 <sub>2003</sub>	1,612	0,403	0,765	34,6
Cs-A8 <sub>2003</sub>	1,740	0,253	0,542	34,4
Cs-A9 <sub>2003</sub>	2,390	0,352	1,040	39,7
Cs-A10 <sub>2003</sub>	2,094	0,296	1,253	38,2
30 °C				
Cs-A11 <sub>2003</sub>	1,949	0,548	0,619	39,0
Cs-A12 <sub>2003</sub>	2,219	0,661	1,312	46,6
Cs-A13 <sub>2003</sub>	2,120	0,251	0,921	38,1
Cs-A14 <sub>2003</sub>	2,345	0,176	1,489	40,3
Cs-A15 <sub>2003</sub>	2,680	0,195	1,716	43,0
35 °C				
Cs-A16 <sub>2003</sub>	1,851	0,365	0,878	36,6
Cs-A17 <sub>2003</sub>	2,400	0,430	1,488	45,4
Cs-A18 <sub>2003</sub>	2,496	0,215	2,037	41,1
Cs-A19 <sub>2003</sub>	2,597	0,143	1,661	43,4
Cs-A20 <sub>2003</sub>	3,045	0,210	1,804	52,8

Shodno očekivanjima sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu Cabernet sauvignon, povećava se produženjem vremena trajanja maceracije i povećanjem temperature. Na temperaturi 20 °C sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja nakon 15 dana maceracije bio je za svega 37 % veći u odnosu na sadržaj u vinu ocedenom nakon tri dana maceracije. Temperatura od 20 °C se smatra niskom i u proizvodnji crvenih vina u našoj zemlji se relativno retko primenjuje. Ekstrakcija fenolnih jedinjenja se na 20 °C odvijala sporo, tako da je sadržaj fenolnih jedinjenja tek nakon 9 dana dostigao vrednosti koje su uobičajene za laka crvena vina. Na temperaturi 25 °C povećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja bilo je nešto intenzivnije. Nakon 12 dana maceracije utvrđen je najviši sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu, koji je za 42 % viši od sadržaja fenolnih jedinjenja u vinu ceđenom posle tri dana maceracije. Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu ceđenog iz kljuka u kome je maceracija vršena na 30 °C, već posle šest dana bio je veći od 2 g/l. Najintenzivnija ekstrakcija fenolnih jedinjenja odigrala se na temperaturi 35 °C. Posle 15 dana maceracije sadržaj fenolnih



jedinjenja bio je veći od 3 g/l, i za 64 % veći od sadržaja fenolnih jedinjenja u vinu ceđenom nakon tri dana maceracije na istoj temperaturi.

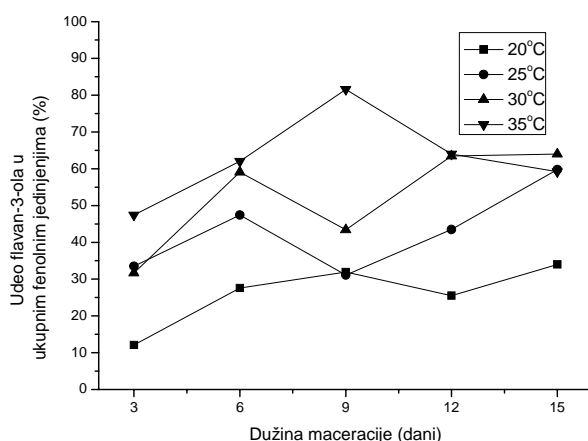
Pošto se antocijani rastvaraju u širi bez etanola (predfermentativna maceracija), najviše koncentracije ovih jedinjenja zabeležene su u vinu Cabernet sauvignon nakon 3, odnosno 6 dana maceracije na svim primenjenim temperaturama. Rezultati prikazani od strane autora *Budić-Leto i sar.*(2005), pokazuju sličan trend. Količina antocijana se povećava tokom prvih 5 dana, a zatim postepeno opada. Na temperaturama maceracije, 20 °C, 30 °C i 35 °C najviši sadržaj antocijana utvrđen je u vinima nakon 6 dana maceracije, dok je na 25 °C najviše antocijana utvrđeno u vinu već posle tri dana maceracije. Produženjem maceracije, sadržaj antocijana se smanjivao. Prema literaturnim podacima (*Auw isar., 1996, Ribereau-Gayon, tom 2, 1999*) do opadanja sadržaja antocijana dolazi usled reakcija polimerizacije, interakcija sa drugim fenolnim jedinjenjima, absorpcije na ćelijske zidove kvasaca, oksidacije, itd. Pošto se ekstrakcija antocijana iz pokožice odigrava veoma brzo, udeo antocijana u količini ukupnih fenolnih jedinjenja najviši je upravo nakon tri i šest dana maceracije. Najveći udeo antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima utvrđen je nakon 6 dana maceracije na 20 °C i 3 dana maceracije na 25 °C i iznosio je 34% odnosno 33%. U vinu ocedenom posle 6 dana maceracije na 30 °C, udeo antocijana u ukupnim fenolima iznosio je 30 %, a na temperaturi 35 °C svega 18 %. Najniži udeo antocijana u ukupnim fenolima utvrđen u vinu proizvedenom iz kljuka čija je faza maceracije bila 12 i 15 dana, na 35 °C, i iznosio je oko 6 % (slika 20).



**Slika 20.** Udeo (%) antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima – vino Cabernet sauvignon

Za ekstrakciju flavan-3-ola potrebno je duže vreme maceracije i više temperature. Sadržaj flavan-3-ola u vinu Cabernet sauvignon, proizvedenom nakon maceracije na 20 °C u

toku tri dana, bio je najniži, a udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolima svega 16 %. Sadržaj flavan-3-ola, u zavisnosti od dužine maceracije i primenjene temperature, menjao se na približno isti način kao i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolima dostiže vrednost 60 % nakon 15 dana maceracije na 25 °C. Sličan udeo utvrđen je u vinima proizvedenim nakon 6, 9, 12 i 15 dana maceracije na 30 °C. Temperatura 35 °C nije značajnije promenila udeo flavan-3-ola, osim kod vina Cs-A18<sub>2003</sub> (9 dana maceracije), u kojem je udeo flavan-3-ola, bio 81 % (slika 21).



**Slika 21.** Udeo (%) flavan-3-ola u ukupnim fenolnim jedinjenjima – vino Cabernet sauvignon

Indeks tanoidnih jedinjenja uglavnom je pratio promene sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavan-3-ola, tako da je minimalna vrednost utvrđena u vinu Cs-A1<sub>2003</sub> (tri dana maceracije na 20 °C), a maksimalna vrednost u vinu Cs-A20<sub>2003</sub> (15 dana maceracije na 35 °C) u kome je utvrđen i najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja.

U tabeli 11. prikazan je uticaj dužine i temperature maceracije na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana i flavan-3-ola, u zavisnosti od vremena trajanja i temperature u vinima Merlot.

**Tabela 11.** Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana, flavan-3-ola i tanoidnih materija u vinu Merlot u zavisnosti od vremena trajanja i temperature maceracije

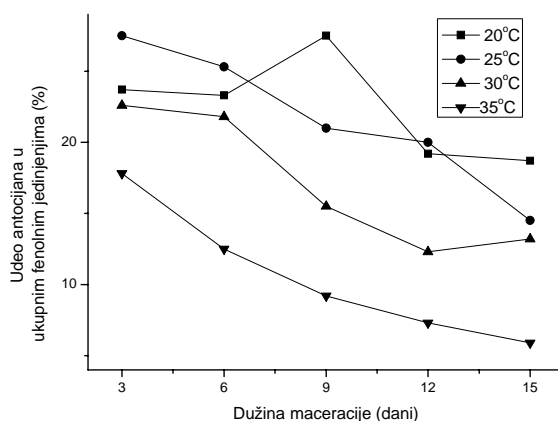
Vino	Uk. fenolna jedinjenja (g/l)	Antocijani (g/l)	Flavan-3-oli (g/l)	A <sub>280</sub>
20 °C				
M-A1 <sub>2003</sub>	1,403	0,333	0,161	35,6
M-A2 <sub>2003</sub>	1,313	0,306	0,465	35,2
M-A3 <sub>2003</sub>	1,418	0,390	0,510	44,8
M-A4 <sub>2003</sub>	1,403	0,269	0,444	38,1
M-A5 <sub>2003</sub>	1,456	0,273	0,617	44,1
25 °C				
M-A6 <sub>2003</sub>	1,592	0,437	0,473	35,4
M-A7 <sub>2003</sub>	1,630	0,412	0,536	36,2
M-A8 <sub>2003</sub>	1,752	0,368	0,780	38,0
M-A9 <sub>2003</sub>	1,809	0,362	1,039	39,1
M-A10 <sub>2003</sub>	1,904	0,277	0,981	37,6
30 °C				
M-A11 <sub>2003</sub>	1,607	0,363	0,360	32,3
M-A12 <sub>2003</sub>	1,422	0,309	0,596	30,7
M-A13 <sub>2003</sub>	2,015	0,312	0,899	40,2
M-A14 <sub>2003</sub>	2,210	0,272	1,651	43,0
M-A15 <sub>2003</sub>	2,015	0,266	1,137	38,3
35 °C				
M-A16 <sub>2003</sub>	1,800	0,321	0,694	35,6
M-A17 <sub>2003</sub>	1,771	0,222	0,654	35,2
M-A18 <sub>2003</sub>	2,000	0,185	1,039	44,8
M-A19 <sub>2003</sub>	2,028	0,150	0,865	38,1
M-A20 <sub>2003</sub>	2,399	0,142	1,286	44,1

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu Merlot proizvedenom iz kljuka na temperaturi maceracije 20 °C, nije se bitno menjao u zavisnosti od vremena maceracije. Maksimalan sadržaj antocijana utvrđen je u vinu nakon 9 dana maceracije. U tom vinu udeo antocijana u ukupnim fenolima bio je nešto viši od 27 %. Na istoj temperaturi maceracije, najviši sadržaj flavan-3-ola utvrđen je posle 15 dana maceracije, kada je udeo ove grupe jedinjenja u ukupnim fenolima iznosio 42 %.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja povećava se produženjem maceracije, na temperaturama 25 °C, 30 °C i 35 °C. Maksimalan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja utvrđen je u vinu Merlot M-A20<sub>2003</sub>. Maceracijom u toku 9 dana na temperaturama 30 °C i 35 °C, proizvedena su vina sa identičnim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja. Na temperaturi maceracije 30 °C, posle 12 dana sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu je bio najveći, za 37 % viši od vina ocedenog posle 3 dana maceracije. Kada je primenjena temperatura 35 °C,

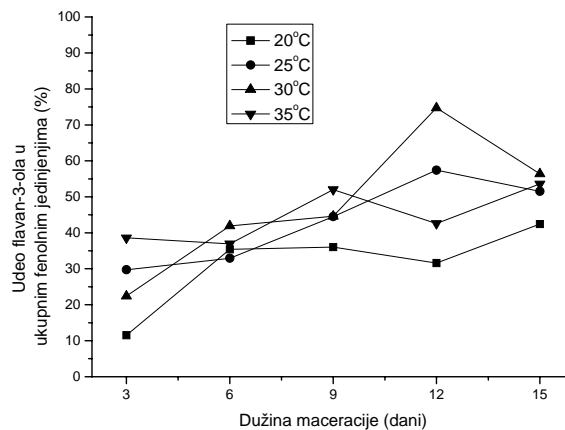
porast sadržaja fenolnih jedinjenja iznosio je ukupno 33 % u vinu u kome je maceracije trajala 15 dana, u odnosu na vino proizvedeno nakon 3 dana maceracije.

Sadržaj antocijana u vinu Merlot dobijenom iz kljuka na kome je primenjena temperatura maceracije bila 25 °C, utvrđen je nakon tri dana maceracije. Nakon devet dana maceracije utvrđen je značajan pad sadržaja antocijana od 18 %. Udeo antocijana u u ukupnim fenolima opada sa 27 % (M-A6<sub>2003</sub>) na 14 % (M-A10<sub>2003</sub>). Na sličan način menjao se sadržaj antocijana i na temperaturi 30 °C, ali je udeo antocijana u ukupnim fenolima bio nešto niži nego na 25 °C. Na 35 °C najviše je smanjen sadržaj antocijana u funkciji vremena, odn. dužine trajanja maceracije (slika 22). Najniži sadržaj antocijana utvrđen je u vinu M-A20<sub>2003</sub>.



**Slika 22.** Promene udela (%) antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima -vino Merlot

Flavan-3-oli u vinu Merlot, ocedenom nakon tri dana maceracije na 20 °C, činili su svega 11 % of ukupnih fenolnih jedinjenja, a nakon 15 dana maceracije udeo flavan-3-ola se povećao na 42 % (slika 23). Za razliku od sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, koji je od trećeg do 15 dana maceracije (na 20 °C) povećan 4 %, sadržaj flavan-3-ola povećan je skoro četvorostruko. Na temperaturi maceracije 25 °C, sadržaj flavan-3-ola je nakon 3 dana maceracije bio približan sadržaju nakon 6 dana maceracije na 20 °C. Najviši sadržaj flavan-3-ola bio je u vinima proizvedenim na višim temperaturama i u toku dugotrajnije faze maceracije. Na sličan način menjao se i indeks  $A_{280}$ .



**Slika 23.** Promene udela (%) flavan-3-ola u ukupnim fenolnim jedinjenjima – vino Merlot

Kada se uporede rezultati za vina Cabernet sauvignon i Merlot primećuje se u oba vina slična pravilnost u pogledu promena sadržaja fenolnih jedinjenja u zavisnosti od vremena i temperature maceracije. U većini vina Merlot sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je niži nego u vinima Cabernet sauvignon. Sadržaj antocijana u većini vina Cabernet sauvignon bio je viši nego u vinima Merlot, proizvedenim pod identičnim uslovima. Tako da je, na primer, udeo antocijana u ukupnim fenolima u vinu Cabernet sauvignon Cs-A13<sub>2003</sub> bio 12 %, dok je u vinu Merlot M-A13<sub>2003</sub> on iznosio 15 %.

#### 4.1.2 Uticaj trajanja i temperature maceracije na boju crvenih vina

Spektar boje crvenih vina ima maksimum na talasnoj dužini  $\lambda=520$  nm (crvena boja), zahvaljujući sadržaju antocijana i njihovih flavilijum jona. Minimum absorbancije beleži se na talasnoj dužini  $\lambda=420$  nm (žuta boja). Prema *Sudrad-u (1958)*, intenzitet i nijansa boje definisani su samo na osnovu učešća crvene i žute boje. Zbir i/ili odnos absorbancija na ove dve talasne dužine su prihvatljivi za definisanje boje starijih crvenih vina, ali ne i za dublju analizu boje mladih crvenih vina. Plava boja, koja potiče od hinoidnih formi antocijana, mora se uzeti u obzir prilikom analize boje vina. Merenje absorbancija na 420, 520 i 620 nm, koristi se da bi se sagledali svi aspekti boje crvenih vina (*Glories, 1985*).

Zbir absorbancija na 420, 520 i 620 nm, pokazuje intenzitet boje vina. Intenzitet boje se u zavisnosti od tipa vina i sorte vinove loze, kreće u granicama 0,3 - 1,8. Nijansa boje, kao odnos absorbancija na 420 i 520 nm, pokazuje stepen prelaska boje u narandžastu, za mlada vina kreće se u intervalu 0,5 - 0,7, dok kod starijih vina može biti 1,2 do 1,3. Udeo boje ( $A_{420}\%$ ,  $A_{520}\%$  i  $A_{620}\%$ ), pokazuje učešće svake od komponenti boje, izraženo u procentima. Vrednost  $dA(\%)$ , koja se još naziva: "svetloća" ili "blistavost" crvene boje, vezana je za oblik

spektra. Vina otvoreno crvene boje imaju jasan i izražen maksimum absorpcije na talasnoj dužini 520 nm. Promenom boje u zatvoreno crvenu ili ciglasto crvenu, maksimum absorpcije na 520 nm, opada. Vrednosti  $dA(\%)$  kreću uglavnom u intervalu 40 - 60. Više vrednosti  $dA(\%)$  ukazuju na veći udeo crvene boje. Osim toga vrednost  $dA(\%)$  definiše i ulogu drugih pigmenta u boji vina (*Ribereau-Gayon i sar., 1999. tom. 2*).

U tabeli 12. prikazani su intenzitet boje, nijansa boje, udeli boja i  $dA(\%)$  vrednost vina dobijenih pod različitim uslovima maceracije kljuka grožđa sorte vinove loze Cabernet sauvignon.

**Tabela 12.** Uticaj temperature i dužine maceracije na boju crvenog vina Cabernet sauvignon

Vino	Intenzitet boje	Nijansa boje	$A_{420}(\%)$	$A_{520}(\%)$	$A_{620}(\%)$	$dA(\%)$
20 °C						
Cs-A1 <sub>2003</sub>	0,702	0,544	34,18	62,82	2,99	70,41
Cs-A2 <sub>2003</sub>	1,271	0,511	32,88	64,28	2,83	72,21
Cs-A3 <sub>2003</sub>	1,020	0,502	32,55	64,80	2,65	72,84
Cs-A4 <sub>2003</sub>	1,328	0,593	36,14	60,92	2,94	67,92
Cs-A5 <sub>2003</sub>	1,067	0,574	35,52	61,85	2,62	69,16
25 °C						
Cs-A6 <sub>2003</sub>	1,147	0,516	33,04	63,99	2,96	71,86
Cs-A7 <sub>2003</sub>	0,929	0,531	33,80	63,62	2,58	71,40
Cs-A8 <sub>2003</sub>	1,119	0,625	37,44	59,87	2,68	66,49
Cs-A9 <sub>2003</sub>	1,259	0,633	37,41	59,09	3,49	65,39
Cs-A10 <sub>2003</sub>	0,975	0,632	37,64	59,49	2,87	65,95
30 °C						
Cs-A11 <sub>2003</sub>	1,246	0,526	33,46	63,56	2,97	71,34
Cs-A12 <sub>2003</sub>	1,442	0,554	34,60	62,41	2,98	69,88
Cs-A13 <sub>2003</sub>	1,071	0,672	38,93	57,89	3,17	63,63
Cs-A14 <sub>2003</sub>	1,003	0,702	39,78	56,60	3,59	61,70
Cs-A15 <sub>2003</sub>	0,990	0,705	39,39	55,86	4,75	60,49
35 °C						
Cs-A16 <sub>2003</sub>	1,045	0,662	38,46	58,08	3,44	63,92
Cs-A17 <sub>2003</sub>	1,337	0,698	39,70	56,84	3,44	62,04
Cs-A18 <sub>2003</sub>	0,879	0,691	39,47	57,11	3,41	62,45
Cs-A19 <sub>2003</sub>	0,859	0,733	40,74	55,53	3,72	59,96
Cs-A20 <sub>2003</sub>	0,943	0,800	41,75	52,13	6,11	54,09

Intenzitet boje vina Cabernet sauvignon bio je najviši u vinima koja su ocedena nakon 12 dana maceracije na temperaturama 20 °C i 25 °C. Najintenzivnija boja kod vina proizvedenih iz kljuka čija maceracija je vršena na višim temperaturama u toku 6 dana (30 °C i 35 °C). Pri tome nijansa boje vina Cs-A17<sub>2003</sub> iznosila je 0,698, znatno više od nijanse boje

Cs-A4<sub>2003</sub>, Cs-A9<sub>2003</sub> i Cs-A12<sub>2003</sub>. To ukazuje da je temperatura 35 °C, negativno uticala na kvalitet boje vina.

Najniža nijansa boje utvrđena je u vinu dobijenom od kljuka čija je maceracija trajala 9 dana na temperaturi 20 °C (NB = 0,502), a najviša u vinu nakon 15 dana maceracije kljuka na 35 °C (NB = 0,800).

Udeo crvene boje u vinu ( $A_{520\%}$ ), obrnuto je proporcionalan vremenu trajanja maceracije i temperaturi. Do tih promena boje vina je dolazi usled reakcija između antocijana i tanina ekstrahovanih u većoj količini tokom dugotrajne maceracije, kao i usled prelaska obojenih oblika antocijana u neobojene halkone, na višim temperaturama maceracije. (*Yokotsuka i sar., 2000., Boulton i sar., 1996*). Promene fenolnih jedinjenja crvenih vina u toku starenja ili usled drugih uzroka, izazivaju lagano opadanje intenziteta boje i porast nijanse boje.

Udeo crvene boje ( $A_{520\%}$ ), bio je iznad 60 % u svim vinima u kojima je nijansa boje niža od 0,600. Dugotrajnija maceracija i više temperature uticale su na povećanje udela žute boje u boji vina, tako da je  $A_{420(\%)}$  na temperaturi 35 °C bila blizu 40 % za 3, 6 i 9 dana maceracije, doka je nakon 12 dana maceracije bila iznad 40 %.

( $dA\%$ ) vrednost u mladim vinima kreće se između 40 i 60 (*Ribereau-Gayon i sar., 1999. Vol. 2*).  $dA$  (%) vrednost opadala je sa porastom nijanse boje, odn. udela žute boje u boji vina. U vinima dobijenim nakon kraće maceracije (3, 6 ili 9 dana) i na nižim temperaturama (20 °C i 25 °C), vrednost  $dA$  (%), bila je iznad 70 %. Na temperaturi 30 °C, samo je u vinu ocedenom nakon tri dana maceracije, vrednost  $dA$  bila veća od 70 %. Najniža vrednost  $dA$  utvrđena je u vinu Cs-A20<sub>2003</sub>, i iznosila je 54.09 %. U istom tom vinu bio je najniži udeo crvene i najviši udeo žute boje.

Ovakvi rezultati pokazatelja kvaliteta boje crvenog vina u skladu su sa udelom antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima, utvrđenom u istim tim vinima. U vinima sa najvišim udelom antocijana, utvrđene su najviše  $dA$  vrednosti.

U tabeli 13. prikazani su intenzitet boje, nijansa boje, udeli boja i  $dA$  (%) vrednost vina dobijenih pod različitim uslovima maceracije kljuka grožđa sorte vinove loze Merlot.

**Tabela 13.** Uticaj temperature i trajananja maceracije na boju crvenog vina Merlot

Vino	Intenzitet boje	Nijansa boje	A <sub>420</sub> (%)	A <sub>520</sub> (%)	A <sub>620</sub> (%)	dA (%)
20 °C						
M-A1 <sub>2003</sub>	0,569	0,613	36,73	59,93	3,34	66,57
M-A2 <sub>2003</sub>	0,480	0,643	41,44	55,13	3,42	59,31
M-A3 <sub>2003</sub>	0,659	0,587	35,81	61,00	3,19	68,03
M-A4 <sub>2003</sub>	0,630	0,645	37,93	58,73	3,34	64,86
M-A5 <sub>2003</sub>	0,628	0,688	39,49	57,32	3,18	62,78
25 °C						
M-A6 <sub>2003</sub>	1,102	0,552	34,48	62,43	3,08	69,91
M-A7 <sub>2003</sub>	1,100	0,580	35,50	61,30	3,20	68,43
M-A8 <sub>2003</sub>	1,077	0,617	37,14	60,17	2,70	66,90
M-A9 <sub>2003</sub>	1,074	0,644	37,89	58,75	3,35	64,89
M-A10 <sub>2003</sub>	0,945	0,671	38,73	57,67	3,59	63,30
30 °C						
M-A11 <sub>2003</sub>	0,865	0,635	37,45	58,96	3,58	65,19
M-A12 <sub>2003</sub>	0,657	0,648	38,20	58,90	2,89	65,11
M-A13 <sub>2003</sub>	1,006	0,697	39,76	57,06	3,18	62,37
M-A14 <sub>2003</sub>	1,109	0,705	39,76	56,35	3,88	61,28
M-A15 <sub>2003</sub>	1,021	0,709	39,76	56,02	4,21	60,75
35 °C						
M-A16 <sub>2003</sub>	0,847	0,751	41,44	55,13	3,42	59,31
M-A17 <sub>2003</sub>	0,935	0,792	41,60	52,51	5,88	54,78
M-A18 <sub>2003</sub>	1,614	0,832	39,71	47,71	12,58	45,19
M-A19 <sub>2003</sub>	1,150	0,821	40,08	48,78	11,13	52,49
M-A20 <sub>2003</sub>	0,978	0,839	42,84	51,02	6,13	52,00

Intenzitet boje vina Merlot proizvedenog maceracijom na 20 °C, bio je relativno nizak. Maceracijom na 25 °C intenzitet boje bila je iznad 1. Najviša vrednost intenziteta boje izmerena je u uzorku vina proizvedenom maceracijom kljuka na temperaturi 35 °C (1,614) u trajanju od 9 dana. U istom uzorku vina izmeren je i najviši udeo plave boje (A<sub>620</sub>%), a i nijansa boje je iznosila čak 0,832.

Iz rezultata prikazanih u tabeli 12 vidi se da je nijansa boje bila je niža u vinima proizvedenim maceracijom na nižim temperaturama (20 °C i 25 °C), a veoma visoka u vinima dobijenim maceracijom na 35 °C. Najviša nijansa boje izmerena je u vinu M-A20<sub>2003</sub> (35 °C, 15 dana) i iznosila je 0,839.

dA % vrednost opada sa porastom temperature i dužine maceracije. U vinima proizvedenim maceracijom kljuka na 25 i 30 °C postignut je dobar odnos intenziteta i nijanse boje. U ovim uzorcima vrednost dA % je vrlo dobra i bez obzira na trajanje maceracije vrednost ne pada ispod 60 %. Najniža dA % vrednost utvrđena je u vinu Merlot u kome je izmeren najveći intenzitet boje ali i udeo plave boje (A<sub>620</sub>%).



U vinima Merlot utvrđene su veće vrednosti nijanse boje u odnosu na vina Cabernet sauvignon, proizvedenim pod identičnim uslovima, što je posledica nižeg sadržaja antocijana u vinima Merlot, u odnosu na vina Cabernet sauvignon. Samim tim udeo crvene boje  $A_{520}$  (%) bio je veći u vinima Cabernet sauvignon. Vrednosti  $dA$  (%) vina Merlot su niže od vina Cabernet sauvignon. Zapaženo je da su najniže  $dA$  vrednosti utvrđene u vinima Merlot (M-A18<sub>2003</sub> i M-A19<sub>2003</sub>) u kojima je udeo plave  $A_{620}$  (%) boje najveći.

#### *4.1.3 Uticaj odnosa čvrste i tečne faze u kljuku na fenolna jedinjenja vina*

##### *4.1.3.1. Uticaj dodatka šepurine na fenolna jedinjenja vina*

Vina Cabernet sauvignon i Merlot, proizvedena postupkom klasične vinifikacije, maceracijom kljuka sa povećanim udelom šepurine. Maceracija je trajala 6 i 9 dana i vršena je na temperaturi 30 °C. Ispitivanjem uticaja dužine i temperature maceracije utvrđeno je da se kraćom maceracijom (3 dana) dobijaju vina sa niskim sadržajem fenolnih jedinjenja i flavan-3-ola, dok su dužom maceracijom (12 i 15 dana) dobijena vina sa znatno lošijom bojom. Takođe je procenjeno da su, maceracijom na temperaturi 30 °C, proizvedena vina sa dobrim karakteristikama boje i odgovarajućim sadržajem fenolnih jedinjenja.

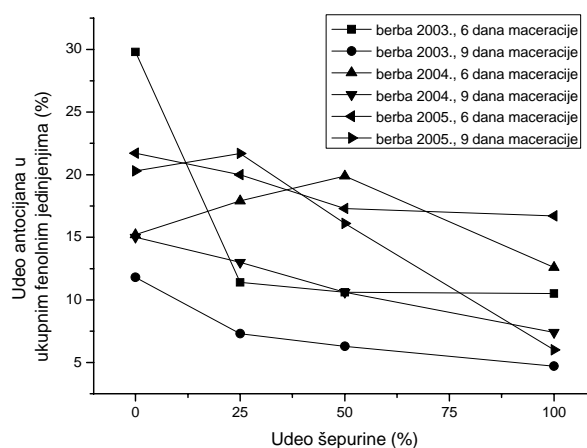
Promene sadržaja fenolnih jedinjenja u vinu Cabernet sauvignon u toku tri godine proizvodnje, prikazane su u tabeli 14.

