

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

mr Aleksandra N. Radovanović

**KARAKTERIZACIJA I KORELACIJA
BIOAKTIVNIH FENOLNIH JEDINJENJA
CRVENIH VINA BALKANA I
NJIHOVA ANTIOKSIDACIONA I
ANTIMIKROBNA SVOJSTVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

mr Aleksandra N. Radovanović

**CHARACTERIZATION AND
CORRELATION OF BIOACTIVE
PHENOLIC COMPOUNDS OF RED WINES
FROM THE BALKANS AND THEIR
ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL
PROPERTIES**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2014

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Mentor

dr Branimi Jovančičević, redovni profesor, Hemijski fakultet univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. dr Vele Tešević, vanredni profesor, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. dr Goran Roglić, vanredni profesor, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. dr Vlatka Vajs, naučni savetnik IHTM u Beogradu

Zahvalnice

Koristim priliku da se mentoru prof. dr Branimiru Jovančičević iskreno zahvalim na korisnim savetima i podršci pri izradi ovog rada.

Srdačno se zahvaljujem i dr Jean Marc Souquet iz Instituta INRA (Monpellier, Francuska) na stručnoj pomoći u toku izrade ove disertacije.

Zahvaljujem kolegama sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu za pomoć pri izradi eksperimentalnog dela ove disertacije u njihovoj instituciji.

Zahvaljujem se članovima komisije: prof. Dr Veletu Tešević, prof dr Goranu Roglić i naučnom savetniku dr Vlatki Vajs na savetima za konačnu verziju ovog rada.

Rezime

U radu su prikazani rezultati ispitivanja fenolnog sastava, antioksidacione i antimikrobne aktivnosti crvenih vina, dobijenih iz vinogradarskih i vinskih rejona Balkana (Bosne i Hercegovine, Hrvatske, Srbije, Crne Gore, Makedonije i Bugarske), proizvedenih u periodu od 2007 do 2011 godine od različitih proizvođača. Izabrana su crvena vina od internacionalnih: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Frankovka i Game i autohtonih *Vitis vinifera* sorti grožđa: Vranac i Kratošija. Ispitivanje fenolnog sastava izvršeno je spektroskopskim metodama i HPLC-om. Na taj način identifikovani su jedanaest fenolnih kiselina (galna, vanilinska, siringinska, hlorogenska, elagilna, *trans*-kaftarna, *trans*-kutarna, *trans*-kafena, *p*-kumarna i ferulna kiselina) određivani DAD detektorom na 280 i 320 nm, *trans*-resveratrol na 320 nm i dvadeset i devet flavonoidna jedinjenja ((+)-katehin, procijanidin B₂, (-)-epikatehin, (-)-epigalokatehingalat, kvercetin-3-glikozid, rutin, miricetin, morin, kvercetin, kemferol, luteolin, apigenin i naringin) određivani na 360 nm i 275/322 nm sa fluorescentnim detektorom i kao veoma značajna flavonoidna grupa antocijani (malvidin-3-glikozid, peonidin-3-glikozid, delphinidin-3-glikozid, cijanidin-3-glikozid i petunidin-3-glikozid, njihovi 3-acetilglikozidi i *p*-kumaroilglikozidi derivati, kao i Vitisin A i malvidin-3-vinilfenolglikozid) na 520 nm. Rezultati ispitivanja svih analiziranih uzoraka vina ukazuju da fenolni sadržaji zavise od više faktora (sorte grožđa, mesta položaja vinograda, agrohemijjskih uslova, vremena i godine berbe grožđa, primenjene tehnologije proizvodnje, načina čuvanja, skladištenja, starenja vina itd). HPLC analiza je pokazala da je najdominantnija fenolna kiselina galna kiselina (65,06 - 88,75% od ukupnih fenolnih kiselina), a od flavonoida najdominantniji su: (+)-katehin (55,30 - 83,13% od ukupnih flavan-3-ola), kvercetin-3-glikozid (57,58 - 60% od ukupnih flavonola) i malvidin-3-glikozid sa njegovim acetil- i *p*-kumaroil derivatima (86,47 - 100% od ukupnih antocijana). Ispitivani uzorci vina pokazuju antioksidativno delovanje na DPPH radikale u opsegu EC₅₀ vrednosti od 47,17 do 145,83 mL/g ili u procentima od 69,55 do 91,83%. Korelacionom analizom je utvrđeno da postoji dobra korelacija (0,6912 - 0,8595) između antioksidativne aktivnosti vina i spektroskopskih, odnosno HPLC detektovanih koncentracija nekih fenolnih jedinjenja (galne kiseline, (+)-katehina, kvercetin-3-glikozida i *trans*-resveratrola). Antioksidaciona aktivnosti vina je analizirana i novom redoks metodom, upotrebom bakar (II)-1,10-fenatrolina kao oksidanta. Dobijeni rezultati su

u saglasnosti sa rezultatima dobijenim DPPH metodom (0,9775 - 0,9776). Antimikrobna aktivnost izabranih uzoraka vina je ispitivana disk-difuzionom i mikrodilucionom metodom u odnosu na šest *Gram*-pozitivnih i šest *Gram*-negativnih bakterija, i kvascu *Candida albicans*. Dobijeni rezultati za minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) i minimalnu bakterijsku koncentraciju (MBC) daju sledeći redosled vina: Cabernet Sauvignon > Vranac > Merlot > Pinot Noir ~ Frankovka ~ Višesortna Župska vina. Ispitivana vina pokazuju antimikrobnu aktivnost u odnosu na *gram*-pozitivne bakterije na sledeći način: *Clostridium perfringens* > *Bacillus subtilis* ~ *Listeria monocytogenes* ~ *Sarcina lutea* > *Staphylococcus aureus* ~ *Micrococcus flavus*. Antimikrobna aktivnost protiv *gram*-negativnih bakterija je sledeća: *Proteus vulgaris* > *Pseudomonas aeruginosa* ~ *Salmonella enteritidis* > *Klebsiella pneumonia* > *Shigella sonnei*. Inhibiciona zona delovanja Cabernet Sauvignon vina pokazuju inhibiciju do 20,0 mm za *Escherichia coli* i 19,0 mm za *Bacillus subtilis*, što je uporedljivo sa inhibicionom zonom standardnih antibiotika (16,0 – 35,0 mm) i nekih fenolnih jedinjenja (14,5 – 21,8 mm). Korelacionom analizom je potvrđeno da postoji dobra korelacija između antimikrobnog delovanja prema *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* i nađenih koncentracija za (+)-katehina (0,6625 - 0,7433) i ukupnih fenolnih kiselina (0,5121 - 0,7333). Urađena analiza antioksidacione i antimikrobne aktivnosti ispitivanih crvenih vina je pokazala da se najbolje korelacije uspostavljaju sa ukupnom koncentracijom detektovanih flavonoida, pa se može zaključiti da je biohemijsko delovanje crvenih vina, posledica sinergističkog delovanja većeg broja biološkoaktivnih komponenata. Dobijeni rezultati bi dali mogućnost za proizvodnju kvalitetnih crvenih vina sa povećanim fenolnim sadržajem, koji bi uz bolji marketing bili konkurentni na svetskom tržištu.

Ključne reči: crvena vina, Balkanski region, fenolna jedinjenja, spektroskopska i HPLC analiza, antioksidacioni kapacitet, antimikrobna aktivnost, korelacije.

Naučna oblast: primenjena hemija

Uža naučna oblast: hemija životne sredine

UDK broj: (663.21+634.85): (547.562+543.9) (497)

Abstract

This paper presents the results of analyzes of the phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of red wines, obtained from wine-growing and wine regions of the Balkans (Bosnia and Herzegovina, Croatia, Serbia, Montenegro, Macedonia and Bulgaria), and produced from 2007 to 2011 from different wineries. The selected red wines were international: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Frankovka and Gamay, and indigenous *Vitis vinifera* grape varieties: Vranac and Kratošija. Investigation of the phenolic composition is carried out by spectroscopic methods, and HPLC. In this way, we have identified eleven phenolic acids (gallic, vanillic, syringic, chlorogenic, ellagic, *trans*-caftaric, *trans*-coutaric, *trans*-caffeic, *p*-coumaric and ferulic acid) with DAD detector at 280 and 320 nm, *trans*-resveratrol at 320 nm, and the twenty-nine flavonoid compounds ((+)-catechin, procyanidins B2, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin gallate, quercetin-3-glycoside, rutin, myricetin, morin, quercetin, kaempferol, luteolin, apigenin and naringin) determined at 360 nm with DAD and at 275/322 nm with a fluorescence detector. As significant flavonoid group anthocyanins (malvidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside and petunidin-3-glucoside and their 3-acetyl glucoside and *p*-coumaroyl glucoside derivatives, as well as Vitisin A and malvidin-3-glucoside-4-vinylphenol) were detected at 520 nm. The results of the analyzed wine samples indicate that the phenolic content depends on several factors (grape variety, place of vineyard, agrochemical conditions, time and year of harvest, the applied production technology, methods of preservation, storage, aging wines, etc). HPLC analysis showed that the dominant phenolic acid is gallic acid (65.06 to 88.75% of the total phenolic acids), and the most dominant of flavonoids are: (+)-catechin (55.30 to 83.13% of the total flavan-3-ols), quercetin-3-glycoside (57.58 to 60% of the total flavonols) and malvidin-3-glucoside of its acetyl- and *p*-coumaroyl glucoside derivatives (86.47 to 100% of the total anthocyanins). The investigated samples of wines show antioxidant activity in the DPPH radicals in the range of EC₅₀ values of 47.17 to 145.83 mL/g and a percentage of 69.55 to 91.83%. Correlation analysis showed that there is a good correlation (0.6912 to 0.8595) between the antioxidant activity of wines and spectroscopic, or HPLC detected concentrations of some phenolic compounds (gallic acid, (+)-catechin, quercetin-3-glycoside and *trans* – resveratrol). Antioxidant activity of wines is determinate with a new redox method,

using copper (II) -1,10-phenanthroline as oxidant. The obtained results are in accordance with the results obtained by DPPH method (0.9775 to 0.9776). The antimicrobial activities of selected wine samples were studied using the disk-diffusion and micro-dilution method, according to the six *Gram*-positive and six *Gram*-negative bacteria and the yeast *Candida albicans*, too. The results of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial concentration (MBC) give the following order of wines: Cabernet Sauvignon > Vranac > Merlot > Pinot Noir ~ Frankovka ~ Blends from Župa. All tested wines showed antimicrobial activity against *Gram*-positive bacteria, as follows: *Clostridium perfringens* > *Bacillus subtilis* ~ *Listeria monocytogenes* ~ *Sarcina lutea* > *Staphylococcus aureus* ~ *Micrococcus flavus*. Antimicrobial activity against *Gram*-negative bacteria is as follows: *Proteus vulgaris* > *Pseudomonas aeruginosa* ~ *Salmonella enteritidis* > *Klebsiella pneumonia* > *Shigella sonnei*. The inhibition zone in which the Cabernet Sauvignon wines show inhibition to 20.0 mm for *Escherichia coli* and 19.0 mm for *Bacillus subtilis*, which is comparable to the standard antibiotic inhibitory zone (16.0 to 35.0 mm), and some of the phenolic compounds (14, 5 to 21.8 mm). Correlation analysis has confirmed that there is a good correlation between the antimicrobial activity towards *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* and the results for the concentrations of (+)-catechin (0.6625 to 0.7433) and total phenolic acids (0.5121 to 0.7333). The analysis of antioxidant and antimicrobial activities of the tested red wines showed that the best correlation is made with the total concentration of flavonoids detected, and it can be concluded that the biochemical activity of red wines is connected with the synergetic action of a number of biologically active components. The results gives the possibility to produce high-quality red wines with high phenolic content, which along with better marketing would be competitive in the world market.

Key words: red wines, the Balkans, phenolic compounds, spectroscopic and HPLC analysis, antioxidant capacity, antimicrobial activity, correlations.

Scientific area: Applied Chemistry

Scientific sub-area: Environmental Chemistry

UDC number. (663.21+634.85): (547.562+543.9) (497)

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
2	OPŠTI DEO.....	3
2.1	Crvena vina Balkana.....	3
2.2	Fenolna jedinjenja u vinu.....	5
2.2.1	Faktori koji utiču na kvalitet vina i sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu.....	5
2.2.1.1	Uticaj klimatskih i agroekoloških faktora na sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu.....	6
2.2.1.2	Uticaj tehnološkog postupka vinifikacije na sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu.....	7
2.2.2	Klasifikacija fenolnih jedinjenja.....	8
2.2.2.1	Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture.....	9
2.2.2.2	Flavonoidi.....	11
2.2.2.3	Flavoni, flavanoni i flavonoli.....	14
2.2.2.4	Antocijani.....	16
2.3	Biološka aktivnost vina.....	18
2.3.1	Antioksidaciona aktivnost vina.....	19
2.3.2	Antimikrobna aktivnost vina.....	21
3	EKSPERIMENTALNI DEO.....	23
3.1	Materijal i aparatura.....	23
3.1.1	Hemikalije.....	23
3.1.2	Bakterijske kulture.....	23
3.1.3	Uzorci crvenih vina.....	24
3.1.4	Aparatura.....	26
3.2	Metode.....	27
3.2.1	UV/Vis spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u uzorcima crvenih vina.....	27
3.2.2	HPLC određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja u uzorcima crvenih vina.....	28
3.2.3	Spektrofotometrijsko određivanje antiradikalne aktivnosti uzoraka crvenih vina.....	30

3.2.4	Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacione aktivnosti uzoraka crvenih vina ..	32
3.2.5	Određivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka crvenih vina	33
3.2.5.1	Disk-difuziona metoda	33
3.2.5.2	Mikro-diluciona metoda	34
3.3	Statistička obrada podataka	35
4	REZULTATI I DISKUSIJA	36
4.1	Analiza uzoraka Cabernet Sauvignon vina iz različitih vinogradarskih i vinskih regiona Balkana	36
4.1.1	Spektroskopska analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima Cabernet Sauvignon vina	37
4.1.2	HPLC analiza neflavonoidnih jedinjenja u uzorcima Cabernet Sauvignon vina	41
4.1.2.1	HPLC analiza fenolnih kiselina u uzorcima Cabernet Sauvignon vina	41
4.1.2.2	HPLC analiza <i>trans</i> -resveratrola u uzorcima Cabernet Sauvignon vina	50
4.1.3	HPLC analiza flavonoidnih jedinjenja u uzorcima Cabernet Sauvignon vina	51
4.1.3.1	Flavan-3-oli u analiziranim uzorcima Cabernet Sauvignon vina	52
4.1.3.2	Flavonoli, flavoni i flavanoni u uzorcima Cabernet Sauvignon vina	56
4.1.3.3	HPLC analiza antocijana u uzorcima Cabernet Sauvignon vina	65
4.2	Analiza uzoraka Vranac vina iz različitih vinogradarskih i vinskih regiona Balkana	73
4.2.1	Spektroskopska analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima Vranac vina	73
4.2.2	HPLC analiza neflavonoidnih jedinjenja u uzorcima Vranac vina	77
4.2.2.1	HPLC analiza fenolnih kiselina u uzorcima Vranac vina	78
4.2.2.2	HPLC analiza <i>trans</i> -resveratrola u uzorcima Vranac vina	86
4.2.3	HPLC analiza flavonoidnih jedinjenja u uzorcima Vranac vina	87
4.2.3.1	Flavan-3-oli u analiziranim Vranac vinima	88
4.2.3.2	Flavonoli, flavoni i flavanoni u Vranac vinima	92
4.2.3.3	HPLC analiza antocijana u Vranac vinima	99
4.3	Analiza uzoraka ostalih jednosortnih crvenih vina iz Srbije i Makedonije	106
4.3.1	Spektroskopska analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima jednosortnih crvenih vina ..	106

4.3.2	HPLC analiza neflavonoidnih jedinjenja u uzorcima jednosortnih crvenih vina	110
4.3.2.1	HPLC analiza fenolnih kiselina u uzorcima jednosortnih crvenih vina	110
4.3.2.2	HPLC analiza <i>trans</i> -resveratrola u uzorcima jednosortnih crvenih vina	116
4.3.3	HPLC analiza flavonoidnih jedinjenja u jednosortnim crvenim vinima.....	117
4.3.3.1	Flavan-3-oli u izabranim jednosortnim crvenim vinima	117
4.3.3.2	Flavonoli, flavoni i flavanoni u jednosortnim crvenim vinima	119
4.3.3.3	HPLC analiza antocijana u izabranim jednosortnim crvenim vinima	124
4.4	Analiza uzoraka višesortnih crvenih vina iz Župskog vinogradarskog i vinskog rejona	128
4.4.1	Spektroskopska analiza različitih grupa fenolnih jedinjenja u uzorcima višesortnih Župskih crvenih vina.....	128
4.4.2	HPLC analiza neflavonoidnih jedinjenja u izabranim uzorcima višesortnih Župskih crvenih vina.....	131
4.4.2.1	HPLC analiza fenolnih kiselina u višesortnim Župskim crvenim vinima	131
4.4.2.2	HPLC analiza <i>trans</i> -resveratrola u višesortnim Župskim crvenim vinima	136
4.4.3	HPLC analiza flavonoidnih jedinjenja u izabranim uzorcima višesortnih Župskih crvenih vina	137
4.4.3.1	Flavan-3-oli u višesortnim Župskim crvenim vinima.....	137
4.4.3.2	Flavonoli, flavoni i flavanoni u uzoraka višesortnih Župskih crvenih vina	139
4.4.3.3	HPLC analiza antocijana u uzoraka višesortnih Župskih crvenih vina	144
4.5	Antioksidaciona aktivnost i njena korelacija sa sadržajem fenolnih jedinjenja u izabranim uzorcima crvenih vina Balkana	147
4.5.1	Antioksidaciona aktivnost određena DPPH slobodnoradikalnom metodom i njena korelacija sa sadržajem fenolnih jedinjenja u izabranim uzorcima crvenih vina.....	148
4.5.2	Antioksidaciona aktivnost određena Cu(II)-1,10-fenantrolin-skom redoks reakcijom i njena korelacija sa sadržajem fenolnih jedinjenja u izabranim uzorcima crvenih vina	160
4.6	Antimikrobna aktivnost i njena korelacija sa sadržajem fenolnih jedinjenja u izabranim uzorcima crvenih vina Balkana	163
5	ZAKLJUČAK	177
6	LITERATURA	186

1 UVOD

Poznato je, još iz vremena pre Hrista, da vino ima pozitivan uticaj na zdrastveno stanje ljudi. Tragovi o pravljenju i korišćenju vina pronađeni su u Egiptu i Kini, još od prvog veka pre Hrista. Mnogi narodi smatrali su vino Božjim darom i koristili ga u religioznim ceremonijama. U grčkoj mitologiji poznat je i Bog vina, Dionis, a Platon vino je definisao kao „najlepši i najčistiji napitak“.

Prvi dokaz o korišćenju ekstrakata grožđa za lečenje kardiovaskularnih oboljenja (pre 2000 godina) je indijski biljni preparat, čiji glavni sastojak predstavlja grožđe, *Vitis vinifera L.* Zanimanje za supstance prisutne u vinu postoji oduvek, ali početkom XX veka je primetno poraslo, jer su istraživanja Svetske Zdrastvene Organizacije koja su obuhvatila preko 1 000 000 stanovnika iz 18 razvijenih zemalja ukazala na potencijalnu povezanost između konzumiranja crvenog vina i smanjenja pre svega kardiovaskularnih bolesti (Bertelli, 2007; Renaud i de Lorgeril, 1992). Tada je primećeno smanjenje rizika od nastanka i razvoja pojedinih bolesti pri redovnom umerenom unošenju vina. Luis Paster je rekao da je vino „najhigijenskije piće“ koje doprinosi boljem zdrastvenom stanju ljudi.

Ova istraživanja ukazala su na potrebu da se ustanovi koje su komponente vina koje daju takvu biološku moć. Zna se da vino, kao proizvod biljnog porekla, sadrži veliki broj različitih jedinjenja, od kojih neka utiču na njegova senzorna svojstva (ukus, boju, aromu), dok određena grupa poseduje biološka svojstva i pozitivno utiču na pojedine funkcije u organizmu. U ovoj grupi spadaju jedinjenja fenolnog tipa (flavonoida i fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture). Još od prošlog veka je poznato da fenolna jedinjenja nemaju nutritivni značaj, ali pomažu u očuvanju ljudskog organizma zbog visokog antioksidativnog potencijala [Hertog i sar. 1995]. Različita istraživanja su dokazala da fenolna jedinjenja pozitivno deluju na krvne sudove, štite od štetnog sunčevog i radioaktivnog zračenja, deluju antioksidativno, antiinflamatorno, antimikrobno i antikancerogeno [Bravo, 1998; Gey, 1999; Daglia i sar., 2007; Gry i sar., 1998; Hou, 2003; Macheix i Fleuriet, 1998; Radovanović i sar., 2008; Renaud i de Lorgeril, 1992; Rice-Evans i sar., 1995; Soleas i sar, 2002; Wang i sar., 1997]. Oksidativna moć fenolnih jedinjenja prisutnih u grožđu, a samim tim i u

vinu, je dvadeset puta veća nego vitamina E i pedeset puta veća nego vitamina C [Van Asker i sar., 1996].

Crvena vina su bogata fenolnim jedinjenjima koja se iz čvrstih delova grožđa (pokožici, pulpi i semenke) ekstrajuhu u fazi maceracije. Sadržaj i odnos fenolnih jedinjenja u vinu zavisi od više faktora, pre svega od sorte vinove loze, stepena zrelosti grožđa, klimatskih i drugih agroekoloških uslova regiona tzv. terroir efekat (zemljište, temperaturne razlike, primenjene agrotehničke mere), primenjenog tehnološkog postupka vinifikacije (pH, sumpor (IV) oksid, etanol, udeo čvrtse faze u kljuku), uslova čuvanja i odležavanja vina [Alcalde-Eon i sar, 2006; Connor i sar., 2005; Daynes i Williams, 2012; [Jones i sar., 2005; Singleton i sar., 1965].

S obzirom da su grožđe i vino značajan izvor biološki aktivnih fenolnih jedinjenja, izučavanje crvenih vina sa naših prostora, Balkanskog vinogradarskog i vinskog regiona je značajno sa više aspekata. Zbog toga je cilj ovog rada bio da se ispita fenolni sastav vina sa poznatim geografskim poreklom i uspostave korelacije između koncentracija fenolnih komponenata prisutnih u vinima sa njihovim antioksidativnim i antimikrobnim kapacitetom. Dobijeni rezultati bi dali mogućnost za proizvodnju kvalitetnih crvenih vina sa povećanim fenolnim sadržajem, koji bi uz bolji marketinga bili konkurentni na svetskom tržištu.

2 OPŠTI DEO

2.1 Crvena vina Balkana

Propisi regulišu klasifikaciju, pa i prodaju vina u mnogim regionima sveta. U Evropskoj uniji postoji tendencija da se klasificiraju po regionima (napr. Bordeaux, Rioja), dok van-Evropska vina imaju klasifikaciju po sortama grožđa (napr. Pinot Noir, Merlot). Međutim, u zadnje vreme dobar marketing nekih vinskih regiona u svetu je doveo do povećavanja njihove popularnosti i tržišnog priznavanja.

Sama kategorizacija vinskih regiona vrši se na osnovu opštih karakteristika klime tog područja u toku vegetacije. Najveći deo vrhunskih vina svetske proizvodnje pripadaju Mediteranskom (napr., Tuscany), primorskom (napr. Bordeaux) ili kontinentalnom (napr., Columbia Dolina) klimatskom regionu koji se nalaze između 30. i 50. paralele na severnoj i južnoj hemisferi (Srbija zauzima položaj između 41^o i 46^o severne geografske širine).

Terroir regiona je interaktivni ekosistem određenog lokaliteta koji uključuje klimatske promene, tip zemljišta, biljke i uticaj čoveka, ima ključnu ulogu u kvalitetu grožđa i vina [Deloire i sar., 2002, Jones, 2006]. Tako da upoređivanjem vinogradarskih regiona sveta može se uspostaviti veza između terroir-a i kvaliteta vina [Daynes i Williams, 2012]. Zrenje grožđa zavisi od temperature vazduha i prisutne vlage zemljišta. Kada je temperatura vazduha +27 °C započinju fiziološki procesi u vinovoj lozi i grožđe zri. Jedna od karakteristika koja dovodi do razlike između klimatskih vinskih regiona je dužina vremena potrebna da se dođe do ove optimalne temperature u toku zrenja. Osim temperature, druga karakteristika je količina padavina i potreba za dodatnim navodnjavanjem. Ostali klimatski faktori koji utiču na zrenje grožđa, kao što su: vetar, atmosferski pritisak i dnevne varijacije temperature, koje se razlikuju po klimatskim regionima [Jackson i Lombard, 1993].

Na osnovu heliotermičkih uslova, vinogradarski regioni Balkana imaju kontinentalnu klimu, sa vrućim i suvim letima, a hladnim i vlažnim zimama, koja omogućuje sazrevanje velikog broja sorti na nadmorskoj visini od 80 do 500 m. Ovi klimatski uslovi su veoma slični klimatskim uslovima u regionima Cotes du Rhone u

Francuskoj, Barolo i Chianti u Italiji, Porto i Vinho Verde u Portugaliji [Jones i sar., 2005].

Crvena vina Balkanskog regiona najčešće su od jedne ili više sorti Evropske vrste grožđa *Vitis vinifera*, kao što su: Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Merlot, Frankovka i Gamay, koji su mediteranskog porekla, kao i autohtone sorte grožđa: Vranac, Prokupac i Kratošija.

Na osnovi Zakona (Sl. glasnik RS”, br. 41/2009 i 93/2012) vinogradarski regioni su područja koja “se odlikuju sličnim ekološkim faktorima, izborom preporučenih sorti i ostalim neophodnim činiocima za uspešno gajenje vinove loze, što omogućava proizvodnju grožđa, šire, vina i drugih proizvoda karakterističnih po kvalitetu, prinosu grožđa i senzornim osobinama za taj region”.