**Tabela 14.** Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu Cabernet sauvignon u zavisnosti od količine šepurine u kljuku

Vino	Uk. fenolna jedinjenja (g/l)	Antocijani (g/l)	Flavan-3-oli (g/l)	A <sub>280</sub>
2003.				
Cs-B1 <sub>2003</sub>	2,219	0,661	1,312	46,6
Cs-B2 <sub>2003</sub>	2,047	0,234	1,112	36,7
Cs-B3 <sub>2003</sub>	2,293	0,244	1,570	38,8
Cs-B4 <sub>2003</sub>	3,235	0,341	1,878	52,8
Cs-B5 <sub>2003</sub>	2,120	0,251	0,921	38,1
Cs-B6 <sub>2003</sub>	2,805	0,204	2,028	46,7
Cs-B7 <sub>2003</sub>	2,779	0,175	1,631	45,9
Cs-B8 <sub>2003</sub>	2,810	0,134	1,834	44,2
2004.				
Cs-B1 <sub>2004</sub>	1,678	0,256	1,182	36,6
Cs-B2 <sub>2004</sub>	1,195	0,214	0,824	26,7
Cs-B3 <sub>2004</sub>	1,370	0,273	1,206	31,4
Cs-B4 <sub>2004</sub>	1,738	0,219	1,626	34,6
Cs-B5 <sub>2004</sub>	1,815	0,273	1,579	38,6
Cs-B6 <sub>2004</sub>	1,570	0,205	1,108	33,8
Cs-B7 <sub>2004</sub>	1,429	0,152	1,243	30,6
Cs-B8 <sub>2004</sub>	1,810	0,134	1,334	34,2
2005.				
Cs-B1 <sub>2005</sub>	1,239	0,269	0,156	31,50
Cs-B2 <sub>2005</sub>	1,388	0,277	0,247	34,20
Cs-B3 <sub>2005</sub>	1,431	0,248	0,260	32,40
Cs-B4 <sub>2005</sub>	1,436	0,240	0,383	32,60
Cs-B5 <sub>2005</sub>	1,569	0,319	0,268	33,20
Cs-B6 <sub>2005</sub>	1,579	0,344	0,281	33,30
Cs-B7 <sub>2005</sub>	1,521	0,245	0,282	32,80
Cs-B8 <sub>2005</sub>	1,729	0,115	0,320	36,30

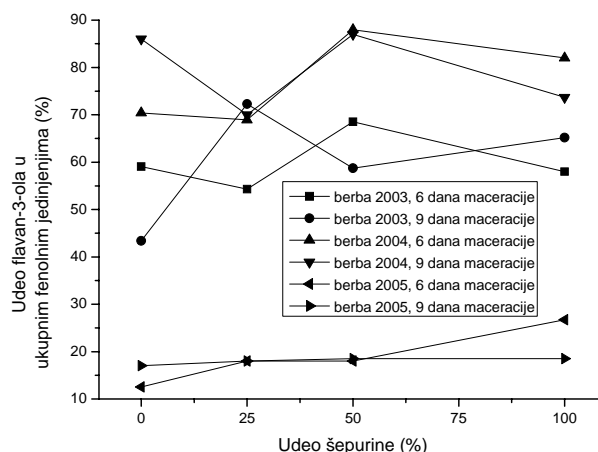
Sadržaj ukupnih fenolnih materija se povećava sa povećanjem udela šepurine u kljuku. Najveći sadržaj fenolnih jedinjenja utvrđen u vinu dobijenom ceđenjem kljuka sa 100 % šepurine i 6 dana maceracije (vino Cs-B4<sub>2003</sub>). Za 13,13 % niži sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja utvrđen je u vinu od iste sorte vinove loze nakon 9 dana maceracije i sa sadržajem šepurine 100 %. Ovi rezultati su u saglasnosti sa vrednostima indeksa tanoidnih jedinjenja, međutim, najviši sadržaj flavan-3-ola utvrđen je u vinu proizvedenom maceracijom kljuka sa 25 % šepurine u toku 9 dana i bio je za 2,2 puta viši u odnosu na kontrolno vino (Cs-B5<sub>2003</sub>).

Maceracijom kljuka grožđa vinove loze Cabernet sauvignon (2003) sa povećanim udelom šepurine u kljuku, dolazi do smanjenja količine antocijana, u odnosu na kontrolno vino, za 46,6 % (Cs-B8<sub>2003</sub>) do 48,4 % (Cs-B4<sub>2003</sub>). Najviši udeo antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima, bio je u kontrolnom vinu nakon 6 dana maceracije. U tom vinu udeo antocijana iznosio je 30 %, od ukupnih fenola. Povećanjem sadržaja šepurine u kljuku, udeo antocijana opada na oko 10 %. U vinima dobijenim nakon maceracije u trajanju 9 dana, udeo antocijana je ponovo bio najveći u kontrolnom vinu i iznosio oko blizu 12 %. Najniži udeo antocijana u ukupnim fenolima utvrđen je u vinu nakon 9 dana maceracije sa celokupnom šepurinom u kljuku i bio je niži od 5 % (slika 24).



**Slika 24.** Promene udela (%) antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima u zavisnosti od udela šepurine u kljuku-vino Cabernet sauvignon

Sadržaj flavan-3-ola se povećava sa povećanjem udela šepurine u kljuku. Najveća količina flavan-3-ola, u vinu Cabernet sauvignon (2003) proizvedenom iz kljuka čija je maceracije trajala 6 dana, bio je u vinu sa celokupnom šepurinom (Cs-B4<sub>2003</sub>). Međutim, najveći udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolima, utvrđen je u vinu Cs-B3<sub>2003</sub>, iznosio je 68 %. Maceracijom kljuka u koji je vraćen deo ili celokupna šeputina, u toku 9 dana, takođe je došlo do povećanja sadržaja flavan-3-ola u odnosu na kontrolno vino (bez šepurine). U vinima berbe 2003, proizvedenim uz predhodno obogaćivanje kljuka vraćanjem šepurine, najviši sadržaj flavan-3-ola bio je u vinu Cs-B6<sub>2003</sub>. U isto vreme u tom vinu, udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolnim jedinjenjima je bio čak 72 % (slika 25). Indeks tanoidnih jedinjenja, u većini uzoraka pratio promene sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja.



**Slika 25.** Promene udela (%) flavan-3-ola u ukupnim fenolnim jedinjenjima u zavisnosti od udela šepurine u kljuku-vino Cabernet sauvignon

Loši uslovi sazrevanja i nepotpuna fenolna zrelost grožđa Cabernet sauvignon (berba 2004) uzrok su nižeg sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana i indeksa tanoidnih jedinjenja. Utvrđen sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja kako u kontrolnim vinima, tako i vinima obogaćenim šepurinom, je na granici prihvatljivog za crvena vina. Najviši sadržaj antocijana utvrđen je u kontrolnom vinu nakon 9 dana maceracije, a vino proizvedeno nakon maceracije sa celokupnom količinom šepurine (Cs-B8<sub>2004</sub>) sadržalo je za oko 50 % manje ovih pigmentata. U ova dva uzorka vina (Cs-B5<sub>2004</sub> i Cs-B8<sub>2004</sub>) utvrđene su najviše količine ukupnih fenolnih jedinjenja i flavan-3-ola. Dodatak šepurine u kljuk je pozitivno uticao na sadržaj flavan-3-ola tokom kraće maceracije (6 dana), dok je devetodnevna maceracija uticala na smanjenje sadržaja ovih jedinjenja u odnosu na kontrolno vino.

Udeo antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima bio je nizak. Najveći udeo antocijana bio je u vinu Cs-B3<sub>2004</sub> (6 dana maceracije, dodatak 50 % šepurine). Nešto niži udeo antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima utvrđen je u uzorku kontrolnog vina Cabernet sauvignon (berba 2004) za čiju je proizvodnju premenjena dužina maceracije od 9 dana, a šepurine uklonjena u potpunosti. U svim uzorcima vina berbe 2004. udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolnim jedinjenjima je bio visok.

Uslovi sazrevanja grožđa 2005. bili su lošiji od uslova predhodne dve godine. Znatno više padavina u avgustu i septembru kao i prosečne mesečne temperature koje su bile za oko 1 °C niže od temperature u istim mesecima predhodne godine (2004) bile su uzrok slabe fenolne zrelosti grožđa. Uslovi sazrevanja su se odrazili na kvalitet vina. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinima proizvedenim sa različitim udelima šepurine u kljuku, bio je ispod ili tek neznatno iznad minimuma za crvena vina (1,5 g/l). Maceracija u trajanju 6 dana nije bila

dovoljna da se sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja poveća iznad 1,5 g/l, čak ni kada je u kljuk vraćena celokupna količina šepurine (Cs-B4<sub>2005</sub>). Vina proizvedena nakon 9 dana maceracije sadržala su nešto više fenolnih jedinjenja. Maksimalan sadržaj utvrđen je u vinu Cs-B8<sub>2005</sub>, (9 dana maceracije, 100 % šepurine).

U svim uzorcima vina sadržaji antocijana i flavan-3-ola su takođe bili niski. Međutim, udeo antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima je bio zadovoljavajući. U vinima proizvedenim uz maceraciju 6 dana, udeo antocijana se kretao od 22 % u kontrolnom vinu, do oko 17 % u vinu Cs-B4<sub>2005</sub> (6 dana maceracije, 100 % šepurine). Najveći udeo antocijana utvrđen je u vinu iscedenom iz kljuka čija je maceracija trajala 9 dana uz sadržaj šepurine 25 %.

Udeo flavan-3-ola u vinima Cabernet sauvignon (2005) bio je veoma nizak. Najveći udeo flavan-3-ola utvrđen je u vinu Cs-B4<sub>2005</sub>, i iznosio je svega 26 %. U svim ostalim vinima berbe 2005. proizvedenim uz dodatak šepurine, kao i u kontrolnim vinima, udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolnim jedinjenjima bio je niži od 20 %.

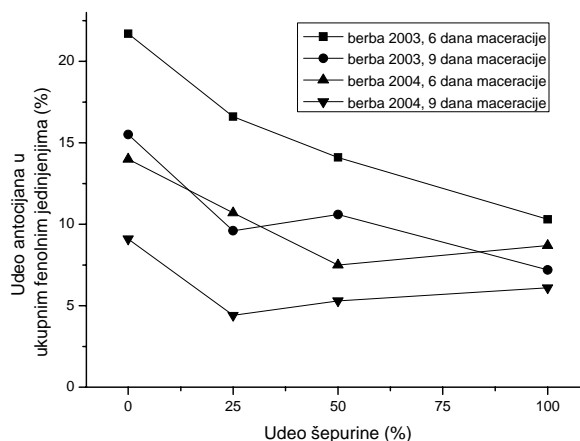
Promene sadržaja fenolnih jedinjenja u vinu Merlot u toku tri godine proizvodnje, prikazane su u tabeli 15.

**Tabela 15.** Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu Merlot u zavisnosti od količine šepurine u kljuku

Vino	Uk. fenolna jedinjenja (g/l)	Antocijani (g/l)	Flavan-3-oli (g/l)	A <sub>280</sub>
2003.				
M-B1 <sub>2003</sub>	1,422	0,309	0,596	30,7
M-B2 <sub>2003</sub>	2,077	0,345	1,207	40,8
M-B3 <sub>2003</sub>	2,205	0,312	1,643	43,2
M-B4 <sub>2003</sub>	2,764	0,294	2,580	51,6
M-B5 <sub>2003</sub>	2,015	0,312	0,899	40,2
M-B6 <sub>2003</sub>	2,696	0,260	1,607	45,3
M-B7 <sub>2003</sub>	2,670	0,285	1,605	45,7
M-B8 <sub>2003</sub>	2,969	0,214	2,655	51,2
2004.				
M-B1 <sub>2004</sub>	1,200	0,170	0,353	24,0
M-B2 <sub>2004</sub>	1,015	0,109	0,205	20,7
M-B3 <sub>2004</sub>	1,260	0,094	0,477	25,9
M-B4 <sub>2004</sub>	1,330	0,117	0,958	26,5
M-B5 <sub>2004</sub>	1,165	0,107	0,649	24,6
M-B6 <sub>2004</sub>	1,185	0,053	0,477	24,5
M-B7 <sub>2004</sub>	1,565	0,083	1,019	29,2
M-B8 <sub>2004</sub>	1,465	0,090	1,019	29,0

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinima Merlot (2003), povećan je dodatkom dela predhodno odvojene šepurine, u kljuk. Kada je maceracija trajala 6 dana, sadržaj ukupnih fenola povećan je od 46 % (25 % šepurine) do 94 % (100 % šepurine), u odnosu na kontrolno vino. Najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja utvrđen je u vinu Merlot M-B8<sub>2003</sub>. (9 dana maceracije, 100 % šepurine). Sadržaj ukupnih fenola u vinu Merlot M-B8<sub>2003</sub>, je za 47 % većiu odnosu na kontrolno vino M-B5<sub>2003</sub>.

Udeo antocijana u ukupnim fenolima bio je najveći u kontrolnom vinu Merlot, proizvedenom nakon 6 dana maceracije i iznosio je 22 %. Povećanjem udela šepurine (100 %) u kljuku udeo antocijana u vinu opao je za 84 % u odnosu na kontrolno vino. Maceracija u trajanju 9 dana izazvala je smanjenje udela antocijana u ukupnim fenolima. U kontrolnom vinu M-B5<sub>2003</sub>, udeo antocijana je bio 15 %, a u vinu M-B8<sub>2003</sub>, svega 7 % u odnosu na ukupne fenole (slika 26).



**Slika 26.** Promene udela (%) antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima u zavisnosti od udela šepurine u kljuku-vino Merlot

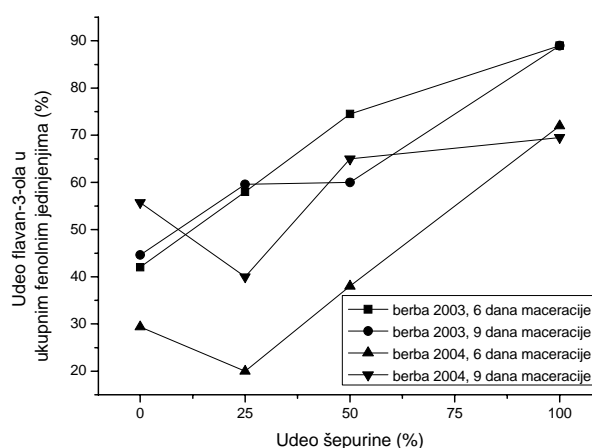
I u vinima Merlot sadržaj flavan-3-ola, takođe je povećan, dodatkom šepurine u kljuk, u odnosu na vina proizvedena bez šepurine, odn. kontrolna vina. Poređenjem rezultata za vina Merlot proizvedena sa istim udelom šepurine u kljuku, a različitom dužinom maceracije (6 odn., 9 dana) može se zapaziti da duža maceracija nije uticala bitno na povećanje količine flavan-3-ola. Sadržaj flavan-3-ola bio je visok u svim uzorcima vina proizvedenih sa dodatkom šepurine u kljuk. U kontrolnim vinima udeo flavan-3-ola bio je 42 % (6 dana) i 44 % (9 dana), a dodatak 50 % šepurine u kljuk povećan je udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolima, na 74 % (M-B3<sub>2003</sub>) i 60 % (M-B7<sub>2003</sub>). Dugotrajnijom maceracijom kljuka Merlot iz kojeg šepurine nije izdvajana takođe nije postignut značajan porast sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, kao ni vrednosti indeksa  $A_{280}$  i flavan-3-ola, u odnosu na maceraciju u trajanju 6 dana. Na osnovu toga se može zaključiti da je pod ovim uslovima vinifikacije već nakon 6 dana maceracije iscrpljen potencijal šepurine, a da dugotrajnija maceracija rezultuje opadanjem sadržaja antocijana i lošijim kvalitetom boje vina. Vrednost  $A_{280}$  povećavale se, u odnosu na kontrolna vina, srazmerno povećanju udela šepurine u kljuku.

U vinima Merlot, berbe 2004, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja bio je nizak, ispod 1,5 g/l, što je minimalna količina potrebna da bi se neko vino moglo svrstati u kategoriju crvenih vina. Tek nakon 9 dana maceracije kljuka sa sadržajem šepurine 50 % i 100 %, sadržaj ukupnih fenola je bio oko 1,5 g/l.

Vraćanje šepurine u kljuk Merlot (2004 godina) (tabela 14) dodatno je smanjio, već i inače nizak sadržaj antocijana. Udeo antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima opadao je sa porastom udela šepurine u kljuku i dužine maceracije. Maksimalni udeo antocijana utvrđen je u kontrolnom vinu M-B1<sub>2004</sub> (6 dana maceracije bez šepurine), iznosio je 14 %. Kontrolno

vino Merlot M-B5<sub>2004</sub>. sadržalo je 9 % antocijana od ukupnih fenola, a sa povećanjem udela šepurine, udeo antocijana se smanjivao.

Udeo flavan-3-ola u vinima Merlot (2004) je uglavnom bio niži u odnosu na udeo flavan-3-ola u vinima Merlot (2003). Minimalni udeo flavan-3-ola utvrđen je u kontrolnom vinu Merlot M-B1<sub>2004</sub>, u kome je iznosio 29 %. Povećanjem udela šepurine u kljuku povećavao se i udeo flavan-3-ola, tako da je dostigao maksimalne vrednosti u vinu M-B4<sub>2004</sub> (6 dana maceracije, 100 % šepurine) gde je iznosio 72 %. Udeo flavan-3-ola u vinu Merlot M-B8<sub>2004</sub>, (9 dana maceracije, 100 % šepurine) bio je 69 % (slika 27).



**Slika 27.** Promene udela (%) flavan-3-ola u ukupnim fenolnim jedinjenjima u zavisnosti od udela šepurine u kljuku-vino Merlot

Vrednosti indeksa  $A_{280}$  bile su niske i varirale su između 20,7 i 29,2 u skladu sa promenama sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavan-3-ola.

Ako se uporedo posmatraju rezultati za obe ispitivane sorte, berbe 2003. zapaža se da je u oba vina sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja povećan u vinima proizvedenim uz dodatak šepurine u kljuk. U većini vina Cabernet sauvignon sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja bio je nešto veći u odnosu na vina Merlot. Najveći sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu Cabernet sauvignon bio je u uzorku Cs-B4<sub>2003</sub> (6 dana, 100 % šepurine), a u vinu Merlot u uzorku M-B8<sub>2003</sub>. (9 dana, 100 % šepurine). Udeo antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima u vinima Merlot bio je nešto niži nego u vinima Cabernet sauvignon. U vinima sa povećanim udelom šepurien, smanjenje sadržaja antocijana izraženije je kod Caberneta sauvignon, nego kod vina Merlot. Udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolima, kod vina Cabernet sauvignon i Merlot bio je



visok već nakon maceracije kljuka sa 50 % šepurine, u toku 6 dana. Produžena maceracija (9 dana) u oba vina nije doprinela porastu udela flavan-3-ola.

Berba 2004. godine, bila je voma loša u pogledu agroekoloških uslova. Takvi uslovi doprineli su veoma lošem kvalitetu grožđa, naročito u pogledu fenolne zrelosti. Vina Cabernet sauvignon (2004) i Merlot (2004) sadržala su male količine ukupnih fenolnih jedinjenja. Povećanje udela šepurine u kljuku nije značajno pivilo sadržaj fenolnih jedinjenja. Ipak sadržaj fenolnih jedinjenja u vinima Cabernet sauvignon bio je veći u odnosu na vina Merlot, kako u kontrolnim tako i u vinima sa povećanim udelom šepurine. Sadržaj antocijana u ukupnim fenolima bio je nizak u vinima od obe ispitivane sorte. Udeo antocijana u ukupnim fenolima niži je u vinima Merlot u odnosu na Cabernet sauvignon. Udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolima bio je veći u vinima Caberneta sauvignon. Dodatak šepurine neznatno je uticao na porast sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, ali u većini vina (berba 2004) je bio ispod 1,5 g/l, što je minimalna granica za crvena vina. Dodatak 100 % šepurine i maceracija u dužini 6 dana, povećao je sadržaj flavan-3-ola za 2,7 puta, ali je količina ovih jedinjenja za 20,60 % niža u odnosu na vino proizvedeno sa udelom šepurine 25 % predhodne godine. Tek nakon 9 dana maceracije, kao i dodatka 50 i 100 % šepurine, sadržaj flavan-3-ola je prešao 1 g/l.

#### *4.1.3.2. Uticaj dodatka semenki na fenolna jedinjenja vina*

U ranije objavljenim radovima (*Cheyrier i sar. 1989*), *Ricardo da Silva i sar. 1993*) mogla su se videti mišljenja da semenke nemaju bitan uticaj na sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu. Kasnija istraživanja (*Revilla i sar., 1997*) ustanovila su da maceracija kljuka sa povećanim sadržajem semenki vodi srazmernom porastu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, bez obzira na poreklo i sortu grožđa. Razlog za to je sastav fenolnih jedinjenja semenki koje sadrže visoke koncentracije fenolnih jedinjenja i to uglavnom monomerne flavan-3-ole i proantocijanidole (*Cheyrier i sar., 1997, Ricardo da Silva, 1997, Singleton, 1992*).

U tabeli 16. prikazan je uticaj dodatka semenki u kljuk na fenolna jedinjenja vina Cabernet sauvignon.

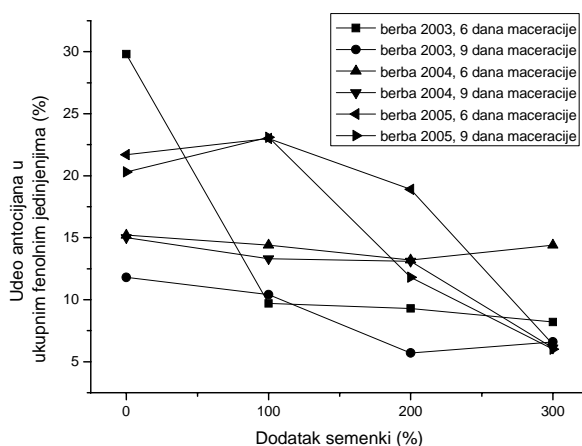
**Tabela 16.** Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu Cabernet sauvignon u zavisnosti od količine dodatih semenki u kljuk

Vino	Uk. fenolna jedinjenja (g/l)	Antocijani (g/l)	Flavan-3-oli (g/l)	A <sub>280</sub>
2003.				
Cs-C1 <sub>2003</sub>	2,219	0,661	1,312	46,6
Cs-C2 <sub>2003</sub>	2,905	0,282	1,848	43,9
Cs-C3 <sub>2003</sub>	2,650	0,248	1,496	42,1
Cs-C4 <sub>2003</sub>	3,485	0,287	2,619	57,0
Cs-C5 <sub>2003</sub>	2,120	0,251	0,921	38,1
Cs-C6 <sub>2003</sub>	2,628	0,274	1,719	43,5
Cs-C7 <sub>2003</sub>	2,894	0,167	1,493	48,1
Cs-C8 <sub>2003</sub>	3,440	0,230	2,832	58,8
2004.				
Cs-C1 <sub>2004</sub>	1,678	0,256	1,182	36,6
Cs-C2 <sub>2004</sub>	1,573	0,227	1,132	35,2
Cs-C3 <sub>2004</sub>	1,671	0,222	1,352	42,1
Cs-C4 <sub>2004</sub>	1,814	0,261	1,497	38,2
Cs-C5 <sub>2004</sub>	1,815	0,273	1,379	38,6
Cs-C6 <sub>2004</sub>	2,140	0,285	1,395	44,9
Cs-C7 <sub>2004</sub>	2,205	0,289	1,641	49,6
Cs-C8 <sub>2004</sub>	2,849	0,175	1,914	49,1
2005.				
Cs-C1 <sub>2005</sub>	1,239	0,269	0,156	31,5
Cs-C2 <sub>2005</sub>	1,516	0,349	0,292	32,7
Cs-C3 <sub>2005</sub>	1,543	0,292	0,333	33,8
Cs-C4 <sub>2005</sub>	3,612	0,232	1,145	62,9
Cs-C5 <sub>2005</sub>	1,569	0,319	0,268	33,2
Cs-C6 <sub>2005</sub>	1,814	0,420	0,437	37,9
Cs-C7 <sub>2005</sub>	2,064	0,244	0,515	40,4
Cs-C8 <sub>2005</sub>	3,527	0,210	1,271	61,5

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinima Cabernet sauvignon (berba 2003) bio je iznad 2 g/l. Porast sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja nije srazmeran dodatoj količini semenki. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu Cs-C4<sub>2003</sub> (dodata trostruka količina semenki u odnosu na prirodnu, maceracija trajala 6 dana) bio je za 57 % veći nego u kontrolnom vinu, očeđenom iz kljuka u koji semenke nisu dodavane. Dugotrajnija maceracija (9 dana) uz dodatak trostruke količine semenki (Cs-C8<sub>2003</sub>), uticala je na porast sadržaja ukupnih fenola za 62 % u odnosu na kontrolno vino (Cs-C5<sub>2003</sub>). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu Cs-C8<sub>2003</sub> bio je približno isti kao i u vinu Cs-C4<sub>2003</sub>. Iz rezultata u

tabeli 15. može se konstatovati da dugotrajnija meceracija (9 dana) nije opravdana sa aspekta sadržaja ukupnih fenola u vinu, bez obzira da li je sadržaj semenki u kljuku povećan ili ne.

Sadržaj antocijana smanjio se u vinima sa povećanim udelom semenki, u odnosu na kontrolna vina. Udeo antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima u kontrolnom vinu Cs-C1<sub>2003</sub> bio je 30 %, a u vinu Cs-C4<sub>2003</sub> (6 dana macrecije, dodata trostruka količina semenki) svega 8,2 %. Maceracijom u trajanju 9 dana, udeo antocijana u ukupnim fenolima smanjen je, u kontrolnom vinu (Cs-C5<sub>2003</sub>) na 12 %, a u vinu Cs-C8<sub>2003</sub>, udeo antocijana je bio svega 6,6 % (slika 28).



**Slika 28.** Promene udela (%) antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima u zavisnosti od dodatka semenki u kljuk-vino Cabernet sauvignon

Sadržaj flavan-3-ola u vinu Cs-C4<sub>2003</sub>, udvostručen je u odnosu na kontrolno vino Cs-C1<sub>2003</sub>, dobijeno u toku 6 dana maceracije. Vina dobijeno maceracijom u toku 9 dana i sa dodatkom i sa dodatkom trostruke količine semenki u kljuk imalo je trostruko veći sadržaj flavan-3-ola, u odnosu na kontrolno vino (Cs-C5<sub>2003</sub>). Udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolima u vinu Cs-C4<sub>2003</sub> bio je 75 %, a u vinu Cs-C8<sub>2003</sub>, 82 %. Produžena faza maceracije, u uslovima klasične vinifikacije kvalitetnog grožđa, nije značajno povećala udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolima.

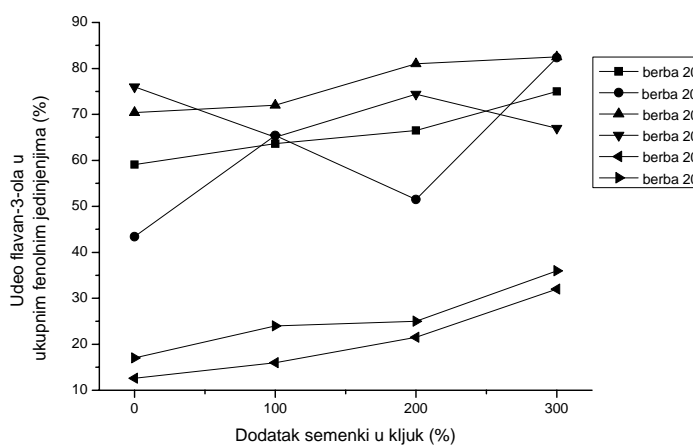
Kada se porast sadržaja flavan-3-ola uporedi sa promenama sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, zapaža se da je povećanje flavan-3-ola daleko izraženije u slučaju kljuka obogaćenog semenkama, nego šepurinom. Razlog za to je sastav fenolnih jedinjenja semenki koje sadrže visoke koncentracije fenolnih jedinjenja i to uglavnom monomerne flavan-3-ole i proantocijanidola (*Cheynier i sar., 1997, Ricardo da Silva, 1997, Singleton, 1992*).

Vina Cabernet sauvignon (2004) proizvedena nakon faze maceracije koja je trajala 6 dana, imala su nizak sadržaj fenolnih jedinjenja. Dodatak trostruke količine semenki (vino Cs-

C4<sub>2004</sub>) uticao je na povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja za svega 8 %, u odnosu na kontrolno vino Cs-C1<sub>2004</sub>. Nakon 9 dana maceracije sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu Cs-C8<sub>2004</sub>, bio je za 57 % veći od kontrolnog vina (Cs-C5<sub>2004</sub>). Verovatno je uzrok tome činjenica da je za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz semenki grožđa koje nije potpuno tehnološki zrelo, potrebno duže vreme.

Udeo antocijana u ukupnim fenolima bio je nizak i kretao se između 13 % i 15 %. Dodatak semenki nije značajno umanjio udeo antocijana, osim kod vina CsC8<sub>2004</sub>. U tom vinu udeo antocijana bio je svega 6 %.

Sadržaj flavan-3-ola u vinu Cs-C4<sub>2004</sub>, bio je za 26 % veći u odnosu na kontrolno vino Cs-C1<sub>2004</sub>. Dodatak trostruko veće količine semenki u toku 9 dana maceracije, uticao je na porast sadržaja flavan-3-ola za 36 % (vino Cs-C8<sub>2004</sub>) u odnosu na kontrolno vino (Cs-C5<sub>2004</sub>). Može se zapaziti da je udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolima, u vinima nakon 9 dana maceracije niži nego u vinima sa istim udelom semenki, ali nakon 6 dana maceracije. Na slici 29 prikazane su promene udela flavan-3-ola u ukupnim fenolnim jedinjenjima u zavisnosti od dodatka semenki u kljuk-vino Cabernet sauvignon.



**Slika 29.** Promene udela (%) flavan-3-ola u ukupnim fenolnim jedinjenjima u zavisnosti od dodatka semenki u kljuk-vino Cabernet sauvignon

Uslovi za sazrevanje grožđa u posmatrane tri godine bili su najlošiji 2005-te godine. U vinima od grožđa obranog u tako lošim agroekološkim uslovima, rezultati su se značajno razlikovali od rezultata za vina iz predhodne dve godine. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinima proizvedenim nakon 6 dana maceracije značajno je povećan tek dodatkom trostruke količine semenki u kljuk (vino Cs-C4<sub>2005</sub>). Povećanje sadržaja ukupnih fenola, u odnosu na kontrolno vino (Cs-C1<sub>2005</sub>) je bilo trostruko, srazmerno količini dodatih semenki. Dodatkom dvostruke količine semenki u kljuk, u toku 9 dana maceracije, rezultovalo je povećanjem

sadržaja fenolnih jedinjenja za 31 % (vino Cs-C7<sub>2005</sub>). U vinu Cs-C8<sub>2005</sub>, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja bio je za 2,2 puta veći od sadržaja u kontrolnom vinu (Cs-C5<sub>2005</sub>).

Udeo antocijana u ukupnim fenolima u vinima Cabernet sauvignon, berbe 2005. bio je najniži u vinima proizvedenim ceđenjem kljuka u koji je dodata trostruka količina semenki. Najveći udeo antocijana utvrđen je u vinima u kojima je količina semenki udvostručena (vina Cs-C2<sub>2005</sub> i Cs-C6<sub>2005</sub>) i iznosio je 23 %. Najmanji udeo antocijana utvrđen je u vinima Cs-C4<sub>2005</sub> i Cs-C8<sub>2005</sub>, svega 6 %.

Sadržaj flavan-3-ola u svim vinima Cabernet sauvignon (2005) je bio nizak. Dodatkom trostruke količine semenki u kljuk sadržaj flavan-3-ola povećan je preko 1 g/l. Udeo flavan-3-ola u ukupnim fenolima takođe je bio nizak. Najveći udeo utvrđen je u vinima Cs-C4<sub>2005</sub> i Cs-C8<sub>2005</sub> (32 % i 36 %). Razlike u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja, flavan-3-ola i udela flavan-3-ola između vina Cs-C4<sub>2005</sub> i Cs-C8<sub>2005</sub> su neznatne. Dodatkom trostruke količine semenki u kljuk proizvedena su vina za značajno većim sadržajem fenolnih jedinjenja i flavan-3-ola. Indeks A<sub>280</sub> u ovim vinima je bio iznad 60. Međutim, i u ovom slučaju, kada je prerađivano nedovoljno zrelo grožđe, produžena faza maceracije nije dala srazmerno bolje rezultate u odnosu na maceraciju u toku 6 dana.

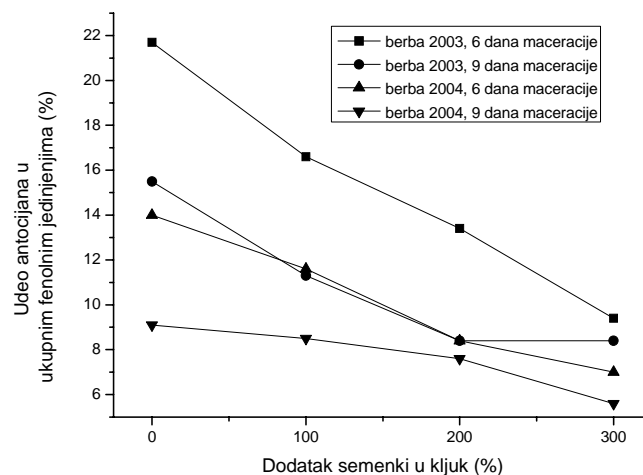
U tabeli 17. prikazan je uticaj dodataka semenki u kljuk na fenolna jedinjenja vina Merlot.

**Tabela 17.** Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu Merlot u zavisnosti od količine dodatih semenki u kljuk

Vino	Uk. fenolna jedinjenja (g/l)	Antocijani (g/l)	Flavan-3-oli (g/l)	A <sub>280</sub>
2003.				
M-C1 <sub>2003</sub>	1,422	0,309	0,596	30,7
M-C2 <sub>2003</sub>	2,046	0,341	1,135	40,5
M-C3 <sub>2003</sub>	2,558	0,338	2,075	51,6
M-C4 <sub>2003</sub>	3,290	0,303	2,586	58,5
M-C5 <sub>2003</sub>	2,015	0,312	0,899	40,2
M-C6 <sub>2003</sub>	2,634	0,299	1,705	43,6
M-C7 <sub>2003</sub>	2,696	0,226	2,028	44,4
M-C8 <sub>2003</sub>	3,070	0,258	2,718	51,0
2004.				
M-C1 <sub>2004</sub>	1,200	0,170	0,353	24,0
M-C2 <sub>2004</sub>	1,195	0,139	0,723	25,0
M-C3 <sub>2004</sub>	1,230	0,103	0,699	25,6
M-C4 <sub>2004</sub>	1,950	0,137	1,651	39,0
M-C5 <sub>2004</sub>	1,165	0,107	0,649	24,6
M-C6 <sub>2004</sub>	1,234	0,106	0,805	26,7
M-C7 <sub>2004</sub>	1,365	0,104	1,107	29,2
M-C8 <sub>2004</sub>	1,995	0,113	1,637	32,8

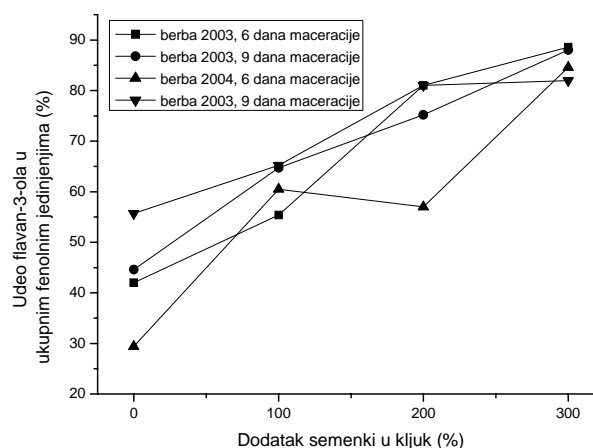
Dodavanjem semenki u kljuk u vinima Merlot (2003) povećan je sadržaj fenolnih jedinjenja. Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu Merlot M-C4<sub>2003</sub>, povećan je 2,3 puta dodatkom trostruke količine semenki u kljuk, u toku 6 dana maceracije, u odnosu na kontrolno vino (M-C1<sub>2003</sub>). Kontrolno vino M-C5<sub>2003</sub> (9 dana maceracije) sadržalo je za 41 % više fenolnih jedinjenja u odnosu na kontrolno vino M-C1<sub>2003</sub>. Povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja u vinu M-C8<sub>2003</sub> (trostruka količina semenki, 9 dana maceracije) bilo je 52 % u odnosu na kontrolno vino (M-C5<sub>2003</sub>).

Udeo antocijana u ukupnim fenolima, opadao je sa porastom količine dodatih semenki u kljuk i vremenom trajanja maceracije. Najveći udeo antocijana utvrđen je u vinu M-C1<sub>2003</sub> iznosio je 22 %. Niži sadržaj antocijana bio je u vinima proizvedenim iz kljuka čija maceracija je trajala 9 dana. Najniži udeo antocijana utvrđen je u vinima M-C7<sub>2003</sub> i M-C8<sub>2003</sub> i iznosio je 8 % (slika 30). *Revilla i sar. (1997)* ustanovili su da maceracija kljuka sa povećanim sadržajem semenki, vodi srazmernom porastu sadržaja ukupnih fenolnih materija, bez obzira na poreklo i sortu grožđa ali je u isto vreme ustanovljeno je značajno smanjenje sadržaja slobodnih antocijana.



**Slika 30.** Promene udela (%) antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima u zavisnosti od dodatka semenki u kljuku-vino Merlot

Sadržaj flavan-3-ola povećan je 4,3 puta u vinu proizvedenom od kljuka obogaćenog trostrukom količinom semenki (M-C4<sub>2003</sub>, 6 dana maceracije) u odnosu na kontrolno vino (M-C1<sub>2003</sub>, 6 dana maceracije). Vino proizvedeno maceracijom u trajanju 9 dana i sa dodatkom trostruke količine semenki (M-C8<sub>2003</sub>) sadržalo je trostruko veću količinu flavan-3-ola u odnosu na kontrolno vino (M-C5<sub>2003</sub>). Udeo flavn-3-ola u ukupnim fenolima vina, povećava se dodatkom semenki u kljuk. Od 42 % (M-C1<sub>2003</sub>) i 44 % (M-C5<sub>2003</sub>), udeo flavan-3-ola povećava se do 80 % (vino M-C4<sub>2003</sub>) i 88 % (vino M-C4<sub>2003</sub>) (slika 31).



**Slika 31.** Promene udela (%) flavan-3-ola u ukupnim fenolnim jedinjenjima u zavisnosti od dodatka semenki u kljuk-vino Merlot

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavan-3-ola u vinima Merlot, proizvedenih sa dodatkom dvostruke i trostruke količine semenki u kljuk, nisu se bitno razlikovali nakon 9 dana maceracije u odnosu na vina proizvedena nakon šest dana maceracije. Sa druge strane

dužom maceracijom udeo antocijana u ukupnim fenolima smanjen je više nego u vinima proizvedenim nakon maceracije od 6 dana.

Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinima Merlot (berba 2004) je bio niži od 1,5 g/l osim u vinima M-C4<sub>2004</sub> i M-C8<sub>2004</sub> (+300 % semenki, 6 odn. 9 dana maceracije). Dodatkom trostruke količine semenki, sadržaj fenolnih jedinjenja je u vinu M-C4<sub>2004</sub> bio za 62 % viši, u odnosu na kontrolno vino M-C1<sub>2004</sub>. Nakon 9 dana maceracije i dodatka +300% semenki (M-C8<sub>2004</sub>), sadržaj fenolnih jedinjenja je povećan za 71 % u odnosu na kontrolno vino (M-C5<sub>2004</sub>). Sadržaj antocijana je bio nizak u svim vinima, a udeo antocijana u ukupnim fenolima opadao je sa produženjem maceracije i povećanjem udela semenki u kljuku. Najveći udeo antocijana u ukupnim fenolima utvrđen je u vinu M-C1<sub>2004</sub> (14 %), a najniži u vinu M-C8<sub>2004</sub> (5,6 %). Sadržaj flavan-3-ola višestruko je povećan dodatkom trostruke količine semenki. Odnos sadržaja flavan-3-ola između vina M-C4<sub>2004</sub> i M-C1<sub>2004</sub> iznosi 4,6, a između vina M-C8<sub>2004</sub> i M-C5<sub>2004</sub>, taj odnos je 2,5. Udeo flavan-3-ola je najniži u vinu bez dodatih semenki ocedenom nakon 6 dana maceracije (M-C1<sub>2004</sub>) iznosi 29 %. Najviši udeo flavan-3-ola utvrđen je u vinima M-C4<sub>2004</sub>, M-C7<sub>2004</sub> i M-C8<sub>2004</sub>, u kojima se kretao od 80 do 82 %.

#### *4.1.3 Uticaj odnosa čvrste i tečne faze u kljuku na boju vina*

##### *4.1.3.1. Uticaj dodatka šepurine u kljuk na boju vina*

U toku maceracije kljuka od grožđa sorte vinove loze Cabernet sauvignon (berba 2003) sa određenim udelom šepurine (25, 50 i 100 %) utvrđen je negativan uticaj šepurine na intenzitet boje u vinima Cs-B2<sub>2003</sub> i Cs-B8<sub>2003</sub>. U vinima iz berbi 2004. i 2005. intenzitet boje nakon 6 i 9 dana maceracije opada sa porastom udela šepurine i u svim vinima je niži od intenziteta boje kontrolnog vina. (tabela 18).



**Tabela 18.** Promene boje vina Cabernet sauvignon u zavisnosti udela šepurine u kljuku

Vino	Intenzitet boje	Nijansa boje	A <sub>420</sub> (%)	A <sub>520</sub> (%)	A <sub>620</sub> (%)	dA (%)
2003.						
Cs-B1 <sub>2003</sub>	1,442	0,554	34,60	62,41	2,98	69,88
Cs-B2 <sub>2003</sub>	0,999	0,670	38,94	58,06	3,00	63,88
Cs-B3 <sub>2003</sub>	1,108	0,674	38,81	57,58	3,61	63,16
Cs-B4 <sub>2003</sub>	1,488	0,659	38,30	58,06	3,63	63,89
Cs-B5 <sub>2003</sub>	1,071	0,672	38,93	57,89	3,17	63,63
Cs-B6 <sub>2003</sub>	1,034	0,674	38,78	57,54	3,67	63,11
Cs-B7 <sub>2003</sub>	1,156	0,673	38,93	57,78	3,29	63,47
Cs-B8 <sub>2003</sub>	0,888	0,700	39,41	56,36	4,28	61,20
2004.						
Cs-B1 <sub>2004</sub>	0,738	0,795	37,94	47,69	14,36	45,17
Cs-B2 <sub>2004</sub>	0,522	0,789	38,12	48,27	13,60	46,43
Cs-B3 <sub>2004</sub>	0,497	0,846	39,84	47,08	13,08	43,80
Cs-B4 <sub>2004</sub>	0,502	0,906	40,63	44,80	14,54	38,43
Cs-B5 <sub>2004</sub>	0,761	0,740	36,40	49,14	14,46	48,25
Cs-B6 <sub>2004</sub>	0,642	0,828	38,32	46,26	15,42	41,92
Cs-B7 <sub>2004</sub>	0,476	0,985	42,02	42,64	15,33	32,75
Cs-B8 <sub>2004</sub>	0,446	1,012	43,90	39,80	16,30	24,37
2005.						
Cs-B1 <sub>2005</sub>	1,311	0,574	36,50	52,58	10,92	45,09
Cs-B2 <sub>2005</sub>	0,988	0,649	37,30	51,50	11,20	52,91
Cs-B3 <sub>2005</sub>	1,067	0,619	39,60	47,35	13,05	44,40
Cs-B4 <sub>2005</sub>	0,854	0,670	41,20	47,22	14,58	40,93
Cs-B5 <sub>2005</sub>	1,042	0,648	35,00	51,75	13,25	48,90
Cs-B6 <sub>2005</sub>	0,985	0,734	40,56	46,04	13,40	41,40
Cs-B7 <sub>2005</sub>	0,941	0,635	41,60	45,28	13,12	39,57
Cs-B8 <sub>2005</sub>	0,913	0,686	44,10	41,40	14,50	29,22

Kontrolno vino Cabernet sauvignon Cs-B1<sub>2003</sub> imalo je veoma dobru boju. Visok intenzitet (1,442) i niska nijansa boje (0,554), u skladu je sa visokim udelom crvene boje (A<sub>520</sub> % = 62,41) i dA (%) vrednošću, (69,88). Dodatkom 25 % šepurine u kljuk nijansa boje vina se povećala. Udeo crvene boje je bio veći u vinima dobijenim iz kljuka sa povećanim udelom šepurine. Najveća nijansa boje (0,700) i najniži intenzitet boje (0,888) utvrđeni su u vinu proizvedenom nakon maceracije u trajanju 9 dana uz dodatak 100 % šepurine. Niti u jednom uzorku vina Cabernet sauvignon (2003) dA(%) vrednost nije opala ispod 61 %.

Sazrevanje grožđa tokom 2004. godine bilo je otežano usled relativno niskih temperatura i uopšte lošijih agroekoloških uslova, u odnosu na predhodnu (2003) godinu.

Grožđe je obrano u fazi kada je imalo prosečan sadržaj šećera, ali u isto vreme i visok sadržaj ukupnih kiselina. To ukazuje na činjenicu da fenolna zrelost grožđa nije bila adekvatna. Količina padavina u junu, julu i avgustu je bila dvostruko veća u odnosu na predhodnu godinu. Srednje dnevne temperature u avgustu bile su za 4 ° niže u odnosu na 2003. godinu.

Intenzitet boje vina berbe 2004 bio je nizak u svim uzorcima. Najviši intenzitet boje utvrđen je u kontrolnim vinima (Cs-B1<sub>2004</sub> i Cs-B5<sub>2004</sub>). Povećanje udela šepurine u kljuku umanjilo je intenzitet boje vina. U isto vreme nijansa boje se povećavala sa povećanjem udela šepurine i dužine trajanja maceracije. Najveća vrednost nijanse boje utvrđena je u vinu Cs-B8<sub>2004</sub>, gde je iznosila 1,012. U tom vinu udeo žute boje (A<sub>420</sub> %) bio je veći od udela crvene boje.

Vrednost dA (%) u svim uzorcima vina Cabernet sauvignon, berbe 2004, bila je niska, a u vinu Cs-B8<sub>2004</sub> iznosila je svega 24,37 %. U svim uzorcima izmeren je visok udeo plave boje (A<sub>620</sub> %) i kretao se u intervalu 13,08 % do 16,30 %.

Loš kvalitet boje ovih vina mogao bi se objasniti interakcijama između antocijana i fenolnih jedinjenja šepurine, ali i razblaženjem vina vodom izdvojenom iz nedovoljno zrele šepurine. Na boju su verovatno značajno uticale i mineralne materije ekstrahovane iz šepurine (pre svega kalijum), usled čega je došlo do porasta pH vrednosti i promene boje vina.

Boja vina Cabernet sauvignon, berbe 2005, bila je nešto bolja od predhodne berbe (2004), bez obzira što su uslovi za sazrevanje grožđa bili loši. Intenzitet boje kontrolnih vina (Cs-B1<sub>2005</sub> i Cs-B5<sub>2005</sub>) su veći od intenziteta boje vina sa povećanim udelom šepurine. Udeo crvene boje (A<sub>520</sub> %) opadao je, a udeli žute (A<sub>420</sub> %) i plave (A<sub>620</sub> %) su se povećavali sa povećanjem udela šepurine u kljuku i vremena trajanja maceracije. Najviša vrednost dA(%) utvrđena je u vinu Cs-B2<sub>2005</sub> (25 % šepurine, 6 dana maceracije). U vinima koja su ceđena nakon 9 dana maceracije, vrednost dA(%) opadala je sa povećanjem udela šepurine, tako da je u vinima sa dodatkom 50 % i 100 % šepurine bila niža od 40 %.

Uticaj povećanog udela šepurine u kljuku na boju vina Merlot prikazan je u tabeli 19.

**Tabela 19.** Promene boje vina Merlot u zavisnosti od udela šepurine u kljuku

Vino	Intenzitet boje	Nijansa boje	A <sub>420</sub> (%)	A <sub>520</sub> (%)	A <sub>620</sub> (%)	dA (%)
2003.						
M-B1 <sub>2003</sub>	0,657	0,648	38,20	58,90	2,89	65,11
M-B2 <sub>2003</sub>	1,064	0,652	38,06	58,36	3,57	64,33
M-B3 <sub>2003</sub>	1,058	0,702	39,69	56,52	3,78	61,54
M-B4 <sub>2003</sub>	1,140	0,689	39,29	57,02	3,68	62,31
M-B5 <sub>2003</sub>	1,006	0,697	39,76	57,06	3,18	62,37
M-B6 <sub>2003</sub>	0,988	0,728	40,48	55,56	3,95	60,02
M-B7 <sub>2003</sub>	1,002	0,750	41,02	54,69	4,29	58,57
M-B8 <sub>2003</sub>	0,976	0,753	41,08	54,51	4,41	58,27
2004.						
M-B1 <sub>2004</sub>	0,387	0,784	38,50	49,09	12,40	48,15
M-B2 <sub>2004</sub>	0,364	0,826	39,28	47,53	13,19	44,79
M-B3 <sub>2004</sub>	0,430	0,796	38,14	47,91	13,95	45,63
M-B4 <sub>2004</sub>	0,371	0,894	40,97	45,82	13,21	40,88
M-B5 <sub>2004</sub>	0,394	0,942	41,62	44,16	14,21	36,78
M-B6 <sub>2004</sub>	0,454	0,792	37,00	46,70	16,30	42,92
M-B7 <sub>2004</sub>	0,523	0,800	36,71	45,89	17,40	41,04
M-B8 <sub>2004</sub>	0,425	1,069	43,29	40,47	16,23	26,45

Dodatak šepurine u kljuk povećava intenzitet boje u odnosu na kontrolno vino Merlot M-B1<sub>2003</sub>, u kome je intenzitet bio najniži. Najveći intenzitet boje utvrđen je u vinu M-B4<sub>2003</sub>. Intenzitet boje vina Merlot berbe 2003, ne menja se značajno sa povećanjem udela šepurine u kljuku, i uglavnom se kreće oko 1.

Nijansa boje vina koja su dobijena maceracijom u toku 9 dana je blago porasla, u odnosu na kontrolno vino. Nijansa boje vina proizvedenih nakon 9 dana maceracije bila je neznatno veća od nijanse boje vina Merlot nakon 6 dana maceracije. Povećanjem udela semenki, kao i vremena trajanja maceracije (9 dana) blago je opado udelo crvene boje A<sub>520</sub> (%) i vrednost dA (%).

Intenzitet boje vina Merlot berbe 2004 bio je nizak, što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u tabeli 16 iz kojih se vidi da je udeo antocijana u ukupnim fenolima nizak. Nijansa boje svih vina je visoka i povećava se sa povećanjem udela šepurine u kljuku. U vinu M-B8<sub>2004</sub> (trostruka količina semenki, 9 dana maceracije), nijansa boje prelazi vrednost 1. U tom uzorku bio je veći udeo žute boje A<sub>420</sub> (%) od udela crvene boje A<sub>520</sub> (%). Povećanjem udela šepurine povećava se udeo plave boje vina (A<sub>620</sub> %) (Stanković-Opšenić, 2005). U vinima Merlot (2004) udeo plave boje bio je izuzetno visok i kretao se u granicama od 12,40 % do 17,40 %. Vrednost dA (%) bila je niska u svim uzorcima. Najniže vrednosti dA (%)

zabeležene su u uzorcima M-B5<sub>2004</sub> i M-B8<sub>2004</sub>, i bile su niže od 40, što je neprihvatljivo za mlada crvena vina.

#### 4.1.3.2. Uticaj dodatka semenki u kljuk na boju vina

U tabeli 20. prikazani su rezultati parametara boje vina Cabernet sauvignon, u zavisnosti od dodatka semenki u kljuk.

**Tabela 20.** Promene boje vina Cabernet sauvignon u zavisnosti udela semenki u kljuku

Vino	Intenzitet boje	Nijansa boje	A <sub>420</sub> (%)	A <sub>520</sub> (%)	A <sub>620</sub> (%)	dA (%)
2003.						
Cs-C1 <sub>2003</sub>	1,442	0,554	34,60	62,41	2,98	69,88
Cs-C2 <sub>2003</sub>	1,140	0,657	37,81	57,54	4,65	63,11
Cs-C3 <sub>2003</sub>	1,140	0,677	38,60	57,02	4,38	62,31
Cs-C4 <sub>2003</sub>	1,193	0,660	38,47	58,25	3,27	64,17
Cs-C5 <sub>2003</sub>	1,071	0,672	38,93	57,89	3,17	63,63
Cs-C6 <sub>2003</sub>	1,020	0,710	40,00	56,27	3,72	61,15
Cs-C7 <sub>2003</sub>	1,107	0,717	39,84	55,55	4,61	60,00
Cs-C8 <sub>2003</sub>	1,073	0,659	38,11	57,80	4,09	63,49
2004.						
Cs-C1 <sub>2004</sub>	0,738	0,795	37,94	47,69	14,36	45,17
Cs-C2 <sub>2004</sub>	0,807	0,709	35,31	49,81	14,87	54,23
Cs-C3 <sub>2004</sub>	0,639	0,902	40,68	44,44	14,88	37,49
Cs-C4 <sub>2004</sub>	0,613	0,855	39,47	46,16	14,37	41,68
Cs-C5 <sub>2004</sub>	0,761	0,740	36,40	49,14	14,46	48,25
Cs-C6 <sub>2004</sub>	1,033	0,642	33,88	52,76	13,36	55,23
Cs-C7 <sub>2004</sub>	0,816	0,724	36,27	50,12	13,61	50,24
Cs-C8 <sub>2004</sub>	0,734	0,713	35,28	49,45	14,28	49,89
2005.						
Cs-C1 <sub>2005</sub>	1,311	0,574	36,50	52,58	10,92	45,09
Cs-C2 <sub>2005</sub>	0,982	0,603	37,90	50,20	11,90	50,40
Cs-C3 <sub>2005</sub>	1,014	0,567	37,90	50,80	11,30	51,57
Cs-C4 <sub>2005</sub>	1,371	0,607	39,60	51,80	8,60	53,47
Cs-C5 <sub>2005</sub>	1,042	0,648	35,00	51,75	13,25	48,90
Cs-C6 <sub>2005</sub>	1,225	0,594	37,20	53,68	9,12	56,85
Cs-C7 <sub>2005</sub>	1,054	0,616	39,60	51,35	9,05	52,63
Cs-C8 <sub>2005</sub>	1,260	0,608	39,00	50,90	10,10	51,77

Intenzitet boje vina Cabernet sauvignon berbe 2003, ceđenih nakon 6 dana maceracije sa dodatkom semenki, opao je za 0,25 - 0,3 u odnosu na kontrolno vino (Cs-C1<sub>2003</sub>). Intenzitet boje vina proizvedenih nakon 9 dana maceracije samo je blago oscilovao, u zavisnosti od količine semenki, ali niti u jednom vino nije opao ispod 1. Nijansa boje blago je povećana kod

vina proizvedenih sa povećanim udelom semenki u kljuku. Izuzetak je vino Cs-C8<sub>2003</sub> u kojem je nijansa boje bila na nivou kontrolnog vina (Cs-C5<sub>2003</sub>). Promene intenziteta boje i nijanse u skladu su sa promenama udela pojedinih boja (A<sub>420</sub> (%), A<sub>520</sub> (%) i A<sub>620</sub> (%)). Vrednost d<sub>4</sub> (%) je u svim vinima bila visoka (iznad 60), a najviše vrednosti imala su kontrolna vina (Cs-C1<sub>2003</sub> i Cs-C5<sub>2003</sub>).