Prema zvaničnim statističkim podacima u 2011 godini, Srbija ima 56 434 ha pod vinovom lozom od koje je proizvedeno 1 353 632 hL vina; Makedonija sa ukupnom površinom od 21 000 ha u 2009 godini je proizvela oko 900 000 hL; Hrvatska koja ima 58 000 ha vinograda ima proizvodnju vina od 1 270 000 hL; Bugarska sa 265 000 ha pod vinogradima u 2009 godini proizvela je 2 000 000 hL i Bosna i Hercegovina u 2010 godini je imala proizvodnju od 134 130 hL vina.



Slika 1. Vinogradarski i vinski rejoni sa mediteranskom klimom

2.2 Fenolna jedinjenja u vinu

Fenolna jedinjenja ili polifenoli su široko rasprostranjena grupa sekundarnih biljnih metabolita (više od 8000) koji se nalaze u mnogim biljkama (voću, povrću, žitaricama, lišću i cveću).

Sa hemijskog aspekta fenolna jedinjenja sadrže aromatični prsten sa hidroksilnim grupama koji mogu da budu donori protona i na taj način da se ponašaju kao antioksidanti tj. da "hvataju" slobodne radikale uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala.

2.2.1 Faktori koji utiču na kvalitet vina i sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu

Fenolna jedinjenja u vinu su veoma značajna, kako za kvalitet vina jer utiču na njihovu boju i senzorna svojstva, tako i za njihovo blagotvorno biološko dejstvo po ljudski organizam. Zbog toga potrebno je identifikovati faktore koji su odgovorni za različiti fenolni sadržaj vina [Anli i Vural, 2009; Arnous i sar., 2002; Carluccio i sar., 2003; [Fernandez-Pachon i sar., 2007; Kennedy i sar., 2000; Landroult i sar., 1999; Macheix i sar., 1990; Palma i Taylor 1999; Revilla i sar, 1997; Ribereau-Gayon i sar., 1988, 1999; Villano i sar., 2006].

Sadržaj i odnos fenolnih jedinjenja u vinu zavisi od više faktora, pre svega od sorte vinove loze, stepena zrelosti grožđa, klimatskih i drugih agroekoloških uslova regiona (zemljište, primenjenih agrotehničkih mera), kao i od primenjenog tehnološkog postupka vinifikacije, uslova čuvanja i zrenja vina [Alcalde-Eon i sar, 2006; Connor i sar., 2005; Singleton i sar., 1965].

2.2.1.1 Uticaj klimatskih i agroekoloških faktora na sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu

Obzirom na značaj klime za vinogradarstvo i kvalitet vina, Jones i sar. [2005, 2006] su ispitivali klimatološke parametre u 27 najvažnijih svetskih vinogradarskih regiona i potvrdili da varijacije temperature u vremenu sazrevanja grožđa utiču na prinos i kvalitet vina. Smatra se da temperatura (klima) regiona, reljef, ekspozicija, osvetljenost, UV zračenje, mineralna svojstva zemljišta i prisustvo vode igraju značajnu ulogu na sadržaj fenolnih jedinjenja u bobici grožđa u fazi sazrevanja.

Vinogorja u Mediteranskoj klimatskoj zoni u kojoj pripada i Balkanski region, imaju suhu i toplu klimu, koja omogućuje da tokom ciklusa rasta grožđa dođe do povećanja koncentracije polifenola u bobici grožđa tj u pokožici, koncentracije organskih kiselina, mineralnih materija, šećera i povećanju pH šire [Alcalde-Eon i sar., 2006; Gil-Munoy i sar., 2010; Downey i sar., 2003; Kennedy i sar., 2000; Lapidot i sar., 1999].

Sadržaj polifenola zavisi i od godine berbe, jer sušne godine, na primer dovode do smanjenja stilbena (resveratrola), kako što su pokazala istraživanja crvenih vina u periodu od 1996 do 2003 godine iz Villany regiona (Mađarska), dobijenih od više sorti grožđa [Pour Nikfardjam I sar., 2006].

Tip zemljišta, takođe ima ključnu ulogu na hemijske i senzorne osobine vina. Nagib, ekspozicija i nadmorska visina zemljišta, dostupnost vode variraju u zavisnosti lokaliteta istog regiona i utiču na sastav bobice i sazrevanje grožđa, a samim tim i na kvalitet vina [Bergqvist I sar. 2001; Crippen i Morrison, 1986; Falquera i sar., 2012].

U toku zrenja grožđa hemijski sastav fenolnih jedinjenja se menja, tako da sadržaj monomernih flavan-3-ola u semenkama se smanjuje za 90 %, sadržaj proantocijanidola se povećava do 60 %, a sadržaj flavonola može da se poveća i deset puta u zavisnosti od broja sunčanih dana u toku zrenja grožđa [Kennedy i sar., 2000].

Neki autori smatraju da u semenkama grožđa nalazi se oko 60 %, u pokožici od 15 do 20 % i u šepurini (ogrozdini) oko 20 % ukupnih fenolnih jedinjenja [Downey i sar. 2003].

Tradicionalan način određivanja tehnološke zrelosti grožđa (odnos šećer/kiseline) treba da se dopuni i određivanjem fenolne zrelosti grožđa (odnos fenolnih jedinjenja/bojene materije) koji omogućuje da se nađe maksimalni antioksidativni potencijal grožđa [de Galulejac i sar., 1999].

Određivanje tehnološke zrelosti ili fenolne zrelosti grožđa je jako bitno jer u toku sazrevanja grožđa povećavaju se koncentracije fenolnih komponenata, naročito koncentracija antocijana sve do pune zrelosti, a u fazi prezrelosti njihova koncentracija opada.

Ova pravilnost je utvrđena za većinu sorti grožđa, s tim što maksimalne koncentracije antocijana variraju u zavisnosti od klime i regiona [Gil-Munoy i sar., 2010; Harborne i Williams, 2001; Ribereau-Gayon i sar., vol. 1, 1999].

2.2.1.2 Uticaj tehnološkog postupka vinifikacije na sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu

U toku tehnološkog postupka vinifikacije, u fazi maceracije fenolna jedinjenja, zajedno sa drugim jedinjenjima kao što su: polisaharidi, azotna jedinjenja i mineralne materije, se ekstrahuju u zavisnosti od uslova i vremena trajanja maceracije.

Ekstrakcija fenolnih jedinjenja zavisi od više faktora, kao što su: odnos čvrste i tečne faze kljuka, intenzitet muljanja grožđa, temperatura, prisustva kiseonika, alkohola, sumpor (IV) oksida, kvasca, kao i od sredstava stabilizacije i bistrenja vina [Lapidot i sar. 1999; Ewart i sar., 1993; Merida i sar., 1991; Morata i sar., 2004; Soleas I sar., 1998; Yokotsuka, 2000; Revilla I sar, 1997, 1998; Wilson, 1993;].

Tako na primer, pokazalo se da povećana količina čvrste faze u kljuku, maceracijom čitavog grozda ili dodatkom semenki ili produženom maceracijom do 14 dana, dobijeno vino je bogatije sa (+)-katehinom i proantocijanidolima (B_1 i B_2) [Revilla i sar., 1997].

Neki autori smatraju da samo 20 do 30 % ukupnih fenolnih kiselina iz grožđa se ekstrahuju u vino u toku maceracije [Ribereau-Gayon, 1999].

Izbor kvasca u toku procesa vinifikacije može da utiče na koncentraciju nekih grupa fenolnih jedinjenja. Tako na primer, neki sojevi kvasaca imaju manji afinitet apsorpcije antocijana na ćelijske zidove, dovode do povećanja sadržaja flavan-3-ola

i monomernih antocijana i intenzivniju boju crvenih vina [Arnous i sar., 2002; Caridi i sar., 2004; Gil-Munoy i sar., 2010, De Galulejac i sar., 1999, McDonald i sar, 1998].

Tokom čuvanja tj starenja i zrenja vina dolazi do različitih strukturnih transformacija prisutnih fenolnih jedinjenja, preko različitih oksidacionih i kondenzacionih reakcija.

Pokazalo se da različiti metaboliti kvasca, kao što je piruvinska kiselina i acetaldehid u toku starenja vina mogu da reaguju sa različitim grupama fenolnih jedinjenja i dovedu do stvaranja stabilnih pigmenata Vitisin A i Vitisin B [Liu i sar., 2000; Luiz, 2011; Romero i Bakker, 1999].

Takođe, utvrđeno je da neka sredstva za bistrenje mladih vina sorti Cabernet Sauvignon i Frankovka, kao što je natrijum bentonit u višku u poređenju sa želatinom dovodi do 15 % smanjenja fenolnih jedinjenja (antocijana, katehina i dimere proantocijanidola) i na taj način do smanjenja intenziteta boje vina [Luiz 2011, Singleton i Trousdale, 1992].

Neke nove tehnike proizvodnje vina koje dovode do povećanja fenolnog sadržja vina uključuju: termovinifikaciju, produženu maceraciju, zaleđivanje šire ili dodatak semenke i peteljke grozda u kljuku [Luiz, 2011; Harborne i Williams, 2001].

Eksperimentalna istraživanja su pokazala da vina proizvedena sa povišenom temperaturom fermentacije (60⁰C, 30 min) imaju intenzivniju boju od proizvedenih standardnim postupkom, ali manji sadržaj monomernih antocijana u odnosu na polimernih [Gil-Munoy i sar., 2010; Lapidot i sar., 1999; Lila, 2004].

2.2.2 Klasifikacija fenolnih jedinjenja

Postoje veći broj klasifikacija fenolnih jedinjenja [German i Walzem, 2000; Grotewold, 2006; Havsteen, 2002; Klepacka i sar., 2011; Macheix i sar, 1990; Pereira i sar., 2009].

Na osnovu hemijske strukture predložene su:

- *fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture i*
- *flavonoidi.*

2.2.2.1 Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture

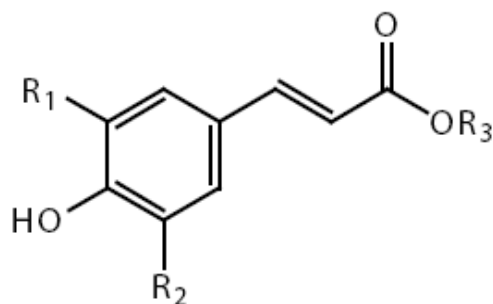
Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture su fenolne kiseline i stilbeni i sadrže C6-C1, C6-C3 ili C6-C2-C6 u osnovnom skeletu.

2.2.2.1.1 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su hidroksi i metoksi derivati benzoeve i cimetine kiseline. U grožđu i vinu od derivata benzoeve kiseline se nalaze: galna, p-hidroksibenzoeva, protokatehinska, vanilinska, siringitinska i elaginska kiselina. Od derivata cimetine kiseline prisutne su: trans-p-kumarna, trans-kafena, trans-ferulna i hlorogena kiselina, a u obliku estara cimetine i vinske kiseline prisutne su: trans-kaftarna, cis- i trans-kutarna, trans-fertarinska i sinapinska kiselina.

Fenolne kiseline u grožđu su prisutne u glukozidnoj formi, iz koje se mogu osloboditi kiselom hidrolizom i u obliku estara, iz koje se oslobađaju alkalnom hidrolizom. Estri vinske kiseline lako podležu oksidaciji i odgovorne su za brzo potamnjivanje šire [Tian i sar, 2009]. Hidroksicimetine kiseline su delimično zaslužne za boju crvenih vina jer njihovom oksidacijom nastaju žuto obojena jedinjenja.

Antioksidaciona aktivnost fenolnih kiselina zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa u benzenovom jezgru. Zbog toga se za galnu kiselinu, koja ima tri hidroksilne grupe smatra da je najbolji fenolni antioksidant. Najznačajnije biološko delovanje fenolnih kiselina je njihov uticaj na lipidnu peroksidaciju, zbog čega se mogu koristiti kao konzervansi i antiinflamatorni agensi [Bravo, 1998; Cushnie i Lamb, 2011; Meyer i sar, 1997; Tian i sar, 2009].



Hidroksicimetne kiseline	R₁	R₂	R₃
<i>p</i> -kumarna kiselina	H	H	OH
Kafena kiselina	OH	H	OH
Ferulna ferulna	OCH ₃	H	OH
Sinapinska kiselina	OCH ₃	OCH ₃	OH

Slika 2. Struktura hidroksicimetnih kiselina

2.2.2.1.2 Stilbeni

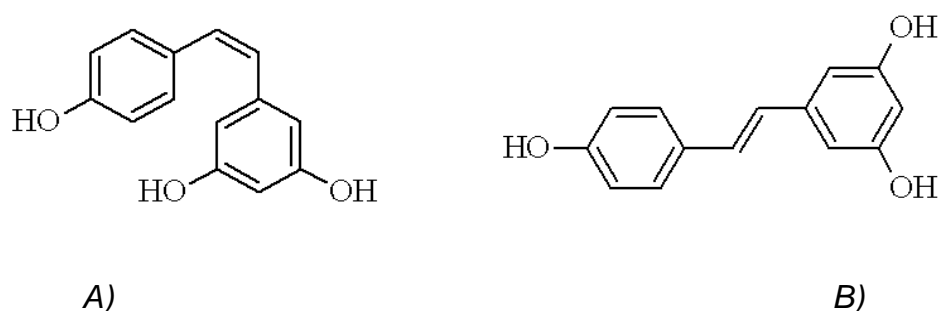
Stilbeni su fenolna jedinjenja kod kojih su dva aromatična jezgra premoštena etanskim ili etenskim mostom [Camont i sar, 2005]. U grupi stilbena pripadaju *cis*- i *trans*-resveratrol, *cis*- i *trans*-piceid, astringinin, astringin i viniferine. *trans*-Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) je najzastupljeniji predstavnik stilbena u vinama, sa dokazanim biološkim delovanjem [Baxter, 2008; Docherty i sar., 2001; Jenadet i sar., 1991; Mark i sar., 2005].

Resveratrol nastaje u grožđu kao odgovor na infekciju izazvanu plesnima ili abiotski stres pod 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 sr., 2000; Falquera i sar., 2012].

Dominantan je *trans*-izomer u slobodnom obliku ili u obliku glikozida, prisutan najviše u pokožici, zastupljen i u semenkama i šepurini u zavisnosti od sorte grožđa (Burns I sar., 2002; Melzoch I sar., 2001; Soleas i sar., 1995). Ekstrakcija

resveratrola je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom etanola tokom alkoholne fermentacije. Takođe, koncentracija resveratrola dvostruko je veća nakon jabučno-mlečne fermentacije (nakon 46 dana) jer aktivnošću jabučno-mlečnih bakterija oslobađa se iz glukozidnih formi.

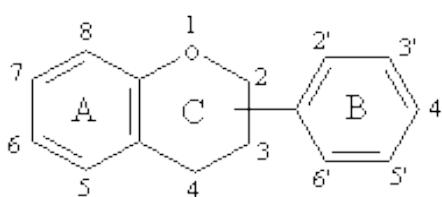
Veće koncentracije resveratrola su utvrđene u vinu Pinot Noir, poreklom iz Bordoja u poređenju sa ostalim crvenim vinima [Jeandet i sar., 1995].



Slika 3. cis-resveratrol (A) i trans-resveratrol (B) (3,5,4'-trihidroksistilben)

2.2.2.2 Flavonoidi

Flavonoidi (lat. flavus-žut) su velika grupa fenolnih jedinjenja koja imaju 15 C-atoma i sadrže dva benzenova jezgra međusobno povezana tročlanim ugljovodoničnim nizom. Struktura flavonoida se može predstaviti kao $C_6 - C_3 - C_6$ sistem sa slobodnim hidroksilnim grupama vezanim za aromatični prsten (Slika 5).



Slika 4. Struktura flavonoida

Zahvaljujući postojanju hromofora, flavonoidi pokazuju sposobnost apsorbovanja UV/VIS zračenja od 240 do 285 nm, kao posledica elektronskih prelaza u prstenu B (cinamoil sistem) i od 300 do 400 nm, kao rezultat $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronskih prelaza u prstenu A (benzoil sistem).

Podela flavonoida je izvršena na osnovu međusobne pozicije prstena B i C, oksidacionog stanja i funkcionalnih grupa prisutnih na prstenu C [Beecher, 2003]. Izoflavonoidi i neoflavonoidi se nazivaju abnormalni flavonoidi. U okviru svake klase pojedinačni flavonoidi se razlikuju prema hidroksilaciji i konjugaciji prstena. Raznovrsnost struktura flavonoida je posledica dodatne hidroksilacije, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata i najvažnije, glikolizacija hidroksilnih grupa (O-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (C-glikozida). U grožđu ova jedinjenja su prisutna najčešće u monoglikozidnoj formi, sa ostacima šećera na OH-grupi u poziciji C-3 na prstenu C.

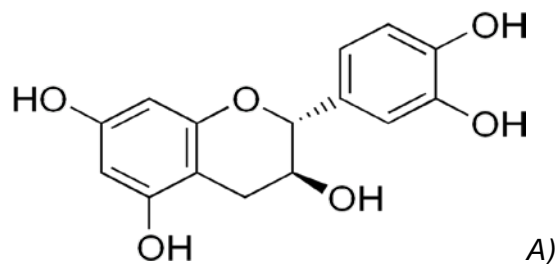
Brojna istraživanja su pokazala da su flavonoidi antioksidati, dobri hvatači slobodnih radikala, helatori metalnih jona i poseduju značajna biološka svojstva (antiinflamatorna, antialergijska, anticancerogena, antihipertenzivna i antimikrobna) [Bakker, 1999; Cliff i sar., 2007; Liu i sar., 2000; Gómez-Serranillos i sar., 2009; Gry i sar., 2007; De Beer i sar., 2003, 2005; Heinonen i sar., 1998; Fikselova i sar., 2010; Meiers i sar., 2001; Minussi i sar., 2004; Rice-Evans i sar., 1995; Rodriguez i sar., 2007; Sanchez-Moreno i sar., 1999; Sato i sar., 1996; Tarko i sar., 2008; Van Asker i sar., 1996; Yoshihito Sakata i sar., 2010; Youdim, 2002; Urqiaga i Leighton, 2000].

Iz ove grupe jedinjenja u crvenim vinima su najzastupljeniji flavan-3-oli, flavonoli i antocijanini.

2.2.2.2.1 Flavan-3-oli

Flavan-3-oli ili flavonoli (po IUPAC-ovoj nomenklaturi: 2-fenil-3,4-dihidro-2H-hromen-3-oli) najzastupljeniji su u pokožici grožđa, ali ima ih i u semenkama i ogrozdini u obliku monomera, dimera, oligomera i polimera. Oligomerne i polimerne forme se nazivaju proantocijanidini ili kondenzovani tanini. Najprisutniji u vinu su: (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epikatehin-3-O-galat, epigalocatehin, epikatehin-3-galat, epigalocatehin-3-galat i njihovi oligomeri, za koje je dokazano da poseduju

antioksidativnu aktivnost, a (+)-katehin da inhibira LDL oksidaciju i agregaciju trombocita [Meyer i sar., 1997; Tian i sar., 2009; Van Asker i sar, 1996; Yang, 2001].



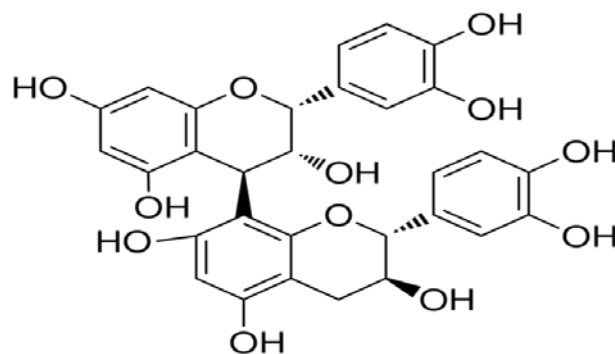
Slika 5. Struktura (+)-katehina

Proantocijanidoli nastaju oksidativnom kondenzacijom flavan-3-ola ili flavan-3,4-diola koja se najčešće odvija između C_4 atoma heterocikličnog prstena i C_8 ili C_6 atoma susedne jedinice. U zavisnosti od ostvarene veze mogu se podeliti u dve grupe: proantocijanidoli B-tipa, koj nastaju vezivanjem dve jedinice flavan-3-ola na C_4-C_8 (B_1-B_4) ili C_4-C_6 (B_5-B_8) i proantocijanidoli A-tipa, koji pored ovog vezivanja imaju i epoksidnu vezu između C_5 ili C_7 i C_2 [Luiz 2011; Singleton i Trousdale, (1992; Vivas i sar., 1996)].

Oligomerni i polimerni flavanoli sa velikim brojem fenolnih grupa ($M_r > 500$) se nazivaju tanini. Mogu imati žutu, braon ili crvenu boju i opori ukus. Za vreme vrenja i sazrevanja, tanini se polimerizuju što dovodi do povećanja veličine molekula i ova jedinjenja postaju nerastvorna, talože se i na taj način se oporost vina smanjuje [Alcalde-Eon i sar., 2006].

Tanini su takođe odgovorni i za trajnost boje vina jer formiraju polimerne pigmente sa antocijanima. Kondenzovani tanini (proantocijanidini) su visoko-molekulski polimeri sastavljeni od flavan-3-ol jedinica međusobno povezanih C-C mostom. Prisutni su u semenkama i pokožici grožđa kao dimeri, trimeri, tetrameri i oligomeri do osam jedinica. Procijanidin dimeri B_1-B_4 nastali vezivanjem dve jedinice katehina ili epikatehina C_4-C_8 vezom su najčešće prisutni u grožđu [Hagerman i sar., 1998; Downey i sar., 2003].

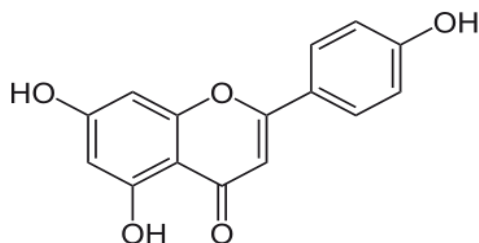
Procijanidini izolovani iz semenki grožđa se koriste kao aktivne komponente u medicinskim preparatima za tretman cirkulatornih oštećenja, jer pomažu rezistentnosti zida kapilara [Rodríguez Vaquero i sar., 2007].



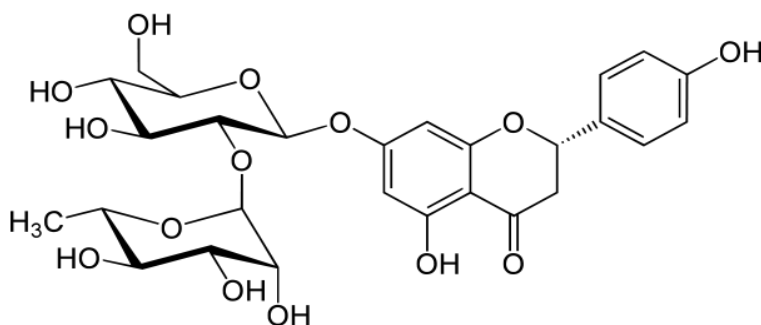
Slika 6. Struktura procijanidina B₂

2.2.2.3 Flavoni, flavanoni i flavonoli

Flavoni i flavanoni su posebne klase flavonoida (2-fenil-1-benzopiran-4-oni) sa strukturnim formulama prikazanim na slikama 7 i 8. U vinu su prisutni flavoni: apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) (A) i luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone), a od flavanona je prisutan naringin (4',5,7-trihidroksiflavanon-7-rutinozid) (B):

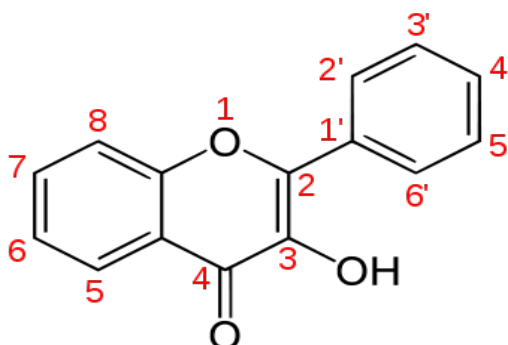


Slika 7. Struktura apigenina



Slika 8. Strukura naringina

Flavonoli - hidroksi derivati flavona (po IUPAC nomenklaturi: 3-hidroksi-2-fenilhromen-4-oni) koji su prisutni u vinu su: kvercetin, kamferol, miricetin, morin koji potiču iz pokožice grožđa. Flavonoli u vinu se javljaju i u obliku glukozida, kao što su: kvercetin glukozid, rutin i dr. U toku starenja vina flavonoli reaguju sa antocijanima dajući polifenolna jedinjenja poznata kao kopigmenti.



Flavonol	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Kvercetin	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
Kemferol	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
Morin	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	H
Miricetin	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H

Slika 9. Struktura flavonola

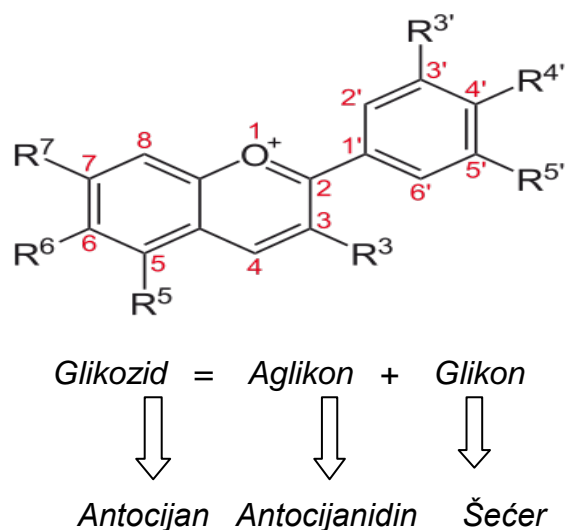
U pokožici crnog grožđa i crvenom vinu zastupljeni su monoglukozidi kamferola i miricetina i monoglukuronozid kvercetola, izokvarcitozid, a u manjim količinama su prisutni apigenin i luteolin.

Antioksidativna aktivnost ovih klasa flavonoida se pripisuje njihovoj sposobnosti da "hvataju" lipidne alkoksi i peroksi radikale, kao i da regenerišu α -tokoferol redukcijom α -tokoferol radikala [Bravo, 1998; Cushnie i Lamb, 2011; Grotewold, 2006; German i Walzem, 2000; Havsteen, 2002; Klepacka i sar., 2011; Macheix i sar., 1990; Pereira i sar., 2009, Shahidi i Wanasundara, 1992].