U vinima proizvedenim od grožđa koje je sazrevalo u lošijim uslovima (berba 2004), dodatak + 100 % semenki izazvao je blagi porast intenziteta bije (vina Cs-C2<sub>2004</sub> i Cs-C6<sub>2004</sub>), da bi dodatak većih količina semenki (+200% i +300%) osim kod vina Cs-C6<sub>2004</sub> i Cs-C7<sub>2004</sub>, koja su imala intenzivniju boju od kontrolnog vina. U vinima Cs-C2<sub>2004</sub> i Cs-C6<sub>2004</sub>, utvrđen je najveći udeo crvene boje (A<sub>520</sub> (%)), a nijansa boje je bila niža u odnosu na kontrolna vina (Cs-C1<sub>2004</sub> i Cs-C5<sub>2004</sub>). U skladu sa promenama intenziteta i nijanse boje, menjala se i vrednost d<sub>4</sub> (%). Vrednost d<sub>4</sub> (%) u vinima berbe 2004, bila je znatno niža od d<sub>4</sub> (%) vrednosti u vinima berbe 2003, a u jednom uzorku niža od 40 (vino Cs-C3<sub>2004</sub>). Na osnovu ovakvih rezultata, moglo bi se zaključiti da je povećanje količine semenki u kljuku za 100 %, u odnosu na prirodni sadržaj, pozitivno uticalo na kvalitet boje vina Cabernet sauvignon.

Dodatak semenki u kljuk grožđa Cabernet sauvignon, berbe 2005, izazvao je promene intenziteta boje vina, ali dodatkom +300 % semenki kod vina Cs-C4<sub>2005</sub> i Cs-C8<sub>2005</sub>, intenzitet boje povećan je iznad intenziteta boje kontrolnih vina Cs-C1<sub>2005</sub> (6 dana) i Cs-C5<sub>2005</sub> (9 dana). Nijansa boje se neznatno menjala a u vinu Cs-C8<sub>2005</sub> (9 dana maceracije, +300 % semenki), bila je niža od nijanse boje kontrolnog vina Cs-C5<sub>2005</sub> (9 dana maceracije bez dodatka semenki). Vrednosti d<sub>4</sub>(%) bile su uobičajene za mlada crvena vina i kretale se u intervalu 45,09 (Cs-C1<sub>2005</sub>) do najviše 56,85 (Cs-C6<sub>2005</sub>, devet dana maceracije, +100% semenki).

U tabeli 21. prikazani su rezultati parametara boje vina Merlot u zavisnosti od dodatka semenki u kljuk.

**Tabela 21.** Promene boje vina Merlot u zavisnosti udela semenki u kljuku

Uzorak	Intenzitet boje	Nijansa boje	A <sub>420</sub> (%)	A <sub>520</sub> (%)	A <sub>620</sub> (%)	dA (%)
2003.						
M-C1 <sub>2003</sub>	0,657	0,648	38,20	58,90	2,89	65,11
M-C2 <sub>2003</sub>	1,033	0,635	37,66	59,24	3,10	65,60
M-C3 <sub>2003</sub>	1,295	0,628	37,06	59,00	3,94	65,25
M-C4 <sub>2003</sub>	1,364	0,640	37,39	58,36	4,25	64,32
M-C5 <sub>2003</sub>	1,006	0,697	39,76	57,06	3,18	62,37
M-C6 <sub>2003</sub>	1,140	0,676	38,60	57,10	4,30	62,44
M-C7 <sub>2003</sub>	1,027	0,692	38,75	55,99	5,26	60,69
M-C8 <sub>2003</sub>	1,085	0,690	39,08	56,59	4,33	61,64
2004.						
M-C1 <sub>2004</sub>	0,387	0,784	38,50	49,09	12,40	48,15
M-C2 <sub>2004</sub>	0,341	0,966	42,23	43,62	14,08	35,57
M-C3 <sub>2004</sub>	0,354	0,987	42,37	42,94	14,69	33,55
M-C4 <sub>2004</sub>	0,516	0,868	39,53	45,54	14,92	40,21
M-C5 <sub>2004</sub>	0,394	0,942	41,62	44,16	14,21	36,78
M-C6 <sub>2004</sub>	0,426	0,889	40,32	45,38	14,30	39,79
M-C7 <sub>2004</sub>	0,468	0,834	38,88	46,58	14,53	42,66
M-C8 <sub>2004</sub>	0,436	0,943	41,74	44,27	14,00	37,05

Intenzitet boje vina Merlot (berba 2003) dvostruko je povećan dodatkom trostruke količine semenki u kljuk (vino M-C4<sub>2003</sub>) u odnosu na kontrolno vino proizvedeno nakon 6 dana maceracije. Nakon 9 dana maceracije, dodatak semenki u kljuk nije bitno uticao na intenzitet boje vina. Takođe, dodatak semenki i dužina maceracije (6 odnosno 9 dana) nisu imali značajnog uticaja na nijansu boje vina Merlot, berbe 2003. U svim uzorcima utvrđen je visok udeo crvene boje (A<sub>520</sub> %), i niski udeli žute i plave boje. Vrednost dA (%) niti u jednom vinu nije bila niža od 60. Dodatak semenki u kljuk i pordužena maceracija (9 dana) dali su lošije parametre boje vina u odnosu na maceraciju u trajanju 6 dana. Maceracija u trajanju od 9 dana doprinela je porastu intenziteta boje samo kod kontrolnog vina (M-C5<sub>2003</sub>) u odnosu na kontrolno vino (M-C1<sub>2003</sub>).

Dodatak trostruke količine semenki (M-C4<sub>2004</sub>) u kljuk od nedovoljno zrelog grožđa (berba 2004) doveo je do porasta intenziteta boje za 0,129 u odnosu na kontrolno vino, nakon 6 dana maceracije (M-C1<sub>2004</sub>). Međutim u kontrolnom vinu je utvrđena najniža nijansa boje i najveća vrednost dA(%). U svim izorcima vina udeo plave boje A<sub>620</sub> (%) je povećan u odnosu na kontrolno vino M-C1<sub>2004</sub>. Na osnovu rezultata u tabeli 20 može se zaključiti da dodatak semenki u kljuk i dugotrajnija maceracija, grožđa koje je sazrevalo u lošim uslovima, daju loše parametre boje crvenog vina.

Ako se uporede boje vina proizvedenih od grožđa koje je sazrevalo u različitim uslovima (srednje temperature, količina padavina), može se zapaziti da povećan sadržaj čvrstih delova grozda u kljuku zrelog grožđa, blago smanjuje intenzitet i povećava nijansu boje. Kod vina proizvedenog od grožđa koje je sazrevalo u lošijim uslovima, povećani udeo šepurine u kljuku uzrok je lošijim parametrima boje vina. Dodatak semenki u kljuk uglavnom je pozitivno delovao na boju vina od nedovoljno zrelog grožđa.

## **4.2. UTICAJ OBRADJE VINA SREDSTVIMA ZA BISTRENJE I STABILIZACIJU NA FENOLNA JEDINJENJA I BOJU**

Bistrenje i stabilizacija vina je neophodan postupak kojim se iz vina uklanjaju čestice mutnoće i materije koje vino čine nestabilnim i mogu izazvati naknadna замуćenja. Vino namenjeno tržištu mora biti kristalno bistro, stabilno i bez taloga, osim u nekim slučajevima kada se radi o veoma starim vinima. Proces bistrenja i stabilizacije vina podrazumeva vršenje određenih tehnoloških operacija (pretakanja, filtracije), obrada niskim i visokim temperaturama, „plavo“ bistrenje vina, i obradu sa jednim ili više enoloških sredstava. Najčešće se obrada vina, u fazi finalizacije, vrši kombinacijom nekoliko postupaka i enoloških sredstava.

Ogledna vina proizvedena metodom klasične vinifikacije, dobijena od kljuka sa povećanim udelom šepurine odnosno, semenki obrađena su uobičajenim sredstvima za bistrenje i stabilizaciju vina. Od organskih sredstava upotrebljen je želatin visoke čistoće čija sposobnost želiranja iznosi 100 Blooma. Želatin, komercijalnog naziva Gelaxina ORO, ima visoku sposobnost flokulacije za polifenolna jedinjenja. Albumin ALBUCLAR, je proizveden posebnim postupkom kako bi se sačuvale karakteristike proteina belanceta. Prema deklaraciji koju daje proizvođač, ovo enološko sredstvo ima odličnu rastvorljivost i visok afinitet prema taninima. Preporučuje se, prvenstveno za tretman crvenih vina.

Od neorganskih sredstava upotrebljen je jedan tip bentonita i polivinilpolipirolidon (PVPP). Polivinilpolipirolidon visoke čistoće i adsorptivne sposobnosti, odlikuje se visokom i specifičnom sposobnošću adsorpcije fenolnih materija, a naročito tanina podložnih oksidaciji. Potpuno je hemijski inertan i pogodan za primenu u enologiji. Proizvođač navodi da PVPP u obradi crvenih vina uzrokuje minimalno smanjenje intenziteta boje. Preporučuje se za eliminisanje žuto-narandžastih nijansi kod crvenih vina i smanjenje sadržaja tanina kod mladih crvenih vina. Drugo neorgansko enološko sredstvo upotrebljeno za bistrenje i

stabilizaciju vina je aktivirani granulirani Na-bentonit velike sposobnosti eliminacije tanina, PLUSGRAN, bentonit proizveden je od montmorilontnih minerala iz nalazišta u području Mediterana. Karakteristike minerala i postupak aktiviranja omogućuju dobijanje bentonita visoke sposobnosti eliminacije proteina. Podesan je za stabilizaciju vina u završnim fazama pripreme za flaširanje.

Uticaj obrade vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju na količinu fenolnih jedinjenja u vinima Cabernet sauvignon proizvedenim od kljuka sa povećanim udelom šepurine, prikazan je u tabeli 22.

**Tabela 22.** Promena sadržaja fenolnih jedinjenja vina Cabernet sauvignon proizvedenih sa dodatkom šepurine u zavisnosti od primenjenog sredstva za bistrenje i stabilizaciju

Vino	Pre obrade	Albumin	Želatin	Bentonit	PVPP
Cs-B1 <sub>2005</sub>	1,239	1,271	1,209	0,936	1,372
Cs-B2 <sub>2005</sub>	1,388	1,415	1,406	1,053	1,316
Cs-B3 <sub>2005</sub>	1,431	1,303	1,463	1,111	1,346
Cs-B4 <sub>2005</sub>	1,436	1,223	1,484	1,245	1,457
Cs-B5 <sub>2005</sub>	1,569	1,578	1,606	1,426	1,596
Cs-B6 <sub>2005</sub>	1,579	1,377	1,558	1,351	1,468
Cs-B7 <sub>2005</sub>	1,521	1,346	1,489	1,319	1,473
Cs-B8 <sub>2005</sub>	1,729	1,521	1,628	1,617	1,750

U pojedinim vinima proizvedenim iz kljuka sa povećanim udelom šepurine, nakon obrade sredstvima za bistrenje i stabilizaciju, utvrđene su promene sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na isto vino pre obrade. Najviše fenolnih jedinjenja iz vina uklonjeno je nakon obrade albuminom i bentonitom. Tako je albumin iz vina Cs-B4<sub>2005</sub> (6 dana maceracije, 100 % šepurine) uklonio 15 % fenolnih jedinjenja. Nakon obrade albuminom, vina Cs-B7<sub>2005</sub> (9 dana maceracije, 50 % šepurine), sadržaj ukupnih fenolnih materija smanjen je za 12,5 %.

Nakon obrade vina bentonitom, u kontrolnom vinu Cs-B1<sub>2005</sub> (6 dana maceracije bez šepurine) i Cs-B2<sub>2005</sub> (6 dana maceracije, 25 % šepurine), sadržaj ukupnih fenolnih materija smanjen je za oko 25 %. Bentonit je najmanje uticao na sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu Cs-B8<sub>2005</sub> (9 dana maceracije, 100 % šepurine). Obrada vina sa želatinom i PVPP-om nije bitno umanjila sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja niti u jednom uzorku.

Uticaj obrade vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju na količinu fenolnih jedinjenja u vinima Cabernet sauvignon proizvedenim od kljuka sa povećanim udelom semenki, prikazan je u tabeli 23.



**Tabela 23.** Promena sadržaja fenolnih jedinjenja vina Cabernet sauvignon proizvedenih sa dodatkom semenki u zavisnosti od primenjenog sredstva za bistrenje i stabilizaciju

Ogledno vino	Pre obrade	Albumin	Želatin	Bentonit	PVPP
Cs-C1 <sub>2005</sub>	1,239	1,271	1,209	0,936	1,372
Cs-C2 <sub>2005</sub>	1,516	1,287	1,484	1,245	1,457
Cs-C3 <sub>2005</sub>	1,543	1,066	1,681	1,223	1,553
Cs-C4 <sub>2005</sub>	3,612	2,692	3,197	2,819	3,133
Cs-C5 <sub>2005</sub>	1,569	1,578	1,606	1,426	1,596
Cs-C6 <sub>2005</sub>	1,814	1,596	1,691	1,617	1,750
Cs-C7 <sub>2005</sub>	2,064	1,814	2,005	1,835	1,941
Cs-C8 <sub>2005</sub>	3,527	3,048	2,500	3,064	3,080

U skladu sa većinom citiranih literarnih navoda (*Revilla i sar., 1995*) upotrebljena enološka sredstva smanjila su količinu fenolnih jedinjenja. Bentonit je veoma intenzivno smanjivao količinu fenolnih jedinjenja, naročito u vinima koja su proizvedena kratkotrajnijom maceracijom (6 dana). Količina ukupnih fenolnih jedinjenja u vinima proizvedenim maceracijom u trajanju 6 dana, nakon tretmana albuminom, smanjena je za najviše 25,50 %. Kako je u literaturi navedeno (*Revilla i sar., 1993*), veće smanjenje sadržaja fenolnih jedinjenja zabeleženo je u vinima bogatijim tim jedinjenjima, tj. u vinima proizvedenim uz dodatak semenki u fazi maceracije. Količina fenolnih jedinjenja u vinu sa dodatkom trostruke količine semenki i maceracijom u trajanju 9 dana (Cs-C8<sub>2005</sub>), opala je za 29 % nakon obrade želatinom. U kontrolnim vinima, samo je bentonit značajnije umanjio sadržaj fenolnih jedinjenja, u vinu proizvedenom maceracijom kljuka u toku 6 dana.

Uticao obrade vina Cabernet sauvignon sredstavima za bistrenje i stabilizaciju na količinu antocijana u vinima proizvedenim od kljuka sa povećanim udelom šepurine, prikazan je u tabeli 24.

**Tabela 24.** Promena sadržaja antocijana vina Cabernet sauvignon proizvedenih sa dodatkom šepurine u zavisnosti od primenjenog sredstva za bistrenje i stabilizaciju

Vino	Pre obrade	Albumin	Želatin	Bentonit	PVPP
Cs-B1 <sub>2005</sub>	0,269	0,231	0,194	0,223	0,156
Cs-B2 <sub>2005</sub>	0,277	0,242	0,208	0,208	0,207
Cs-B3 <sub>2005</sub>	0,248	0,201	0,164	0,189	0,161
Cs-B4 <sub>2005</sub>	0,240	0,203	0,162	0,179	0,151
Cs-B5 <sub>2005</sub>	0,319	0,264	0,220	0,248	0,241
Cs-B6 <sub>2005</sub>	0,344	0,303	0,187	0,281	0,208
Cs-B7 <sub>2005</sub>	0,245	0,186	0,136	0,182	0,161
Cs-B8 <sub>2005</sub>	0,115	0,091	0,053	0,103	0,073

Evidentno je da obrada vina PVPP-om i želatinom intenzivno smanjuje količinu antocijana u vinu, proizvedenim od kljuka obogaćenog šepurinom. Posledice obrade vina albuminom i želatinom su blaže. Kada se uporede sadržaji antocijana pre i nakon obrade

svakog pojedinačnog vina, vidi se da je najviše antocijana (43%) uklonjeno iz kontrolnog vina Cs-B1<sub>2005</sub> (6 dana maceracije), dok je isto sredstvo iz kontrolnog vina Cs-B5<sub>2005</sub> (9 dana maceracije) uklonilo 25 % antocijana. Obradom vina želatinom sadržaj antocijana je smanjen više u vinima proizvedenim od kljuka sa većim udelom šepurine. Takođe, više antocijana je uklonjeno iz vina u toku čije proizvodnje je primenjena duža maceracija. Obradom vina Cs-B8<sub>2005</sub> (9 dana maceracije), uklonjeno je čak 54 % antocijana u odnosu na isto vino pre obrade. Obrada vina albuminom i bentonitom podjednako je uticala na sadržaj antocijana u vinima. Obradom vina Cs-B8<sub>2005</sub> (9 dana maceracije) bentonitom uklonjeno je 11 % antocijana, ali to vino je i pre obrade saдрžalo najmanju količinu antocijana.

Uticaj obrade vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju na količinu antocijana u vinima Cabernet sauvignon proizvedenim od kljuka sa povećanim udelom semenki, prikazan je u tabeli 25.

**Tabela 25.** Promena sadržaja antocijana vina Cabernet sauvignon proizvedenih sa dodatkom semenki u zavisnosti od primenjenog sredstva za bistrenje i stabilizaciju

Vino	Pre obrade	Albumin	Želatin	Bentonit	PVPP
Cs-C1 <sub>2005</sub>	0,269	0,231	0,194	0,223	0,156
Cs-C2 <sub>2005</sub>	0,349	0,300	0,238	0,252	0,220
Cs-C3 <sub>2005</sub>	0,292	0,248	0,213	0,227	0,208
Cs-C4 <sub>2005</sub>	0,232	0,183	0,094	0,182	0,093
Cs-C5 <sub>2005</sub>	0,319	0,264	0,220	0,248	0,241
Cs-C6 <sub>2005</sub>	0,420	0,327	0,179	0,312	0,202
Cs-C7 <sub>2005</sub>	0,244	0,187	0,095	0,190	0,171
Cs-C8 <sub>2005</sub>	0,210	0,161	0,083	0,183	0,129

Obrada vina proizvedenih od kljuka sa povećanim sadržajem semenki, sredstvima za bistrenje i stabilizaciju, daje slične rezultate kao i obrada vina obogaćenih fenolnim jedinjenima šepurine. U pogledu sadržaja antocijana, najveće smanjenje utvrđeno je nakon obrade vina želatinom i PVPP-om. Želatin blaže deluje na antocijane u vinima Cs-C2<sub>2005</sub> i Cs-C3<sub>2005</sub> (6 dana maceracije) nego u vinima sa dodatkom iste količine semenki, ceđenim nakon 9 dana maceracije (Cs-C6<sub>2005</sub> i Cs-C7<sub>2005</sub>). Nakon obrade kontrolnog vina Cs-C1<sub>2005</sub> (6 dana maceracije) PVPP-om uklonjeno je znatno više antocijana nego nakon obrade kontrolnog vina Cs-C5<sub>2005</sub> (9 dana maceracije). Obradom vina (6 dna maceracije) bentonitom uklonjeno je nešto više antocijana u odnosu na obradu istih vina albuminom. Kada se posmatraju vina proizvedena nakon 9 dana maceracije, može se zapaziti da su rezultati obrade sa ova dva sredstva, slični u pogledu uticaja na sadržaj antocijana. Izuzetak je vino Cs-C8<sub>2005</sub> (+300 % semenki, 9 dana maceracije) iz kojeg je obradom bentonitom uklonjen najmanji procenat antocijana. Treba ipak ukazati da je to vino i pre obrade saдрžalo najmanje antocijana. Uticaj

obrade vina sredstavima za bistrenje i stabilizaciju na količinu flavan-3-ola u vinima Cabernet sauvignon proizvedenim od kljuka sa povećanim udelom šepurine, prikazan je u tabeli 26.

**Tabela 26.** Promena sadržaja flavan-3-ola vina Cabernet sauvignon proizvedenih sa dodatkom šepurine u zavisnosti od primenjenog sredstva za bistrenje i stabilizaciju

Vino	Pre obrade	Albumin	Želatin	Bentonit	PVPP
Cs-B1 <sub>2005</sub>	0,156	0,073	0,060	0,086	0,148
Cs-B2 <sub>2005</sub>	0,247	0,151	0,165	0,215	0,177
Cs-B3 <sub>2005</sub>	0,260	0,190	0,177	0,225	0,184
Cs-B4 <sub>2005</sub>	0,383	0,112	0,151	0,281	0,188
Cs-B5 <sub>2005</sub>	0,268	0,242	0,151	0,268	0,190
Cs-B6 <sub>2005</sub>	0,281	0,268	0,112	0,250	0,112
Cs-B7 <sub>2005</sub>	0,282	0,281	0,125	0,203	0,138
Cs-B8 <sub>2005</sub>	0,320	0,216	0,138	0,225	0,130

Obradom vina albuminom uklonjena je velika količina flavan-3-ola. Ovo organsko sredstvo snažnije je delovalo u vinima Cs-B1<sub>2005</sub> - Cs-B4<sub>2005</sub> (6 dana maceracije). Najviše flavan-3-ola uklonjeno je obradom kontrolnog vina i vina proizvedenog od kljuka sa 100 % šepurine, a najmanje iz vina Cs-B3<sub>2005</sub> (6 dana maceracije, 50 % šepurine). Sličan rezultat dobije je nakon obrade vina želatinom. Obradom vina bentonitom uklonjeno je 45 % flavan-3-ola iz kontrolnog vina (Cs-B1<sub>2005</sub>). U vinima obogaćenim fenolima šepurine, taj procenat je znatno manji u odnosu na ista vina pre obrade. Rezultat obrade neorganskim sredstvom visokog afiniteta prema fenolnim jedinjenjima, bio je donekle očekivan. Sadržaj flavan-3-ola nakon obrade PVPP-om smanjen je najviše u vinima najbogatijim u ovim jedinjenjima. Može se zapaziti da je smanjenje sadržaja flavan-3-ola najmanje, obradom vina proizvedenih nakon maceracije u trajanju 9 dana. Želatin i PVPP uklonili su veći procenat flavan-3-ola iz vina koja su i pre obrade sadržala veće količine fenolnih jedinjenja šepurine.

Uticaj obrade vina sredstavima za bistrenje i stabilizaciju na količinu flavan-3-ola u vinima Cabernet sauvignon proizvedenim od kljuka sa povećanim udelom semenki, prikazan je u tabeli 27.

**Tabela 27.** Promena sadržaja flavan-3-ola vina Cabernet sauvignon proizvedenih sa dodatkom semenki u zavisnosti od primenjenog sredstva za bistrenje i stabilizaciju

Ogledno vino	Pre obrade	Albumin	Želatin	Bentonit	PVPP
Cs-C1 <sub>2005</sub>	0,156	0,073	0,060	0,086	0,148
Cs-C2 <sub>2005</sub>	0,292	0,190	0,130	0,320	0,130
Cs-C3 <sub>2005</sub>	0,333	0,151	0,193	0,359	0,294
Cs-C4 <sub>2005</sub>	1,145	0,645	0,333	1,035	0,606
Cs-C5 <sub>2005</sub>	0,268	0,242	0,151	0,268	0,190
Cs-C6 <sub>2005</sub>	0,437	0,203	0,130	0,359	0,138
Cs-C7 <sub>2005</sub>	0,515	0,294	0,151	0,346	0,229
Cs-C8 <sub>2005</sub>	1,271	0,788	0,430	0,684	0,450

Obrada vina obogaćenih fenolnim jedinjenjima semenki dala je slične rezultate u pogledu sadržaja flavan-3-ola, kao i obrada vina obogaćenih fenolima šepurine. Količina flavan-3-ola koja je uklonjena obradom vina želatinom, veća je kod vina sa povećanim sadržajem semenki u kljuku. Albumin je ispoljio nešto blaži uticaj na sadržaj flavan-3-ola kod vina obogaćenih fenolima semenki (Cs-C2<sub>2005</sub> do Cs-C4<sub>2005</sub> i Cs-C6<sub>2005</sub> do Cs-C8<sub>2005</sub>). Obrada bentonitom uzrokovala je nešto umerenije smanjenje sadržaja flavan-3-ola, u donosu na obradu organskim sredstvima. Izuzetak je vino Cs-C8<sub>2005</sub> (9 dana maceracije, 300 % semenki) iz kojeg je nakon obrade bentonitom uklonjeno 47 % flavan-3-ola. PVPP je pokazao visok afinitet prema ovim jedinjenjima. Obradom vina ovim neorganskim sredstvom sadržaj flavan-3-ola smanjen je najviše u vinima sa najvećim sadržajem flavan-3-ola pre obrade. Sadržaj flavan-3-ola u vinima proizvedenim od kljuka obogaćenog sa 300 % semenki, i nakon obrade želatinom i PVPP-om bio je skoro dvostruko veći od sadržaja flavan-3-ola u kontrolnom vinu pre obrade.

Ako se uporede rezultati obrade vina obogaćenih fenolnim jedinjenjima šepurine i vina obogaćenih fenolnim jedinjenjima semenki, može se konstatovati da je delovanje primenjenih sredstava za obradu vina slično. Efekti sredstava za bistrenje i stabilizaciju vina, u pogledu promena sadržaja antocijana, slični su, bez obzira da li se radi o vinima obogaćenim fenolnim jedinjenjima iz šepurine ili semenki. Obradom vina obogaćenih fenolnim jedinjenjima semenki želatinom, uklonjena je veća količina flavan-3-ola nego obradom vina obogaćenih fenolnim jedinjenjima šepurine. Albumin je blaže delovao na fenolna jedinjenja semenki nego šepurine. Obrada vina bentonitom i polivinilpolipirolidonom dala je slične rezultate, u pogledu sadržaja flavan-3-ola, bez obzira na to da li su vina obogaćena fenolnim jedinjenjima šepurine ili semenki.

Obradom mladih vina bentonitom uklanja se više boje nego obradom želatinom (*Zoecklinu, 1988*). Upotrebom bentonita za bistrenje mladih vina sorti Cabernet sauvignon i Frankovka, utvrđeno je veliko smanjenje intenziteta boje (*Stanković i sar., 2002*). Obradom vina sa 25 g/hl polivinilpolipirolidona (PVPP), koji se koristi u zaštiti vina od oksidacije i omekšavanju ukusa crvenih vina bogatih u taninima, ustanovljeno je neznatno smanjenje intenziteta boje, antocijana i taninskih materija (*Ribereau-Gayon i sar., 1976*).

Vrednosti intenziteta boje vina, kako kontrolnog tako i vina dobijenih od kljuka sa povećanim udelom šepurine i semenki, pre i nakon obrade enološkim sredstvima, prikazani su u tabelama 28 i 29.