2.2.2.4 Antocijani

Antocijani (grč. anthos-cvet, kyanos-plav) su biljni pigmenti crvene, ljubičaste ili plave boje. Po hemijskoj strukturi antocijani su glikozidi antocijanidina, tako da hidrolizom antocijana nastaju antocijanidini (aglikoni) i ostatak mono ili disaharid. Antocijanidini po strukturi predstavljaju derivati flavilijum katjona [Harborne i Williams, 2001; Mazza i Miniati, 1993].

Svi antocijanidini imaju hidroksilnu grupu na C3 atomu, a ostale grupe su raspoređene na C5, C7, C3', C4', C5':



Antocijani	R ₁	R ₂
Cijanidin-3-O-glikozid	OH	H
Peonidin-3-O-glikozid	OCH ₃	H
Delfinidin-3-O-glikozid	OH	OH
Malvidin-3-O-glikozid	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidin-3-O-glikozid	H	H
Petunidin-3-O-glikozid	OCH ₃	OH

Slika 10. Struktura antocijana

Na osnovu položaja hidroksilne grupe u prstenu B razlikuju se tri osnovna jedinjenja: pelargonidin, cijanidin i delphinidin. Ukoliko se izvrši metilovanje hidroksilnih grupa u prstenu B dobijaju se pigmenti: peonidin, petunidin i malvidin. Metilovanje hidroksilnih grupa obično se vrši u položajima 5' i 3'.

Jedna od najvažnijih karakteristika antocijana je što kiseonik u heterocikličnom prstenu može da ima pozitivno naelektrisanje i zahvaljujući tome oni se u kiseloj sredini ponašaju kao katjoni i grade soli sa kiselinama (imaju crvenu boju), a u alkalnoj sredini kao anjoni i grade soli sa bazama (imaju plavu boju).

Boja antocijana zavisi od broja hidroksilnih grupa (veći broj OH grupa - plava boja, manji broj - crvena boja). Metilovanjem hidroksilnih grupa na prstenu B povećava se intenzitet boje, tako da pelargonidin ima oranž-crvenu boju, cijanidin - tamnocrven, a delphinidin - ljubičastu boju. Od šećera antocijani sadrže glukozu, galaktozu i ramanozu. Ako antocijan sadrži jedan šećer onda se on najčešće nalazi u položaju 3.

Antocijani su odgovorni za boju crnih grožđa i vina. U grožđu se nalaze u pokožici i pulpi grozda. U sorti grožđa Vitis vinifera nalaze u obliku monoglikozida, dok u američkim sortama u obliku diglikozida.

Poznato je, da sadržaj i vrsta antocijana zavisi od sorte grožđa, uslova gajenja loze, procesa maceracije grožđa i načina čuvanja vina. Tako da boja vina dobijena od iste sorte vinove loze može biti različita u zavisnosti geografskog područja gajenja, tehnologije obrade (temperature i vreme trajanja maceracije, količina sumpor (IV) oksida itd) i načina čuvanja vina.

Utvrđeno je da, mlado vino sorte Pinot Noir može da ima 100 mg/L, a vino od Cabernet Sauvignon i Širah sorte do 1500 mg/L antocijana. Međutim, nakon nekoliko godina čuvanja u flaši njihova koncentracija se smanjuje, kao posledica kondenzacije antocijana i građenja stabilnih kompleksa sa taninima. Ove transformacije mogu se upotrebiti za određivanje starosti vina. Stabilnost boje vina u dužem periodu čuvanja zavisi od formiranja antocijanin-tanin polimera [Jackson, 2008].

Pri reakciji antocijana sa sporednim proizvodima kvasca, kao što su acetaldehid, piruvinska kiselina i vinilfenolima (derivati cimetine kiseline) nastaju tzv. piranoantocijani. Tako, Vitisin A nastaje tokom alkoholne fermentacije reakcijom malvidina i piruvinske kiseline, dok reakcijom malvidina i acetaldehida nastaje Vitisin B [Luiz, 2011; Singleton i Trousdale, 1992].

Antocijaninidi koji se nalaze u grožđu i vinu imaju izrazito antioksidativno i biološko delovanje [Jackson, 2008; De Galulejac i sar., 1999; Gil-Munoy i sar., 2010; Lila, 2004; Mazza i sar., 1993; Meiers i sar., 2001; Munoz-Espada i sar., 2004; Radovanović i sar., 2010b; Wang i sar., 1997]

2.3 Biološka aktivnost vina

Iako se zna da preterano konzumiranje alkohola ima štetan uticaj po zdravlje čoveka, epidemiološke studije početkom XX veka su pokazale da postoji veoma pozitivan uticaj crvenog vina na ljudski organizam.

Svetska organizacija zdravlja (World Health Statistics Annual for 1970) je uključila preko 1 000 000 stanovnika iz 18 razvijenih zemalja i nakon statističke obrade podataka ustanovljeno je da u zemljama gde je veća potrošnja vina, smrtnost od kardiovaskularnih obolenja 3-5 puta manja u poređenju sa zemljama gde je potrošnja vina mala (poznati "French paradox") [Renaud i de Lorgeril, 1992]. Umereno konzumiranje crvenog vina oko 120 mL dnevno može da dovede do smanjenja rizika od kardiovaskularnih bolesti od 25 do 60 % [Bertelli, 2007; Gey, 1990; Doll, 1990; Mimić-Oka i sar., 1999].

Resveratrol, kvercetin, (+)-katehin, (-)-epikatehin inhibiraju stvaranje naslaga u krvnim sudovima i imaju kardioprotektivni i hemoprotektivni efekat [Anli i Vural, 2009; Arnous i sar., 2002; Baxter, 2008; Braicu i sar., 2011; Burns i sar., 2002; Docherty i sar., 2001; Jenadet i sar., 1991; Mark i sar., 2005; Wang i sar. 1997]. Potvrđeno je da sinergistično delovanje više fenolnih jedinjenja u odnosu na pojedinačne fenole pojačava pozitivni efekat na kardiovaskularni sistem [Bertelli, 2007; Gey, 1990; Hertog M., 1995].

Fenolne kiseline imaju dokazano biološko delovanje na lipidnu peroksidaciju, zbog čega se koriste kao konzervansi i antiinflamatorni i antioksidativni agensi [Bravo, 1998; Cushnie i Lamb, 2011; Meyer i sar., 1997; Tian i sar., 2009].

Pozitivni efekat po zdravlje čoveka su pokazala i neka druga fenolna jedinjenja, kao što su flavonoidi [Bravo, 1998; Cushnie i Lamb, 2011; Grotewold, 2006; German i Walzem, 2000; Havsteen, 2002; Klepacka i sar., 2011; Macheix i sar., 1990; Pereira i sar., 2009, Shahidi i Wanasundara, 1992].

Utvrđeno je da vino dobijeno od grožđa Cabernet Sauvignon smanjuje rizik od Alzheimer-ove bolesti [Wang i sar., 1997].

Dokazano je da etilgalat, ferulna kiselina, galna kiselina, kafena kiselina o-etilferulat inhibiraju do 80 % HIV-a [Edeas, 2001].

2.3.1 Antioksidaciona aktivnost vina

1954 godine Cristobal Miranda i 1962 godine Donald R. Buhler su dobili Nobelovu nagradu za istraživanja antioksidativne aktivnosti flavonoida. Oni su potvrdili da antioksidativna aktivnost zavisi od njihove strukture i da oni pomažu pri zaštiti od oksidativnog stresa.

Dr van Acker i njegove kolege iz Holandije su sugerirali da konzumiranje flavonoida (kvercetin) od 50 do 800 mg dnevno može da zameni delovanje vitamina E [Van Asker i sar., 1996].

Hemijska ispitivanja crvenih vina je pokazala da se njihov snažan biološki efekat po zdravlje čoveka pre svega može pripisati prisutnim fenolnim jedinjenjima [German i Walzem, 2000; Grotewold, 2006; Havsteen, 2002; Klepacka i sar., 2011; Macheix i sar., 1990; Pereira i sar., 2009; Shahidi i Wanasundara, 1992].

U vinu se odvija sinergističko delovanje između prisutnih fenolnih jedinjenja i etanola. Pod dejstvom dehidrogenaze (ADH) etanol se transformiše u acetaldehid, dalje u acetalacetata produkujući NADH-a. Na taj način, NAD⁺ se regeneriše i ponovo vraća u process detoksifikacije etanola. Kao posledica ovog sinergističkog delovanja imamo obnovljene antioksidanse (fenolna jedinjenja) tj. dostupna u reduktivnom obliku.

Za visok antioksidacioni potencijal crvenih vina smatra se da su najzaslužniji monomerni katehini, proantocijanidoli, monomerni antocijani i neke fenolne kiseline [Gil-Munoy i sar., 2010; De Galulejac i sar., 1999; Jackson, 2008; Luiz, 2011; Harris i sar., 2010; Macheix i Fleuriet, 1998; Singleton i Trousdale, 1992; Van Asker i sar., 1996; Wang i sar., 1997].

Uspostavljene su pozitivne korelacije između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, kao i udela galne kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina i antioksidacionog potencijala vina [Minussi i sar. 2003; Radovanović i sar., 2010a; Soleas i sar., 1997; Taha i sar., 2008].

Značajna antioksidaciona aktivnost (-)-epikatehina je pripisana njegovom konvertovanju u obliku antocijana pod dejstvom slobodnih radikala [Luiz 2011; Katalinić i sar., 2004].

Takođe, utvrđena je pozitivna korelacija između sadržaja antocijana i antioksidacione aktivnosti nekih crvenih vina [Jackson, 2008; De Galulejac i sar., 1999; Gil-Munoy i sar., 2010; Lila, 2004; Mazza i sar., 1999; Mazza i Miniati, 1993; Meiers i sar., 2001; Munoz-Espada i sar., 2004; Radovanović i sar., 2010b; Wang i sar., 1997].

Primećen je veći antioksidacioni potencijal vina od iste sorte grožđa kada je vino starije, što je objašnjeno razlikama u koncentraciji tanina, koji nastaju tokom sazrevanja vina [Piljac i sar., 2005].

Takođe, primećeno je da se antioksidacioni potencijal menja u zavisnosti od skladištenja vina. Tako na primer, vino Cabernet Sauvignon ima veći potencijal za 47 % ako se čuva u hrastovom buretu, umesto u flašama [Bartlome i sar., 1996; Vivas i Glories 1996].

Utvrđeno je da fenolne kiseline, resveratrol i neki flavonoidi prolaze nepromenjeni kroz želudac i jako brzo dospevaju u krvotok [Simonetti i sar., 2001; Soleas i sar., 2001].

Primenom C¹⁴ izotopa proantocijanidola utvrđeno je da se nakon sat vremena oralnog unošenja proantocijanidol distribuira u čitavom organizmu. Vreme za koje antocijani i flavonoli dospevaju u mozak, meri se u minutima [Passamonti i sar., 2003; Youdim i sar., 2002].

Neki flavonoidi, inhibicijom enzimskih sistema dovode do smanjenja stvaranja histamina koji izaziva lučenje želudačnih kiselina i stvaranje čira na želudcu. Tako da, umereno konzumiranje vina usporava i stvaranje kamena u bubrezima [Curhan i sar., 1998].

Jedinjenja iz grupe flavonola svojom antioksidativnom sposobnošću sprečavaju oksidaciju LDL (Low Density Lipoproteins) holesterola, a povećavaju nivo "dobrog" HDL holesterola i preventivno deluju na arteriosklerozu [Frankel i sar., 1995; Meyer i sar., 1997].

Veliki broj istraživanja je posvećen utvrđivanju antikancerogenog delovanju vina tj. uticaja na smanjenja rizika od raka pluća, dojke i prostate [Doll, 1990; Hertog, 1995; Hou, 2003; Olas i Wachowich, 2002; Soleas i sar, 2002].

2.3.2 Antimikrobna aktivnost vina

Antimikrobno delovanje pokazuju neke fenolne kiseline, kao p-kumarna kiselina i neki flavonoidi, kao (+)-katehin i kvercetin protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija [Cowan, 1999; Cushnie i Lamb, 2005, 2011; Daglia i sar., 2007; Ikigai i sar., 1993; Just i Daeschel, 2003; Fikselova i sar., 2010; Macheix i Fleuriet, 1998; Mori i sar., 1987; Papadopoulou i sar., 2005; Palma i Taylor 1999; Rauha i sar., 2000; Radovanović i sar., 2008, 2010; Rodríguez Vaquero i sar., 2007; Russell, 2002; Sugita-Konishi i sar., 2001; Tenore i sar. 2011; Tesaki i sar., 1999; Thimothe i sar, 2007; Weisse i sar, 1995].

Mehanizmi antimikrobnog delovanja fenolnih jedinjenja nisu još uvek razjašnjeni. Poznato je samo da kvercetin deluje na DNK, dok epigalokatehin, kao antimikrobni agens, na ćelijske membrane.

Antimikrobno delovanje vina se pojačava pri niskim pH vrednostima i prisutnosti etanola (nepovoljnim uslovima za razvoj mikroorganizama).

*Daglia i sardnici (2007.) su pokazali da vino može biti efikasan antibakterijski agens protiv *Streptococcus* bakterijskih vrsta.*

Može se reći da flavonoidi i fenolne kiseline u vinama imaju antibakterijska, antifungalna, antiviralna, antineoplastična, hepatoprotektivna, imunomodulaciona, anti-inflamatorna, antimikrobna, antikancerogena, antimutagena svojstva [Bravo,

1998; Bertelli, 2007; Gey, 1990; German i Walzem, 2000; Grotewold, 2006; Daglia i sar., 2007; Doll, 1990; Havsteen, 2002; Hou, 2003; Klepacka i sar., 2011; Macheix i sar., 1990; Macheix i Fleuriet, 1998;; Mimić-Oka i sar., 1999; Pereira i sar., 2009; Radovanović i sar., 2008; 2012a, 2012b; Renaud i de Lorgeril, 1992; Rice-Evans i sar., 1995; Soleas i sar, 2002; Shahidi i Wanasundara, 1992; Wang i sar., 1997].

3 EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Materijal i aparatura

3.1.1 Hemikalije

Galna kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, trans-kaftarna kiselina, trans-kutarna kiselina, kafena kiselina, hlorogenska kiselina, ferulna kiselina, elaginska kiselina, trans-resveratrol, (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epigalokatehingalat, procianidin B₂ ((-)-epicatechin-(4 β →8)-(-)-epicatechin), kvercetin, kvercetin-3-glikozid, rutin, miricetin, morin, kamferol, luteolin, apigenin, naringin, malvidin-3-glikozid, cyanidin-3-glikozid, 2,2`-difetil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) slobodni radikal, 1,10-fenantrolin monohidrat hidroklorid, (\pm)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karbonska kiselina (Trolox C), 2-terc-butil-4-hidroksianizol (BHA), bakar (II) hlorid dihidrat, su proizvedeni u Sigma Chemical Company (St Louis, SAD). Acetonitril i mravlja kiselina (HPLC-čistoće) su dobijeni od Merck (Darmstadt, Nemačka); Metanol (HPLC-čistoće) od Carlo Erba reagent (Milan, Italija); etanol, amonijumacetat i hlorovodonična kiselina proizvedeni su u „Zorki“, Šabac. Svi reagensi i hemikalije upotrebljene u eksperimentalnom radu bili su analičke čistoće.

3.1.2 Bakterijske kulture

Upotrebljene su šest gram-pozitivne bakterije: Clostridium perfringens ATCC 19404, Bacillus subtilis ATCC 6633, Listeria innocua ATCC 33090, Staphylococcus aureus ATCC 6538, Sarcina lutea ATCC 9341 and Micrococcus flavus ATCC 40240 i šest gram-negativne: Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, Salmonella enteritidis ATCC 13076, Shigella sonnei ATCC 25931, Klebsiella pneumonia ATCC 10031 i Proteus vulgaris ATCC 8427) i kvasac – Candida albicans, dobijeni iz American Type Culture Collection (Roskville, SAD).

Priprema suspenzije je izvršena na sledeći način: Bakterijske kulture su presejane na sveži hranljivi agar i inkubirane 18 h na 37 °C. Zatim su napravljene suspenzije u

fiziološkom rastvoru (0.9 % NaCl) i podešene turbidimetrom na 0.5 McFarland-a, čime je postignuta gustina ćelija $1.0-1.5 \times 10^8$ za bakterije, a $1,5 \times 10^7$ CFU /ml za kvasac (NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003).

3.1.3 Uzorci crvenih vina

Analizirano je četrdeset uzoraka komercijalnih stonih polusuvih i kvalitetnih suvih crvenih vina sa određenim geografskim poreklom, dobijenih iz vinogradarskih i vinskih regiona Balkana, odnosno iz Bosne i Hercegovine, Hrvatske, Srbije, Crne Gore, Makedonije i Bugarske, proizvedenih u periodu od 2007 do 2011 godine.

Izabrana su petnaest uzoraka vina od internacionalne *Vitis vinifera* sorte grožđa Cabernet Sauvignon, četrnaest uzoraka vina od autohtone *V. vinifera* sorte grožđa Vranac, po dva uzorka vina od autohtone sorte Kratošija i internacionalne sorte Merlot, po jedan uzorak vina od internacionalnih sorti Pinot Noir i Frankovka, kao i pet uzoraka crvenih vina iz Župskog vinogradarskog i vinskog rejona, dobijenih od različitih sorti grožđa.

U tabeli 1 su data analizirana crvena vina, sorte grožđa od kojih su dobijena, godine proizvodnje i ime proizvođača:

Tabela 1. Analizirana crvena vina iz Balkanskih vinogradarskih i vinskih regiona

Oznaka vina	Ime vina i godina proizvodnje	Proizvođač
CS1	<i>Cabernet Sauvignon, 2007</i>	<i>Laguna, (Poreč, Hrvatska)</i>
CS2	<i>Cabernet Sauvignon, 2008</i>	<i>Sekulović (Trebinje, Bosna i Hercegovina)</i>
CS3	<i>Cabernet Sauvignon, 2007</i>	<i>Plantaža (Podgorica, Crna Gora)</i>
CS4a, CS4b	<i>Cabernet Sauvignon - Oplenac, 2008, 2009</i>	<i>Kraljevski vinogradi, (Oplenac, Srbija)</i>
CS5a, CS5b	<i>Cabernet Sauvignon - Terra Lazarica, 2008, 2009</i>	<i>Rubin (Kruševac, Srbija)</i>
CS6a, CS6b	<i>Cabernet Sauvignon, 2008, 2009</i>	<i>Rubin (Kruševac, Srbija)</i>
CS7	<i>Cabernet Sauvignon, 2008</i>	<i>Radmilovac (Beograd, Srbija)</i>
CS8	<i>Cabernet Sauvignon, 2008</i>	<i>Cevin (Niš, Srbija)</i>
CS9a, CS9b	<i>Cabernet Sauvignon - Alexandria, 2008, 2009</i>	<i>Tikveš (Skoplje, Makedonija)</i>
CS10	<i>Cabernet Sauvignon - Čardak, 2009</i>	<i>Lozar (Veles, Makedonija)</i>
CS11	<i>Cabernet Sauvignon, 2007</i>	<i>Pivka (Negotin, Makedonija)</i>
CS12	<i>Cabernet Sauvignon, 2007</i>	<i>Katarzyna vinograd (Katarzyna Estate Mezzek, Bugarska)</i>
V1	<i>Vranac- Hercegovački, 2008</i>	<i>Vukoje (Trebinje, Bosna i Hercegovina)</i>
V2	<i>Vranac, 2007</i>	<i>Čitluk (Mostar, Bosna i Hercegovina)</i>
V3	<i>Vranac- Pro corde, 2007</i>	<i>Plantaža (Podgorica, Crna Gora)</i>
V4	<i>Vranac, 2008</i>	<i>Vinoprodukt Čoka/Vinarija Ohrid (Subotica/Ohrid, Srbija/Makedonija)</i>
V5a, V5b	<i>Vranac, 2008, 2009</i>	<i>Rubin (Kruševac, Srbija)</i>
V6a, V6b	<i>Vranac, 2008, 2009</i>	<i>Vino Župa (Aleksandrovac, Srbija)</i>
V7	<i>Vranac, 2008</i>	<i>Status (Niš, Srbija)</i>
V8a, V8b	<i>Vranec - Tga za jug, 2008, 2009</i>	<i>Tikveš (Kavadarci, Makedonija)</i>

V9	<i>Vranec, 2009</i>	<i>Tikveš (Kavadarci, Makedonija)</i>
V10	<i>Vranec- Vilarov, 2011</i>	<i>Stobi (Gradsko, Makedonija)</i>
V11	<i>Vranec, 2008</i>	<i>Pivka (Negotin, Makedonija)</i>
K1	<i>Kratošija, 2009</i>	<i>Vino Župa (Aleksandrovac, Srbija)</i>
K2	<i>Kratošija, 2009</i>	<i>Tikveš (Kavadarci, Makedonija)</i>
M1	<i>Merlot, 2009</i>	<i>Radmilovac (Beograd, Srbija)</i>
M2	<i>Merlot, 2009</i>	<i>Tikveš (Kavadarci, Makedonija)</i>
PN	<i>Pinot Noir, 2007</i>	<i>Rubin (Kruševac, Srbija)</i>
F	<i>Frankovka, 2008</i>	<i>Vršački podrumi (Vršac, Srbija)</i>
Međaš	<i>Međaš (Merlot, Game, Pinot Noir) 2008</i>	<i>Vino Župa (Aleksandrovac, Srbija)</i>
As	<i>As (Vranac, Prokupac, Game) 2008</i>	<i>Vino Župa (Aleksandrovac, Srbija)</i>
Crno VŽ	<i>Crno (Vranac, Prokupac, Pinot Noir) 2008</i>	<i>Vino Župa (Aleksandrovac, Srbija)</i>
Crno R	<i>Crno (Vranac, Prokupac, Pinot Noir) 2008</i>	<i>Rubin (Kruševac, Srbija)</i>
M.krv	<i>Medveđa krv (Vranac, Prokupac) 2009</i>	<i>Rubin (Kruševac, Srbija)</i>

3.1.4 Aparatura

Za snimanje apsorpcionih spektara čistih komponenata i ispitivanih uzoraka vina korišćen je aparat UV/Vis spektrofotometar 8453 Agilent sa kivetom dužine optičkog puta 1 cm.

Za određivanje fenolnih jedinjenja u vinima korišćen je visokoefikasni tečni hromatograf, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) system Agilent 1200, sa kvaternom pumpom G1354A, automatskog injektora G1329A, termostatisane kolone G1316A, Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm), UV/Vis DAD detektorom G1315D, fluorescentnim detektorom (FLD) G1321A kontrolisanog Chemstation softverom, za određivanja sadržaja fenolnih jedinjenja.

Za određivanje antimikrobne aktivnosti je upotrebljen Turbidimetar Thermo Labsystems, Multiskan EX, Software for Multiscan ver.2.6.

Primenjen je microMed high purity water system TKA GmbH za dobijanje demineralizovane vode; analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S za odmerivanje čvrstih supstanci i Hanna Tustruments pH-metrom za određivanje pH Vrednosti vina. Za sva snimanja izvršene su po tri uzastopne analize od svakog uzorka i dobijeni rezultati su prezentovani kao srednja vrednost.

3.2 Metode

3.2.1 UV/Vis spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u uzorcima crvenih vina

Ukupna količine fenola, estara vinske kiseline i flavonola su određene primenom modifikovane Glories metode [Mazza i sar., 1999; Radovanović i sar., 2012a,b].

Rastvori i reagensi: razblaženi uzorak vina (1:10); 10% i 95% rastvori etanola; 0,1% i 2% rastvori HCl; standardni rastvori galne kiseline, kvercetina i rutina.

Spektrofotometrijsko određivanje: Reakciona smeša pripremljena je mešanjem 0,25 ml razblaženog uzorka vina (1:10), 0,25 ml 0,1% HCl u 95% etanola i 4,55 ml 2% HCl. Apsorbanca se meri nakon 15 min na $\lambda_{max} = 280, 320, 360$ nm.

Ukupna količina fenola u datom uzorku vina određena je na osnovu kalibracione krive standarda galne kiseline na $\lambda_{max} = 280$ nm ($A = 0,031 + 0.0008 \times C_{gal}$).

Ukupna količina estara vinske kiseline u uzorku je određena na osnovu kalibracione krive standarda kafene kiseline na $\lambda_{max} = 320$ nm ($A = -0.014 + 0.005 \times C_{kaf}$)

Ukupna količina flavonola u uzorku je određena na osnovu kalibracione krive standarda kvercetina na $\lambda_{max} = 360$ nm ($A = 0,005 + 0,003 \times C_{kver}$).

3.2.2 HPLC određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja u uzorcima crvenih vina

Za HPLC određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja u vinima je razrađena interna metoda (u saradnji sa INRA Institut, Montpellier, Francuska), po kojoj se koriste dva sistema rastvarača za razdvajanje fenolnih komponenata: (A) voda/mravlja kiselina (95:5 v/v) i (B) acetonitril/mravlja kiselina/voda (80:5:15 v/v).

Eluacioni profil je sledeći: od 0 do 28 min, 0-10,0 % B; od 28 do 35 min, 10-25 % B; od 35 do 40 min, 25-50 % B; od 40 do 45 min, 50-80 % B i zadnjih 10 min 0 %. Protok mobilne faze je iznosio 0,8 mL/min. Kolona je termostatisana na temperaturi od 30 °C. Injektovano je po 5 µL uzorka, korišćenjem autosampler-a. Eluent je praćen pomoću UV/Dad detektora na 280 nm, 320 nm, 360 nm i fluorescentnog detektora na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$). Svi uzorci su profiltrirani kroz celulozni filter (0,45 µm) [Radovanović i sar., 2010a, 2010b, 2012b].

Identifikacija fenolnih jedinjenja je izvršena na osnovu retencionih vremena i spektara standardnih supstanci. Korišćene su sledeće standardne supstance: galna kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, trans-kaftarna kiselina, trans-kutarna kiselina, kafena kiselina, hlorogenska kiselina, ferulna kiselina, elaginska kiselina, trans-resveratrol, (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epigalokatehingalat, procianidin B₂, kvercetin, kvercetin-3-glukozid, rutin, miricetin, morin, kamferol, luteolin, apigenin, naringin, malvidin-3-O-glikozid i cianidin-3-glikozid. Kalibracione krive su dobijene na osnovu dobijenih površina u zavisnosti masene koncentracije standarda i primenjene za određivanje koncentracije identifikovanih fenolnih jedinjenja. Rezultati su prezentovani u mg/L vrednostima (Tabela 2):

Tabela 2. Standardna jedinjenja za određivanje masene koncentracije fenolnih jedinjenja u vinama

Standardno jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Oblast linearnosti ($\mu\text{g/mL}$)	Koeficijent korelacije	Talasna dužina detekcije (nm)
<i>Askorbinska kiselina</i>	1,9	5 - 150	0,9992	280 (DAD)
<i>Galna kiselina</i>	3,2	2 - 145	0,9998	280 (DAD)
<i>trans-Kafarna kiselina</i>	9,5	1 - 50	0,9997	320 (DAD)
<i>trans-Kutarna kiselina</i>	15,5	1 - 100	0,9991	320 (DAD)
<i>(+)-katehin</i>	15,6	2 - 150	0,9975	277/322 (FI)
<i>Kafena kiselina</i>	17,3	1 - 50	0,9997	320 (DAD)
<i>Hlorogenska kiselina</i>	18,3	1 - 100	0,9989	320 (DAD)
<i>Procijanidin B₂</i>	19,1	1 - 150	0,9975	277/322 (FI)
<i>(-)-Epicatehin</i>	21,2	2 - 150	0,9956	277/322 (FI)
<i>p-Kumarna kiselina</i>	21,5	0,1 - 14	0,9995	320 (DAD)
<i>Epigalokatehin galat</i>	22,5	1 - 100	0,9993	277/322 (FI)
<i>Siringinska kiselina</i>	22,8	6,25 - 100	0,9999	280 (DAD)
<i>Cijanidin glikozid</i>	24,2	1 - 100	0,9988	520 (DAD)
<i>Ferulna kiselina</i>	24,3	0,1 - 50	0,9998	320 (DAD)
<i>Vanilinska kiselina</i>	24,5	1 - 130	0,9995	280 (DAD)
<i>Malvidin glikozid</i>	26,4	1 - 100	0,9991	520 (DAD)
<i>Elaginska kiselina</i>	26,5	1 - 100	0,9992	280 (DAD)
<i>Kvercetin-β-glikozid</i>	27,2	1 - 20	0,9999	360 (DAD)
<i>Rutin</i>	27,5	1,6 – 130,9	0,9983	360 (DAD)
<i>Naringin</i>	28,2	1 – 100	0,9994	280 (DAD)
<i>Luteolin glikozid</i>	28,5	4 - 140	0,9998	360 (DAD)
<i>trans-Resveratrol</i>	30,1	0,2 – 20,4	0,9994	320 (DAD)
<i>Morin</i>	31,0	2 - 120	0,9996	360 (DAD)
<i>Miricetin</i>	31,8	1 - 20	0,9989	360 (DAD)
<i>Kvercetin</i>	33,7	0,2 - 50	0,9997	360 (DAD)
<i>Apigenin</i>	37,6	1,0 - 130	0,9988	360 (DAD)
<i>Kemferol</i>	37,8	1 - 140	0,9999	360 (DAD)

3.2.3 Spektrofotometrijsko određivanje antiradikalne aktivnosti uzoraka crvenih vina

Antiradikalna ili antioksidaciona aktivnost uzoraka vina određena je korišćenjem 2,2'-difenil-1-pikrihidrazil radikala (DPPH[•]) [Lachman i sar., 2007; Villano i sar., 2006; Radovanović i sar., 2008, 2010a]. Po ovoj metodi nastala redoks reakcija između uzorka i 2,2'-difenil-1-pikrihidrazil radikala koja služi za određivanje antiradikalne aktivnosti uzorka se prati promenom apsorbcije na 517 nm. DPPH[•] radikal ima ljubičastu boju i nakon reakcije sa kiseonikovim atomom prisutnog u uzorku formira 2,2'-difenil-1-pikrihidrazilin (DPPH-H) koji je žuto obojen. Spektrofotometrijskim praćenjem promene boje na 517 nm se određuje antiradikalni potencijal ispitivanog uzorka.

Metod I

Rastvori i reagensi: razblaženi uzorak vina (1:25); metanolni rastvor DPPH[•] (1×10^{-4} M) i metanol.

Spektrofotometrijsko određivanje: Absorbancija 5mL rastvora DPPH[•] u metanolu na 517 nm se koristi kao kontrolna proba. Absorbancija razblaženog uzorka vina (5 mL) u prisustvu 1 ml DPPH[•] se meri nakon 20 minuta. Dobijene vrednosti se unose u formulu koja služi za izračunavanje kapaciteta neutralisanja DPPH radikala:

$$\text{Kapacitet neutralisanja DPPH}^{\bullet} (\%) = (A_B - A_U / A_K) \times 100$$

gde je: A_U - apsorbcija uzorka i rastvora DPPH[•] na 517 nm; A_B - apsorbcija rastvora DPPH radikala u metanolu („blank“ proba) na 517 nm.

Metod II

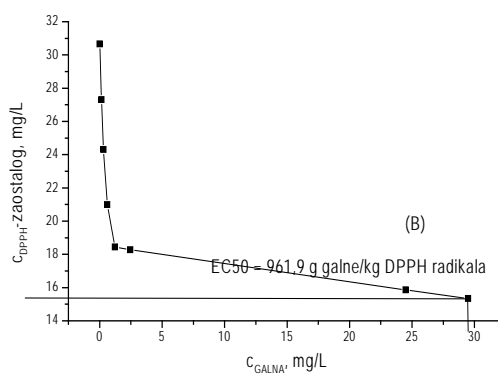
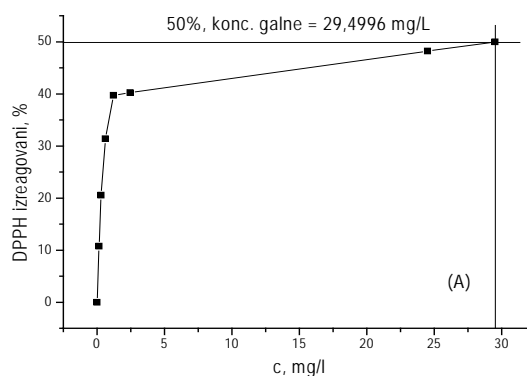
Rastvori i reagensi: razblaženi rastvori uzorka vina i standardni rastvori: DPPH[•] radikala, galne kiseline, rutina, kvercetina, trolox-a i metanola.

Spektrofotometrijsko određivanje: Absorbancija 1ml rastvora DPPH[•] u 1 mL metanola, na 517 nm se koristi kao kontrolna proba. Takođe, registruje se apsorbcija na 517 nm „blank“ probe, koja sadrži 1 mL rastvora uzorka u 1 mL metanola. Absorbancija 1 mL uzorka vina različitih koncentracija u prisustvu 1 mL

DPPH[•] se registruje nakon 20 minuta. Za svaku koncentraciju uzorka vina se izračuna kapacitet neutralisanja DPPH[•] u procentima (slika 12):

$$\text{Kapacitet neutralisanja (izreagovanog) DPPH}^{\bullet} (\%) = 100 - (A_{t=20 \text{ min}}/A_{t=0}) \times 100$$

Dobijene jednačine za standardna jedinjenja, korelacione koeficijente i oblast linearnosti su date u Tabeli 3.



A)

B)

Slika 11. Grafički prikaz procenta izreagovanog (A) i neizreagovanog (B) DPPH[•] radikala pri reakciji sa određenom koncentracijom galne kiseline

Tabela 3. Jednačine kalibracionih krivih za galne kiseline, kvercetin i rutin po DPPH[•] metodi

Standardno jedinjenje	Kalibracione jednačine	Koeficijent korelacije	Oblast linearnosti, $\mu\text{mol/l}$
Galna kiselina	$y = 2,1281 + 3,69066x$	0,9965	$2,5 \times 10^{-6} - 1,9 \times 10^{-5}$
Kvercetin	$y = 9,4766 + 39,88591x$	0,9708	$2,0 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-6}$
Rutin	$y = 3,39148 + 4,80155x$	0,9749	$5,0 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-5}$

3.2.4 Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacione aktivnosti uzoraka crvenih vina

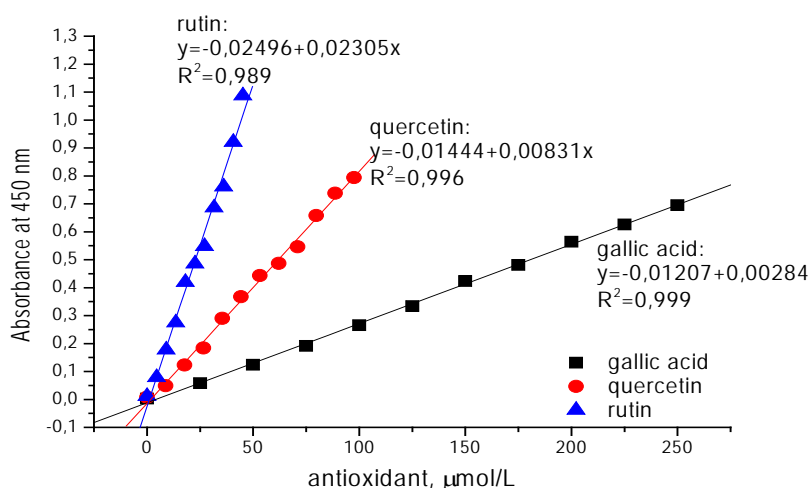
Druga spektrofotometrijska metoda za određivanje antioksidacione aktivnosti ispitivanih uzoraka vina se zasniva na oksidacione sposobnosti bakar(II)-1,10-fenatrolin reagensa. U neutralnoj pH sredini, u toku od 30 min nastaje redoks reakcija između ovog oksidacionog agensa i fenolnih jedinjenja iz vina. Kao rezultat ove redukcije nastaje bakar(I)-1,10-fenantrolin, koji pokazuje apsorpcioni maksimum na 450 nm. Spektrofotometrijskim praćenjem promene ovog apsorpcionog maksimuma određuje se antioksidaciona aktivnost ispitivanog uzorka vina. Princip ove bakar redukujuće („Cupri Reducing“ – CR) metode je sličan CUPRAC metodi [Apak, 2004].

Rastvori i reagensi: razblaženi uzorak vina; 10^{-2} M rastvor bakar (II) hlorid dihidrata; $7,5 \times 10^{-3}$ M rastvor 1,10-fenantrolin monohidrat hidrohloridai 1 M rastvor amonijumacetata (pufer pH 7,0).

Spektrofotometrijsko određivanje: Smeši od 1 mL Cu(II) hlorida, 1mL 1,10-fenatrolina i 1 mL amonijum acetata doda se x mL uzorka vina ($x = 40 - 200 \mu\text{L}$) i vode (1-x) mL do ukupne zapremine rastvora 4,1 mL. Nakon 30 min meri se apsorbancija nastalog bis(1,10-fenantrolin) Cu(I) helatnog katjona na 450 nm. Ukupan antioksidacioni kapacitet uzorka vina je određen na osnovu kalibracionih kriva standarda na $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$:

Tabela 4. Jednačine kalibracionih krivih galne kiseline, kvercetina i rutina primenom bakar (II))-1,10-fenatrolin agensom

Standardno jedinjenje	Kalibracione jednačine	Koeficijent korelacije	Oblast linearnosti, $\mu\text{mol/L}$
Galna kiselina	$y = -0,01207 + 0,00284x$	0,9992	$2,5 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$
Kvercetin	$y = -0,01444 + 0,00831x$	0,9967	$4,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$
Rutin	$y = -0,02496 + 0,02305x$	0,9893	$4,5 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-5}$



Slika 12. Kalibracione krive galne kiseline, rutina i kvercetina određene Cu (II)-1,10-fenatrolinom

3.2.5 Određivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka crvenih vina

3.2.5.1 Disk-difuzionna metoda

Antimikrobni testovi su izvršeni disk difuzionom metodom upotrebom 100 μl bakterijske suspenzije postavljene na Muller-Hinton-ovom agaru (MHA, Torlak) u sterilizovanim Petrijevim šoljama (90 mm u dijimetru). Diskovi (9 mm u dijimetru, HiMedia Laboratories Pvt. Limited) na koje je naneto po 50 μL testiranih uzoraka vina stavljeni su u agar (20 mL), dok količina galne kiseline je bila 5 $\mu\text{g/disk}$, kvercetina 0,05 $\mu\text{g/disk}$ i (+)-katehina 2 $\mu\text{g/disk}$. Posude su inkubirane 24 h na 37 $^{\circ}\text{C}$.

Referentni antibiotici chloramfenol, streptomycin i tetraciklin po 30 µg/disk, su upotrebljeni kao pozitivna kontrola, dok je rastvarač – voda (50 µL/disk) upotrebljen kao negativna kontrola. Potvrđeno je da rastvarač ne pokazuje inhibitorску aktivnost. Svi testovi su ponovljeni tri puta. Antibakterijska aktivnost je određena merenjem zone inhibicije (u mm) na testiranim bakterijskim vrstama [Murray i sar., 2003].

3.2.5.2 Mikro-diluciona metoda

Mikro-diluciona metoda je korišćena za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne bakterijske koncentracije (MBC) prema Nacionalnom komitetu za kliničke laboratorijske standarde (NCCLS, 2003).

Serija duplih razblaženja testiranih uzoraka vina je napravljena u mikrotitar ploči sa 96 udubljenja, u rangu (opsegu) od 500-0,25 µL/mL, u inokulisanoj hranljivoj tečnoj podlozi zapremine 100 µL i finalna bakterijska koncentracija je 10⁶ CFU/mL u svakom udubljenju.

Fenolne komponente: galna kiselina, kumarna kiselina, kvercetin i (+)-katehin su analizirani u opsegu koncentracije od 10,0 do 0,002 µg/mL, dok standardni antibiotici: chloramfenol, streptomycin, tetraciklin i nistatin u koncentraciji od 30 µg/mL.

Nakon 24 h inkubacije na 37 °C i dodavanja reagensa TTC (trifenil-tetrazolium hlorid), očitana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). MIC je definirana kao najniža koncentracija uzoraka vina pri kojoj i nema vidljivog rasta mikroorganizama i definirana je koncentracijom u prvom bunarčiću u kojem nema vidljivog rasta i crvenog obojenja. Sadržaji bunarčića bez vidljivog rasta su preneti na MHA (Mueller Hinton Agar), a posle inkubacije (24 h na 37 °C) očitana je i minimalna baktericidna koncentracija (MBC). MBC je definisana kao najniža koncentracija uzorka vina pri kojoj je ubijeno 99,9% mikroorganizama od ukupnog broja u suspenziji (NCCLS standard – National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003). Eksperiment je rađen u tri ponavljanja, sa kontrolom rasta mikroorganizama (inokulisana podloga bez ekstrakta), na sterilnoj podlozi (čista podloga) i sa pozitivnom kontrolom-antibioticima.

Mikrobiološki rast je očitavan uz pomoć univerzalnog čitača mikrotitarskih ploča na apsorbanci od 620 nm.

3.3 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišćeni su kompjuterski softverski program Microsoft Exel v. 2007. Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Nortampton, USA, 1991-2002). Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja \pm standardna greška. Za pojedine parametre je urađena analiza varijanse (ANOVA) i koeficijent korelacije između parametara.

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Analiza uzoraka Cabernet Sauvignon vina iz različitih vinogradarskih i vinskih regiona Balkana

U tabeli 1 (Eksperimentalni deo) data su petnaest vrsta kvalitetnih Cabernet Sauvignon (CS) vina sa određenim geografskim poreklom, proizvedena u periodu od 2007 do 2009 godine od različitih proizvođača sa prostora:

- *Hrvatske (Istarsko vinogorje, proizvođač Laguna, Poreč),*
- *Bosne i Hercegovine (Trebinjsko vinogorje, proizvođač Sekulović, Trebinje),*
- *Crne Gore (Centralno crnogorsko vinogorje, proizvođač Plantaža, Podgorica),*
- *Srbije (Šumadijsko Veliko moravski rejon - Beogradski i Oplenački podrejoni, proizvođači: Radmilovac, Beograd i Kraljevski vinogradi, Oplenac; Zapadno moravski rejon - Kruševaki podrejon, proizvođač Rubin, Kruševac i Nišavsko Južnomoravski rejon - Sićevačko vinogorje, proizvođač Cevin, Niš),*
- *Makedonije (Tikveški i Povardarski rejoni, proizvođači: Tikveš, Skopje; Lozar, Veles i Pivka, Negotin) i*
- *Bugarske (Južno Bugarski rejon, proizvođač Katarzyna vinograd, Mezzek) [Radovanović i sar, 2008, 2010a, 2010b, 2012a, 2012b].*

4.1.1 Spektroskopska analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima Cabernet Sauvignon vina

U tabeli 5 prikazani su rezultati spektroskopske analize sadržaja ukupnih fenola, estara vinske kiseline i ukupnih flavonola određenih po modifikovanoj Glories metodi [Mazza i sar., 1999; Radovanović i sar., 2012a,b] u ispitivanim uzorcima CS vina. Koncentracija ukupnih fenola je praćena na 280 nm i predstavljena kao ekvivalent koncentracije galne kiseline. Ukupni estri vinske kiseline su praćeni na 320 nm (ekvivalent koncentracije kafene kiseline) i ukupni flavonoli na 360 nm (ekvivalent koncentracije kvercetina).

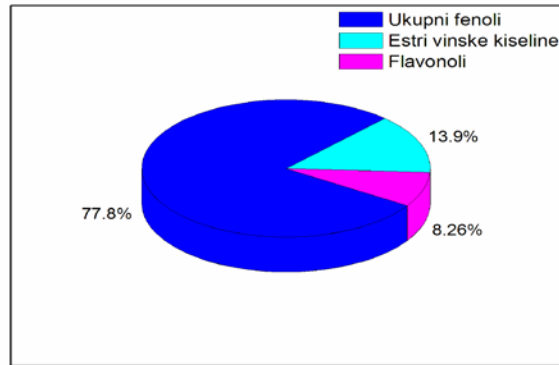
Sva ispitivana CS vina imaju pH vrednost od 3,21 (CS–Alexandrija iz Makedonije) do 3,67 (CS iz Bugarske) sa sadržajem alkohola od 11,5 do 13%.

Analiza spektroskopski dobijenih rezultata je pokazala da se dobijene vrednosti razlikuju u zavisnosti od vinogradarskog i vinskog regiona i proizvođača (vinarije) (Tabela 5.), tako da je koncentracija ukupnih fenola u širokom intervalu od 997,29 do 1968,27 mg/L, koncentracija ukupnih estara vinske kiseline od 199,59 do 352,52 mg/L i koncentracija flavonola od 109,98 do 209,04 mg/L [Radovanović i sar., 2008, 2010a, 201a; 2012b].

Ove vrednosti su najveće kod CS4b vina iz 2009 godine proizvedenog u vinariji Kraljevski vinogradi (Srbija) i zbog toga njihov procentni odnos je prikazan na Slici 13.

Tabela 5. Sadržaj ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola (mg/L), kao i vrednost prisutnog alkohola (%) i pH u izabranim uzorcima Cabernet Sauvignon vina

Vino	Alkohol (%)	pH vrednost	Ukupni fenoli	Estri vinske kiseline	Ukupni flavonoli
CS1	12,0	3,55	1285,39±1,24	220,14±200	115,61±1,25
CS2	12,5	3,28	1550,70±0,18	286,39±0,24	125,99±0,22
CS3	12,5	3,45	1408,55±2,02	261,49±1,25	152,03±1,10
CS4a	13,0	3,41	1759,60±0,96	288,69±0,99	155,20±0,45
CS4b	12,0	3,40	1968,27±1,50	352,52±0,66	209,04±1,05
CS5a	11,5	3,54	1434,37±0,78	210,69±0,67	113,58±0,56
CS5b	11,7	3,46	1785,20±0,30	313,50±0,51	175,69±1,21
CS6a	12,5	3,45	1641,55±0,14	278,50±0,22	175,69±0,25
CS6b	11,5	3,44	1744,22±0,25	311,89±0,92	170,52±0,40
CS7	12,5	3,54	1192,80±1,08	209,03±0,75	120,72±0,77
CS8	11,5	3,55	997,29±1,12	199,59±0,95	109,98±0,78
CS9a	11,5	3,21	1554,70±0,45	250,21±0,98	131,65±1,09
CS9b	11,5	3,25	1631,30±0,22	268,72±0,26	137,68±0,28
CS10	12,5	3,63	1769,80±0,12	259,77±0,25	129,01±0,15
CS11	13,0	3,65	1517,45±0,24	280,66±±0,12	122,84±±0,22
CS12	14,0	3,67	1585,28±1,04	266,11±1,23	150,85±0,97

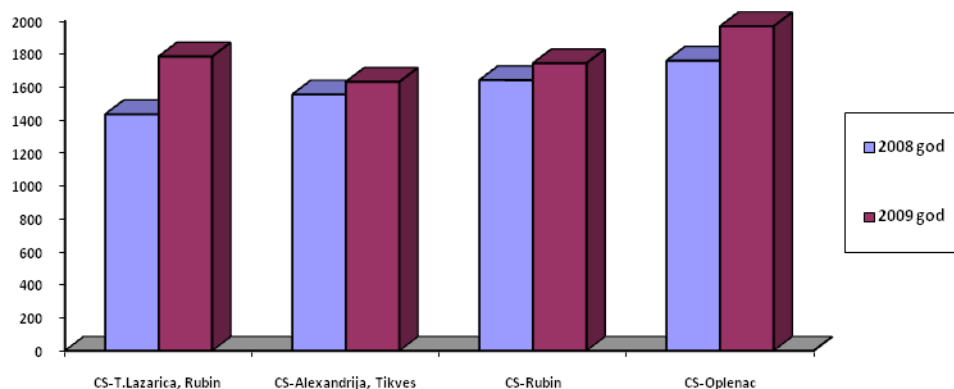


Slika 13. Grafički prikaz procentnog odnosa spektroskopski određenih ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u vinu Cabernet Sauvignon iz vinarije Kraljevski vinogradi

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima za druga ispitivana vina [Cliff i sar., 2007; Lachman i sar., 2007; Piljac i sar, 2005; Simonetti i sar, 1997; Singleton i Rossi, 1965; Stratil i sar.2008].

Zbog praćenja spoljnih uticaja (temperaturnih klimatskih razlika, ekspozicije i osvetljenosti terena) koji utiču na stepena fenolne zrelosti grožđa i fenolnog sastava vina, ispitivana su CS vina iz dve uzastopne godine proizvodnje sa istog vinogradarskog i vinskog rejona i od istog proizvođača: Rubin, Kraljevski vinogradi i Tikveš [Alcalde-Eon i sar., 2006; Connor I sar., 2005; Gil-Munoy i sar., 2010; Downey i sar., 2003; Kennedy i sar., 2000; Revilla i sar, 1997].

Rezultati su pokazali da ispitivana CS vina u dve uzastopne godine imaju veoma različit sastav, tako da se koncentracija ukupnih fenola menja od 5,04 do 30,86%, estrara vinske kiseline od 3,56 do 32,80%, a flavonola od 4,38 do 35,36%, kao što je prikazano u Tabeli 6 i na Slici 14.



Slika 14. Grafički prikaz uticaja godine berbe na fenolni sastav Cabernet Sauvignon od istih proizvođača

Tabela 6. Uticaj godine berbe grožđa i proizvodnje vina na fenolni sastav nekih Cabernet Sauvignon vina

Godina	Vino	Polifenoli	Estri viske kiseline	Flavonoli
2008	Cabernet Sauvignon -	1434,30±0,72	210,69±0,67	113,58±0,56
2009	Terra Lazarica	1785,20±0,30	313,50±0,51	175,69±1,21
2008	Cabernet Sauvignon -	1554,70±0,45	250,21±0,98	131,65±1,09
2009	Alexandrija	1631,30±0,22	268,72±0,26	137,68±0,28
2008	Cabernet Sauvignon -	1759,60±0,96	288,69±0,99	155,20±0,45
2009	Oplenac	1968,27±1,50	352,52±0,66	209,04±1,05
2008	Cabernet Sauvignon -	1641,55±0,12	278,50±0,22	175,69±0,25
2009	Rubin	1744,22±0,25	311,89±0,92	170,52±0,40

Primećeno je da su veće koncentracijske vrednosti dobijene za vina proizvedena 2009 godine, što se slaže sa meterološkim podacima. Letnji period u 2009 godini je bio sa povećanim sunčanim danima, što je uticalo na fenolni sastav grožđa ivina [Landroult i sar., 1999; Harris i sar., 2010]. Korelacija između ekoloških uslova lokaliteta tj. terroir-a i kvaliteta vina su predmet daljeg istraživanja.

4.1.2 HPLC analiza neflavonoidnih jedinjenja u uzorcima Cabernet Sauvignon vina

Fenolna jedinjenja u grožđu i vinama (Opšti deo) su podeljena po svojoj strukturi pre svega na fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture i flavonoide. Svaka grupa ima svoje podgrupe, takođe, na osnovu strukturnih razlika. Neflavonidna grupa jedinjenja u kojima pripadaju hidoksibenzoeve, hidoksicimetne kiseline i stilbeni zauzimaju veliki deo prisutnih fenolnih jedinjenja u crvenim vinima.

U ovom poglavlju biće izvršena identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u izabranim izorcima Cabernet Sauvignon vina, da bi mogli da izvršimo upoređivanje rezultata sa njihovom antioksidativnom i antimikrobnom delovanju.

4.1.2.1 HPLC analiza fenolnih kiselina u uzorcima Cabernet Sauvignon vina

U analiziranim uzorcima Cabernet Sauvignon vina iz različitih vinogradarskih i vinskih regiona Balkana određen je sadržaj deset fenolnih kiselina i trans – resveratrol, kao glavnog predstavnika stilbena, na osnovu retencionih vremena i apsorpcionih maksimuma njihovih standardnih jedinjenja (Eksperimentalni deo).