**Tabela 28.** Promena intenziteta boje vina Cabernet sauvignon proizvedenih sa dodatkom šepurine u zavisnosti od primenjenog sredstva za bistrenje i stabilizaciju

Vino	Pre obrade	Albumin	Želatin	Bentonit	PVPP
Cs-B1 <sub>2005</sub>	1,311	1,292	1,252	1,195	1,300
Cs-B2 <sub>2005</sub>	0,988	0,972	0,936	0,883	0,978
Cs-B3 <sub>2005</sub>	1,067	1,022	0,970	0,968	1,027
Cs-B4 <sub>2005</sub>	0,854	0,776	0,795	0,737	0,816
Cs-B5 <sub>2005</sub>	1,042	0,946	0,969	0,882	1,004
Cs-B6 <sub>2005</sub>	0,985	0,929	0,926	0,856	1,044
Cs-B7 <sub>2005</sub>	0,941	0,876	0,907	0,824	0,978
Cs-B8 <sub>2005</sub>	0,913	0,895	0,761	0,859	0,932

**Tabela 29.** Promena intenziteta boje vina Cabernet sauvignon proizvedenih sa dodatkom semenki u zavisnosti od primenjenog sredstva za bistrenje i stabilizaciju

Vino	Pre obrade	Albumin	Želatin	Bentonit	PVPP
Cs-C1 <sub>2005</sub>	1,311	1,292	1,252	1,195	1,300
Cs-C2 <sub>2005</sub>	0,982	0,918	0,962	0,820	0,981
Cs-C3 <sub>2005</sub>	1,014	1,016	0,994	0,939	1,026
Cs-C4 <sub>2005</sub>	1,371	1,374	1,297	1,314	1,374
Cs-C5 <sub>2005</sub>	1,042	0,946	0,969	0,882	1,004
Cs-C6 <sub>2005</sub>	1,225	1,087	1,164	0,940	1,229
Cs-C7 <sub>2005</sub>	1,254	1,236	1,197	1,164	1,231
Cs-C8 <sub>2005</sub>	1,360	1,364	1,290	1,391	1,327

Intenzitet boje svih vina, kontrolnih i vina proizvedenih od kljuka obogaćenog šepurinom, opao je nakon obrade sredstvima za bistrenje i stabilizaciju vina, u odnosu na intenzitet boje pre obrade. Obrada vina polivinilpolipirrolidonom, skoro da nije uticala na intenzitet boje svih vina, bez obzira na dužinu maceracije i udeo šepurine. Obrada vina albuminom, najviše je umanjila intenzitet boje vina Cs-B4<sub>2005</sub> i Cs-B5<sub>2005</sub>. Albumin je minimalno umanjio intenzitet boje kontrolnog vina Cs-B1<sub>2005</sub>, vina proizvedenog od kljuka sa dodatkom 25 % šepurine (Cs-B2<sub>2005</sub>) i vina proizvedenog nakon 9 dana maceracije kljuka od celog grozda (Cs-B8<sub>2005</sub>). Obrada želatinom, najblaže je uticala na intenzitet boje vina sa Cs-B1<sub>2005</sub> (kontrola, 6 dana) i Cs-B2<sub>2005</sub> (25 % šepurine, 6 dana maceracije). Želatin je najviše smanjio intenzitet boje vina Cs-B8<sub>2005</sub> (ceo grozd, 9 dana maceracije). Obrada vina Na-bentonitom bitno je smanjila intenzitet boje vina, najviše u slučaju vina Cs-B4<sub>2005</sub> i kontrolnog vina Cs-B5<sub>2005</sub>. Intenzitet vina dobijenog od kljuka celog grozda, nakon 9 dana maceracije Cs-B8<sub>2005</sub>, najmanje je smanjen upotrebom bentonita.

Intenzitet boje vina proizvedenih od kljuka obogaćenog fenolnim jedinjenjima semenki pretrpeo je manje promene nakon obrade sredstvima za bistrenje i stabilizaciju. PVPP skoro da uopšte nije menjao intenzitet boje. Albumin je blago smanjio intenzitet boje kontrolnih vina i vina sa dodatkom 100 % semenki. Uticaj želatina je, takođe bio blag, nešto

izraženiji u vinima proizvedenim nakon 9 dana maceracije. Uticaj bentonita na intenzitet boje bio je najveći, od svih primenjenih enoloških sredstava. Slično albuminu, bentonit je minimalno uticao na intenzitet boje vina proizvedenih sa dodatkom 200 i 300 % semenki.

Vrednosti nijanse boje vina, kako kontrolnog tako i vina dobijenih od kljuka sa povećanim udelom šepurine i semenki, pre i nakon obrade enološkim sredstvima, prikazani su u tabelama 30 i 31.

**Tabela 30.** Promena nijanse boje vina Cabernet sauvignon proizvedenih sa dodatkom šepurine u zavisnosti od primenjenog sredstva za bistrenje i stabilizaciju

Vino	Pre obrade	Albumin	Želatin	Bentonit	PVPP
Cs-B1 <sub>2005</sub>	0,574	0,585	0,591	0,594	0,583
Cs-B2 <sub>2005</sub>	0,649	0,631	0,646	0,676	0,633
Cs-B3 <sub>2005</sub>	0,619	0,623	0,614	0,637	0,615
Cs-B4 <sub>2005</sub>	0,670	0,669	0,682	0,713	0,677
Cs-B5 <sub>2005</sub>	0,648	0,643	0,642	0,668	0,647
Cs-B6 <sub>2005</sub>	0,634	0,647	0,639	0,678	0,630
Cs-B7 <sub>2005</sub>	0,635	0,669	0,672	0,700	0,669
Cs-B8 <sub>2005</sub>	0,686	0,719	0,712	0,749	0,712

**Tabela 31.** Promena nijanse boje vina Cabernet sauvignon proizvedenih sa dodatkom semenki u zavisnosti od primenjenog sredstva za bistrenje i stabilizaciju

Vino	Pre bistrenja	Albumin	Želatin	Bentonit	PVPP
Cs-C1 <sub>2005</sub>	0,574	0,585	0,591	0,594	0,583
Cs-C2 <sub>2005</sub>	0,603	0,617	0,612	0,642	0,609
Cs-C3 <sub>2005</sub>	0,567	0,572	0,567	0,594	0,570
Cs-C4 <sub>2005</sub>	0,607	0,626	0,625	0,633	0,620
Cs-C5 <sub>2005</sub>	0,648	0,643	0,642	0,668	0,647
Cs-C6 <sub>2005</sub>	0,594	0,611	0,608	0,641	0,631
Cs-C7 <sub>2005</sub>	0,616	0,594	0,598	0,607	0,570
Cs-C8 <sub>2005</sub>	0,608	0,609	0,620	0,630	0,625

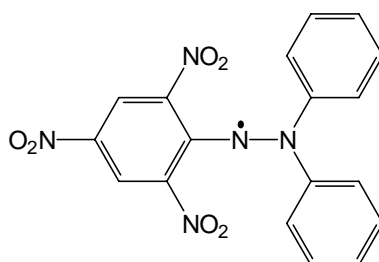
Primenjena enološka sredstva izazvala su neznatne oscilacije nijanse boje kontrolnih vina i vina „obogaćenih“ fenolnim jedinjenjima šepurine. Obrada vina bentonitom izazvala je blago „posmeđivanje“ vina odnosno povećanje nijanse boje svih obrađenih vina. Najveće povećanje nijanse boje, u odnosu na ista vina pre obrade, bentonit je izazvao u vinima Cs-B7<sub>2005</sub> i Cs-B8<sub>2005</sub> (50 i 100 % šepurine, 9 dana maceracije).

Promene nijanse boje vina proizvedenih od kljuka obogaćenog fenolnim jedinjenjima semenki bile su neznatne. Porast nijanse boje vina sa povećanim udelom fenola semenki je još blaži nego u slučaju obrade vina proizvedenih od kljuka sa povećanim sadržajem šepurine.

### 4.3. ESR SPEKTROSKOPSKO ODREĐIVANJE ANTIRADIKALSKE AKTIVNOSTI VINA

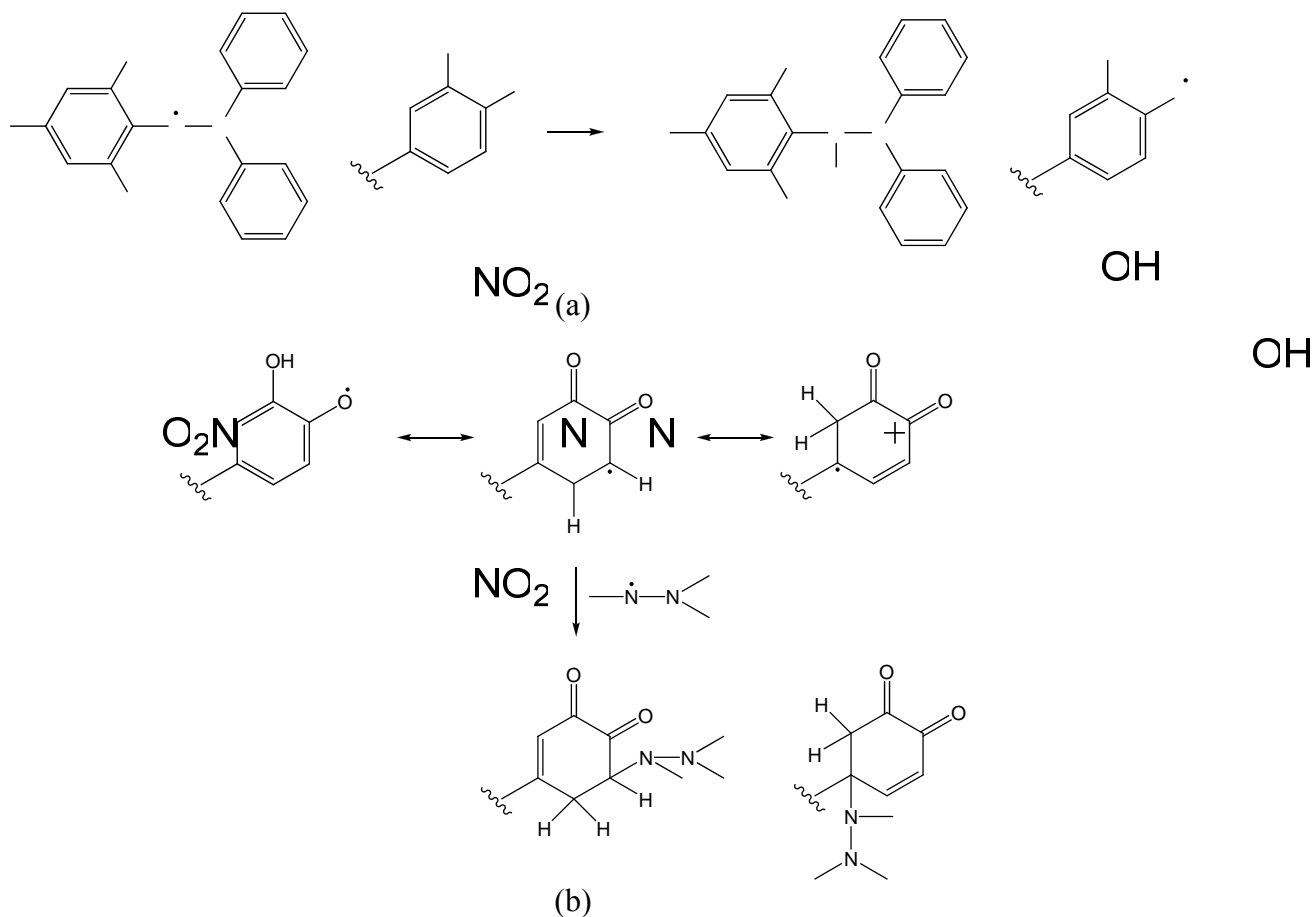
Antiradikalska aktivnost vina Cabernet sauvignon i Merlot, kao i vina obogaćenih fenolnim jedinjenjima iz šepurine i semenki odgovarajuće sorte grožđa, na stabilne 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) i na reaktivne hidroksil (<sup>•</sup>OH) radikale ispitana je elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom.

DPPH test je jedan od parametara koji se koristi za definisanje antioksidativne aktivnosti prirodnih sekundarnih metabolita. Stabilni DPPH<sup>•</sup> radikali imaju sledeću hemijsku strukturu (slika 32).



**Slika 32.** Hemijska struktura stabilnih DPPH<sup>•</sup> radikala

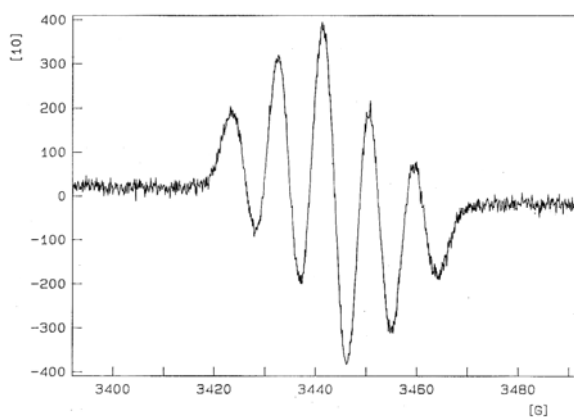
Antioksidanti, različitim hemijskim transformacijama redukuju DPPH radikale u neradikalsku DPPH-H formu. Mehanizam antiradikalskog delovanja polifenolnih jedinjenja na DPPH radikale (*Kurechi, 1983*), zasniva se na njihovoj sposobnosti da otpuste H-atom uz nastajanje stabilnih aroksil radikala (slika 33) i, najverovatnije, na sposobnosti formiranja stabilnih jedinjenja reakcijom aroksil radikala i DPPH radikala sledećim reakcionim mehanizmom prikazanim na slici 33:



**Slika 33.** Mehanizem antiradikaloskog delovanja polifenolnih jedinjenja: a) otpuštanje H atoma i b) reakcija aroksil radikala sa DPPH• radikalom

Ove hemijske promene se mogu pratiti spektrofotometrijski, praćenjem promene boje, od ljubičaste do žute, ili ESR spektrometrijski, direktnim merenjem koncentracije DPPH radikala.

Na slici 34. prikazan je ESR spektar stabilnih DPPH slobodnih radikala slepe probe.

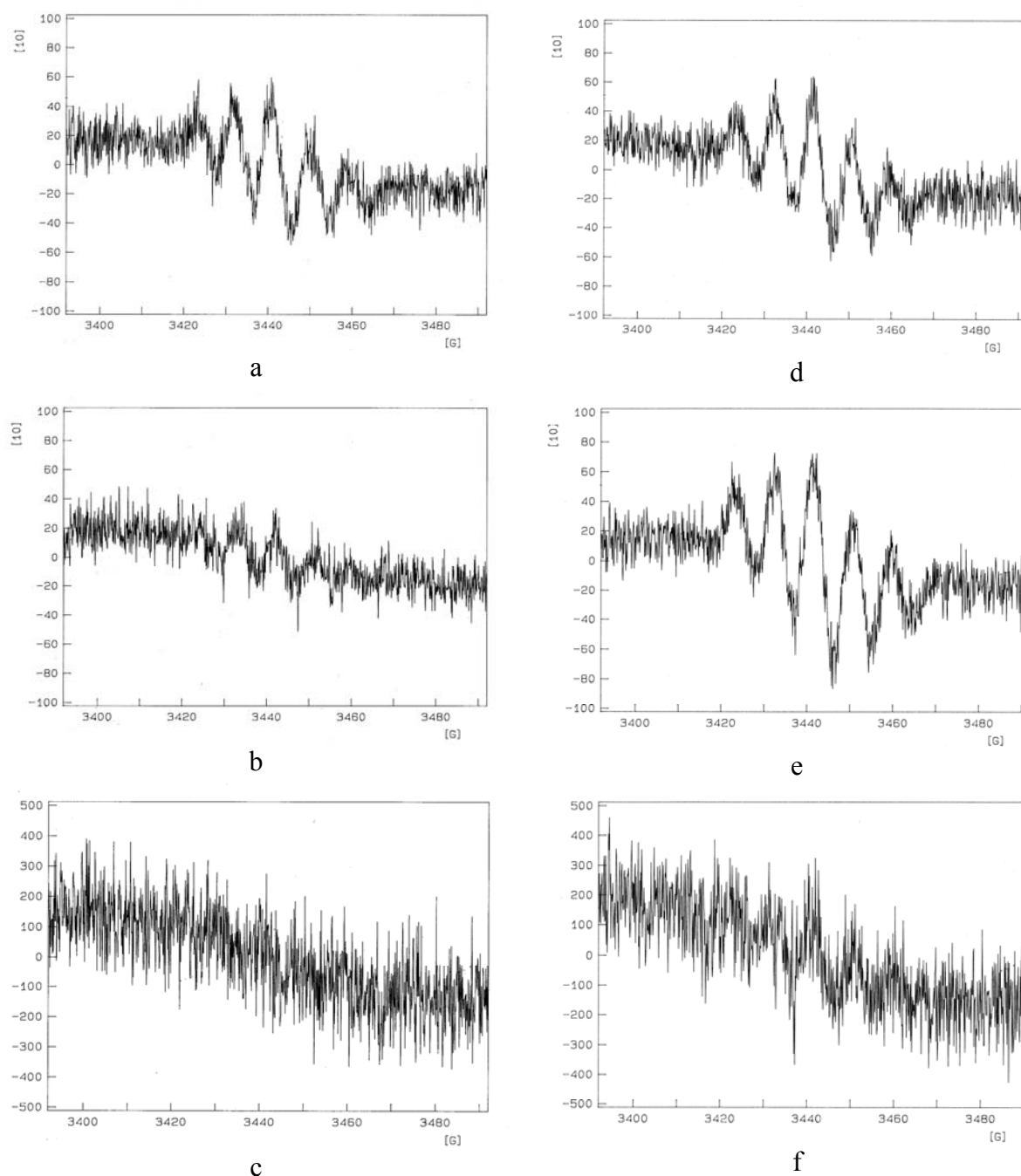


**Slika 34.** ESR spektar stabilnih DPPH radikala (slepa proba)



Hiperfina struktura ESR spektra stabilnih DPPH radikala potiče od interakcije nesparenog elektrona i dva  $^{14}\text{N}$  atoma ( $I=1$ ). Sastoji se od pet linija relativnog intenziteta 1:2:3:2:1. Konstanta hiperfinog cepanja ima vrednost  $a_N=9,03\text{G}$ .

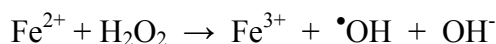
Na slici 35. (a-f) prikazani su ESR spektri DPPH radikala nastalih u prisustvu vina Cabernet sauvignon i Merlot, i vina obogaćenih fenolnim jedinjenjima iz šepurine i semenki grožđa Cabernet sauvignon i Merlot.



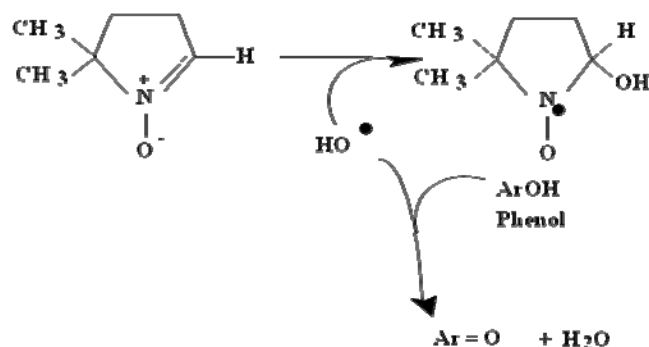
**Slika 35.** ESR spektar stabilnih DPPH radikala: a) vino Cabernet sauvignon, b) vino Cabernet sauvignon sa dodatkom 50 % šepurine, c) vino Cabernet sauvignon sa dodatkom 300% semenki, d) vino Merlot, e) vino Merlot sa dodatkom 50 % šepurine, f) vino Merlot sa dodatkom 300% semenki.

Poređenjem ESR spektra DPPH radikala slepe probe (slika 34) sa ESR spektrima DPPH radikala uzoraka sa ispitivanim vinima (slika 35 a-f), uočava se da je hiperfina struktura spektra očuvana, a intenziteti linija ESR signala se snižavaju.

U cilju određivanja antiradikalske aktivnosti vina na slobodne hidroksil radikale, pripremljen je Fentonov reakcioni sistem za generisanje hidroksil radikala:

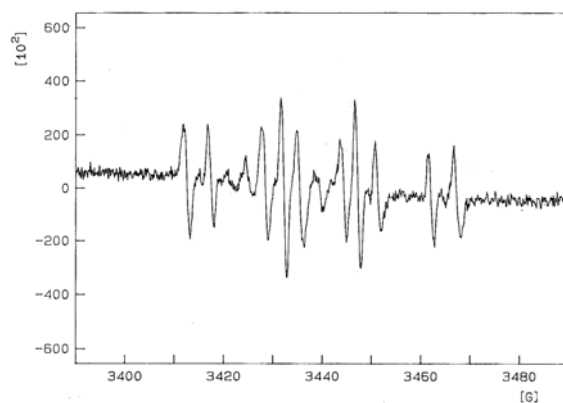


U Fentonovom reakcionom sistemu u prisustvu "spin trapa", hidroksil radikali reaguju i sa polifenolnim jedinjenjima i sa DMPO:



Hidroksil radikali nastali u Fentonovoj reakciji reaguju različitim mehanizmima sa fenolnim jedinjenjima i stvaraju neradikalske proizvode, hinone. Položaj i broj hidroksilnih grupa su strukturne karakteristike fenolnih jedinjenja koje imaju najveći značaj za antiradikalsko delovanje ovih jedinjenja na hidroksil radikale (*Hiramoto i sar. 1996, Cotelle 2001, Yang i sar. 2002, Heim i sar. 2002*). Preostali hidroksil radikali, koji nisu reagovali sa fenolnim jedinjenjima, u prisustvu "spin trapa" DMPO formiraju stabilne nitroksid radikale, odnosno DMPO-OH "spin adukte". Nastali stabilni DMPO-OH "spin adukti" imaju relativno dugo vreme života, te su pogodni za detekciju ESR-om (*Hiramoto i sar. 1996*).

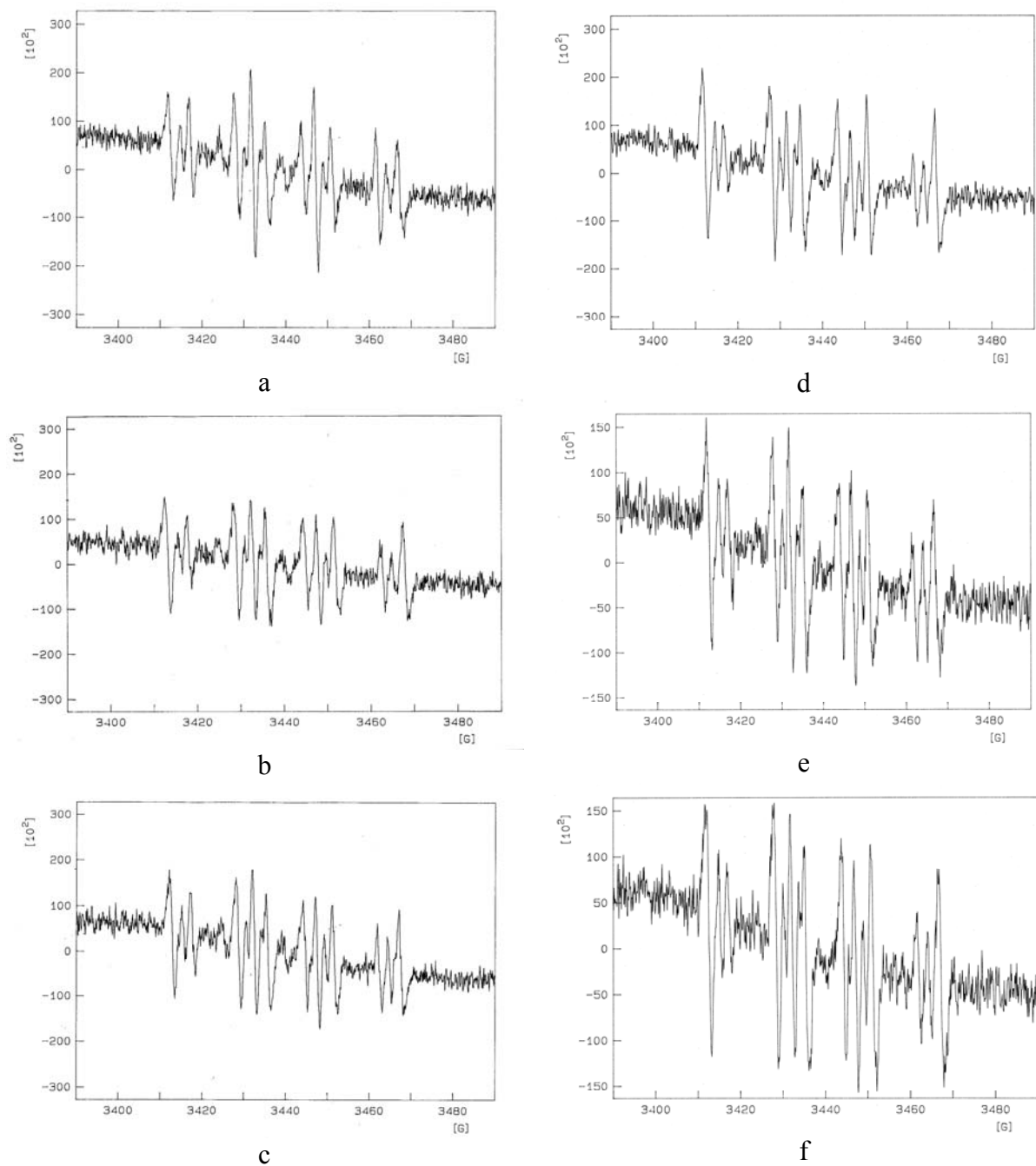
Na slici 36. prikazan je ESR spektar DMPO-OH "spin adukata" nastalih u Fentonovom model sistemu (slepa proba).



**Slika 36.** ESR spektar DMPO-OH "spin adukata" nastalih u Fentonovom model sistemu (slepa proba)

Hiperfina struktura ovog spektra je predstavljena sa četiri linije relativnog intenziteta 1:2:2:1 i istih konstanti hiperfinog cepanja za jedan  $^{14}\text{N}$ -atom ( $I=1$ )  $a_{\text{N}}=14,9$  G, i za jedan  $^1\text{H}$ -atom ( $I=1/2$ )  $a_{\text{H}}=14,9$  G.

Na slici 37 (a-f) prikazani su ESR spektri DMPO-OH "spin adukata" nastalih u Fentonovom model sistemu u prisustvu vina Cabernet sauvignon i Merlot, i vina obogaćenih fenolnim jedinjenjima iz šepurine i semenki grožđa Cabernet sauvignon i Merlot.



**Slika 37.** ESR spektar DMPO-OH "spin adukata" nastalih u Fentonovom model sistemu: a) vino Cabernet sauvignon, b) vino Cabernet sauvignon sa dodatkom 50 % šepurine, c) vino Cabernet sauvignon sa dodatkom 300% semenki, d) vino Merlot, e) vino Merlot sa dodatkom 50 % šepurine, f) vino Merlot sa dodatkom 300% semenki.

ESR spektralnom analizom, poređenjem intenziteta ESR signala DMPO-OH "spin adukata" slepe probe (slika 36) i uzoraka sa ispitivanim vinima (slika 37, a-f), utvrđeno je da ispitivana vina inhibiraju stvaranje hidroksil radikala i/ili utiču na njihovu transformaciju.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana i flavan-3-ola, indeks tanoidnih materija i antiradikalska aktivnost na DPPH i hidrosil radikale ispitivanih vina prikazani su tabeli 32.