U tabeli 7 su date vrednosti koncentracija nekih hidoksibenzoevih kiselina prisutnih u ispitivanim uzorcima CS vina: galne, vanilinske, siringinske i elagilne kiseline, određenih na 280 nm, kao i ukupne vrednosti za hidoksibenzoeve kiseline.

Tabela 7. Sadržaj hidroksibenzoevih kiselina u izabranim Cabernet Sauvignon vinima, određenih na 280 (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	Galna kiselina (1)	Vanilinska kiselina (2)	Siringinska kiselina (3)	Elaginska kis. (4)	Ukupne hidroksibenzoeve kiseline
CS1	32,42 \pm 0,98	2,61 \pm 0,24	2,23 \pm 0,27	5,19 \pm 0,14	42,45 \pm 0,42
CS2	76,29 \pm 0,18	1,14 \pm 0,35	4,09 \pm 0,48	5,99 \pm 0,22	87,51 \pm 0,16
CS3	31,93 \pm 1,22	2,07 \pm 0,21	2,21 \pm 0,66	5,78 \pm 0,24	41,99 \pm 0,33
CS4a	75,04. \pm 0,87	1,70 \pm 0,21	4,75 \pm 0,45	12,37 \pm 0,26	93,86 \pm 0,44
CS4b	70,06 \pm 0,12	2,12 \pm 0,24	8,18 \pm 0,13	15,90 \pm 0,43	96,26 \pm 0,09
CS5a	56.66 \pm 0,67	/	/	5,46 \pm 0,76	56,66 \pm 0,78
CS5b	63.84 \pm 0,91	1,11 \pm 0,18	10,86 \pm 0,19	4.66 \pm 0,98	62,12 \pm 0,36
CS6a	64,05 \pm 0,92	1,55 \pm 0,25	8,08 \pm 0,55	/	73,68 \pm 0,09
CS6b	66,59 \pm 0,33	0,64 \pm 0,44	10,81 \pm 0,28	/	78,04 \pm 0,41
CS7	45,40 \pm 0,77	2,59 \pm 0,99	0,51 \pm 0,43	3,73 \pm 0,88	44,77 \pm 0,34
CS8	22,82 \pm 0,98	0,44 \pm 0,55	0,51 \pm 0,18	4,05 \pm 0,47	19,72 \pm 0,68
CS9a	101,57 \pm 1,09	1,09 \pm 0,09	4,52 \pm 0,19	4,91 \pm 0,93	102,27 \pm 0,71
CS9b	110,66 \pm 0,37	4,42 \pm 0,59	10,73 \pm 0,67	13,85 \pm 0,68	139,66 \pm 0,08
CS10	112,37 \pm 0,17	1,33 \pm 0,95	8,03 \pm 0,99	5,12 \pm 0,92	126,85 \pm 0,55
CS11	95,79 \pm 1,14	1,22 \pm 0,37	2,23 \pm 0,28	4,79 \pm 0,36	104,03 \pm 0,54
CS12	69,14 \pm 0,78	0,69 \pm 0,99	0,55 \pm 0,16	4,04 \pm 0,91	74,42 \pm 0,43

Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da se dobijene vrednosti za hidroksibenzojeve kiseline nalaze u intervalu od 19,72 do 130,77 mg/L. Najveće vrednosti su dobijene za Cabernet Sauvignon vino proizvedeno u vinariji Lozar (CS - Čardak) 2009 godine.

Kao najprisutnija hidroksibenzojeva kiselina je galna kiselina i njena koncentracija je najveća kod Cabernet Sauvignon vina iz Makedonije: Alexandria (110,66 mg/L) i Čardak (112,37 mg/L), proizvedenih 2009 godine.

U tabeli 8 date su koncentracije hidroksicimetnih kiselina: trans-kaftarna, trans-coutaric acid trans-kutarna (trans-coutaric acid), hlorogenska, trans-kafena, para-kumarna i ferulna kiselina, određene na 320 nm.

Pri analizi ovih rezultata može se zaključiti da je najveća koncentracija hidroksicimetnih kiselina (46,90 mg/L) nađena kod CS - Čardak, proizvedenog 2009 godine u vinariji Lozar (Veles).

U ispitivanim uzorcima Cabernet Sauvignon vina trans-kaftarna kiselina je najdominantna hidroksicimetna kiselina i najveća njena koncentracija je nađena kod uzoraka CS vina iz Oplenca (26,65 mg/L) i CS-Alexandria (22,98 mg/L).

U tabeli 8, takođe su date zbirne vrednosti koncentracija za sve detektovane fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne) u ispitivanim uzorcima Cabernet Sauvignon vina, koji se nalaze u intervalu od 38,94 mg/L za CS8 (CS iz Cevina) do 176,67 mg/L za CS10 (CS - Čardak iz Stobija). Analizirana vina sa bogim sadržajem fenolnih kiselina (iznad 100 mg/L) su vina iz vinarija: Tikveš, Rubin, Kraljevski vinogradi (Oplenac) i Sekulović (Trebinje).

Table 8. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u izabranim Cabernet Sauvignon vina, određeni na 320 nm (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	t-kaftarna kis. (1)	t-kutarna kis. (2)	Kafena kis. (3)	Hlorogen-ska kis.(4)	p-Kumarna kis. (5)	Ferulna kis.(6)	Ukupne hidroksicimetne kiseline
CS1	17,63 \pm 1,12	2,06 \pm 1,21	4,54 \pm 1,12	2,86 \pm 0,66	8,28 \pm 1,21	0,57 \pm 0,46	36,11 \pm 0,16
CS2	15,20 \pm 0,18	8,33 \pm 0,11	2,76 \pm 0,24	2,24 \pm 0,62	2,54 \pm 0,24	3,41 \pm 0,29	34,48 \pm 0,42
CS3	18,19 \pm 0,97	1,59 \pm 0,93	7,22 \pm 0,97	3,51 \pm 0,98	3,95 \pm 0,93	2,91 \pm 1,23	37,37 \pm 0,55
CS4a	26,65 \pm 0,89	4,37 \pm 0,58	1,48 \pm 0,51	0,13 \pm 0,20	0,50 \pm 0,78	0,27 \pm 0,44	33,40 \pm 0,43
CS4b	24,67 \pm 0,09	2,09 \pm 0,31	1,49 \pm 0,22	0,85 \pm 0,11	2,38 \pm 0,13	2,83 \pm 0,64	34,31 \pm 0,23
CS5a	19,86 \pm 0,28	9,31 \pm 0,15	8,91 \pm 0,18	0,67 \pm 0,66	5,58 \pm 0,35	0,54 \pm 0,15	44,87 \pm 0,67
CS5b	22,21 \pm 0,87	7,28 \pm 0,48	5,28 \pm 0,69	2,05 \pm 0,58	6,06 \pm 0,44	0,36 \pm 0,63	43,24 \pm 0,86
CS6a	21,06 \pm 0,37	1,54 \pm 0,49	5,94 \pm 0,89	2,05 \pm 0,13	4,48 \pm 0,54	2,09 \pm 0,55	37,16 \pm 0,42
CS6b	16,27 \pm 0,85	9,32 \pm 0,33	6,79 \pm 0,98	2,69 \pm 0,48	3,67 \pm 0,98	0,39 \pm 0,98	39,13 \pm 0,44
CS7	14,95 \pm 0,13	7,16 \pm 0,78	1,97 \pm 0,56	/	1,07 \pm 0,45	0,78 \pm 0,18	25,93 \pm 0,86
CS8	4,97 \pm 0,25	2,09 \pm 0,91	2,07 \pm 0,77	0,53 \pm 0,45	0,67 \pm 1,02	0,79 \pm 0,97	11,65 \pm 0,78
CS9a	22,98 \pm 0,56	3,55 \pm 0,65	3,75 \pm 0,56	2,34 \pm 0,24	2,63 \pm 0,15	0,81 \pm 0,56	36,06 \pm 0,06
CS9b	21,87 \pm 0,24	3,81 \pm 0,37	3,81 \pm 0,92	0,82 \pm 0,06	5,27 \pm 0,42	1,23 \pm 0,49	36,81 \pm 0,09
CS10	10,22 \pm 0,34	7,67 \pm 0,37	3,93 \pm 0,39	1,46 \pm 0,31	2,77 \pm 0,33	5,08 \pm 0,95	24,42 \pm 0,18
CS11	18,51 \pm 1,09	1,49 \pm 1,23	7,87 \pm 1,09	/	8,35 \pm 1,23	2,79 \pm 1,11	38,210,35
CS12	21,26 \pm 0,37	9,98 \pm 0,47	5,00 \pm 0,18	/	3,06 \pm 0,98	1,21 \pm 0,55	39,77 \pm 0,56

Rezulti dobijeni za fenolne kiseline su u saglasnosti sa literaturnim podacima [Jeffery i sar., 2008; Kallithraka i sar., 2006; Hakkinen i sar., 1998; Harris i sar., 2010; Pour Nikfardjam i sar, 2006; Seruga i sar, 2011].

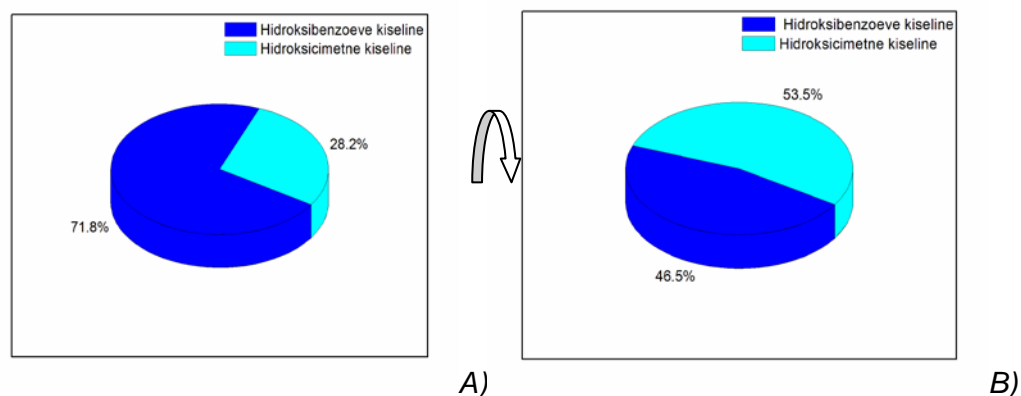
Takođe, prikazan je i procentni odnos najdominantne kiseline (galne), ukupnih hidroksi-benzoevih i ukupnih hidroksicimetnih kiselina u odnosu na ukupne određene fenolne kiseline u ispitivanim uzorcima Cabernet Sauvignon vina. Analizom dobijenih procentnih vrednosti može se zaključiti da prisustvo galne kiseline može dostići vrednosti do 65,06 % kod Cabernet sauvignon vino iz Pivke, 63,92 % kod CS – Alexandria i 62,03 % kod CS - Sekulović iz Trebinja.

Procentni odnos između hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina se kreće od 41,45 do 67,88 %. Može se zaključiti da CS vina iz Podgorice i Poreča imaju veći procenat hidroksicimetnih kiselina (> 50 %), dok srpska, makedonska i bugarska Cabernet sauvignon vina su bogatija sa hidroksibenzoevim kiselinama (> 60 %).

Tabela 9. Ukupne fenolne kiseline (mg/L) i procentno prisustvo galne kiseline, hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina (%) u Cabernet Sauvignon vinima

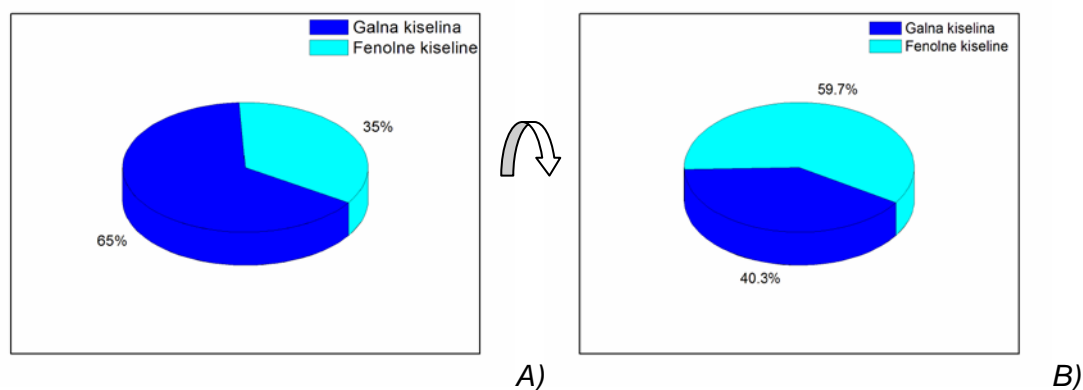
Vino	Ukupne fenolne kiseline (mg/L)	Galna kiselina (%)	Hidroksibenzoeve kiseline (%)	Hidroksicimetne kiseline (%)
CS1	78,39±0,46	40,33	46,35	53,39
CS2	122,99±0,24	62,03	66,28	33,72
CS3	79,36±0,19	36,55	41,45	58,55
CS4a	127,26±0,55	58,72	69,07	30,93
CS4b	130,57±0,17	50,70	64,22	35,78
CS5a	106,99±0,43	52,96	61,17	47,04
CS5b	123,36±0,36	51,75	52,96	38,83
CS6a	116,13±0,27	55,15	63,45	36,55
CS6b	117,17±0,32	56,83	66,60	33,40
CS7	78,16±0,26	58,09	62,05	37,95
CS8	38,94±0,21	58,60	61,04	38,96
CS9a	161,15±0,24	63,08	66,51	33,49
CS9b	176,47±0,67	63,92	71,77	28,23
CS10	151,27±0,12	61,52	67,88	31,76
CS11	142,24±0,48	65,06	67,40	32,60
CS12	114,19±0,34	60,55	61,63	38,37

Na Slici 15 grafički je prikazan procentni odnos između hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina kod uzorka Cabernet Sauvignon - Alexandria i Cabernet Sauvignon iz Plantaže:



Slika 15. Grafički prikaz procentnog odnosa između hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u vinima: Cabernet Sauvignon - Alexandria (A) i Cabernet Sauvignon vino iz Plantaže (B)

Na Slici 16 grafički su date granične vrednosti galne kiseline u odnosu prema ukupnoj vrednosti fenolnih kiselina u Cabernet Sauvignon vino iz vinarije Pivka (A) i Cabernet Sauvignon vino iz vinarije Lagune (B):

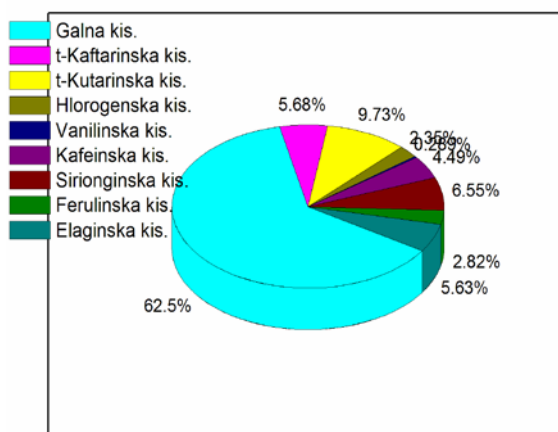


Slika 16. Grafički prikaz procentne granične vrednosti galne kiseline u odnosu prema ukupnoj vrednosti fenolnih kiselina u Cabernet Sauvignon iz vinarije Pivka (A) i Cabernet Sauvignon iz vinarije Lagune (B)

Upoređivanjem detektovanih fenolnih kiselina po njihovom prisustvu u ispitivanim Cabernet Sauvignon vinima, odnosno po vrednostima koncentracija odnos bi bio

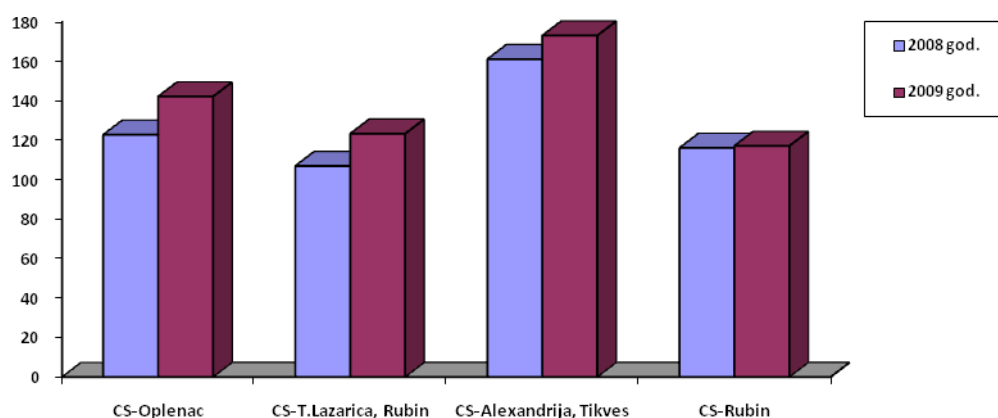
sledeći: galna kiselina > trans-kaftarna kiselina > trans-kutarna kiselina > siringinska kiselina > elaginska kiselina > p-kumarna kiselina > kafena kiselina > hlorogenska kiselina > ferulna kiselina > vanilinska kiselina.

Na sledećoj slici prikazana je distribucija svih fenolnih kiselina kod najbogatijeg uzorka vina tj CS – Čardak iz Lozara:



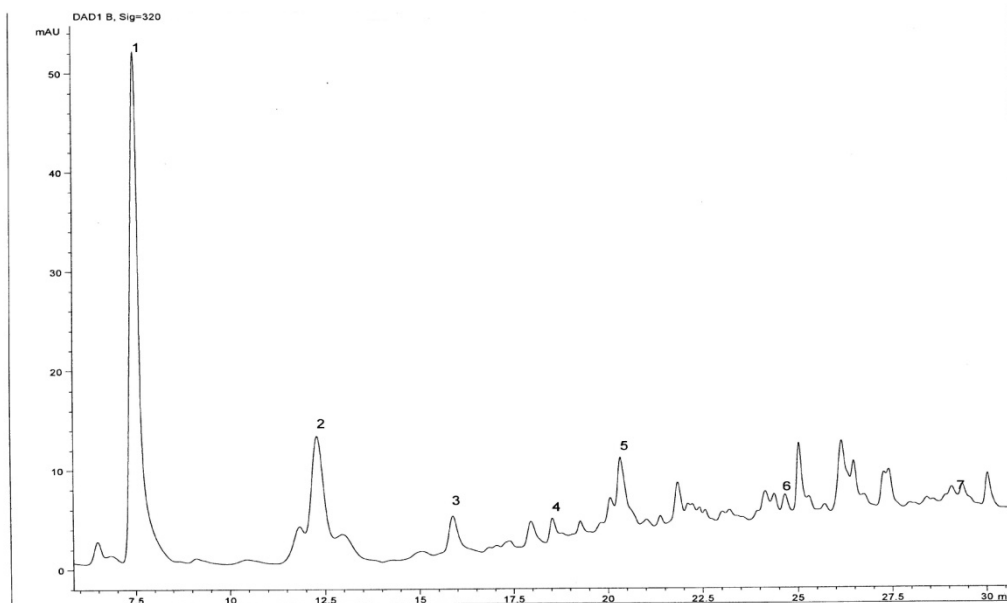
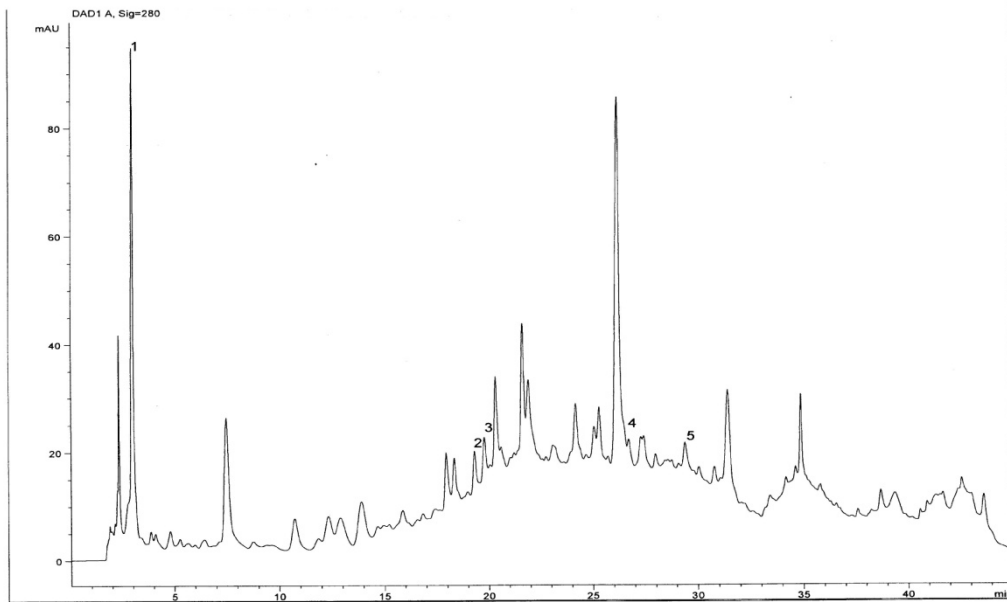
Slika 17. Distribucija u procentima prisutnih fenolnih kiselina u Cabernet Sauvignon - Čardak iz vinarije Lozar

Zbog uticaja meteroloških uslova na zrelost grožđa, upoređeni su rezultati dobijenih fenolnih kiselina za CS vina iz dve uzastopne godine (2008. i 2009.) od tri ista proizvođača (Rubina, Kraljevskih vinograda i Tikveša):



Slika 18. Grafički prikaz uticaja meteroloških uslova na berbu grožđa i koncentraciju fenolnih kiselina, detektovanih HPLC metodom u Cabernet Sauvignon vinima od istih proizvođača

Rezultati su pokazali da postoji razlika u koncentraciji određenih fenolnih kiselina, tako da CS vina iz 2009 godine imaju povećanu koncentraciju fenolnih kiselina u poređenju sa istim CS vinima iz 2008 godine. Koncentracija ukupnih fenolnih kiselina se povećava na sledeći način: kod CS vina iz Oplenca za 7,52 %, kod CS - Terra Lazarica iz Rubina za 13,27 %, kod CS - Alexandrija iz Tikveša za 6,92% i kod CS iz Rubina za 0,91%.



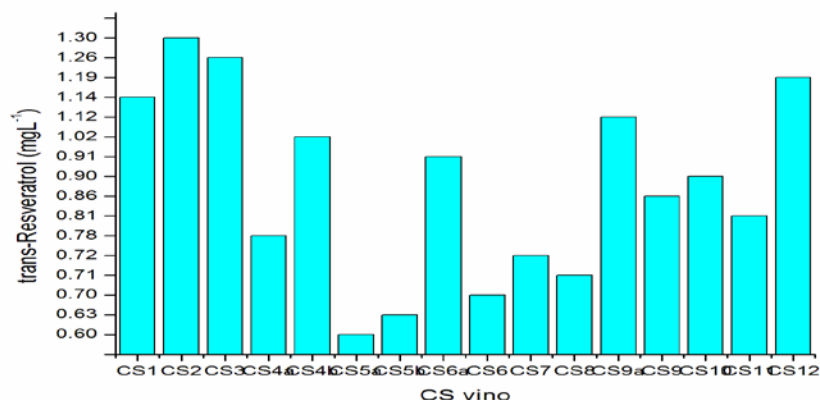
Slika 19. HPLC dijagram fenolnih kiselina u Cabernet Sauvignon - Alexandria na 280 i 320 nm (imena fenolnih kiselina su data u Tabelama 7 i 8)

4.1.2.2 HPLC analiza trans-resveratrola u uzorcima Cabernet Sauvignon vina

U grupi ne flavonoidnih jedinjenja pripada i trans-resveratrol, kao najznačajniji predstavnik stilbena. Kao što je u Opštom delu pokazano trans-resveratrol je biološki veoma značajna fenolna komponenta koja se nalazi u grožđu i vinima, jer pokazuje hemoprotektivnu aktivnost. [Baxter, 2008; Docherty i sar., 2001]. U Tabeli 10 i na Slici 20 date su dobijene vrednosti o sadržaju trans-resveratrola, na osnovu standardne jednačine i apsorpcionog maksima određenog na 320 nm:

Tabela 10. Sadržaj trans-resveratrola u analiziranim Cabernet Sauvignon vina na 320 nm (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	trans-Resveratrol (7)
CS1	1,14 \pm 0,12
CS2	1,03 \pm 0,10
CS3	1,26 \pm 0,23
CS4a	1,78 \pm 0,14
CS4b	1,64 \pm 0,11
CS5a	0,60 \pm 0,08
CS5b	0,69 \pm 0,10
CS6a	0,91 \pm 0,09
CS6b	0,70 \pm 0,08
CS7	0,72 \pm 0,11
CS8	0,71 \pm 0,12
CS9a	1,02 \pm 0,23
CS9b	0,86 \pm 0,22
CS10	1,29 \pm 0,12
CS11	0,81 \pm 0,09
CS12	1,19 \pm 0,21



Slika 20. Grafički prikaz sadržaja trans-resveratrola u ispitivanim Cabernet Sauvignon vinima

Rezultati pokazuju da se ovo fenolno jedinjenje u ispitivanim uzorcima CS vina nalazi u malim količinama i to od 0,60 mg/L kod Cabernet Sauvignon - Terra Lazarica, proizvedenog 2008 godine od Rubina do 1.64 mg/L kod Cabernet Sauvignon - Alexandria, proizvedenog 2009 godine u vinariji Tikveš. Rezultati su u saglasnosti sa literaturno nađenim vrednostima [Jenadet i sar., 1991; Mark i sar., 2005].

4.1.3 HPLC analiza flavonoidnih jedinjenja u uzorcima Cabernet Sauvignon vina

U flavonoide po svojoj strukturi pripada veliki broj fenolnih jedinjenja koji se razlikuju na osnovu međusobne pozicije prstena B i C, oksidacionog stanja i funkcionalnih (hidroksi i metoksi) grupa prisutnih na prstenu C [Beecher, 2003].

Raznovrsnost struktura flavonoida je posledica dodatne hidroksilacije, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata i najvažnije, glikolizacije hidroksilnih grupa (O-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (C-glikozida).