**Tabela 32.** Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana i flavan-3-ola, indeks tanoidnih materija i antiradikalska aktivnost na DPPH i hidrosil radikale

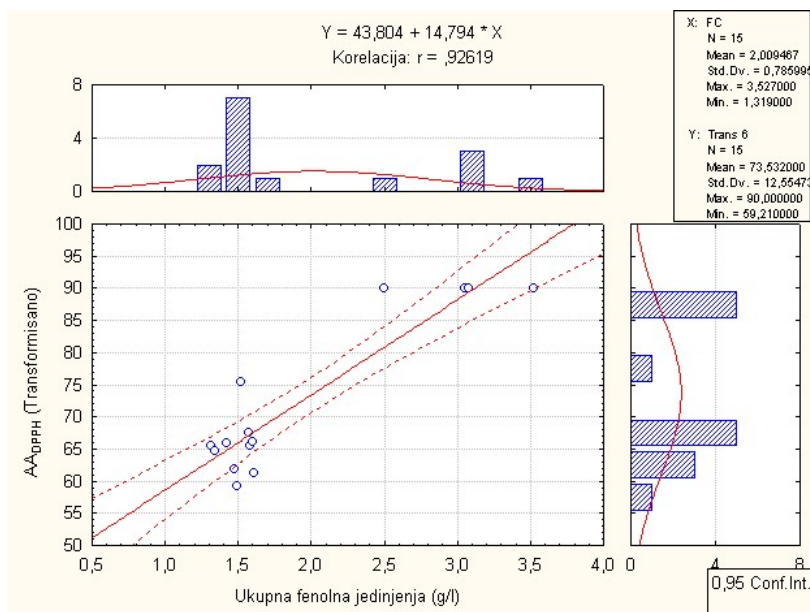
parametar vino	Uk. fenolna jed., (g/l)	Flavan-3- oli, (g/l)	Antocijani, (g/l)	$A_{280}$	$AA_{DPPH\cdot}$	$AA_{\cdot OH}$
Cs- C(B)5 <sub>2005</sub>	1,37	0,27	0,32	33,20	85,32	38,09
Cs-B7 <sub>2005</sub>	1,52	0,28	0,24	32,70	93,65	47,79
Cs-C8 <sub>2005</sub>	3,53	1,27	0,21	61,50	100	47,02
M- C(B)5 <sub>2005</sub>	1,46	0,37	0,33	38,40	83,73	70,30
M-B7 <sub>2005</sub>	1,60	0,72	0,23	39,40	84,13	66,30
M-C8 <sub>2005</sub>	2,39	2,37	0,26	58,30	100	71,04

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da vina Cabernet sauvignon i Merlot proizvedena sa dodatkom semenki poseduju najizraženiju antiradikalsku aktivnost na DPPH• radikale ( $AA_{DPPH\cdot}=100\%$ ), s obzirom da ova vina potpuno redukciju ESR signal ovih radikala. Pretpostavlja se da je visoka efikasnost vina proizvedenih sa dodatkom semenki uslovljena povećanim sadržajem fenolnih jedinjenja i flavan-3-ola u odnosu na kontrolna vina. Takođe, može se uočiti da vina Merlot (i kontrolno vino i vina proizvedena sa dodatkom šepurine i semenki) pokazuju nešto izraženiju antiradikalsku aktivnost na hidrosil radikale u odnosu na vina Cabernet sauvignon (i kontrolno vino i vina proizvedena uz dodatak šepurine i semenki). Značajna, relativno slična, antiradikalska aktivnost ( $AA_{\cdot OH}\approx 70\%$ ) utvrđena je za vina Merlot.

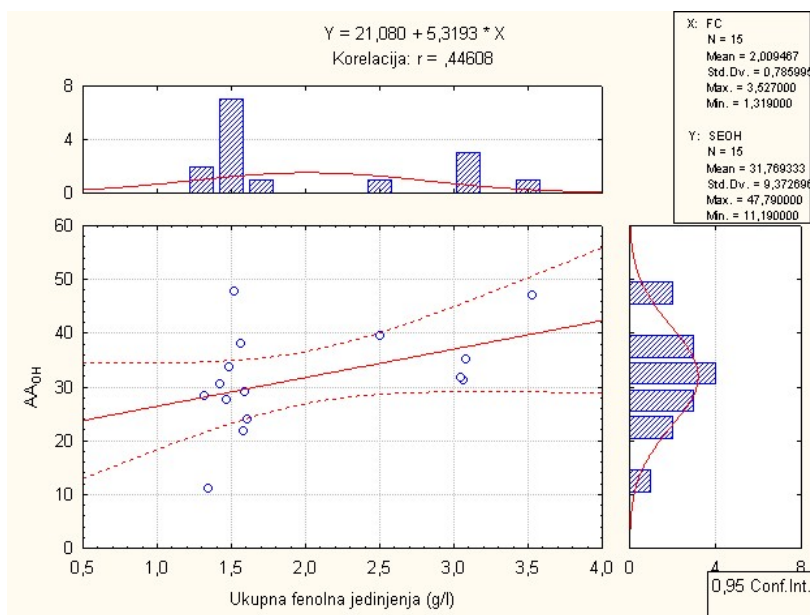
#### 4.3.1. Korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i antiradikalske aktivnosti vina

U mnogim istraživanjima je dokazan visok stepen pozitivne korelacije sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala vina (*Soleas i sar., 2007, Rosana-Minussi i sar., 2003*). Da bi se potvrdila veza između antiradikalske aktivnosti vina i povećanog sadržaja fenolnih jedinjenja iz čvrstih delova grozda, urađena je korelaciona analiza. Uticaj sadržaja fenolnih jedinjenja na antiradikalsku aktivnost, vina Cabernet sauvignon, na DPPH radikale ( $AA_{DPPH\cdot}$ ), iskazan je pozitivnom i visokom korelacijom. Regresioni model je iskazan jednačinom sa pozitivnim predznakom uz parameter b, što ukazuje da se pri porastu koncentracije fenolnih jedinjenja antiradikaska aktivnost vina povećava. Međutim, zavisnost

promenljive  $AA_{DPPH}$ , vina Cabernet sauvignon praćena je znatno višom vrednošću koeficijenta linearne korelacije ( $r=0,926$ ) nego što je to slučaj korelacije sadržaja fenolnih jedinjenja i promenljive  $AA_{OH}$ , gde je vrednost koeficijenta,  $r=0,446$  (slike 38 i 39).



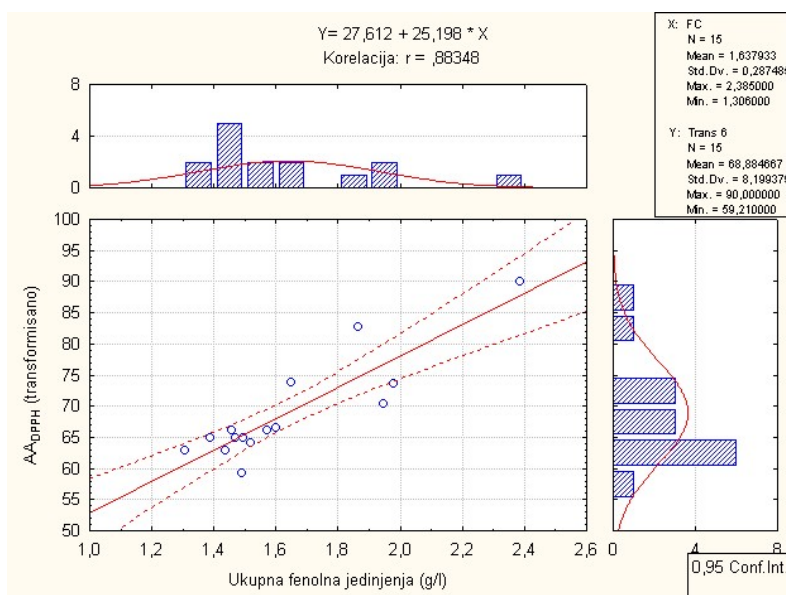
**Slika 38.** Linearna korelacija  $AA_{DPPH}$  u zavisnosti od sadržaja fenolnih jedinjenja (vino Cabernet sauvignon)



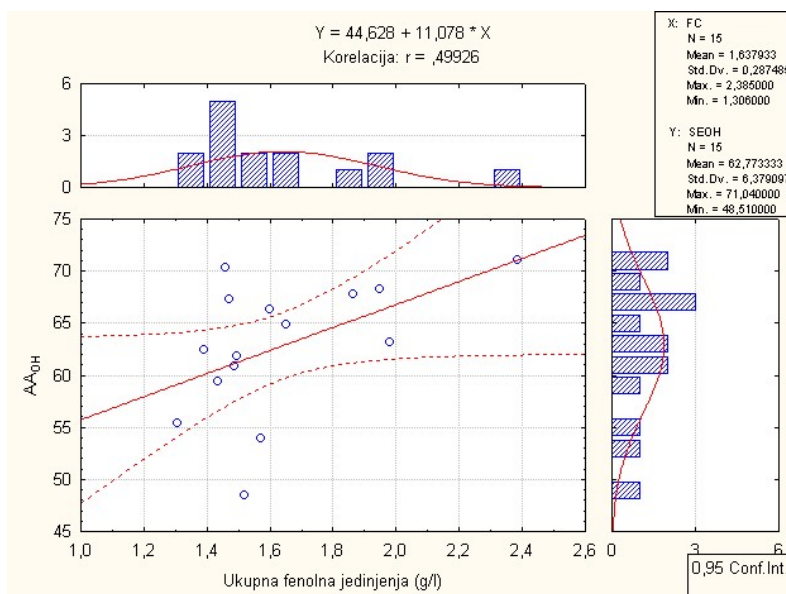
**Slika 39.** Linearna korelacija  $AA_{OH}$  u zavisnosti od sadržaja fenolnih jedinjenja (vino Cabernet sauvignon)

U slučaju vina Merlot vrednost koeficijenta linearne korelacije sadržaja fenolnih jedinjenja i promenljive  $AA_{DPPH}$  je visoka i iznosi,  $r=0,883$ , a korelacije sadržaja fenolnih jedinjenja i promenljive  $AA_{OH}$ , znatno niža ( $r=0,499$ ) (slike 40 i 41). U ovom slučaju postoji

relativno visoka pozitivna korelacija između koncentracije fenolnih jedinjenja i pokazatelja antiradikaskе aktivnosti vina (promenljive AA<sub>DPPH•</sub>).

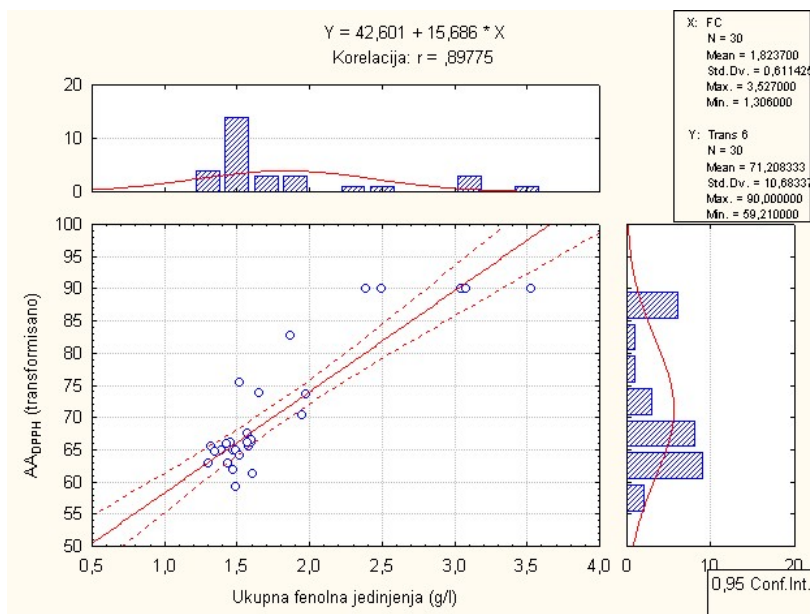


**Slika 40.** Linearna korelacija AA<sub>DPPH•</sub> u zavisnosti od sadržaja fenolnih jedinjenja (vino Merlot)



**Slika 41.** Linearna korelacija AA<sub>OH</sub> u zavisnosti od sadržaja fenolnih jedinjenja (vino Merlot)

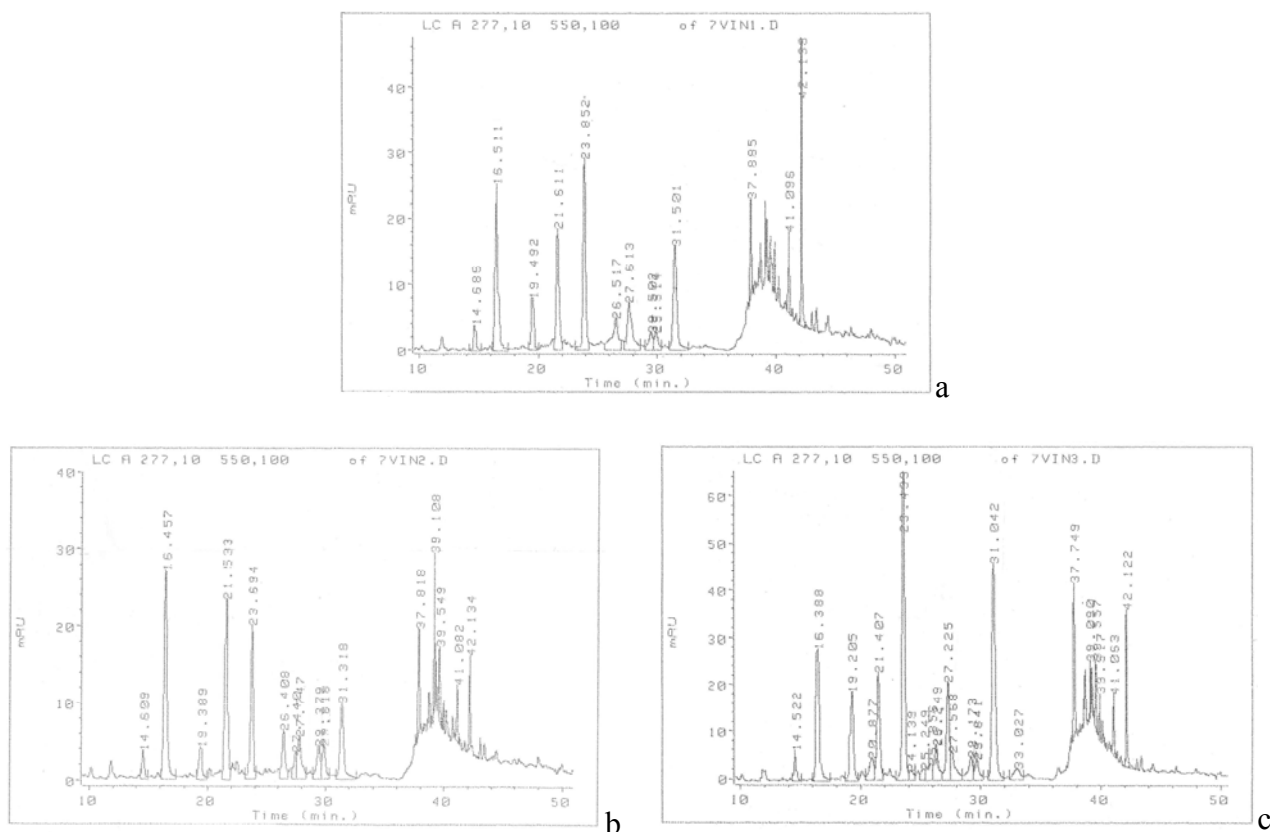
Sagledavanje uticaja sadržaja fenolnih jedinjenja na antiradikalisku aktivnost vina (AA<sub>DPPH•</sub> i AA<sub>OH</sub>), koje je izvedeno za obe ispitivane sorte ukazuje na postojanje visoke i pozitivne korelacije ovih promenljivih. Regresija zavisno promenljive na nezavisno promenljivu praćena je pozitivnim predznakom uz parametar b, pri čemu je koeficijent linearne korelacije, r=0,897 (slika 42).



**Slika 42.** Linerana korelacija AA<sub>DPPH</sub> i AA<sub>OH</sub> u zavisnosti od sadržaja fenolnih jedinjenja (vina Cabernet sauvignon i Merlot)

Sadržaj (+)-katehina u vinima proizvedenim uz dodatak šepurine i/ili semenki u kljuka, nije se značajno menjao u odnosu na kontrolno vino. U kontrolnom vinu Merlot sadržaj (+)-katehina je iznosio 27,5 mg/l, vino iscedeno iz kljuka sa povećanim udelom šepurine 33,5 mg/l, a vino Merlot "obogaćeno semenkama" 34,8 mg/l (+)-katehina. Veće razlike utvrđene su u sadržaju (-)-epikatehina u ova tri vina. Kontrolno vino sadržalo je 46,7 mg/l (-)-epikatehina, vino proizvedeno sa dodatkom šepurine u kljuk, 30 mg/l, dok je vino dobijeno od kljuka sa 300 % povećanim udelom semenki (M-C8<sub>2005</sub>), sadržalo 121,4 mg/l (-)-epikatehina. Znatno viši sadržaj (-)-epikatehina u odnosu na sadržaj (+)-katehina, mogao bi se porediti sa rezultatima *Fuleki i Ricardo da Silva (1997)* koji su utvrdili da je sadržaj (-)-epikatehina, u ekstraktima semenki grožđa, viši od sadržaja (+)-katehina. HPLC hromatogrami kontrolnog vina i vina proizvedenih sa povećanim udelom šepurine i semenki u kljuku, prikazani su na slici 43 (a-c).





**Slika 43.** HPLC hromatogram vina; a-vino sa prirodnim sadržajem čvrstih delova grozda; b-vino sa dodatkom 50 % šepurine; c- vino sa dodatkom 300 % semenki

#### 4.3.2. Uticaj obrade vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju na antiradikalisku aktivnost

Vina Cabernet sauvignon i Merlot, kao i vina obogaćena fenolnim jedinjenjima iz šepurine i semenki odgovarajuće sorte grožđa, tretirana su mineralnim (bentonit i PVPP) i organskim (albumin i želatin) sredstvima za bistrenje i stabilizaciju. Sadržaj fenolnih jedinjenja i antiradikaliska aktivnost na DPPH i hidroksil radikale vina Cabernet sauvignon prikazani su tabeli 33.

**Tabela 33.** Sadržaj fenolnih jedinjenja, indeks tanoidnih materija i antiradikaliska aktivnost vina Cabernet sauvignon

Vino	Parametar	Pre obrade	Bentonit	Albumin	Želatin	PVPP
kontrol no	Uk. fenol. (g/l)	1,569	1,425	1,573	1,606	1,596
	AA <sub>DPPH</sub>	85,32	83,33	82,94	76,98	83,73
	AA <sub>OH</sub>	38,09	30,60	21,64	23,88	29,10
šepurin a	Uk. fenol. (g/l)	1,521	1,319	1,346	1,489	1,473
	AA <sub>DPPH</sub>	93,65	82,94	81,75	73,81	77,78
	AA <sub>OH</sub>	47,79	28,36	11,19	33,58	27,61
semenk c	Uk. fenol. (g/l)	3,527	3,064	3,048	2,500	3,080
	AA <sub>DPPH</sub>	100	100	100	100	100
	AA <sub>OH</sub>	47,02	31,34	31,72	39,55	35,07

Sadržaj fenolnih jedinjenja i antiradikalska aktivnost na DPPH• i hidroksil radikale vina Merlot prikazani su tabeli 34.

**Tabela 34.** Sadržaj fenolnih jedinjenja, indeks tanoidnih materija i antiradikalska aktivnost vina Merlot

Vino	Parametar	Pre obrade	Bentonit	Albumin	Želatin	PVPP
kontrol no	Uk. fenol. (g/l)	1,460	1,390	1,470	1,306	1,496
	AA <sub>DPPH•</sub>	83,73	81,94	82,14	79,37	82,14
	AA <sub>•OH</sub>	70,30	62,38	67,33	55,45	61,88
šepurin a	Uk. fenol. (g/l)	1,601	1,520	1,436	1,489	1,573
	AA <sub>DPPH•</sub>	84,13	80,95	79,37	73,80	83,73
	AA <sub>•OH</sub>	66,34	48,51	59,41	60,89	53,96
semenk e	Uk. fenol. (g/l)	2,385	1,865	1,948	1,650	1,980
	AA <sub>DPPH•</sub>	100	98,48	88,69	92,38	92,06
	AA <sub>•OH</sub>	71,04	67,82	68,32	64,85	63,12

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da vina Cabernet sauvignon i Merlot proizvedena sa dodatkom semenki i nakon primene sredstava za bistrenje poseduju značajnu antiradikalsku aktivnost na DPPH radikale. Posle bistrjenja vina svim ispitivanim sredstvima, antiradikalska aktivnost vina Cabernet sauvignon proizvedenog sa dodatkom semenki iznosi 100%, a nešto niže vrednosti (AA<sub>DPPH•</sub>=88,69-98,48%) zabeležene su kod vina Merlot proizvedena sa dodatkom semenki. Takođe, može se uočiti da vino Merlot proizvedeno sa dodatkom semenki (AA<sub>•OH</sub>=63,12%-68,32%) pokazuje izraženiju antiradikalsku aktivnost na hidroksil radikale u odnosu na vino Cabernet sauvignon proizvedeno sa dodatkom semenki (AA<sub>•OH</sub>=31,34-39,55%) i nakon primene sredstava za bistrenje.

Suma (+)-katehina i (-)-epikatehina nije bitnije promenjena nakon obrade kontrolnog vina Merlot i vina proizvedenog sa povećanim sadržajem šepurine, sredstvima za bistrenje i stabilizaciju. Obradom kontrolnog vina zbir (+)-katehina i (-)-epikatehina opada sa 74,3 mg/l, na 66,7 mg/l (bentonit), 62,3 mg/l (albumin) i 55,5 mg/l (PVPP). Na sličan način menjao se sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina, nakon obrade istim sredstvima, u vinima proizvedenim uz dodatak šepurine u kljuk. U vinu proizvedenom uz dodatak semenki u kljuk suma (+)-katehina i (-)-epikatehina bila je najviša i iznosila je 156,2 mg/l. Nakon obrade vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju vina, sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina smanjen je ispod kontrolnog vina. Posle obrade vina bentonitom sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina bio je 52,9 mg/l, a nakon obrade albuminom 45,7 mg/l.

## 5. ZAKLJUČAK

U radu je ispitan uticaj temperature i vremena trajanja maceracije na sadržaj fenolnih jedinjenja i boju crvenih vina proizvedenih od grožđa dve priznate sorte vinove loze: Cabernet sauvignon i Merlot. Vinogradi se nalaze na području Fruške gore. Osim uticaja ova dva faktora u toku tri godine (berbe) ispitan je uticaj vremena trajanja maceracije i odnosa čvrste i tečne faze u kljuku na sadržaj fenolnih jedinjenja, antocijana, flavan-3-ola i boju crvenih vina. Radom je obuhvaćeno ispitivanje uticaja obrade crvenih vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju na sadržaj fenolnih jedinjenja, antocijana, flavan-3-ola i boju vina. Ispitana je antiradikalska aktivnost crvenih vina proizvedenih uz dodatak šepurine i semenki u kljuk, kao i antiradikalska aktivnost vina nakon obrade sredstvima za bistrenje i stabilizaciju.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja povećava se produženjem vremena trajanja maceracije i povećanjem temperature. Najniži sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu Cabernet sauvignon utvrđen je nakon 3 dana maceracije na temperaturi 20 °C (1,323 g/l), a najviši nakon 15 dana maceracije na temperaturi 35 °C (3,045 g/l). Već nakon 6 dana maceracije na 20 °C sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu Cabernet sauvignon bio je iznad 1,5 g/l, što je minimalna vrednost potrebna da bi se vino moglo svrstati u grupu crvenih (crnih) vina. U slučaju vina Merlot ekstrakcija fenolnih jedinjenja tokom maceracije kljuka na 20 °C tekla je nešto sporije. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja niti nakon 15 dana maceracije nije prešao vrednost 1,5 g/l. Najviši sadržaj fenolnih jedinjenja utvrđen u vinu Merlot nakon 15 dana maceracije na temperaturi 35 °C (2,399 g/l).

Najviši udeo antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima u vinu Cabernet sauvignon utvrđen je nakon 6 dana maceracije na temperaturi 20 °C (34 %) i 3 dana maceracije na temperaturi 25 °C (33 %). Nakon 15 dana maceracije na temperaturi 20 °C udeo antocijana je opao na 23 %. U pogledu udela antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima temperatura maceracije od 35 °C bila je najlošija. Nakon 3 dana maceracije na 35 °C udeo antocijana je iznosio 18 %, da bi posle 15 dana maceracije opao na 6 %. Ekstrakcija antocijana iz grožđa Merlot na temperaturi 20 °C tekla je sporije, tako da je udeo antocijana u ukupnim fenolnim jedinjenjima dostigao maksimalnu vrednost (28 %) tek nakon 9 dana. Na temperaturi 25 °C najveći udeo antocijana u ukupnim fenolima utvrđen je nakon 3 dana maceracije i iznosio je 27 %. Produženjem vremena trajanja maceracije i povećanjem temperature maceracije udeo antocijana se smanjivao.

Udeo flavan-3-ola u vinu Cabernet sauvignon povećava se na temperaturi maceracije 35 °C do devetog dana, kada iznosi 81 %, a zatim opada. Na temperaturama maceracije 25 °C i 30 °C udeo flavan-3-ola, nakon neujednačenog rasta dostigao je maksimalnu vrednost 60 %, nakon 15 dana. U vinu Merlot udeo flavan-3-ola se ravnomernije povećavao i nakon 6 dana maceracije kretao se u intervalu od 31 % do 42 %, a nakon 9 dana, od 32 % do 51 %.

Analizom boje vina zaključeno je da se nakon maceracije na 25 °C i 30 °C u trajanju 3, 6 i 9 dana dobijaju vina sa kvalitetnom bojom. Duže vreme trajanja maceracije i više temperature dovode do povećanja nijanse boje odnosno, žutih tonova, što je nepoželjno kod crvenih vina. U vinu Merlot, nakon maceracije na 35 °C nijansa boje je je iznosila 0,839. Visoke vrednosti  $dA(\%)$  utvrđene su u vinima Merlot nakon maceracije na temperaturama 25 °C i 30 °C.

Dodatakom 25, 50 i 100 % šepurine u kljuk od zrelog grožđa (berba 2003) srazmerno se povećava sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Neznatno viši sadržaj fenolnih jedinjenja utvrđen je u vinu Cabernet sauvignon dobijenom nakon 6 dana maceracije kljuka sa 100 % šepurine (3,23 g/l), nego u vinu sa istim udelom šepurine nakon 9 dana maceracije (2,81 g/l). Najviši udeo flavan-3-ola utvrđen je u vinu Cabernet sauvignon nakon 9 dana maceracije sa dodatkom 25 % šepurine i iznosio je 72 %. Povećan sadržaj šepurine u kljuku dao je slične rezultate u pogledu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavan-3-ola i antocijana u vinu Merlot (berba 2003). Povećanje udela šepurine u kljuku od grožđa koje je sazrevalo u lošim vremenskim uslovima (berbe 2004 i 2005) kao rezultat imalo je blaži porast sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavan-3-ola u vinima Cabernet sauvignon i Merlot u odnosu na berbu 2003. Negativna posledica dodatka šepurine u ovom slučaju je loša boja vina. Dodatak šepurine u kljuk izazvao je porast nijanse boje preko 1 (vino M-B8<sub>2004</sub> i Cs-B8<sub>2004</sub>) dok je svetloća boje vina (vrednost  $dA$ ) opala ispod 40 %. Ovakvi rezultati ukazuju na to da se dodatak šepurine u kljuk može vršiti samo u godinama kada su uslovi sazrevanja grožđa odgovarajući.