U grožđu ova jedinjenja su prisutna najčešće u monoglikozidnoj formi, sa ostacima šećera na OH-grupi u poziciji C-3 na prstenu C.

Kao najprisutniji i biološki najznačajniji flavonoidi u grožđu i vinu su: flavan-3-oli, flavoni, flavanoni, flavonoli i antocijanini [Bakker, 1999; Cliff i sar., 2007; Liu i sar., 2000; Gómez-Serranillos i sar., 2009; Gry i sar., 2007; De Beer i sar., 2003, 2005; Heinonen i sar., 1998; Fikselova i sar., 2010; Meiers i sar., 2001; Minussi i sar., 2004; Rice-Evans i sar., 1995; Rodriguez i sar., 2007; Sanchez-Moreno i sar., 1999; Sato i sar., 1996; Tarko i sar., 2008; Van Asker i sar., 1996; Yoshihito Sakata i sar., 2010; Youdim, 2002; Urqiaga i Leighton, 2000].

4.1.3.1 Flavan-3-oli u analiziranim uzorcima Cabernet Sauvignon vina

U Tabeli 8 date su koncentracije najzastupljenijih flavan-3-ola u ispitivanim uzorcima CS vina, kao što su: (+)-katehin, procijanidin B2, odnosno dimer B tipa: (-)-epikatehin-(4 β →8)-(-)-epikatehin, (-)-epikatehin i (-)-epigalokatehingalat, detektovane fluorescentnim detektorom na 275/322 nm.

Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da se vrednosti koncentracijaukupnih flavan-3-ola se nalaze u granicama od 49,20 do 143,75 mg/L.

Najveće vrednosti su dobijene u Cabernet Sauvignon vinu iz vinarije Mezzek i Cabernet Sauvignon vinu (proizvedenog 2009 godine) iz vinarije Kraljevski vinogradi [Radovanović i sar., 2010a, 2012a; 2012b].

U svim uzorcima Cabernet Sauvignon vina najdominantniji je (+)-katehin i nalazi se u opsegu koncentracija od 15,23 (CS8) do 56,49 mg/L (CS12). Nakon toga sledi (-)-epikatehin sa vrednostima koncentracija od 8,35 (CS2) do 38,61 mg/L (CS12).

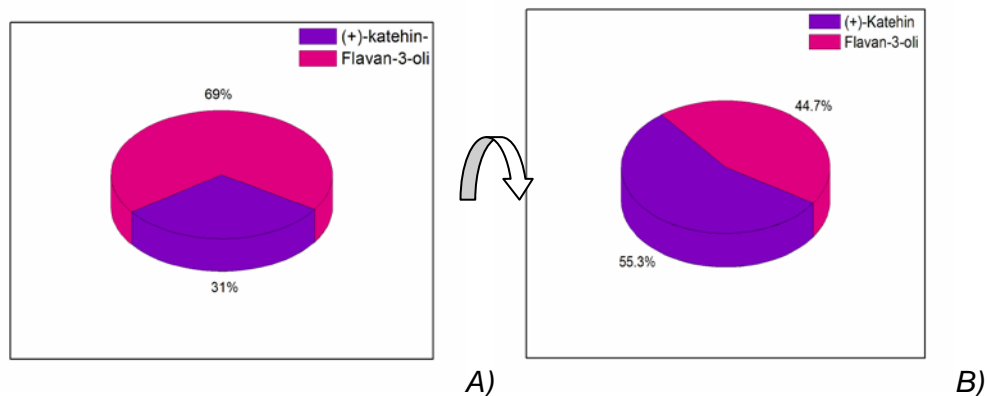
Table 11. Sadržaj flavan-3-ola u Cabernet Sauvignon vinima (mg/L±SD, n = 3) na 275/322 nm

Vino	(+)-Katehin (1)	Procijanidin B₂ (2)	(-)-Epikatehin (3)	(-)-Epigallo-katechingalat (4)	Ukupni flavan-3-oli
CS1	29,18±0,32	7,99 ±0,88	15,22±0,87	3,10±0,23	55,49±0,69
CS2	30,61±0,32	8,75±0,32	9,55±0,32	7,76±0,35	56,67±0,24
CS3	28,86±0,21	19,20±1,09	16,10±1,34	5,24±0,46	64,16±0,88
CS4a	19,69±0,85	11,26±0,97	15,45±1,23	9,53±0,26	55,93±1,02
CS4b	49,89±0,32	19,51±0,32	10,68±0,33	17,05±0,68	97,13±1,34
CS5a	23,55±0,05	13,62±0,85	20,00±0,07	3,58±0,11	60,75±0,74
CS5b	36,34±0,89	15,72±0,89	21,55±0,89	7,56±0,12	81,17±0,39
CS6a	18,72±1,02	18,58±0,78	11,18±0,95	3,65±0,55	52,13±1,35
CS6b	28,98±0,32	11,53±0,45	11,49±0,38	4,34±0,65	56,34±1,55
CS7	36,24±0,17	23,94±0,56	24,29±0,95	8,32±0,33	92,79±0,56
CS8	15,23±0,23	11,70±0,55	12,51±0,46	9,76±0,24	49,20±0,41
CS9a	27,96±0,45	16,23±1,20	26,30±1,06	4,99±0,58	75,48±0,83
CS9b	34,69±0,25	26,37±1,22	23,64±1,16	9,64±0,31	94,34±0,43
CS10	38,59±0,14	18,24±0,33	18,62±0,36	3,25±0,66	78,70±1,35
CS11	28,35±0,32	9,61±0,52	8,35±0,67	4,95±0,46	51,26±1,15
CS12	56,49±0,16	45,54±0,25	38,61±0,45	3,11±0,32	143,75±0,29

U Tabeli 12 date su procentne vrednosti (+)-katehina u odnosu na ukupne vrednosti flavan-3-ola u uzorcima vina. Rezultati pokazuju da se nalazi u granicama od 30,96 (CS vino iz Cevina) do 55,30 % (CS vino iz Pivke) i 54,01% (CS vino iz Sekulovića):

Tabela 12. Procentni prinos (+)-katehina u ispitivanim Cabernet Sauvignon vinima

<i>Vino</i>	<i>(+)-Katehin (%)</i>
<i>CS1</i>	52.59
<i>CS2</i>	54.01
<i>CS3</i>	44.98
<i>CS4a</i>	33.98
<i>CS4b</i>	38.75
<i>CS5a</i>	38.77
<i>CS5b</i>	44.77
<i>CS6a</i>	33.53
<i>CS6b</i>	47.73
<i>CS7</i>	39.06
<i>CS8</i>	30.96
<i>CS9a</i>	37.04
<i>CS9b</i>	36.90
<i>CS10</i>	49.03
<i>CS11</i>	55.30
<i>CS12</i>	39.58

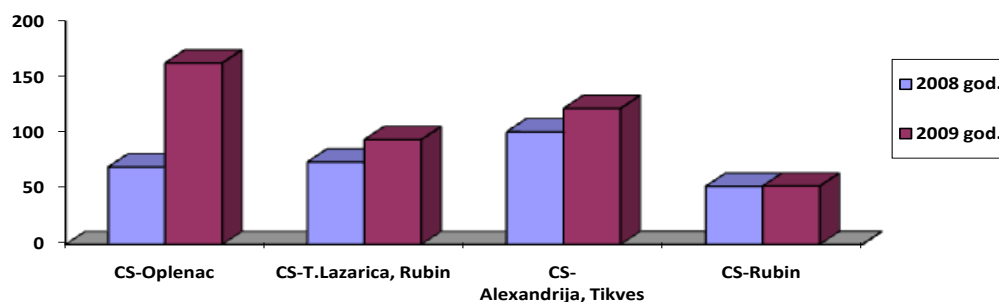


Slika 21. Grafički prikaz procentnog odnosa (+)-katehina u poređenju sa ukupnim flavan-3-olima kod uzoraka Cabernet Sauvignon vina iz vinarije Cevin (A) i Pivke (B)

Analiza dobijenih rezultata je pokazano da je najbogatije vino Caberent Sauvignon flavan-3-olima vino iz vinarije Katarzyna Estate Mezzeka.

Redosled prisutnih flavan-3-ola po njihovim vrednostima koncentracija je sledeći: (+)-katehina > (-)-epikatehin > procijanidin B₂ > (-)-epigallokatehingalat.

Procijanidin B₂, po svojoj strukturi: (-)-epikatehin-(4-β-8 (-)-epikatehin, pripada grupi tanina i je prisutan u većim koncentracijama u Cabernet Sauvignon vinu iz vinarije Kraljevski vinogradi (47,27 mg/L) i vinu iz vinarije Mezzek (45,54 mg/L), a najmanje u Cabernet Sauvignon vinu iz vinarije Laguna (7,99 mg/L).



Slika 22. Grafički prikaz uticaja godine berbe na koncentraciju flavan-3-ola u Cabernet Sauvign vinima istih proizvođača

Zbog praćenja uticaja godine berbe grožđa, upoređivane su nađene koncentracije za flavan-3-ole u Cabernet Sauvignon vinima iz 2008 i 2009 godine od tri proizvođača (Rubin, Kraljevski vinogradi i Tikveš).

Rezultati su pokazali da postoji razlika u njihovoj koncentraciji, tako da Cabernet Sauvignon vina proizvedena u 2009 godine imaju povećanu koncentraciju flavan-3-ola u poređenju sa istim Cabernet Sauvignon vinima proizvedenim 2008 godine.

Dobijene vrednosti su u saglasnosti sa literaturnim podacima za vina iz Hrvatske, Grčke i Turske [Anli i Vural, 2009; Katalinić i sar., 2004; Kallithraka i sar., 2006; Piljac i sar., 2005] i ostalim ispitivanim vinima [Bartolome, 1996; Luiz 2011; Seruga i sar, 2011; Singleton I Trousdale, 1992].

4.1.3.2 Flavonoli, flavoni i flavanoni u uzorcima Cabernet Sauvignon vina

U Tabeli 12 date su određene koncentracije u Cabernet Sauvignon vinima za najprisutnije flavonole, kao što su: kvercetin-3-glikozid, rutin (kvercetin-3-O-rutinozid), miricetin, morin, kvercetin i kemferol. Sva jedinjenja su određena na 360 nm, na osnovu retencionih vremena i apsorpcionih maksimuma njihovih standardnih jedinjenja (eksperimentalni deo).

Analizom rezultata može se uočiti da se dobijene vrednosti koncentracija razlikuju, tako da ukupna koncentracija određenih flavonola se nalazi u intervalu od 11,80 do 35,15 mg/L. Najveće vrednosti su nađene u Cabernet sauvignon vinu iz vinarskog podruma Plantaža.

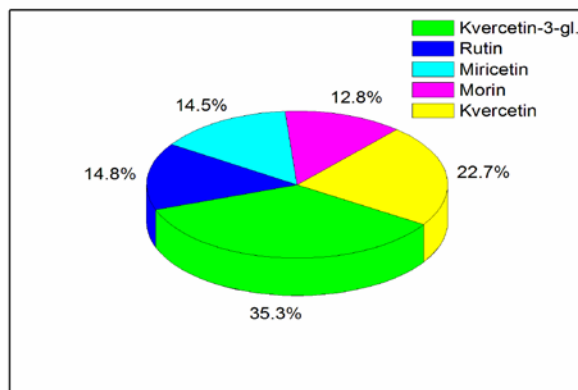
Dobijeni podatci su u saglasnosti sa literaturnim podacima za druga analizirana vina [Anli i Vural, 2009; Arnous i sar., 2002; Braicu i sar., 2011; Jeffery i sar., 2008; Kallithraka i sar., 2006; McDonald i sar., 1998; Pour Nikfardjam i sar., 2006].

Tabela 13. Sadržaj flavonola u Cabernet Sauvignon vinima na 360 nm (mg/L \pm SD, n =3)

Vino	Kvercetin-3-glikozid (1)	Rutin (2)	Miricetin (3)	Morin (4)	Kvercetin (6)	Kemferol (8)	Ukupni flavonoli
CS1	4,68 \pm 0,85	7,34 \pm 0,1	2,17 \pm 0,16	3,93 \pm 0,98	1,46 \pm 0,98	/	19,58 \pm 0,17
CS2	2,61 \pm 0,16	4,40 \pm 0,15	0,87 \pm 0,16	3,52 \pm 0,16	1,36 \pm 0,16	/	12,76 \pm 0,34
CS3	12,32 \pm 0,57	5,18 \pm 0,16	5,05 \pm 0,16	4,46 \pm 0,46	7,92 \pm 0,60	0,22 \pm 0,15	35,15 \pm 0,66
CS4a	2,22 \pm 1,05	4,82 \pm 0,33	/	5,76 \pm 1,09	1,42 \pm 0,89	/	14,83 \pm 0,87
CS4b	10,82 \pm 0,25	9,91 \pm 0,32	3,91 \pm 0,16	2,53 \pm 0,16	3,77 \pm 0,14	0,72 \pm 0,15	32,32 \pm 0,45
CS5a	4,66 \pm 0,85	2,81 \pm 0,16	/	4,68 \pm 0,96	/	/	12,15 \pm 0,18
CS5b	4,65 \pm 0,86	3,50 \pm 0,24	/	3,10 \pm 0,86	1,03 \pm 0,11	/	12,28 \pm 0,67
CS6a	4,01 \pm 0,14	3,37 \pm 0,19	0,78 \pm 0,16	2,78 \pm 0,78	0,48 \pm 0,16	0,38 \pm 0,55	12,22 \pm 0,19
CS6b	4,22 \pm 0,88	5,34 \pm 0,74	0,98 \pm 0,16	3,78 \pm 0,66	1,86 \pm 0,99	0,43 \pm 0,43	16,67 \pm 0,85
CS7	1,53 \pm 0,78	2,94 \pm 0,12	2,42 \pm 0,16	4,85 \pm 0,55	0,63 \pm 0,95	/	12,37 \pm 0,13
CS8	6,97 \pm 0,98	3,68 \pm 0,16	0,60 \pm 0,16	3,82 \pm 0,67	3,03 \pm 0,77	0,45 \pm 0,15	18,55 \pm 0,45
CS9a	8,19 \pm 1,25	4,81 \pm 0,21	/	3,41 \pm 1,12	2,41 \pm 0,52	/	19,12 \pm 0,41
CS9b	7,70 \pm 0,16	5,72 \pm 0,16	/	3,46 \pm 0,16	0,65 \pm 0,16	/	17,53 \pm 0,34
CS10	10,73 \pm 0,16	2,53 \pm 0,15	2,76 \pm 0,16	4,82 \pm 0,15	1,97 \pm 0,14	0,62 \pm 0,19	23,43 \pm 0,52
CS11	3,35 \pm 0,16	3,18 \pm 0,16	1,33 \pm 0,16	3,07 \pm 0,23	1,10 \pm 0,56	/	12,03 \pm 0,12
CS12	3,35 \pm 0,99	6,30 \pm 0,16	1,76 \pm 0,16	2,51 \pm 0,75	5,04 \pm 1,23	1,34 \pm 0,22	20,30 \pm 0,15

Ako uporedimo flavonole po njihovom prisustvu u ispitivanim Cabernet Sauvignon vinima, odnosno po njihovoj koncentraciji odnos je sledeći: kvercetin-3-glikozid > rutin > morin ~ kvercetin > miricetin > kemferol

Na sledećoj slici je prikazan procentni odnos određenih flavonola kod najbogatijeg uzorka (35,15 mg/L) tj kod Cabernet Sauvignon vina iz Plantaže (CS3):



Slika 23. Grafički prikaz procentnog odnosa određenih flavonola na 360 nm u Cabernet Sauvignon vina iz Plantaže

U Tabeli 14 date su procentne vrednosti kvercetina i kvercetin-3-glikozida u odnosu na ukupne vrednosti flavonola u uzorcima Cabernet Sauvignon vina. Kvercetin-3-glukozid prisutan u većoj koncentraciji, u granicama od 12,37 i 12,38 % (CS vino iz Radmilovca i CS - Čardak iz Lozara, 2009 godine) do 41,33 % (CS – Terra Lazarica iz Rubina, 2009 godine).

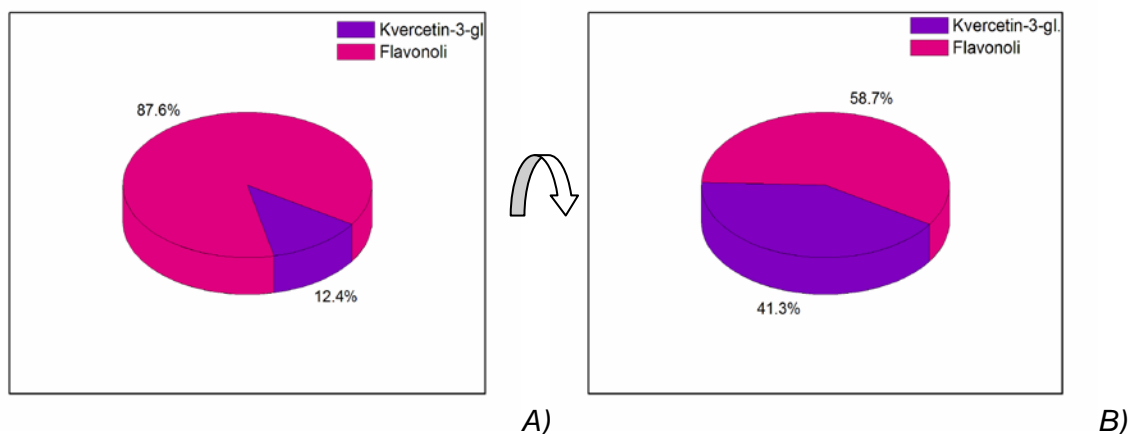
Prisustvo kvercetina je manje i maksimalnu vrednost koncentracije dostiže kod Cabernet Sauvignon vina iz Mezzeka (24,83 %) i Cabernet Sauvignon vina iz Plantaža (22,53 %). Koncentracija kvercetina i njegovog glikozida je značajna u njihovom biološkom delovanju, pre svega kao anticancer agens [Davis i sar., 2005].

Ukupno procentno prisustvo kvercetina i kvercetin-3-glikozida se nalazi u intervalu od 20,79 do 51,58 i 57,58 % (CS iz Plantaže i CS - Terra Lazarica iz Rubina, 2009 godine):

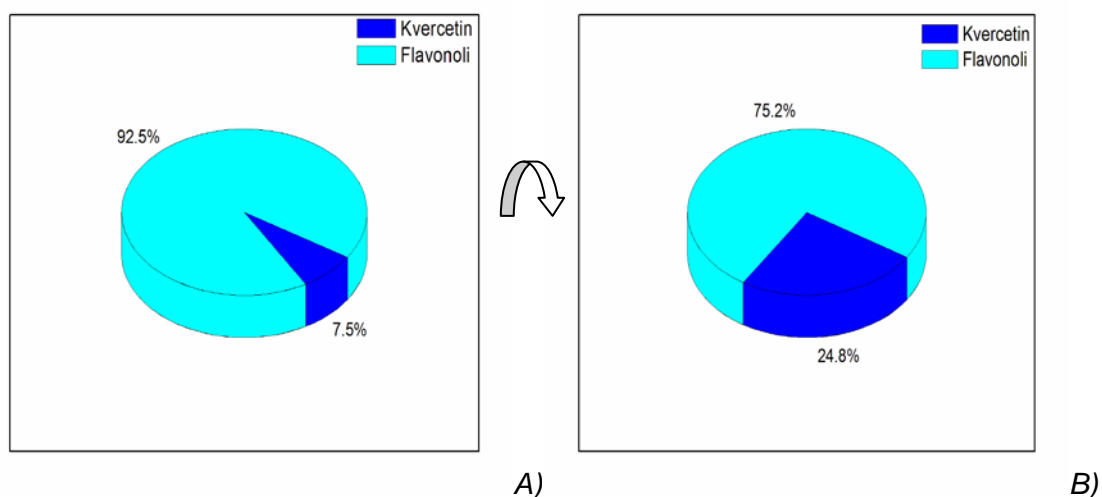
Tabela 14. Zajednički procentni prinos kvercetina i njegovog glikozida u ispitivanim Cabernet Sauvignon vinima

Vino	Kvercetin-3-glikozid (%)	Kvercetin (%)	Ukupno (%)
CS1	23,90	7,46	31,36
CS2	20,45	10,66	31,11
CS3	35,05	22,53	57,58
CS4a	14,77	9,58	24,35
CS4b	33,48	11,66	45,14
CS5a	38,35	/	38,35
CS5b	41,33	10,68	52,01
CS6a	22,68	3,93	26,61
CS6b	33,98	11,16	45,14
CS7	12,37	16,33	28,70
CS8	37,55	10,71	48,26
CS9a	36,40	10,02	46,42
CS9b	36,54	11,03	47,57
CS10	12,38	8,41	20,79
CS11	27,85	9,14	36,99
CS12	16,50	24,83	41,33

Na Slici 24 i 25 grafički su prikazana Cabernet Sauvignon vina u kojima se nalazi kvercetin-3-glikozid i kvercetin u graničnim procentnim vrednostima u odnosu na ukupne flavanole:



Slika 24. Grafički prikaz graničnih procentnih vrednosti kvercetin-3-glikozida u odnosu na ukupne određene flavonole kod uzorka Cabernet Sauvignon vina: A) CS – Čardak (CS7) i B) CS – Terra Lazarica iz Rubina, 2009 godine (CS5b)



Slika 25. Grafički prikaz graničnih procentnih vrednosti kvercetina u odnosu na ukupne flavonole kod uzorka Cabernet Sauvignon vina iz vinarije Laguna (A) i kod Cabernet Sauvignon vina iz vinarije Mezzek (B)

U Tabeli 15 date su dobijene vrednosti za dva flavona: luteolin i apigenin, određenih na 360 nm i jednog flavanona – naringin, određenog na 280 nm.

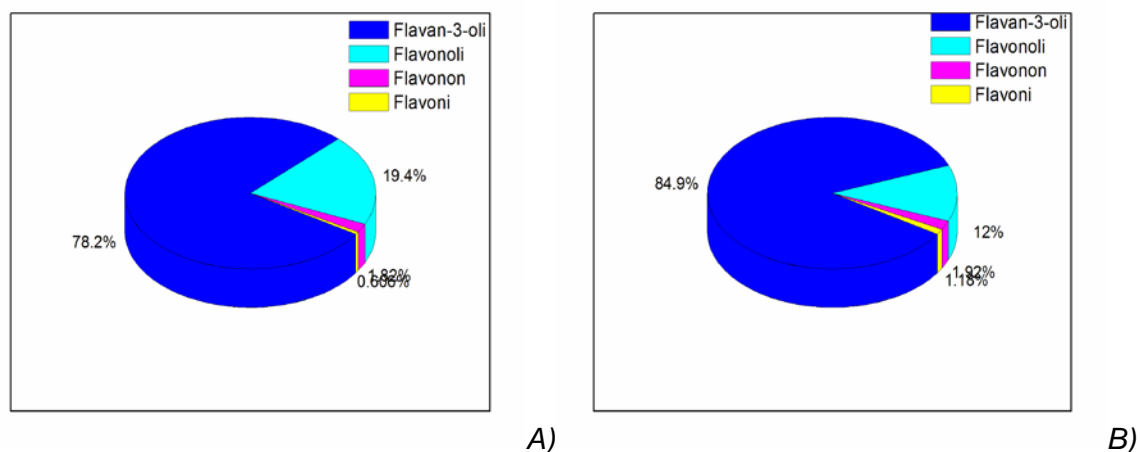
Tabela 15. Sadržaj luteolina i apigenina na 360 nm, naringina na 280 nm i ukupnih flavonoida na 280, 322/275 i 360 nm u Cabernet Sauvignon vinima (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	Luteolin (5 na 360 nm)	Apigenin (7)	Naringin (5 na 280 nm)	Ukupni flavonoidi (322/275, 280 i 360 nm)
CS1	/	0,21 \pm 0,14	0,88 \pm 0,26	76,16 \pm 0,11
CS2	/	0,72 \pm 0,16	0,73 \pm 0,18	60,88 \pm 0,31
CS3	2,54 \pm 0,11	0,77 \pm 0,67	1,01 \pm 0,15	103,42 \pm 0,21
CS4a	/	/	2,11 \pm 0,13	94,18 \pm 0,34
CS4b	0,88 \pm 0,01	/	4,19 \pm 0,14	134,19 \pm 0,45
CS5a	/	0,32 \pm 0,11	0,66 \pm 0,68	73,88 \pm 0,18
CS5b	/	0,57 \pm 0,25	0,83 \pm 0,68	93,95 \pm 90,51
CS6a	/	0,72 \pm 0,21	0,67 \pm 0,91	65,74 \pm 0,35
CS6b	/	0,45 \pm 0,56	0,99 \pm 0,56	74,45 \pm 0,12
CS7	/	0,12 \pm 0,58	0,86 \pm 0,66	106,14 \pm 0,10
CS8	0,18 \pm 0,55	0,12 \pm 0,12	0,65 \pm 0,68	68,70 \pm 0,55
CS9a	/	2,20 \pm 0,08	6,24 \pm 0,78	103,04 \pm 0,41
CS9b	/	/	6,14 \pm 0,56	118,01 \pm 0,36
CS10	2,76 \pm 0,17	3,21 \pm 0,16	0,92 \pm 0,18	108,89 \pm 0,09
CS11	/	/	0,95 \pm 0,24	64,24 \pm 0,13
CS12	1,02 \pm 0,43	0,91 \pm 0,11	0,65 \pm 0,12	166,63 \pm 0,68

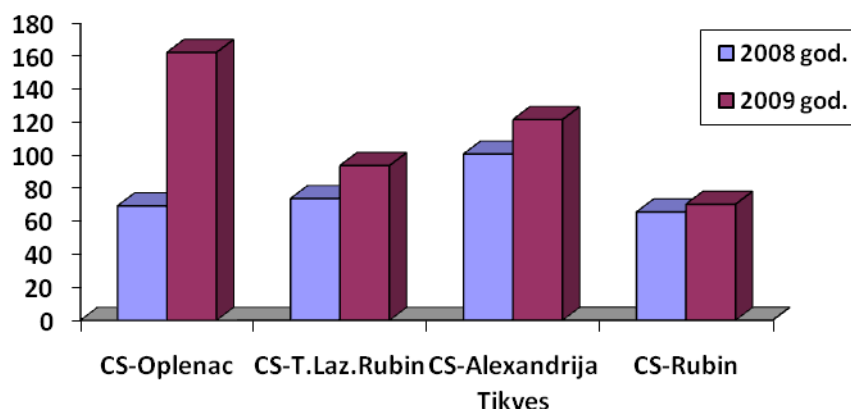
Analizom dobijenih vrednosti očigledno je da flavoni: luteolin i apigenin, kao i flavanon-naringin su slabo prisutni u vinima, tj njihova ukupna vrednost se nalazi u intervalu od 0,12 do 5,97 mg/L.

Sabiranjem dobijenih vrednosti za ukupne koncentracije flavanol-3-ola, detektovanih fluorescentnim dektektorom na 275/322 nm, sa koncentracionim vrednostima flavanola, flavona i flavanona, detektovanih DAD detektorom na 280 i 360 nm dobijaju se podaci o vinima sa najvećm koncentracijom flavonoida.

Kao najbogatije Cabernet Sauvignon vino flavonoidnim jedinjenjima pokazalo se Cabernet Sauvignon vino iz Kraljevskih vinograda, proizvedenog 2009 godine (162,60 mg/L) i CS vino iz Mezzeka (166,63 mg/L). Na Slici 26 prikazani su procentni odnosi određenih flavonoidnih jedinjenja u ovim Cabernet Sauvignon vinima:



Slika 26. Grafički prikaz procentnog odnosa određenih flavonoidnih jedinjenja u Cabernet Sauvignon vinu iz Kraljevskih vinograda (A) i Cabernet Sauvignon vinu iz Katarzyna Estate Mezzeka (B)

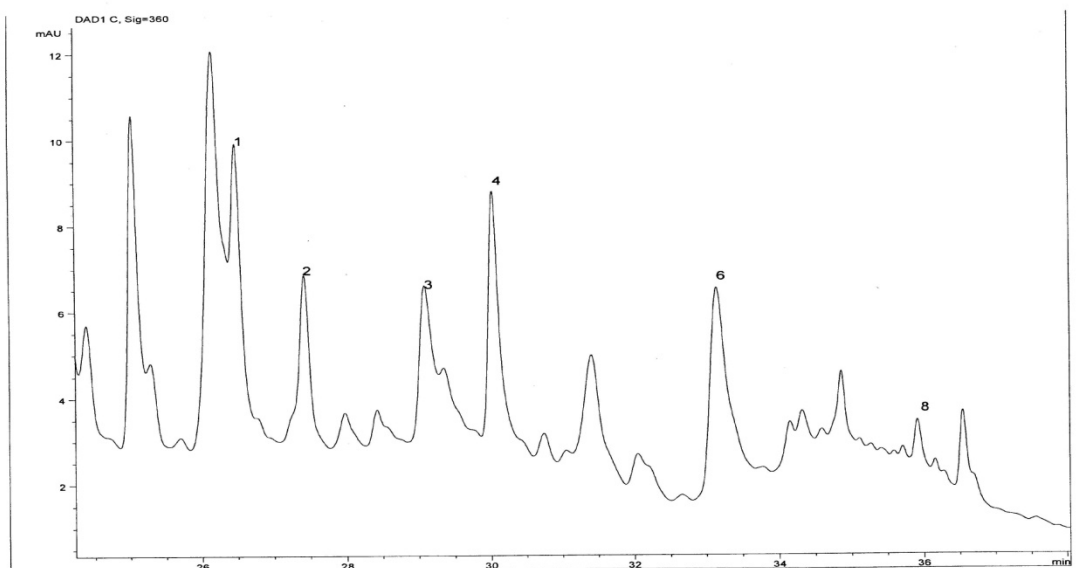
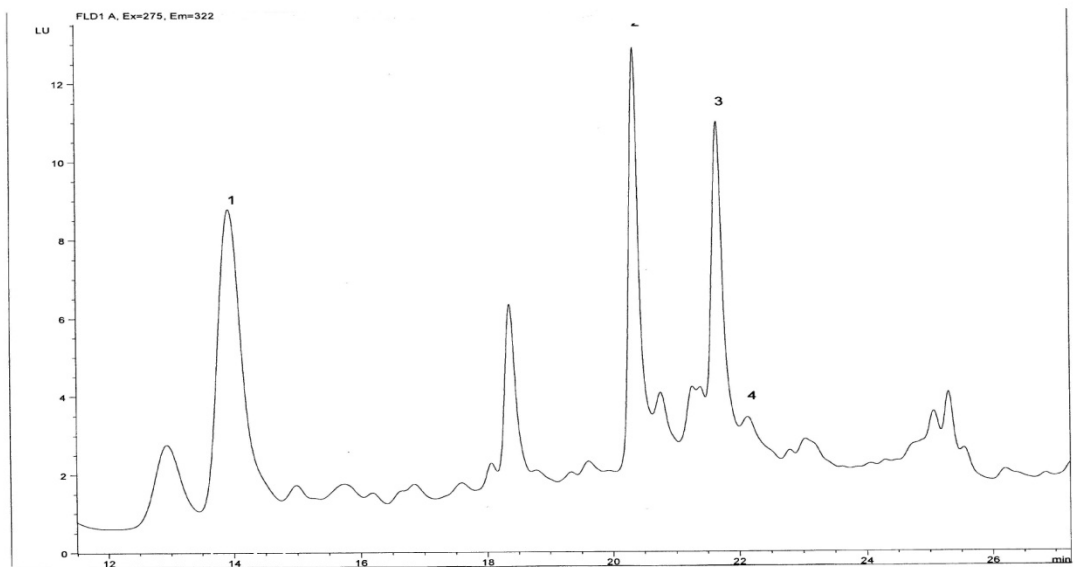


Slika 27. Grafički prikaz uticaja godine berbe na koncentraciju ukupnih flavonoida detektovanih na 322/275 i 360 nm kod Cabernet Sauvignon vina od istih proizvođača

Sadržaj flavonoida, kao i drugih detektovanih fenolnih jedinjenja u vinima, je pod uticajem spoljnih faktora, kao što je jačina sunčeve svetlosti. Iz literature se već zna da grozd koji bio izloženiji suncu može do deset puta više da sadrži flavonole od grozda koji je bio u hladu.

Zbog toga izvršeno je upoređivanje između ukupno detektovanih flavonoida u Cabernet Sauvignon vinima iz 2008 i 2009 godine od tri proizvođača (Rubin, Kraljevski vinograd i Tikveš).

Rezultati su pokazali da postoji razlika u njihovoj koncentraciji, tako da Cabernet Sauvignon vina proizvedena u 2009 godini imaju povećanu koncentraciju flavonoida u poređenju sa istim Cabernet Sauvignon vinima iz 2008 godine od 4,92 % kod CS-Alexandria iz Tikveša do 46,08 % kod CS vinu iz Kraljevskih vinograda.



Slika 28. HPLC dijagram flavan-3-ola na 322/275 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$) i flavonola, flavona i flavanona na 360 nm u Cabernet Sauvignon vinu iz Kraljevskih vinograda, 2009 godine

4.1.3.3 HPLC analiza antocijana u uzorcima Cabernet Sauvignon vina

Antocijani koji su najčešće prisutni u crvenim vinima su: cijanidin-3-O-glikozid, peonidin-3-O-glikozid, delphinidin-3-O-glikozid, malvidin-3-O-glikozid, pelargonidin-3-O-glikozid i petunidin-3-O-glikozid koji su detektovani na 520 nm (Tabele 15-17). Dobijeni rezultati su pokazali da najdominantniji antocijani su malvidin-3-glikozid i njegovi derivati [Radovanović i sar., 2010b].

Analizom dobijenih rezultata uočava se da se vrednosti za ukupne antocijane u obliku 3-glikozide (Tabela 16) nalaze u širokom intervalu od 10, 95 i 10, 97 mg/L u Cabernet Sauvignon vinima iz vinarije Pivka i Rubin do 869,83 mg/L, u Cabernet Sauvignon vinu iz Kraljevskih vinograda, proizvedenog 2009 godine.

Analizom rezultata iz Tabela 17 i 18 vidi se da Cabernet Sauvignon vino iz Kraljevskih vinograda ima najveću koncentraciju 3-acetilglikozida (367,84 mg/L) i 3-para-kumaroilglikozida (165,24 mg/L). Ovo ukazuje da ovo vino je najbogatije antocijanima (1463,56 mg/L).

Table 16. Sadržaj glavnih monomernih antocijana u obliku glukozida prisutnih u Cabernet Sauvignon vinima, na 520 nm: Dp-3-gl, Cy-3-gl, Pt-3-gl, Pn-3-gl, Mv-3-gl (mg/L \pm SD, n = 3)

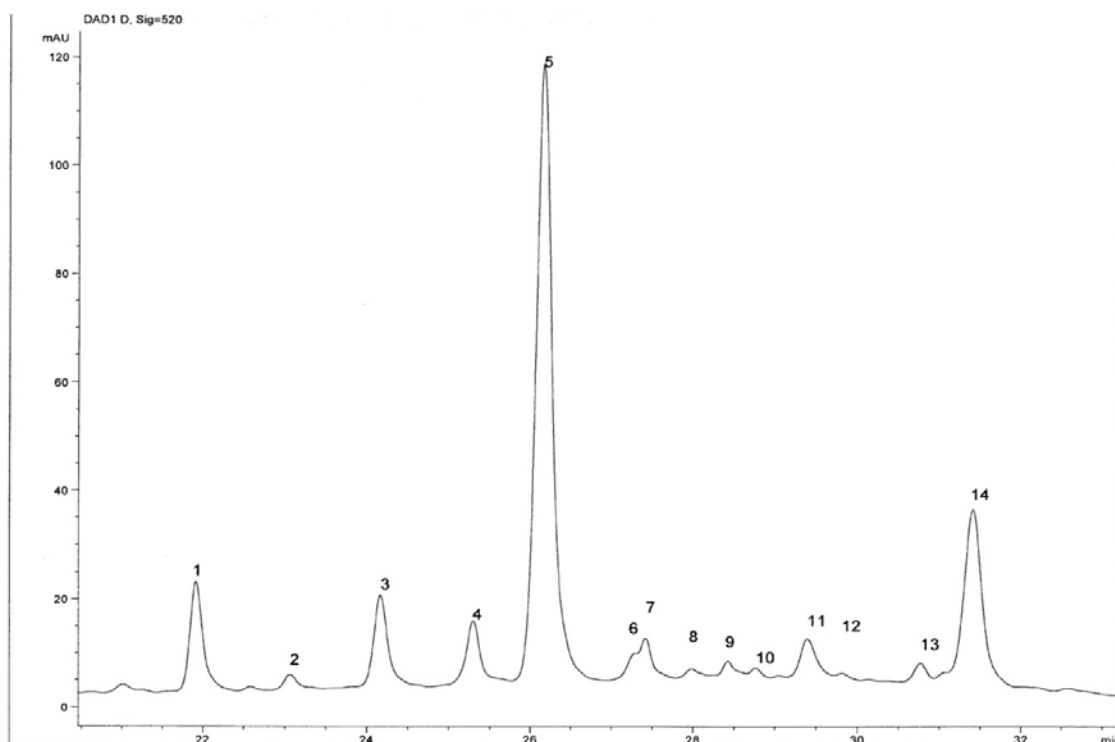
Vino	Dp-3-gl (1)	Cy-3-gl (2)	Pt-3-gl (3)	Pn-3-gl (4)	Mv-3-gl (5)	Ukupni 3-glukozidi
CS1	24,67 \pm 0,21	/	32,80 \pm 0,95	10,81 \pm 0,86	248,24 \pm 1,10	316,52 \pm 1,85
CS2	10,85 \pm 0,45	7,64 \pm 0,29	9,53 \pm 0,12	9,48 \pm 0,95	36,88 \pm 0,29	73,38 \pm 0,95
CS3	18,48 \pm 0,67	6,75 \pm 0,19	34,48 \pm 1,76	35,87 \pm 2,00	249,19 \pm 1,97	344,77 \pm 1,35
CS4a	23,61 \pm 0,45	5,63 \pm 0,11	22,87 \pm 0,45	9,04 \pm 0,65	114,55 \pm 0,99	175,70 \pm 3,12
CS4b	90,33 \pm 0,35	14,85 \pm 0,95	80,53 \pm 0,45	59,10 \pm 0,26	625,02 \pm 0,58	869,83 \pm 1,09
CS5a	10,63 \pm 1,11	/	14,47 \pm 0,09	10,59 \pm 0,23	103,04 \pm 0,55	139,09 \pm 1,69
CS5b	11,13 \pm 0,24	/	11,97 \pm 0,23	7,97 \pm 0,65	104,47 \pm 0,13	135,54 \pm 0,55
CS6a	/	/	/	/	21,11 \pm 0,91	21,11 \pm 0,91
CS6b	/	/	/	/	10,97 \pm 0,33	10,97 \pm 0,91
CS7	19,42 \pm 1,54	/	21,83 \pm 0,91	19,77 \pm 1,23	266,58 \pm 1,05	327,60 \pm 0,98
CS8	7,02 \pm 1,09	/	12,97 \pm 0,65	5,43 \pm 0,43	168,52 \pm 0,97	193,94 \pm 1,65
CS9a	9,60 \pm 0,87	/	29,85 \pm 0,97	30,47 \pm 0,34	187,11 \pm 1,09	257,03 \pm 1,61
CS9b	10,85 \pm 0,58	/	15,52 \pm 0,78	16,65 \pm 0,99	122,33 \pm 0,679	165,35 \pm 1,09
CS10	/	/	/	/	33,37 \pm 0,85	33,37 \pm 0,85
CS11	/	/	/	/	10,95 \pm 0,45	10,95 \pm 0,45
CS12	21,50 \pm 0,17	/	27,61 \pm 1,02	22,44 \pm 0,05	300,62 \pm 0,01	372,17 \pm 0,12

Table 17. Sadržaj monomernih antocijana u obliku 3-acetilglikozida i vitisin A prisutnih u analiziranim Cabernet Sauvignon vinima, na 520 nm (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	Dp-3-acet. gl. (6)	Cy-3-acet. gl.(8)	Pt-3-acet. gl. (9)	Pn-3-acet. gl. (10)	Mv-3-acet. gl. (11)	Ukupni 3-acetilgl.	Vitisin A (7)
CS1	12,14 \pm 1,02	6,60 \pm 1,45	9,10 \pm 0,65	5,50 \pm 0,97	56,04 \pm 1,15	89,38 \pm 1,57	/
CS2	10,88 \pm 0,22	9,33 \pm 0,65	9,33 \pm 0,64	9,34 \pm 1,34	97,32 \pm 1,32	153,87 \pm 0,53	19,48 \pm 1,02
CS3	16,96 \pm 1,56	6,64 \pm 0,67	8,57 \pm 0,97	11,27 \pm 1,43	46,20 \pm 2,03	89,64 \pm 1,10	/
CS4a	26,71 \pm 0,56	19,26 \pm 0,78	17,13 \pm 0,24	17,12 \pm 0,75	30,03 \pm 0,38	110,25 \pm 0,23	17,38 \pm 0,18
CS4b	61,43 \pm 0,78	55,18 \pm 0,55	21,13 \pm 1,04	27,83 \pm 1,10	202,27 \pm 1,09	367,84 \pm 2,14	29,51 \pm 0,23
CS5a	5,95 \pm 0,95	/	6,86 \pm 0,35	/	32,35 \pm 0,57	45,16 \pm 0,34	10,24 \pm 0,49
CS5b	/	/	/	/	36,66 \pm 0,79	36,66 \pm 0,79	/
CS6a	/	/	/	/	/	/	15,39 \pm 0,45
CS6b	/	/	/	/	/	/	8,67 \pm 1,25
CS7	7,16 \pm 1,01	/	11,27 \pm 0,23	18,40 \pm 0,75	82,74 \pm 0,66	120,01 \pm 1,98	12,63 \pm 0,28
CS8	16,86 \pm 0,45		8,30 \pm 1,25	8,96 \pm 1,05	87,17 \pm 0,95	121,29 \pm 1,05	11,09 \pm 0,21
CS9a	24,32 \pm 1,12	/	9,40 \pm 0,75	8,02 \pm 0,98	49,45 \pm 1,09	91,21 \pm 1,97	9,92 \pm 0,17
CS9b	13,89 \pm 1,22	/	5,40 \pm 0,78	5,21 \pm 0,78	27,09 \pm 1,56	64,40 \pm 1,57	/
CS10	/	/	/	/	10,61 \pm 1,01	10,61 \pm 1,32	12,88 \pm 1,01
CS11	/	/	/	/	/	/	/
CS12	18,15 \pm 1,11	8,97 \pm 0,55	8,83 \pm 0,65	7,28 \pm 0,75	96,87 \pm 0,23	140,10 \pm 1,95	8,09 \pm 0,55

Table 18. Sadržaj antocijana u obliku 3-p-kumaroilglikozida i malvidin-vinilfenilglikozid u Cabernet Sauvignon vinima, na 520 nm i ukupni nađeni antocijani (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	Pt-3- p-kumgl (12)	Pn-3-p-kumgl (13)	Mv-3-p-kumgl (14)	Ukupni 3-p-kumaroilgl	Mv-3-vinilfenolgl (15)	Ukupni antocijani
CS1	6,33 \pm 1,31	6,47 \pm 1,23	5,77 \pm 0,67	25,57 \pm 1,10	/	424,47 \pm 0,11
CS2	16,23 \pm 1,02	28,41 \pm 0,02	56,25 \pm 0,55	100,89 \pm 1,23	25,41 \pm 1,12	373,03 \pm 1,02
CS3	17,32 \pm 1,23	15,26 \pm 1,95	38,18 \pm 0,67	70,76 \pm 1,15	/	505,17 \pm 0,91
CS4a	30,03 \pm 0,99	57,30 \pm 0,88	43,83 \pm 0,98	131,16 \pm 2,00	49,18 \pm 0,45	462,29 \pm 0,28
CS4b	54,01 \pm 0,58	35,28 \pm 0,28	75,82 \pm 0,35	165,11 \pm 0,89	31,14 \pm 0,78	1463,43 \pm 0,45
CS5a	7,80 \pm 1,08	/	13,29 \pm 1,09	21,09 \pm 0,12	/	205,57 \pm 0,55
CS5b	/	/	13,47 \pm 0,67	13,47 \pm 0,67	4,35 \pm 0,57	190,04 \pm 0,25
CS6a	/	/	5,78 \pm 1,11	5,78 \pm 1,11	/	37,08 \pm 0,11
CS6b	/	/	6,93 \pm 0,23	6,93 \pm 0,23	/	20,62 \pm 0,09
CS7	8,10 \pm 0,56	/	12,24 \pm 1,07	18,34 \pm 2,00	7,52 \pm 0,22	486,40 \pm 0,79
CS8	/	/	9,53 \pm 0,89	9,53 \pm 1,15	/	335,85 \pm 0,48
CS9a	11,23 \pm 1,23	12,81 \pm 1,43	22,59 \pm 0,56	46,63 \pm 2,76	4,01 \pm 1,02	407,90 \pm 0,98
CS9b	/	/	22,38 \pm 1,22	22,38 \pm 1,43	/	252,13 \pm 0,65
CS10	/	/	6,16 \pm 0,71	6,16 \pm 0,35	2,78 \pm 0,06	63,40 \pm 0,18
CS11	/	/	6,96 \pm 1,01	6,96 \pm 1,09	3,42 \pm 0,32	21,33 \pm 0,23
CS12	18,63 \pm 0,43	9,53 \pm 0,02	40,07 \pm 0,05	68,23 \pm 3,09	4,68 \pm 0,26	593,27 \pm 0,45



Slika 29. HPLC dijagram antocijana u Cabernet Sauvignon vinu iz Kraljevskih vinograda na 520 nm

Prisustvo 3-glikozida u odnosu na ukupne antocijane varira od 9,89 % kod uzorka vina CS2, proizvedenog u vinariji Sekulović (Trebinje) do 58,48 % kod uzorka CS1, proizvedenog u Laguni (Poreč).

Prisustvo 3-acetilglikozida u odnosu na ukupne antocijane takođe varira i dostiže maksimalnu vrednost od 25,96 % u Cabernet Sauvignon vina iz vinarije Cevin (Niš).

Prisustvo 3-para-kumaroilglikozida u ispitivanim uzorcima Cabernet Sauvignon vina varira i dostiže maksimalnu vrednost od 33,61 % u CS vinu iz vinarije Rubin (Kruševac).

Najveći procenat ukupnih malvidin glikona (86,47 %) ima uzorak Cabernet Sauvignon vina, proizvedenom 2009 godine iz Rubina i Cabernet Sauvignon iz Pivke (83,97 %), a najmanji (40,76 %) nalazimo u Cabernet SauvignonS vinu proizvedenom 2008 godine iz Kraljevskih vinogorada (Tabela 19).

Derivati malvidina su različito prisutni u ispitivanim Cabernet Sauvignon vinima i to: malvidin-3-glikozid (9,89 – 58,48 %) > malvidin-3-acetilglikozid (0 – 26,09 %) > malvidin-3-p-kumaroil- glikozid-trans (1,36 -33,61 %).

Tabela 19. Procentni odnos prisutnih malvidin glikozida u odnosu na ukupne antocijane u uzorcima Cabernet Sauvignon vina

Vino	Malvidin-3-glikozid (%)	Malvidin-3-acetilglikozid (%)	Malvidin-3-pkumaroil-glikozid (%)	Ukupno malvidin glikozidi (%)
CS1	58,48	13,20	1,36	73,04
CS2	9,89	26,09	15,08	51,06
CS3	49,28	9,15	7,56	65,99
CS4a	24,78	6,50	9,48	40,76
CS4b	42,22	13,66	5,12	61,00
CS5a	50,10	15,74	6,46	72,30
CS5b	54,73	19,29	7,09	81,05
CS6a	56,93	/	15,59	71,89
CS6b	52,86	/	33,61	86,47
CS7	54,81	17,01	2,52	74,34
CS8	50,18	25,96	2,84	78,98
CS9a	45,87	12,12	5,54	63,53
CS9b	48,52	10,74	8,88	68,14
CS10	52,63	16,74	9,72	79,09
CS11	51,34	/	32,63	83,97
CS12	50,67	16,33	6,75	73,75

Prisustvo Vitisina A odnosno malvidin-3-glikozid piruvinske kiseline je mnogo manje i dostiže maksimalnu vrednost do 3,25 % u Cabernet Sauvignon vinu iz Kraljevskih vinograda. Takođe, prisustvo malvidin-3-vinilfenolglikozid dostiže maksimalno prisustvo od 10,64 % u istom vinu, proizvedenom 2008 godine (Tabela 19).

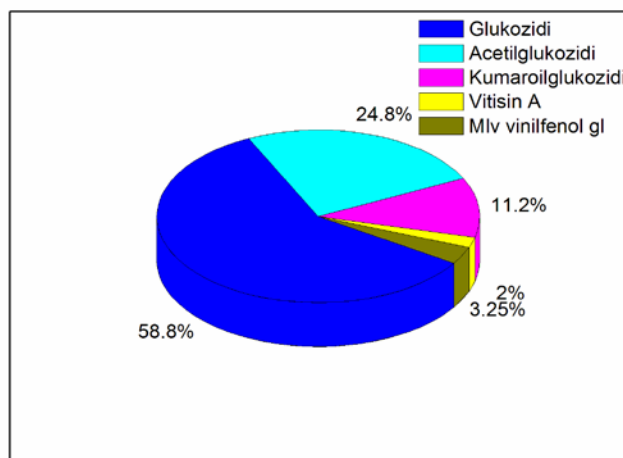
Iz procentnog odnosa ukupnih glikozida, acetilglikozida i kumaroilglikozida u uzorcima Cabernet Sauvignon vina (Tabela 20) može se zaključiti da prisustvo vrste antocijana je sledeće:

Glikozidi (max 74,57%) > Acetilglikozidi (max 41,25%) > Kumaroilglikozidi (max 27,05%)

Tabela 20. Procentni odnos prisutnih antocijanskih derivata u ispitivanim uzorcima Cabernet Sauvignon vina

Antocijanini (%)	Minimum	Maksimum
Ukupni 3-Glikozidi	19,67 % (CS iz Rubina)	74,57 % (CS iz Sekulovića)
Ukupni 3-Acetilglikozidi	0 % (CS iz Rubina i Pivke)	41,25 % (CS iz Sekulovića)
Ukupni 3-p-Kumaroilglikozidi	2,84 % (CS iz Cevina)	27,05 % (CS iz Sekulovića)
Vitisin A	0 % (CS1, CS3, CS5, CS9, CS11)	3,25 % (CS iz Kraljevskih vinograda)
Mv-3- vinilfenolglikozid	0 % (CS1, CS3, CS5, CS6, CS8, CS9)	10,64 % (CS iz Kraljevskih vinograda)
Ukupni antocijani	1,26 % (CS iz Rubina i Pivke)	100 % (CS iz Kraljevskih vinograda)

Kod CS vina iz Kraljevskih vinograda, proizvedenog 2009 godine, koje sadrži najveći sadržaj antocijana proračunato je da su antocijani u obliku 3–glikozida prisutni 58,75 %, 3-acetilglikozida ima 24,84%, 3-para-kumaroilglikozidima 11,16%, dok vitisin A je prisutan 2% i malvidin-3-vinilfenolglikozid 3,25%, što je i grafički prikazano na sledećoj slici:



Slika 30. Grafički prikaz procentnog odnosa antocijana u obliku 3-glukozida, 3-acetilglukozida i 3-para-kumaroilglukozida kod Cabernet Sauvignon vina iz Kraljevskih vinograda, proizvedenog 2009 godine

Kako su antocijani biološko značajna fenolna jedinjenja, u literaturi nalazimo puno radova posvećena njihovoj analizi u različitim vrstama crvenih vina [De Galulejacil sar., 1999; Jackson, 2008; Lila, 2004; Mazza i Miniati, 1993; Mazza i sar, 1999; Meiers i sar, 2001; Munoz-Espada i sar., 2004; Wang i sar., 1997]. Naša istraživanja pokazuju da je ukupna koncentracija antocijana u uzorcima Cabernet Sauvignon vina veoma različita (20,62 - 1480,56 mg/L), i zavisi od mnogo različitih faktora (zrenje grožđa, proizvodnja, čuvanje tj starenje vina itd) i ne može se povezati samo sa godinom zrenja grožđa [Gil-Munoy i sar., 2010].