Dodatak semenki grožđa u kljuk u količini 100 %, 200 % i 300 % u odnosu na prirodni sadržaj, srazmerno je uticao na povećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavan-3-ola u oba ispitivana vina berbe 2003. Najviši sadržaj fenolnih jedinjenja utvrđen je u vinima sa dodatkom trostruke količine semenki: Cs-C4<sub>2003</sub> (3,48 g/l), Cs-C8<sub>2003</sub> (3,44 g/l), Cs-C4<sub>2005</sub> (3,61 g/l), Cs-C8<sub>2005</sub> (3,53 g/l). Dodatak semenki u kljuk Merlot 2003 godine povećao je sadržaj fenolnih jedinjenja M-C4<sub>2003</sub> (3,29 g/l), M-C8<sub>2003</sub> (3,07 g/l), dok je u vinu 2004 godine povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja bilo znatno manje. Najviši udeo flavan-3-ola utvrđen je u vinima Cs-C4<sub>2003</sub> (75 %), Cs-C8<sub>2003</sub> (82 %). Boja vina berbe 2003, proizvedenih

od kljuka sa povećanim udelom semenki bila odgovarajućeg kvaliteta. Nijansa boje je samo kod vina Cs-C8<sub>2003</sub> dostigla vrednost 0,7, ali je vrednost dA i dalje ostala iznad 60, a udeo crvene boje (A<sub>520</sub>) 56,36 %. Dodatak semenki u kljuk grožđa Merlot (2003) u toku 6 i 9 dana maceracije, nije značajno povećao vrednost nijanse, a dA vrednost bila je iznad 60 u svim vinima. Potpuno drugačiji rezultati dobijeni su analizom vina Merlot (2004) Nijansa boje je bila visoka u kontrolnim vinima, a dodatkom semenki vrednost nijanse se dodatno povećala. U vinu M-C3<sub>2004</sub> nijansa boje iznosila je 0,987, a vrednost dA svega 33,55 %.

Primenom ESR spektralne analize određena je antiradikalska aktivnost vina Cabernet sauvignon i Merlot. Vina Cabernet sauvignon i Merlot proizvedena sa dodatkom semenki poseduju najizraženiju antiradikalsku aktivnost na DPPH radikale (AA<sub>DPPH</sub> = 100%), s obzirom da ova vina potpuno redukuju ESR signal ovih radikala. Ovako visoka vrednost AA<sub>DPPH</sub> vina proizvedenih sa dodatkom semenki u skladu je sa povećanim sadržajem fenolnih jedinjenja i flavan-3-ola u odnosu na kontrolna vina. Vina Merlot (kontrolno vino i vina proizvedena sa dodatkom šepurine i semenki) pokazuju nešto izraženiju antiradikalsku aktivnost na hidroksil radikale (AA<sub>OH</sub> ≈ 70%) u odnosu na vina Cabernet sauvignon (AA<sub>OH</sub> ≈ 47%).

Uticaj sadržaja fenolnih jedinjenja na antiradikalsku aktivnost, vina Cabernet sauvignon, na DPPH radikale iskazan je pozitivnom i visokom korelacijom (r=0,926), dok je vrednost koeficijenta linearne korelacije sadržaja fenolnih jedinjenja i AA<sub>OH</sub>, znatno niža (r=0,446). U slučaju vina Merlot utvrđena je nešto niža vrednost koeficijenta linearne korelacije sadržaja fenolnih jedinjenja i AA<sub>DPPH</sub> (r=0,883), a koeficijent korelacije sadržaja fenolnih jedinjenja i AA<sub>OH</sub>, iznosio je r=0,499.

Na osnovu HPLC analize utvrđeno je da je u vinu Cabernet sauvignon proizvedenom od kljuka sa dodatkom trostruke količine semenki sadržaj (-)-epikatehina 2,6 puta veći u odnosu na kontrolno vino. Obradom kontrolnog vina, sredstvima za bistrenje i stabilizaciju, zbir (+)-katehina i (-)-epikatehina opada sa 74,3 mg/l, na 66,7 mg/l (bentonit), 62,3 mg/l (albumin) i 55,5 mg/l (PVPP). Na sličan način menjao se sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina u vinima proizvedenim uz dodatak šepurine u kljuk, nakon obrade istim sredstvima. U vinu proizvedenom uz dodatak semenki u kljuk suma (+)-katehina i (-)-epikatehina bila je najviša i iznosila je 156,2 mg/l. Nakon obrade vina sredstvima za bistrenje i stabilizaciju vina, sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina smanjen je ispod sadržaja utvrđenom u kontrolnom vinu. Posle obrade vina bentonitom sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina bio je 52,9 mg/l, a nakon obrade albuminom 45,7 mg/l.

## 6. LITERATURA

-Abuja, P.M., Albertini, R., Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Cli. Chim. Acta*, 306, 1 - 17, 2001.

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

-Adrian M., Jenadet P., Breuil A., Levite D., Deborg S., Bessis R., Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wine by direct injection high performance liquid chromatography, *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(1), 37-41, 2000.

-Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Trinajstić, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Croat. Chem. Acta*, 76, 55-61, 2003.

-Amrani-Joutei K., These de Doctorat Enologie Ampelologie, Universite de Bordeaux II, 1993.

-Amrani-Joutei K., Glories Y., *Rev. Fr. Enol.*, 153, 28, 1995.

-Anderson D.W., Gueffroy D.E., Webb A.D., Kepner R.E., Copigmentation of anthocyanins of a acetic acid an acylating of anhocyanin pigments in grapes, *Phytochemistry*, 11, 1139-1144, 1970.

-Anis, A., Dimitris, P.M., Panagiotis, K., Correlation pf pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece, *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655-665, 2002.

-Arichi H., Kimura Y., Okuda H., Baba K., Kozawa M., Arichi S., Effesct of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 1766-1770, 1982.

-Aruoma, O.I., Methodological considerations for Characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods, *Mut. Res. Int.*, 523 - 524, 9 - 20, 2003.

-Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., Kim, A.L., Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention, *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 224, 274-283, 2007.

-Augustin, M., Vivas, N., Sain-Cricq de Gaulejac, N., Glories, Y., A biochemical approach to the evolution of procianidins in grape seeds during the ripening of red grapes (*Vitis vinifera* L. Cv Merlot noir), *Journal of Wine research*, 8, 159-169, 1997.

-Auw J.M., Blanco V., Keefe S.F., Sims C.A., 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, 1996.

-Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Casetta, B., HPLC/MS Application to Anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 43, 2104-2109, 1995.

-Bagchi, K., Puri, S., Free radicals and antioxidants in health and disease, *EMHJ*, 4, 350 - 360, 1998.

-Barral D., Universite de Montpellier, I, 1985.

-Bartolome B., Hernandez T., Bengoeches M.L., Quesada C., Gomez-Cordovez C., Estrella I., Determination of some structural features of procyanidins and related compounds by photodiode-array detection. *J. Chromatogr., A*, 273, 19-26, 1996.

-Bartolome B., Nunez V., Monagas M., Gomez-Cordoves C., In vitro antioxidant activity of red grape skins, *Food Research Technology*, 218, 173-177, 2004.

-Bartowsky, E.J., Dillon, S.J., Ortiz-Julien, A., Dumont, A., Markides, A.J., Hoj, P.B., Herderich, M., Pretorius, I.S., Henschike, P.A., The potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast to improve red wine colour, *Aust. N.Z. grapegrower winemaker* 490, 83-85, 2004.

-Becker, E.M., Nissedn, L.R., Skibsted, L.H., Antioxidante evaluation protocols.: Food quality or health effects, *Eur., Food Res. Technol.*, 219, 561 - 571, 2004.

-de Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W. C. A., and Manley, M. Phenolic compounds: A review of their possible role as *in vivo* antioxidants of wine, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 23, 48–61, 2002.

-Boulton, R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E., Principoles and Practices of Winemaking, 224-228, Chapman and Hall, New York, 1996.

-Boulton, R.B., The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 67-87, 2001.

-Bourhis M., Theodore N., Weber J.F., Vercauteren J., Polyphenols Communications, Boredeaux, 43, 1996.

-Bourzeix M., Weyland D., Heredia N., 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, 1986.

-Budić-Leto I., Lovrić T., Pezo I., Gajdoš-Kljusurić J., Study of Dynamics of Polyphenol Extraction During Traditional and Advanced Maceration Processes of the Babić Grape Variety, *Food Technolical and Biotechnological*, 43 (1), 47-53, 2005.

-Bukvić B., Prilog poznavanju bojenih materija u grožđu i soku nekih sorti vinove loze tipa bojadisera, Doktorska disertacija, poljoprivredni fakultet Beograd, 1988.

-Burk, R.F., Lane, J.M., Patel, K., Relationship of Oxigen and Glutathione in Protection against Carbon Tetrachloride-induced Hepatic Microsomal Lipid Peroxidation and Covalent Binding in the Rat, *J. Clin. Invest.*, 74, 1996 - 2001, 1984.

-Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lea E.J.M., Crozier A., Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3337-3340, 2002.

-Burns, J., Gardner, P.T., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., McPhail, D.B., Lister, C., Matthews, D., MacLean, M.R., Lean, M.E., Duthie, G.G., Crozier, A., Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and phenolic content in red wines, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 220-230, 2000.

-Bragadóttir, M., Endogenous antioxidants in fish, A literature review submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of science in food science, Department of Food Science, University of Iceland, 2001.

-Bravo, L., Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutrition Reviews*, 56, 317-333, 1998.

-Brouillard R., Chemical Structure Anthocyanins, part 1, Anthocyanins as Food Colors, 1982.

-Campodoncio P., Barbieri E., Pizarro M., Sotomayor C.P., Lissi E.A., A comparison between total phenol content of wines and their TRAP values measured by the bleaching of ABTS radical cations, *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 43(3), 281-285, 1998.

-Cantos E., Garcia-Viguera C., De Pascual-Teresa S., Tomas-Barberan F.A., Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4606-4612, 2000.

-Caridi A., Cufari A., Lavino R., Palumbo R., Tedesco I., Influence of Yeast on Polyphenol Composition of Wine, *Food Technol. and Biotechnol.*, 42(1), 37-40, 2004.

-Cao, G., Prior, R.L., Red wine in moderation: potential health benefits independent of alcohol, *Nutrition and Clinical Care*, 3, 76-82, 2000.

-Castagnino C., Vercauteren J., *Tetrahedron Lett.*, 37, 7739, 1996.

-Castino M., *Riv. Viticul, Enol.*, 34, 333-348, 1982.

-Cedric T.S., Andrew L.W., Synergetic activity of catechin and other antioxidants, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (11) 4491-4494, 1999.

-Cheynier V., Rigaud J., HPLC separation and characterization of flavonols in the skin of *Vitis vinifera* var. Cinsault., *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 248-252, 1986.



-Cheynier V., Rigaud J., Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay Wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 36-42, 1989.

-Cheynier, V., Prieur C., The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins, In: Proceedings of ACS Symposium Series 661, Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits, T. R. Watkins (Ed.), 81-93, 1997.

-Cheynier, V., Moutounet, M., Sarni-Manchado, P., 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, 2003.

-Choi, H.S., Cha, Y.N., Kim, C., Taurine chloramine inhibits PMA-stimulated superoxide production in human perhaps by inhibiting phosphorylation and translocation of p38 $\alpha$ , *Int. Immunopharmac.*, 6, 1431 - 1440, 2006.

-Cindrić P., Korać N., Kovač V., *Sorte vinove loze*, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Prometej, Novi Sad, 2000.

-Cook N.C., Samman S., Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nut. Biochem*, 7, 66-76, 1996.

-Cotelle, N. Role of flavonoids in oxidative stress, *Curr. Top. Med. Chem.*, 1, 569-590, 2001.

-Curhan, G. C., Willett, W. C., Speizer, F. E., Stampfer, M. J., Beverage use and risk for kidney stones in women. *Ann. Intern. Med.* **128**, 534-540, 1998.

-Czochanska Z., Foo L.Y., Porter L.J., *Phytochemistry*, 18, 1818-1822, 1979.

-Čanadanović-Brunet, J.M., Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1997.

-da Silva J.M.R., Cheynier V., Rigaud J., Cheminat A., Moutounet M., *Phytochemistry*, 30, 1259, 1991.

-Damiani, P., Masse, H.H., L'alcoolisme en chiffres, La documentation française édit., 1 vol., Paris, 1986.

-Darne G. Glories Y., *Vitis*, 27, 71, 1988.

-Darne G., These de Doctorat es Sciences, Univesity de Bordeaux I, 1991.

-Dallas, C., Laureano, O., Effect of SO<sub>2</sub> on the extraction of individual anthocyanins and coloured matter of three Portuguese grape varieties during winemaking, *Vitis* 33, 41-47, 1994.

-Dallas J.M., Ricardo da Silva O., Laureano O., *J. Sci. Food Agric.*, 70, 493-500, 1996.

- Dicey, M. The Effect of Cold Maceration With and Without Sulphur Dioxide on Pinot Noir Wine, M. Appl. Sci. Thesis, Lincoln University, New Zealand, 1996.
- Doll R., An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer, *Proceeding of Nutrition and Society*, 49, 119-131, 1990.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., Robinson, S. P., Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust J. Grape Wine Res.* 9, 15–27, 2003.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., Robinson, S. P., Synthesis of flavonoids and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera L.*), *Aust J. Grape Wine Res.*, 9, 110-121, 2003.
- Džamić, M., Osnovi biohemije II, Beograd, 1978.
- Đorđević, V., Pavlović, D., Kocić, G., Biohemija slobodnih radikala, Medicinski fakultet, Niš, 2000.
- Edeas M., Lindenbaum A., Protective effects of various flavonoids compounds on HIV infection, XXV Congres Mondial de la Vigne et du vin. Wine and Health, 57-61, 2001.
- Eglinton, J., Henschike, P., Hoj, P., Pretorius, I., Winemaking properties and potential of *Saccharomyces bayanus* wine yeast-harnessing the untapped potential of yeast biodiversity, *Aust. N.Z. Wine Ind. J.*18(6), 16-19, 2003.
- Eglinton, J., Griesser, M., Henschke, P.A., Kwiatowski, M.j., Parker, M., Herderich, M., Yeast-mediated formation of pigmented polymers in red wine. Waterhouse, A.L.; Kenndey, J.A. (eds.), Red wine color:Revealing the mysteries, *ACS Symposium Series 886*, Oxford University Press, 7-21, 2004.
- Ewart, A., Gawel, R., Managing the complexity of Pinot noir. *Aust. Grapegrow. Winemaker* 352, 115-118, 1993.
- Faustino S.R., Clark A.T., Sobrattee S., Czubryl P.M., Pierce N.G., Differential antioxidant properties of red wines in water soluble and lipid soluble peroxy radical generating systems, *Molecular and cellular biochemistry*, 263, 211-215, 2004.
- Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A., Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(3), 1035-1040, 1999.
- Fulcrand H., Benabdeljalil J., Rigaud V., Cheyner M., Moutounet, *Phytochemistry*, 47, 1401-1407, 1998.
- Frankel E.N., Waterhouse A.L., Teissedre P.L., Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 890-894, 1995.

- Fraser-Bell, S., Wu, J., Klein, R., Azen, S. P., Varma, R., Smoking, alcohol intake, estrogen use, and age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. *Am. J. Ophthalmol.* **141**, 79–87, 2006.
- de Freitas V., These de Doctorat Enologie Ampelologie, Universite de Boredeaux II, 1995.
- Fuleki T., Ricardo da Silva J.M., Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario, *Journal of agricultural & food chemistry*, 45, 1156-1160, 1997.
- de Galulejac N.S., Glories Y., Vivas N., Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines, *Food Research International*, 32(5), 327-333, 1999.
- de Galulejac N.S., Vivas N., Glories Y., *Rev. Franc. Oenol.*, 173, 22-25, 1998.
- Galvin C., These de dostorat Enologie-Ampelologie, Universite de Bordeaux II, 1993.
- Gatellier, P., Anton, M., Renerre, M., Lipid Peroxidation Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Activated Metmyoglobin and Detection of a Myoglobin-Derived Radical, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 651 - 656, 1995.
- Gavinnet-Jeannin C., Groult N., Godeau G., Roberti A.M.R., *Congres Internationale d'Angiologie*, Toulouse, 17-26, 1988.
- Goldber D.M., Yan J., Ng E., Diamandis E.P., Karumanchiri A., Soleas G., Waterhouse A.L., A global survey of *trans*-resveratrol concentrations in comercial wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 159-165, 1995.
- Glories Y., *Bull. de Liaison Groupe Polyphenols*, 9, 129, 1980.
- Glories Y., Ribereau-Gayon P., Ribereau-Gayon J., *CR Acad. Agric.*, 623, 1981.
- Glories Y., *Connaiss. Vigne Vin*, 8, 375-393, 1974.
- Ghiselli A., Nardini M., Baldi A., Scaccini C., Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(2), 361-367, 1998.
- Glories Y., *La couleur des vins rouges*, 2 Partie: Mesure, origine et interpretation, *Conn. Vigne Vin.*, 18(4), 253-273, 1984.
- Gu X., Chu Q., o'Dwyer M., Zeece M., Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis, *J. Chrom.A.*, 881, 471-481, 2000.
- German J.B., Frankel E.N., Waterhouse A.L., Hansen R.J., Walzem R.L., Wine phenolics and targets of chronic disease. In: Watkins T.R., ed. *Wine: Nutritional and therapeutic benefits*, Washington DS, ASC, 196-214, 1997.

- Gey K., The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms, *Biochemical Society Transaction*, 18, 1041-1045, 1990.
- Girotti, A.W., Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *JLR*, 39, 1529 - 1542, 1998.
- Hagerman A.E., Butler R.G., *Journal of Biological Chemistry*, 9, 4494-4497, 1981.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Lipid peroxidation: a radical chain reaction, U: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Eds., Oxford, Clarendon Press, pp. 189 - 193, 1985.
- Halliwell, B., How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Res. Commun.*, 9, 1 - 32, 1990.
- Halliwell, B., Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end, *Free Radical Research*, 31, 261 - 272, 1999.
- Halliwell, B., Whiteman, M., Measuring reactive species and oxidative damage in vivo in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br. J. Pharmacol.* 142, 231-255, 2004.
- Hayasaka, Y., Waters, E. J., Cheynier, V., Herderich, M. J., and Vidal, S., Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 17, 9-16, 2003.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *J. Nutr. Biochem.*, 13, 572 - 584, 2002.
- Henn T., Stehle P., Total phenolics and antioxidant activity of commercial wines, teas and fruit juices, *Ernahrungs-Umchau*, 45(9), 308-313, 1998.
- Hiramoto, K., Ojima, N., Sako, K-I., Kikugawa, K., Effect of Plant Phenolics on the formation of the Spin-Adduct of Hydroxyl Radical and the DNA Strand Breaking by Hydroxyl Radical, *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 4, 558-563, 1996.
- Hollman P.C.H., Hertog M.G.L., Katan M.B., Analysis and health effects of flavonoids, *Food Chem.*, 57, 43-46, 1996.
- Hosseini, F., Antioxidant properties of flaxseed lignans using in vitro model systems, A Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, 2006.
- Hertog MGL., Kromhout D., Aravanis C., Blackburn H., Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study, *Arch. Intern. Med.*, 155, 381-386, 1995.

-Hudson, B.J.F., Lewis J.L., Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils, Structural criteria for activity, *Food Chem.*, 10, 47 - 55, 1983.

-Hung, L.M.; Su, M.J., Chu, W.K., Chiao, C.W., Chan, W.F., Chen, J.K.; The protective effect of resveratrol on ischaemia.reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy, *Br. J. Pharmacol.*, 135, 1627-1633, 2002.

-Jackson S.J., Wine science-principles and applications, Third edition, Academic press, 2008.

-Jang M., Cai L., Udeani O.G., Slowing K., Thomas F.C., Beecher W.W.C., Fong H.S.H., Farnsworth R.N., Douglas Kinghorn A., Mehta G.R., Moon C.R., Pezzuto M.J., Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes, *Science*, 275, 218-220, 1997.

-Jazić Lj., Ružić N., *Praktikum za tehnologiju vina*, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 40-41, 1982.

-Jeandet P., Bessis R., Maume B.F., Sbaghi M., Analysis of resveratrol in Burgundy wines, *J. Wine Res.*, 4(2), 79-85, 1993.

-Jeandet P., Bessis R., Maume B.F., Meunier P., Peyron D., Trollat P., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 316, 1995.

-Jović S., Bukvić B., Characteristics of colored substances in red wines considering their age, *Review of Research Work at the Faculty of Agriculture*, 39 (1), 79-86, 1994.

-Jović, S., Zirojević T., Petrović, A., Fenolna jedinjenja vina i mogućnost prevencije bolesti prouzrokovane oksidativnim stresom, *Zbornik radova VI savetovanje proizvođača alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta*, 55 – 60, Vrnjačka Banja, 2002.

-Kanofsky, J.R., Hooglandli, H., Weverl, R., Weissll, S.J., Singlet Oxygen Production by Human Eosinphils, *Biol. Chem.*, 263, 9692 - 9696, 1988.

-Kantz K., Singleton V.L., Isolation and determination of polymeric polyphenols using sephandex LH-20 and analysis of grape tissue extracts, *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 223-228, 1990.

-Kantz K., Singleton V.L., Isolation and determination of polymeric polyphenols in wines using sephandex LH-20, *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 309-315, 1991.

-Karakaya S., El N.S., Tas A.A., Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds, *Internationa journal of food science and nutrition*, 52, 501-508, 2001.

-Katalinić, V., Grape catechins-natural antioxidants, *Journal of Wine research*, 10, 15-23, 1999.

-Keli, S. O., Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., and Kromhout, D., Dietary flavonoids, antioxidant vitamins and the incidence of stroke: the Zutphen Study. *Arch. Intern. Med.* **154**, 637–642, 1994.

-Kennedy N.P., Tipton K.F., Ethanol metabolism and alcoholic liver disease, *Essay. Biochem.*, 25, 137-195, u: Zoecklein W.B., Fugelsang C.K., Gump H.B., Nury S.F., Wine analysis and production, Chapman & Hall, 1995.

-Kennedy, J.A., Jones, G.P., Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol, *Journal of Agricultural & Food chemistry*, 49, 1740-1746, 2001.

-Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening, *Phytochemistry*, 55, 77-85, 2000.

-Kerry N.L., Abbey M., Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro, *Atherosclerosis*, 135(1), 93-102, 1997.

-Kimura Y., Okuda H., Arichi S., Effect of stilbens on arachidonate metabolism in leukocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 834, 275-278, 1985.

-Knowles, R.G., Moncada, S., Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem. J.*, 298, 249 - 258, 1994.

-Kovač V., Pekić B., Proantocijanidoli grožđa i vina, *Savremena poljoprivreda*, 39 (4), 5-17, 1991.

-Kovač V., Alonso E., Revilla E., The Effects of Adding Supplementary Seeds During fermentation on the Phenolic Composition of Wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, 46 (3), 363-367, 1995.

-Kovač V., Alonso E., Bourzeix M., Revilla E., Effect of Several Enological Practices on the Content of Catechins and Proanthocyanidins of Red Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (10), 1953-1957, 1992.

-Kovač V., Uticaj načina vinifikacije na sastav i organoleptičke osobine crnih vina u Vojvodini, *Zbornik Privredne komore Vojvodine*, XXII, 299-314, 1980.

-Kovač V., *Bull. OIV*, 52, 560-572, 1979.

-Kondo K., Kurihara M., Miyata N., Suzuki T., Toyoda M., Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 362(1), 79-86, 1999.

-Konowalchuk J., Speirs J.I., Virus inactivation by grapes and wines, *Applied and Environmental Microbiology*, 6, 757-763, 1976.

- Kow, Y.W., Oxidative Stress, DNA Damage and Human Diseases, *Dojindo Newsletters*, 2, 1999.
- Kliever W.M., *American Journal of Enology and Viticulture*, 23, 71-77, 1972.
- Kurechi, T., Aizawa, N., Kunugi, A., Studies of the antioxidants, Oxidation products of TBHQ, *JAOCs*, **60**, 1878-1882, 1983.
- Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J. M., and Moutounet, M., Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2719–2723, 1999.
- Langcake P., *Physiology Plant Pathology*, 18, 213, 1981.
- Lamuela-Reventos R.M., Romero-Perez A.I., Waterhouse A.L., Tore-Bornonat M.C., Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*- resveratrol and piceid isomers in Soanish red *Vitis vinifera* wines, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 281-283, 1995.
- Lamuela-Reventos R.M., Waterhouse A.L., Occurrence of Resveratrol in selected California wines by a new HPLC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(4), 521-523, 1993.
- Laparra J., Michaud J., Masquelier J., 11, No special, 133-142, 1977.
- Laparra J., Michaud J., Masquelier J., *J. Pharm de Bordeaux*, 1-2, 7-13, 1979.
- Lea A.G.H., Bridle P., Timberlake C., Singleton V.L., *American Journal of Enology and Viticulture*, 4, 289-300, 1979.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B., Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals, *CRFSFS*, 3, 21 - 33, 2004.
- Liu Q.S., Pilone J.G., An Overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications, *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 49-61, 2000.
- Liu, R.H., Finley, J., Potential Cell Culture Models for Antioxidant Research, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4311 - 4314, 2005.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J., *Fruit Phenolics*, CRC press: Boca Raton, Fl., 1990.
- Malešević, Z., Ispitivanje antioksidativne aktivnosti čajeva elektron spin rezonantnom spektroskopijom, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2002.
- Mandic, I.A.; Đilas M.S.; Četković. S.G.; Čanadanović-Brunet, M.J.; Tumbas, T.V. Polyphenolic Composition and Antioxidant Activities of Grape Seed Extract, *International Journal of Food Properties*, 11(4), 713-726, 2008.

-Mandić, A., Antioksidativna svojstva ekstraktata semena sorti belog grožđa, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2007.

-Manzanares P., Rojas V., Genoves S., Valles S., A preliminary search for anthocyanin- $\beta$ -D-glucosidase activity in non-Saccharomyces wine yeast, *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 95-103, 2000.

-Masquelier J., Michaud J., Laparra J., Dumon M.C., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 118, 95-108, 1979.

-Masquelier J., Verone, 147-155, 1982.

-Masquelier, J., Effets physiologiques du vin. Sa part dans l'alcoolisme. *Bull. O.I.V.* **61**, 555-577, 1988.

-Masquelier J., Le vigne, plante Medicinale. Naissance et essor d'une therapeutique, *Bull de l OIV*, 733-734, 177-196, 1992.

-Masquelier J., Rencontre Intern. *De Coursan*, 88-93, 1989.

-Masquelier J., Dumon M.C., Dumas J., *Acta Therapeutica*, 7, 101-105, 1981.

-Masquelier J., *Dietetique et Medecine*, 14, 141-145, 1985.

-Masquelier J., Michaud J., 104<sup>e</sup> Congres National des societes savantes, Bordeaux Sciences, Fasc II, 447-457, 1979.

-Mateus, N., Oliveira, J., Haettich-Motto, M., de Freitas, V., New family of bluish pyranoanthocyanins. *J. Biomed. Biotechnol.* **5**, 299-305, 2004.

-Maxwell S., Cruickshank, A., Thorpe G., Red wine and antioxidant activity in serum, *Lancet*, 344, 193-194, 1994.

-McDonald, M.S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M.E.J., Matthews, D., Crozier, A., Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 368-375, 1998.

-Mennet R.H., Nakayama T.O.M., The Adsorption of Hydroksibenzoic Acids by Poly-N-Vinyl Pyrrolidinone, *American Journal of Enology and Viticulture*, 20, 169-175, 1969.

-Melzoch K., Hanzlikova I., Filip V., Buckiova D., Šmidrkal J., Resveratrol in Parts of Vine and Wine Originating from Bohemina and Moravian Vineyard Regions, *Agriculturale Conspectus Scientificus*, 66(1), 53-57, 2001.

-Melzoch K., Hanzlikova I., Filip V., Buckiova D., Šmidrkal J., Resveratrol in Parts of Wine Originating from Bohemian and Moravian Vineyard Regions, *Agriculture Conspectus Scientificus*, 66 (1), 53-57, 2001.

-Merida, J., Moyano, L., Millan, C., Medina, M.,: Extraction of phenolic compounds in controlled macerations of Pedro Ximenez grapes, *Vitis* 30:117-127, 1991.



-Meyer J., Hernandez R., Seed tannin extraction in Cabernet sauvignon, *American Journal of Enology and Viticulture*, 21, 184-188, 1970.

-Meyer A.S., Heinonen M., Frankel E.N., Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation, *Food Chemistry*, 61,71-75, 1998.

-Meyer, A.S., Yi, O.S., Pearson, D.A., Waterhouse, A.L., Frankel, E.N., Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*), *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1638-1643, 1997.

-Mimić-Oka, J., Simić, D.V., Simić, T.P., Free radicals in cardiovascular diseases, *Facta Univ.*, Series: Medicine and Biology, 6, 11 - 22, 1999.

-Minussi C.R., Rossi M., Bologna L., Cordi L., Rotilio D., Patore M.G., Duran N., Phenolic compounds and total antioxidant potential of comercial wiens, *Food chemistry*, 82, 409-416, 2003.

-Mgbonyeby O.P., Russo J., Russo I.H., Antiproliferative effect of syntetic resveratrol on human breast epithelial cells, *International Journal of Oncology*, 12, 865-869, 1998.

-Morata, A., Gomez-Cordovez, C., Suarez, J., Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls of *Saccharomyces* during the fermentation of red wines, XXIX Congres mondial de la vigne et du vin, Viena, 2004.

-Muselik J., Garcia-Alonso M., Martin-Lopez P.M., Žemlička M., Rivas-Gonzalo C.J., Measurement of antioxidant activity of wine catechins, procyanidins, anthocyanins and pyroanthocyanins, *Int. J. Mol. Sci.*, 8, 797-809, 2007.

-Ohara, Y., Peterson, T.E., Harrison, D.G., Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production, *Clin. Investig.*, 91, 2546 - 2551, 1993.

-Olas, B., Wachowicz, B., Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets, *Thromb. Res.* 106, 143-148, 2002.

-Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, J.M., Gomez, E., Fernandez, P., The possible implication of trans.resveratrola in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption, *Mol. Pharmacol.*, 61, 294-302, 2002.

-Oszmianski, J., Romeyer, F.M., Sapis, J.C., Macheix, J.J., Grape seed phenolics: Extraction as affected by some conditions occuring during wine processing. *Am. J. Enol. Vitic*, 37, 7-12, 1986.

-Paganga G., AlHashim H., Khodr H., Scott B.C., et al., Mechanisms of antioxidant activites of quercetin and catechin, *Redox Report*, 2, 359-364, 1996.

-Pascale U., Jean-Pierre S., Marie-Carmen M., Nicolas F., Fouraste I., Nepveu F., ESR antioxidative activity of phenolic acids and esters, *2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, 1998.

-Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., and Mattivi, F. (2003) The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett.* **544**, 210–213.

-Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., and Mattivi, F. (2005) Fast access of some grape pigments to the brain. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7029–7034.

-Peckert R.C., Small C.J., *Phytochemistry* 19, 2571, 1980.

-Pezet R., Cuenat Ph., Resveratrol in wine: Extraction From Skin During Fermentation and Post-fermentation Standing of Must from Gamay Grapes, *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(3), 287, 1996.

-Pellegrini N., Simonetti P., Claudio G., Brighenti F., Pietta P., Polyphenol content and total antioxidant activity of red wines processed by carbonic maceration, *2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, 1998.

-Pellegrini N., Simonetti P., Gardana C., Brenna O., Brighenti F., Pietta P., Polyphenol content and total antioxidant activity of *Vini Novelli* (young red wines), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 732-735, 2000.

-Percival, M., Antioxidants, Clinical nutrition insights, *Advanced Nutrition Publications, Inc.*, pp. 1 - 4, 1996.

-Pietta, P.G., Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, 63, 1035 - 1042, 2000.

-Piletić, M.V., Milić, B.Lj., Đilas, S.M., *Organska hemija II deo*, Prometej, Novi Sad, 1993.

-Piljac J., Martinez S., Valek L., Stipčević T., Kovačević-Ganić K., A Comparison of Methods to Define the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Croatian Wines, *Food Technology and Biotechnology*, 43(3), 271-276, 2005.

-Pocock, K. F., Sefton, M. A., and Williams, P. J., Taste thresholds of phenolic extracts of French and American oakwood: The influence of oak phenols on wine flavor. *Am. J. Enol. Vitic.* **45**, 429–434, 1994.

-Pokorny, J., Introduction, U: Antioxidants in Food, Practical applications, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England, pp. 22 - 70, 2001.

-Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M., Watson, B.T., Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine, *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 187-194, 1995.

-Puig P., Poliphenols du vin et Atherome. Vin et Sante. Compterendu du Colloque, 20-28, 1993.

-Puškaš V., Kovač V., Dodić J., Dodić S., Effect of fermentation conditions on content of phenolic compounds in red wine, *Acta Periodica Technologica*, 36, 61-69, 2005.

-Puškaš V., Ružić N., Uticaj temperature čuvanja na stabilnost boje crnih vina, Zbornik radova V savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta, 183 – 190, Vrnjačka Banja, 2000.

-Radić I., Puškaš V., Uticaj sredstava za bistrenje na boju crnih vina, Zbornik radova sa VI savetovanja industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta, Vrnjačka banja, 119-122, 2002.

-Recueil des methodes internationales d analyse des vins et des mouts, OIV, 155 - 166; 274 - 278, 1990.

-Revilla, E., Alonso, E., Burzeix, M., Heredia, N., Dosage des catechins et des proanthocyanidols dans les vins, *Bull. O.I.V.*, F.V. 829, 1991.

-Revilla E., Alonso E., Kovač V., The Content of catechins and Procyanidins in Grapes and wines as Affected by Agroecological Factors and Technological Practices, *American Chemical Society*, 69-80, 1997.

-Revilla E., Ryan J.M., Kovač V., Nemanic J., The effect of the addition of supplementary seeds and skins during fermentation on the chemical and sensory characteristics of red wines, Food Flavors: Formation, *Analysis and Packaging Influences*, 583-596, 1998.

-Revilla E., Alonso E., Bourzeix M., Kovač V., Extractability of catechins and proanthocyanidins of grape seeds. Technological consequences, *Food Science and Human Nutrition*, 437-450, 1992.

-Revilla E., Kovač V., Alonso E., Treatment of wines with clays and clay minerals . Effects of their phenolic composition, 4<sup>th</sup> International Symposium "Innovations in Wine Technology, Stuttgart, Killesberg, 1995.

-Revilla E., Kovač V., Alonso E., In: Proceedings 4<sup>th</sup> International Symposium "Innovations in Wine Technology, Stuttgart, 132-141, 1995.

-Revilla E., Alonso E., In: Food Flavours, Ingredients and Composition, Charalambous G., Ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 455-468, 1993.

-Renaud S., de Lorgeril M., Alcohol, platelets and the french paradox for coronary heart disease, *Lancet*, 339, 1523-1526, 1992.

- Ribereau-Gayon P., Les composes phenoliques des vegetaux, X Congres mondial de la Vigne et du Vin, Madrid, 254-263, 1968.
- Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Vinification en rouge. In: Traite d'Oenologie, Sciences et Techniques du Vin, Tom 3, Dunod (ed.), 151-255, Paris, 1976.
- Ribereau-Gayon P., C.R. *Acad. Sciences*, 260, 341, 1965.
- Ribereau-Gayon P., Les Composes Phenoliques du Raisin et du Vin, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1964.
- Ribereau-Gayon P., Resherches sur les Anthocyanes des vegetaux, Lib. Generale de l'Enseignement, Paris, 1959.
- Ribereau-Gayon P., in: Anthocyanins as Food Colours, Markakis (ed), Academic Press, New York, 209-224, 1982.
- Ribereau-Gayon P., Sudraud P., Milhe J.C., Canbas A., *Conn. Vigne Vin*, 2, 133, 1970.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Phenolics in grapes and wines. In: *Proceedings of the 6th Australian Wine Industry Technical Conference* (T. Lee, ed.), pp. 247-256. Australian Industrial Publishers, Adelaide, Australia, 1987.
- Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A., Handbook of Enology, Vol. 1, John Wiley & sons LTD, New York, 1999.
- Ribereau-Gayon P., The Anthocyanins of Grapes and Wines, In Anthocyanins as Food Colors, Markakis P. Ed, Academic Press, New York, 209-244, 1982.
- Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Ribereau-Gayon P., Sudraud P., Science et techniques du vina, Tom 4, Dunod Paris, 1977.
- Ribereau-Gayon P., Stonestreet E., *Chimie Anal.*, 48(4), 188, 1966.
- Ribereau-Gayon J, Peynaud E., Ribereau-Gayon P., Sudraud P., Sciences et techniques du vin, tom 3, Paris, 1971.
- Ribereau-Gayon P., Stonestreet E., Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 9, 2649, 1965.
- Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., Handbook of Enology vol 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, John Wiley & sons LTD, New York, 1999.
- Ricardo da Silva M.J., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S., Oxigen Fre Radical Scavenger Capacity in Aqueous Models of Differebt Procyanidins from Grape Seeds, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1549-1552, 1991.

- Ricardo da Silva J.M., Rigault J., Cheminat A., Moutounet M., Procyanidin dimers and trimers from grape seeds, *Phytochemistry*, 30, 1259-1264, 1991.
- Ricardo da Silva J.M., Cheynier V., Effect of pomace contact, carbonic maceration, and hyperoxidation on the procyanidin composition of Grenache blanc Wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 168-172, 1993.
- Ricardo da Silva J.M., Anthocyanins and proanthocyanidins in grape and wines. Their primordial role in enology. In: Proceedings of the First Symposium in *Vino Analytica Scientia*, 101-113, Bordeaux, 1997.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933-956, 1996.
- Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., de Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P., Van Zanden, J.J., Van der Woude, H., Alink, G.M., Koeman, J.H., The prooxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 11, 321 - 333, 2002.
- Rivas-Gonzalo C.J., Gutierrez Y., Hebrero E., Santos-Buelga C., Comparisons of methods for the determination of anthocyanins in red wines, *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 2, 210 - 214, 1992.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chem.* 66, 401-436, 1999.
- Robinson, J.P., Babcock, G.F., Oxygen and Nitrogen Reactive Metabolites and Phagocytic Cells, *Phagocyte Function: A Guide for Research and Clinical Evaluation* Purdue University, West Lafayette, Indiana, 1998.
- Rodopulo A.K., *Osnovi biohimii vinodelija*, 1983, Moskva.
- Romeyer F.M., Macheix J.J., Sapis J.C., *Phytochemistry*, 25, 219-221, 1986.
- Romero, C., Bakker, J., Interactions between grape anthocyanins composition and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model systems, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3130-3139, 1999.
- Ros Barceló A., Calderón A.A., Zapata J.M., Muñoz R., *Scientia Horticulturae*, 57, 265, 1994.
- Sanchez-Moreno C., Larrauti J.A., Saura-Calixto F., Free radical scavenging of selected red, rose and white wines, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(10), 1301-1304, 1999a.

-Sanchez-Moreno C., Larrauti J.A., Saura-Calixto F., Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, *Food Research International*, 32(6), 407-412, 1999b.

-Sanchez-Moreno, C., Satue-Gracia, M.T., Frankel, E.N., Antioxidant activity of selected Spanish wines in corn oil emulsions, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 5581-5587, 2000.

-Sanchez-Moreno, C., Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems, Review: Free Radical Scavenging Activity in Foods, *Food Sci., Tech. Int.*, 8, 121 - 137, 2002.

-Sanchez-Moreno C., Cao G., Ou B., Prior R.L., Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity. Comparison with nontraditional wines obtained from high bush blueberry, *J. Agric. Food Chem*, 51, 4889-9, 2003.

-Sato M., Ramarathnam N., Suzuki Y., Ohkubo T., Takeuchi M., Ochi H., Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44(1), 37-41, 1996.

-Savatović M.S., Antioksidativna i antiproliferativna aktivnost ekstraktata tropa jabuka, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2007.

-Simonetti, P., Pietta, P., Testolin, G., Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 1152-1155, 1997.

-Simonetti, P., Gardana, C., Pietta, P., Plasma levels of caffeic acid and antioxidant status after red wine intake. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5964–5968, 2001.

-Singleton V.L., Esau P., Phenolic Substances in Grapes and Wines, and Their Significance, Academic Press, New York, 1969.

-Singleton V.L., Tannins and the qualities of wines. In: Plant Polyphenols Synthesis, Properties, Significance. R.W. Hemingway and P.E. Laks (Eds.), 859-880, Plenum Press, New York, 1992.

-Singleton V.L., Draper D.E., The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, 15, 34-40, 1964.

-Singleton V.L., Esau P., Phenolic Substances in Grapes and Wines, and Their Significance, Academic Press, New York, 1969.

- Singleton, V. L., Trousdale, E., Anthocyanin–tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 63–70, 1992.
- Singleton V.L., Orhofer R., Lamuela-Raventos R.M., Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178, 1999.
- Soleas G.J., Goldberg D.M., Diamandis E.P., Karumanchiri A., Yan J., Ng E., A derivatized gas chromatographic-mass spectrophotometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 346-352, 1995.
- Soleas G.J., Tomlinson G., Goldberg, M.D., Kinetics of polyphenol Release into Wine Must During Fermentation of Different Cultivars, *Journal of Wine Research*, vol. 9 (1), 27 - 41, 1998.
- Soleas G.J., Dam J., CXarey M., Goldberg D.M., Toward the fingerprinting of wines: cultivar-related patterns of polyphenolic constituents in Ontario wines, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45(10), 3871-3880, 1997.
- Soleas, G. J., Yan, J., and Goldberg, D. M., Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **757**, 161–172, 2001.
- Somers, T.C., *Journal of Science Food Agric.*, 30, 623-633, 1979.
- Somers, T. C., Wescombe, L. F., Red wine quality, the critical role of SO<sub>2</sub> during vinification and conservation. *Aust. Grapegrower Winemaker* **220**, 1–7, 1982.
- Somers, T.C., Westcombe, L.G., Evolution of red wines II. An assessment of the role of acetaldehyde, *Vitis*, 26, 27-36, 1987.
- Souquet J.M., Cheynier V., Brossaud F., Moutounet M., *Phytochemistry*, 43, 509, 1996.
- Spayd, S. E., Tarara, J.M., Mee, D.I., Ferguson, J.C., Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries, *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 171-182, 2002.
- Sun B.S., Pinto T., Leandro M.C., Ricardo da Silva J.M., Spranger M.I., Transfer of Catechins and Proanthocyanidins from Solid Parts of the Grape Cluster Into Wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(2), 179-184, 1999.

-Sudraud, P., Etude experimental de la vinification en rouge, *These Docteur-Ingenier*, Faculte des Sciences de Bordeaux, 1963.

-St Leger, A.S., Cochrane, A.L., Moore, F., *The lancet*, 1017-1020, 1979.

-Scudomore-Smith P.D., Hooper R.J., Mc Laren E.D., Colour and Phenolic Changes of Cabernet sauvignon Wine Made by Simultaneous yeast/bacterial Fermentation and Extended Pomace Contact, *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 57-67, 1990.

-Schwarz, M., Wabnitz, T. C., Winterhalter, P., Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3682–3687, 2003.

-Stanković S., Živković J., Ranković V., Mošić I., Tarailo R., Uticaj bentonita i želatina na bojene materije crnog vina, *Poljoprivreda*, 390-393, 270-277, 2002.

-Stanković-Opšenić S., Uticaj načina vinifikacije i stabilizacije na karakteristike boje crvenih vina, Doktorska disertacija, Novi Sad, 2005.

-STATISTICA 8.0 (2009), StatSoft, Univerzitetska licenca, Univerzitet u Novom Sadu

-Stratford, M., Morgan, P., Rose, A.H., Sulphur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces ludwigii*, *J. Gen. Microbio.* 133, 2173-2179, 1987.

-Shang, J.X., Yao, G., Ge, P.J., Sun, Y., Teng, H.W., Huang, F.Y., Procyanidin induces apoptosis and necrosis of prostate cancer cell line PC-3 in a mitochondrion-dependent manner, *Journal of andrology*, 30(2), 2009.

-Shan C.W., Effects polydatin on platelet aggregation of rabbits, *Yaoxue Xuebao*, 23, 394-396, 1988.

-Shankar, S., Siddiqui, I., Srivastava, R.K., Molecular mechanisms of resveratrol (3,4,5-trihydroxy-trans-stilbene) and its interaction with TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in androgen-insensitive prostate cancer cells, *Mol. Cell Biochem.*, 304, 273-285, 2007.

-Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., Introducing natural antioxidants, U: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England, pp. 22 - 70, 2001.

-Stivala, L.A., Savio, M., Carafoli, F., Perruca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, U.M., Albini, A., Prosperi, E., Vannini, V., Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol, *J. Biol. Chem.*, 276, 22586-22594, 2001.



- Taha, M.R.; Khalil, I.E.; Majdi, A. Al-M.; Khalid, I.; Al-Gutha, H.; Yang, W. Total Phenolics, Antioxidant Activities, and Anthocyanins of Different Grape Seed Cultivars Grown in Jordan, *International Journal of Food Properties*, 11(2), 472-479, 2008.
- Teissedre, P.L., Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Peleg, H., German, J.B., Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wines, *J. Sci. Food Agric.*, 70, 55-61, 1996.
- Thompson R.S., Jacques D., Haslam E., Tanner R.J.N., *J. Chem. Soc. Perkins Trans. Part I*, 1387, 1972.
- Timberlake C.F., Bridle P., Interaction between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance red wines, *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 97 - 105, 1976.
- Touzani, A., Muna, J.P., Doneche, B., *Journal Internationale Science Vigne et Vin*, 28 (1),19, 1994.
- Tsai su C.T., Singleton V.L., *Phytochem.*, 8, 1553-1558, 1969.
- Uchida S., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Nonaka G.I., Nishioka I., Niwa M., Ozaki M., *Med. Sci. Res.*, 15, 831-832, 1987.
- Urizzi P., Monje M.C., Souchard J.P., Abella A., Chalas J., Lindenbaum A., Vergnes L., Labidalle S., Nepveu F., Antioxidant activity of phenolic acids and esters present in red wine on human low-density lipoproteins, *J. Chim. Phys. Chim. Biol.*, 96,110-115, 1999.
- Ursini, F., Tubaro, F., Rong, J., Sevanin, A., Optimisation of nutrition: Polyphenols and vaskular protection, *Nutr. Rev.*, 58(8), 241-249, 1999.
- Ushida S., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Nonaka G.I., Nishioka I., Niwa M., Ozaki M., *Med Sci Res.*, 15, 831-832, 1987.
- Valls-Belles V., Muniz P., Gonzales P., Gonzales-Sanjose M.L., Beltran S., Mechanism of protection by epicatechin against tert-butylhydroperoxide induced oxidative cell injury in isolated rat hepatocytes and calf thymus DNA, *Press Biochemistry*, 37(6), 659-664, 2002.
- Vasserot Y., Caillet J.B., Maujean A., Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of some Physicochemical Parametrs, *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 433-437, 1997.
- Vaya, J., Aviram, M., Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications, *Curr. Med. Chem. - Imm., Endoc. & Metab. Agents*, 1, 99 - 117, 2001.

- Venketaramana, V., Talauea, M.T., Dayarama, Y.K., Peteroy-Kellye, M.A., Bud, W., Connella, N.D., Nitric oxide regulation of L-arginine uptake in murine and human macrophages, *Tuberculosis*, 83, 583 - 606, 2003.
- Vinas P., Lopez-erroz C., Marin-Hernandez J.J., Hernandez-Cordoba M., Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection, *J. Chrom. A.*, 872, 85-93, 2000.
- Vivas N., Glories Y., *Rev. Fr. Enol.*, 33, 142, 33, 1993.
- Vivas N., Glories Y., Role of Oak Wood Ellagitannins in the Oxidation Process of Red wines During Aging, *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 103, 1996.
- Vivas N., Degaulejac N., Glories Y., Influence of SO<sub>2</sub> and ascorbic acid on the scavenger effect of tannins measured on superoxide anion. Application to red wines, *Vitis*, 36, 91-96, 1997.
- Vivas N., Glories Y., Role of Oak Wood Ellagitannins in the Oxidation Process of Red Wines During Aging, *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 103 - 107, 1996.
- Voyatzis I., These de Doctorat, Œnologie-Ampélogie, Université de Bordeaux II, 1984., u Ribereau-Gayon P, Glories Y., Maujean A., Dubourdiou D., Handbook of Enology, Vol. 2, str. 171, 1998.
- Wallerath, T., Li, H., Godtel-Ambrust, U., Schwarz, P. M., and Forstermann, U., A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric Oxide* 12, 97–104, 2005.
- Wang, Z., Huang, Y., Zou, J., Cao, K., Xu, Y., Wu, J.M., Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro, *Int. J. Mol. Med*, 9, 77-79, 2002.
- Wang, H., Race, E.J., Shrikhande, A.J., Anthocyanin transformation in Cabernet sauvignon wine during aging, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7989-7994, 2003.
- Weinges k., Kalenhauser W., Marx H.D., Nader E., Nader F., Perner J., Seler D., Liebigs *Ann. Chem.*, 711, 184, 1968.
- Wilson, B., Bitterness and astringency: studies into phenolic extraction during winemaking. Aust. Grapegrow, *Winemaker* 352, 121-122, 1993.
- World healt statistics annual for 1970 (codes A82, A83,A85, A93 and, AE138).
- Wu, D., Cederbaum, A.I., Alcohol, oxidative stress, and free radical damage, *Alcohol Res., Health*, 27, 277 - 284, 2003.
- Wulf, L.W., Nagel, C.W., Am. J. Enol. Vitic., 29, 42, 1978.

-Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials, *Ann. Sci.*, 17, 599-604, 2001.

-Yanishlieva-Maslarova, N.V., Inhibiting oxidation, U: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England, pp. 22 - 70, 2001.

-Yokotsuka K., Michikatsu S., Noboru U., Singelton V.L., Colour and Sensory Characteristics of Merlot Red Wines Caused by Prolonged Pomace Contact, *Journal of Wine Research*, 11 (1), 7-18, 2000.

-Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Begley, D. J., Rice-Evans, C. A., and Abbott, N. J., Flavonoid permeability across an *in situ* model of the blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 592-604, 2004.

-Yoncheva, T., Spasov, H., Popova, J., Breeding of yeast for production of red wines, II Balkan symposium of viticulture and enology, 232-236, 2004.

-Zirojević, T., Jović S., Čeleketić D., Petrović A., Slobodni radikali i njihov biološki značaj, *Zbornik radova VI savetaovanje industrije alkoholnih i bezalkolnih pića i sirćeta*, Vrnjačka Banja, 45-54, 2002.

-Zoecklin B., Bentonite fining of juice and wine, Virginia Cooperative extension Publication, 463-014, 1-8, 1988.

-Zoecklein, B., An overview of maceration during red winemaking. *Australian & N.Z. Wine Industry Journal*, 6:265-267, 1991.

-Zhou, K., Yin, J.J., Yu, L.L., ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals, *Food Chem.* 95, 446-457, 2006.

Univerzitet u Novom Sadu  
Tehnološki fakultet  
Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Vladimir Puškaš
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Slobodan Jović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd
Naslov rada: NR	Uticaj tehnoloških faktora u proizvodnji crvenih vina na sadržaj i stabilnost katehinai njihovih oligomera
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp./eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2010.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1.
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 6; stranica: 143 ; slika: 43; tabela: 34; reference: 306
Naučna oblast: NO	Biotehnologija
Naučna disciplina: ND	Tehnologija vina
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	crveno vino, šepurina, semenke, maceracija, fenolna jedinjenja, slobodni radikali, antiradikalna aktivnost, ESR spektroskopija
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar Cara Lazara 1
Važna napomena:	nema

VN	
Izvod IZ	<p>Fenolna jedinjenja su zaslužna za osnovna senzorna svojstva srvenih vina, pre svega boju i trpkost. Superoksid (<math>O_2^{\cdot-}</math>) i hidroksil radikali (<math>\cdot OH</math>) izazivaju ozbiljna oštećenja tkiva degradaciju proteina, nerastvornih lipida, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina. U ovom radu ispitan je uticaj tehničko-tehnoloških uslova proizvodnje i odnosa čvrste i tečne faze u kljuku, na boju vina, sadržaj fenolnih jedinjenja i antioksidativni potencijal. Izmena odnosa čvrste i tečne faze u kljuku vršena je vraćanjem jednog dela ili celokupne količine šepurine i povećavanjem sadržaja semenki dodavanjem 100, 200 i 300 % semenki u odnosu na prirodni sadržaj. Stabilnost boje, sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala ispitivana je pre i nakon tretmana vina sa dva organska i dva neorganska sredstva za bistrenje i stabilizaciju. Utvrđeno je da povećanje sadržaja semenki u kljuku pojačava antioksidativno delovanje vina. U vinu Cabernet sauvignon utvrđena je viša vrednost antiradikalske aktivnosti prema DPPH radikalima (<math>AA_{(DPPH\cdot)}</math>), koja se nije promenila pod delovanjem sredstava za bistrenje i stabilizaciju vina. Vino Merlot ispoljilo je veću antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale (<math>AA_{(\cdot OH)}</math>).</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	17.07.2006.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime/titula/zvanje/naziv organizacije/status) KO	<p>Predsednik: Gordana Četković/dr/redovni profesor/Tehnološki fakultet u Novom Sadu/ Član: Slobodan Jović/dr/redovni Profesor/Poljoprivredni fakultet Zemun/ Član: Nada Korać/dr/ redovni Profesor/Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu</p>

University of Novi Sad  
Faculty of Technology  
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Vladimir Puškaš
Mentor: MN	Dr Slobodan Jović, Faculty of Agriculture, Zemun-Belgrade
Title: TI	
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Eng./serb.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2010.
Publisher: PU	Autor's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1.
Physical description: PD	Chapters: 6; pages: 143 ; figures: 43; tebles: 34; references: 306
Scientific field: SF	Biotechnology
Scientific discipline: SD	Wine technology
Subjest, Key words: SKW	Red wine, stem, seed, maceration, must, phenolics, antioxidant activity
UC	
Holding data: HD	Faculty of Technology (library) Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
Note: N	none
Abstract: AB	Phenolic compounds are responsible for basic sensory properties of red wines,

	<p>primarily color and astringency. Superoxide (<math>O_2^{\cdot-}</math>) and hydroxyl radicals (<math>\cdot OH</math>) causes serious damage to the tissue degradation of proteins, insolubility lipids, carbohydrates and nucleic acids. The paper examined the impact of technical and technological conditions of production and relations of liquid and solid phases in pomase on the color of wine, phenolic compounds content and antioxidant potential. Changing relations between solid and liquid phases in pomase carried out the return of a part, or the whole amount of stem and increasing seeds content adding +100, +200 and +300 % of seeds. Color stability, phenolic compounds content and antioxidative potential was examined before and after treatment of wine with two organic and two inorganic agents for fining and stabilization. It was found that increasing the seeds content in pomase increases antioxidative action of wines. In the wine Cabernet Sauvignon was found higher value antiradical activity to DPPH radicals (<math>AA_{(DPPH\cdot)}</math>), which are not changed under the fining action and stabilization of wine. Merlot wine exhibited a higher antioxidant potential of the hydroxyl radicals (<math>AA_{(\cdot OH)}</math>).</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	17.07.2006.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: Gordana Četković/dr/ Professor/Faculty of technology, Novi Sad Member: Slobodan Jović/dr/ professor/Faculty of agriculture, Zemun Member: Nada Korać/dr/ professor/ Faculty of agriculture, Novi Sad</p>