4.2 Analiza uzoraka Vranac vina iz različitih vinogradarskih i vinskih regiona Balkana

Kako je jedan od ciljeva našeg rada bio ispitivanje fenolnog sastava najprisutnijih crvenih vina iz različitih vinogradarskih i vinskih regiona Balkana, u produžetku biće prezentovani rezultati ispitivanih uzoraka Vranac vina, dobijenih od autohtone sorte Vitis Vinifera Vranac koja je dominantna na ovim prostorima.

U Tabeli 1 (Eksperimentalni deo) data su četrnaest uzoraka Vranac vina sa određenim geografskim poreklom, proizvedena u periodu od 2007 do 2011 godine, od različitih proizvođača sa različitih prostora Balkana odnosno, iz Bosne i Hercegovine (Trebinjsko i Mostarsko vinogorje sa proizvođačima Vukoje i Čitluk), Crne Gore (Centralno crnogorsko vinogorje, proizvođač Plantaža), Srbije (Zapadno moravski rejon koji obuhvata Kruševaki podrejon tj. Župsko vinogorje sa proizvođačima VINO Župa i Rubin; kao i Nišavsko Južnomoravski rejon - Sićevačkim vinogorjem, proizvođač Status) i Makedonije (Tikveški, Povardarski i Ohridski rejoni, sa proizvođačima Tikveš, Pivka, Stobi i vinarija Ohrid) [Radovanović i sar, 2008, 2012a, 2012b].

4.2.1 Spektroskopska analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima Vranac vina

U tabeli 21 prikazani su rezultati spektroskopske analize sadržaja ukupnih fenola, estara vinske kiseline i ukupnih flavonola određenih modifikovanom Glories metodom [Mazza i sar., 1999; Radovanović i sar., 2012a,b].

Tabela 21. Sadržaj ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola (mg/L), kao i vrednost prisutnog alkohola (%) i pH u izabranim uzorcima Vranac vina

Vino	Alkohol (%)	pH vrednost	Ukupni fenoli	Estri vinske kiseline	Ukupni flavonoli
V1	13,0	3,65	1527,75±0,21	310,57±0,33	129,52±0,57
V2	12,0	3,35	991,74±0,55	177,40±0,38	92,69±0,24
V3	13,0	3,43	1539,30±0,32	259,34±0,13	147,82±0,99
V4	11,8	3,39	1988,85±1,56	362,24±0,12	215,45±0,34
V5a	11,5	3,21	1706,40±0,58	290,65±0,31	130,10±0,78
V5b	11,5	3,24	1726,42±1,31	292,61±1,11	136,60±1,21
V6a	11,0	2,80	1492,65±2,03	173,07±1,53	109,34±0,46
V6b	11,0	2,82	1624,36±0,03	207,48±0,53	112,92±0,45
V7	12,0	3,11	1978,50±0,34	225,22±0,46	120,24±0,56
V8a	12,5	3,48	2161,91±0,78	374,02±0,45	183,26±0,23
V8b	13,0	3,53	2184,52±0,65	389,08±0,66	189,66±0,44
V9	13,0	3,36	2000,30±0,96	280,33±0,93	146,67±0,31
V10	13,0	3,61	2246,05±0,36	382,65±0,67	178,94±0,86
V11	12,0	3,31	1817,32±0,34	381,80±0,88	182,22±0,21

Koncentracija ukupnih fenola, kao i kod prethodno analiziranih Cabernet Sauvignon vina, je praćena na 280 nm i predstavljena kao ekvivalent koncentracije galne kiseline, ukupni estri vinske kiseline pracen su na 320 nm (ekvivalent koncentracije kafene kiseline) i ukupni flavonoli na 360 nm (ekvivalent koncentracije kvercetina).

pH vrednost ispitivanih Vranac vina se nalazi u intervalu od 2,80 (Vranac iz vinarije Vino Župa) do 3,65 (Hercegovački Vranac) i prisustvo alkohola od 11,0 do 13,0 %.

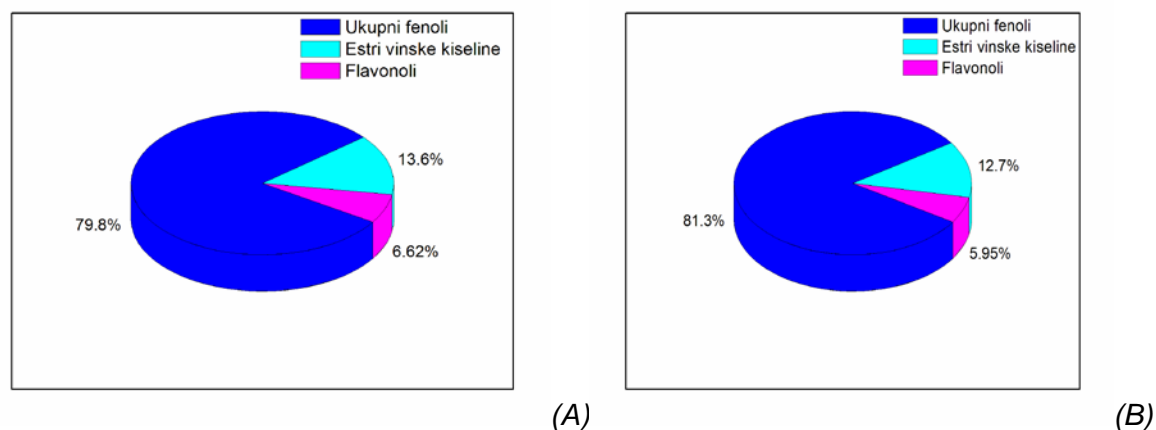
Analiza spektroskopski dobijenih rezultata je pokazala da se dobijene vrednosti razlikuju, u zavisnosti od mesta vinograda i proizvođača, tako da se koncentracije ukupnih fenola nalaze u intervalu od 991,74 mg/L (kod Vranca dobijenog 2007 iz vinarije Čitluk) do 2446,05 mg/L (kod Vranca – Vilarov, proizvedenog 2011 godine

od vinarije Stobi). Koncentracija ukupnih estara vinske kiseline nalazi se u granicama od 164,31 (Vranac iz vinarije Vino Župa, 2008 godine) do 389,08 mg/L (Vranac-Tga za jug, 2009 godine, proizvedenog od vinarije Tikveš).

Koncentracija flavonola nalazi se u intervalu od 90,92 mg /L (Vranac iz Vino Župe, 2009 godine) do 189,66 mg/L (Vranac – Tga za jug, 2009 godine).

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima za druga ispitivana vina [Cliff I sar., 2007; Lachman i sar., 2007; Piljac i sar, 2005; Simonetti i sar, 1997; Singleton i Rossi, 1965; Stratil i sar.2008].

Očigledno je da su najveće vrednosti za ove grupe fenolnih jedinjenja određene kod Vranac vina Tga za jug i Vilarov, grafički prikazani na Slici 31:



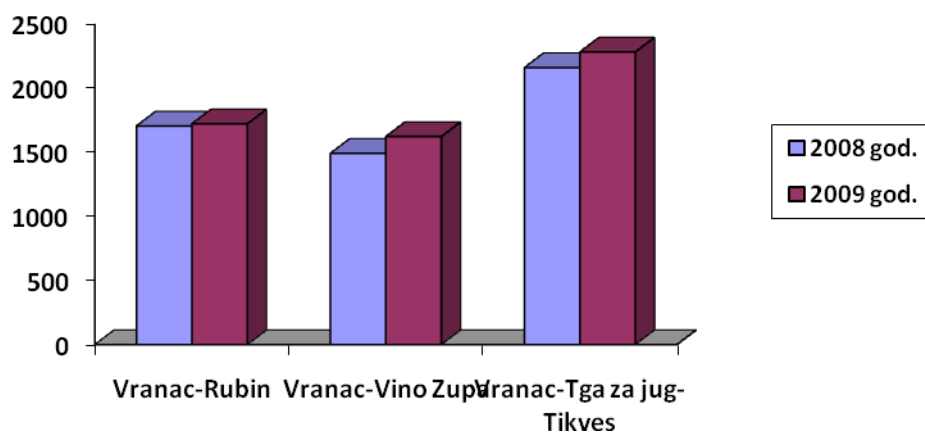
Slika 31. Grafički prikaz procentnog odnosa spektroskopski određenih ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u vinu Vranec -Tga za jug, 2009 godine (A) i vinu Vranec- Vilarov, 2011 godine (B)

Zbog praćenja spoljnih uticaja (temperaturnih klimatskih razlika, ekspozicije i osvetljenosti terena) koji utiču na stepen fenolne zrelosti grožđa i fenolnog sastava vina, ispitivana su Vranac vina dve uzastopne godine proizvodnje sa istog vinogradarskog i vinskog rejona i istog proizvođača: Rubin, Vino Župa i Tikveš [Alcalde-Eon i sar., 2006; Connor I sar., 2005; Gil-Munoy i sar., 2010; Downey i sar., 2003; Kennedy i sar., 2000; Revilla i sar, 1997].

Rezultati su pokazali da Vranac vina istog proizvođača iz istog vinskog rejona, u zavisnosti vremenskih uslova godišnjih doba imaju različit fenolni sastav. Analiza ovih uzoraka vina je pokazala (Tabela 22 i slika 32) da se ukupni fenoli menjaju od 1,00 do 5,38 %, estri vinske kiseline od 0,70 do 16,59 %, a flavonoli od 3,17 do 4,40 %:

Tabela 22. Uticaj godine berbe grožđa i proizvodnje vina na fenolni sastav izabranih Vranac vina

Godina	Vino	Polifenoli	Estri viske kiseline	Flavonoli
2008	Vranac	1706,40±0,58	290,65±0,31	130,60±0,78
2009	- Rubin	1723,42±1,31	292,61±1,11	136,60±1,21
2008	Vranac	1492,65±2,03	173,07±1,53	109,34±0,46
2009	-Vino Župa	1624,36±0,03	207,48±0,53	112,92±0,45
2008	Vranac Tga za jug	2161,91±0,78	374,02±0,45	183,26±0,23
2009	- Tikveš	2284,52±0,65	389,08±0,66	189,66±0,44



Slika 32. Grafički prikaz uticaja godine berbe na fenolni sastav Vranac vina istih proizvođača

Kao i kod prethodno analiziranih Cabernet Sauvignon vina i kod ispitivanih uzoraka Vranac vina dobijene su veće vrednosti za vina iz 2009 godine u poređenju sa vinima iz 2008 godine proizvodnje. Odnosno sa povećanjem sunčanih dana u vreme zrenja grožđa, povećava se i fenolni sadržaj grožđa [Landroult i sar., 1999; Harris i sar., 2010].

4.2.2 HPLC analiza ne flavonoidnih jedinjenja u uzorcima Vranac vina

I u ovom poglavlju, kao i kod Cabernet Sauvignon vina, biće izvršena identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u izabranim uzorcima Vranac vina, da bi izvršili upoređivanje dobijenih koncentracijskih vrednosti sa antioksidativnim i antimikrobnim delovanjem vina.

4.2.2.1 HPLC analiza fenolnih kiselina u uzorcima Vranac vina

U analiziranim uzorcima Vranac vina iz različitih vinogradarskih i vinskih regiona Balkana, kao i kod prethodno analiziranih Cabernet Sauvignon vina, izvršena je identifikacija i kvantifikacija deset fenolnih kiselina i trans – resveratrola, kao predstavnika vinskih stilbena, na osnovu retencionih vremena i apsorpcionih maksimuma njihovih standardnih jedinjenja (eksperimentalni deo).

U tabeli 23 date su koncentracijske vrednosti značajnih hidroksibenzoevih kiselina prisutnih u ispitivanim uzorcima Vranac vina, kao što su: galna, vanilinska, siringinska i elagilna kiselina, određenih na 280 nm, kao i ukupne vrednosti za hidroksibenzoeve kiseline.

Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da se dobijene vrednosti za hidroksibenzoeve kiseline nalaze u intervalu od 50,23 do 150,53 mg/L. Najveće vrednosti dobijene su za Vranac vino, proizvedenom u Tikveš vinariji 2009 godine. Takođe, u ovom vinu je prisutna, u najveća koncentracija galne kiseline (138,88 mg/L).

U tabeli 24 su date određene koncentracije hidroksicimetnih kiselina: trans-kaftarne, trans-kutarne, hlorogenske, trans-kafene, para-kumarne i ferulne kiseline, praćene na 320 nm.

Utvrđeno je da najveću koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina (72,94 mg/L) ima vino Vranec-Vilarov, iz 2011 godine, proizvedeno u vinariji Stobi.

Tabela 23. Sadržaj hidroksibenzoevih kiselina u izabranim Vranac vinima, na 280 nm (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	Galna kiselina (1)	Vanilinska kiselina (2)	Siringinska kiselina (3)	Elaginska kiselina (4)	Ukupne hidroksi-benzoeve kiseline
V1	75,51 \pm 0,19	3,28 \pm 0,23	8,70 \pm 0,12	4,74 \pm 0,22	92,23 \pm 0,45
V2	67,22 \pm 0,13	/	3,80 \pm 0,45	4,56 \pm 0,36	75,58 \pm 0,11
V3	52,88 \pm 0,17	5,60 \pm 0,12	3,15 \pm 0,35	3,87 \pm 0,72	65,50 \pm 0,13
V4	83,32 \pm 0,12	0,38 \pm 0,33	9,04 \pm 0,65	3,96 \pm 0,31	96,70 \pm 0,37
V5a	64,33 \pm 0,19	0,04 \pm 0,45	5,01 \pm 0,65	2,39 \pm 0,13	71,77 \pm 0,12
V5b	72,99 \pm 0,19	0,66 \pm 0,12	4,77 \pm 0,43	3,24 \pm 0,72	81,66 \pm 0,15
V6a	47,53 \pm 0,14	/	0,59 \pm 0,32	2,11 \pm 0,22	50,23 \pm 0,17
V6b	88,46 \pm 0,41	1,51 \pm 0,14	3,11 \pm 0,82	4,12 \pm 0,35	97,20 \pm 0,15
V7	53,44 \pm 0,22	0,56 \pm 0,38	1,72 \pm 0,75	4,10 \pm 0,09	103,38 \pm 0,14
V8a	87,43 \pm 0,43	3,90 \pm 0,12	/	3,98 \pm 0,19	95,31 \pm 0,15
V8b	133,97 \pm 0,53	/	3,44 \pm 0,42	5,87 \pm 0,21	143,28 \pm 0,12
V9	138,88 \pm 0,43	1,73 \pm 0,55	4,32 \pm 0,14	5,60 \pm 0,23	150,53 \pm 0,15
V10	110,87 \pm 0,12	2,80 \pm 0,12	11,65 \pm 0,12	5,91 \pm 0,12	131,66 \pm 0,12
V11	63,70 \pm 0,12	/	8,67 \pm 0,12	4,64 \pm 0,12	77,01 \pm 0,12

Table 24. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u izabranim uzorcima Vranac vina, na 320 nm (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	<i>t</i> -kaftarna kis. (1)	<i>t</i> -kutarna kis. (2)	Kafena kis. (3)	Hlorogenska kis. (4)	<i>p</i> -Kumarna kis. (5)	Ferulna kis. (6)	Ukupne hidroksicimetne kis
V1	26,50 \pm 0,12	2,67 \pm 0,23	15,40 \pm 0,21	/	3,04 \pm 0,16	6,47 \pm 0,11	54,08 \pm 0,19
V2	13,85 \pm 0,55	7,65 \pm 0,25	1,98 \pm 0,12	/	4,57 \pm 0,35	0,58 \pm 0,23	28,63 \pm 0,22
V3	15,61 \pm 0,12	3,58 \pm 0,56	6,76 \pm 0,12	3,72 \pm 0,02	6,89 \pm 0,09	2,95 \pm 0,11	39,51 \pm 0,12
V4	31,81 \pm 0,12	1,40 \pm 0,54	2,97 \pm 0,37	2,20 \pm 0,12	3,15 \pm 0,15	0,37 \pm 0,08	41,90 \pm 0,19
V5a	23,23 \pm 0,07	8,14 \pm 0,08	3,03 \pm 0,05	2,46 \pm 0,12	4,90 \pm 0,05	0,56 \pm 0,12	42,32 \pm 0,19
V5b	28,86 \pm 0,45	1,56 \pm 0,11	5,01 \pm 0,09	3,92 \pm 0,43	4,49 \pm 0,18	0,46 \pm 0,12	44,30 \pm 0,11
V6a	7,56 \pm 0,08	1,83 \pm 0,08	2,95 \pm 0,08	0,80 \pm 0,12	1,59 \pm 0,09	0,29 \pm 0,16	13,19 \pm 0,11
V6b	13,08 \pm 0,12	2,59 \pm 0,45	1,52 \pm 0,09	3,61 \pm 0,23	1,20 \pm 0,75	0,37 \pm 0,43	22,78 \pm 0,22
V7	2,32 \pm 0,08	3,08 \pm 0,13	5,83 \pm 0,42	/	2,26 \pm 0,32	1,35 \pm 0,45	14,84 \pm 0,13
V8a	22,65 \pm 0,11	9,08 \pm 0,65	3,45 \pm 0,53	/	3,04 \pm 0,44	2,49 \pm 0,35	42,82 \pm 0,11
V8b	21,18 \pm 0,12	3,45 \pm 0,38	7,97 \pm 0,45	2,10 \pm 0,12	3,44 \pm 0,76	4,95 \pm 0,23	43,09 \pm 0,12
V9	20,96 \pm 0,71	11,98 \pm 0,35	3,68 \pm 0,11	3,58 \pm 0,56	2,44 \pm 0,45	3,51 \pm 0,23	58,15 \pm 0,14
V10	26,61 \pm 0,25	12,79 \pm 0,72	6,46 \pm 0,23	11,56 \pm 0,43	8,37 \pm 0,35	5,27 \pm 0,71	72,94 \pm 0,02
V11	27,47 \pm 0,12	13,24 \pm 0,12	5,98 \pm 0,12	/	4,03 \pm 0,12	2,73 \pm 0,12	53,45 \pm 0,12

U ispitivanim uzorcima Vranac vina *trans*-kaftarna kiselina je najdominantna hidroksicimetna kiselina i njena najveća koncentracija je utvrđena za Vranac vino iz vinarije Vinoprodukt - Čoka (31,81 mg/L).

Na osnovu podataka datih u ovim tabelama dobijene su zbirne vrednosti za sve detektovane fenolne kiseline (*hidroksibenzojeve* i *hidroksicimetne* kiseline) u ispitivanim uzorcima Vranac vina od kojih se može zaključiti da se ukupna koncentracija fenolnih kiselina nalazi u širokom intervalu, od 63,25 mg/L u Vranac

vinu iz VINO Župe do 204,60 i 198,68 mg/L u Vranac vinama proizvedenim u vinarijama Stobi i Tikveš.

Iz datog procentnog prisustva galne kiseline, kao i ukupnih hidroksibenzeovih i hidroksicimetnih kiselina u ispitivanim uzorcima Vranac vina (Tabela 25), može se reći da je galna kiselina najdominatnija fenolna kiselina prisutna u procentnom prinosu od 45,20 % (Vranac vino iz Statusa, Niš) do 75,15 i 71,88 % (Vranac vina iz VINO Župe i Tikveša).

Procentni odnos između hidroksibenzeovih i hidroksicimetnih kiselina se kreće od 47,49 do 82,58 %. Očigledno je da jedino Vranac vino iz Crne Gore ima veći procenat (> 50 %) hidroksicimetnih kiselina u poređenju sa hidroksibenzeovim kiselinama:

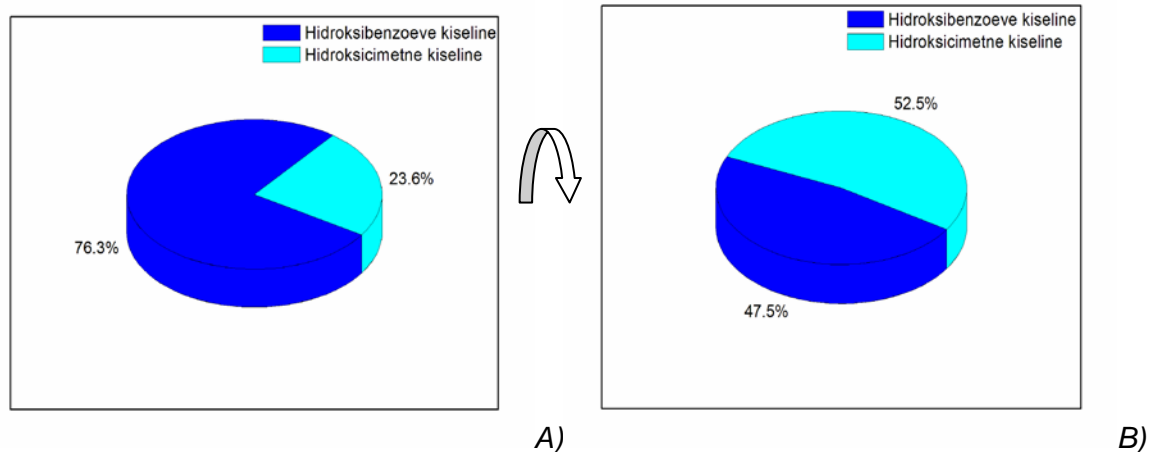
Ako uporedimo sve detektovane fenolne kiseline po njihovom prisustvu u ispitivanim Vranac vinima, kao i kod prethodno analiziranih Cabernet Sauvignon vinia odnos njihovih koncentracija je sledeći:

galna kiselina > trans-kaftarna kiselina > trans-kutarna kiselina > siringinska kiselina > flagilna kiselina > p-kumarna kiselina > kafena kiselina > hlorogenska kiselina > ferulna kiselina > vanilinska kiselina.

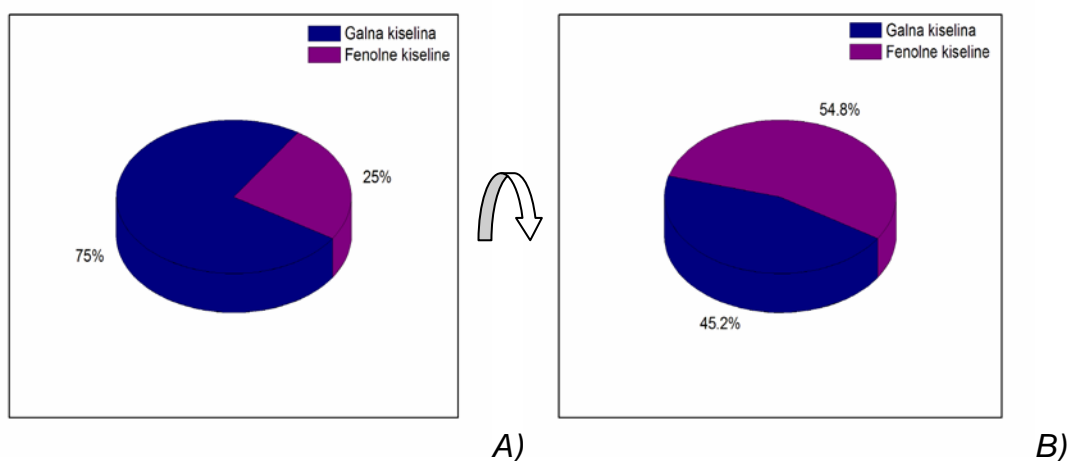
Tabela 25. Ukupne fenolne kiseline (mg/L) i odnos galne kiseline, ukupnih hidrosibenzoevih i hidrosicimetnih kiselina prema ukupnih detektovanih fenolnih kiselina (%)

Vino	Ukupne fenolne kiseline (mg/L)	Galna kiselina (%)	Hidrosibenzoevih kiselina (%)	Hidrosicimetnih kiselina (%)
V1	146,31±0,12	51,60	58,20	41,79
V2	104,21±0,11	64,51	68,15	31,85
V3	105,01±0,24	50,36	47,49	52,51
V4	138,60±0,19	60,12	59,60	40,40
V5a	117,09±0,15	54,94	59,25	40,75
V5b	125,96±0,34	57,95	58,98	41,02
V6a	63,25±0,13	75,15	76,35	23,65
V6b	124,57±0,12	71,01	74,72	25,28
V7	118,22±0,18	45,20	82,58	17,42
V8a	140,02±0,45	62,44	64,76	35,24
V8b	186,37±0,23	71,88	72,95	27,05
V9	198,68±0,54	69,90	76,52	23,48
V10	204,60±0,44	54,19	55,01	44,99
V11	130,46±0,15	48,83	55,05	44,95

Na Slici 33 je grafički prikazan najveći procentni prinos hidrosibenzoevih kiselina u Vranac vinu iz VINO Župe (A) i najveći prinos hidrosicimetnih kiselina u Vranac vina iz Plantaže (B):

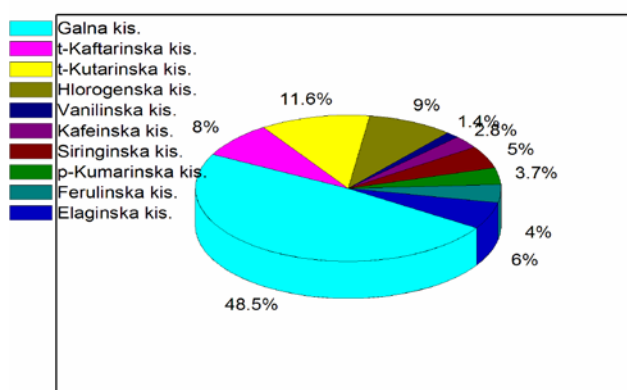


Slika 33. Grafički prikaz procentnog odnosa prisutnih hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u uzorcima Vranac vina iz VINO ŽUPE (A) i Vranac vina iz PLANTAŽE (B)



Slika 34. Grafički prikaz procentne granične vrednosti galne kiseline u odnosu prema ukupnoj vrednosti fenolnih kiselina u Vranac vinu iz VINO ŽUPE (A) i Vranac vinu iz STATUSA (B)

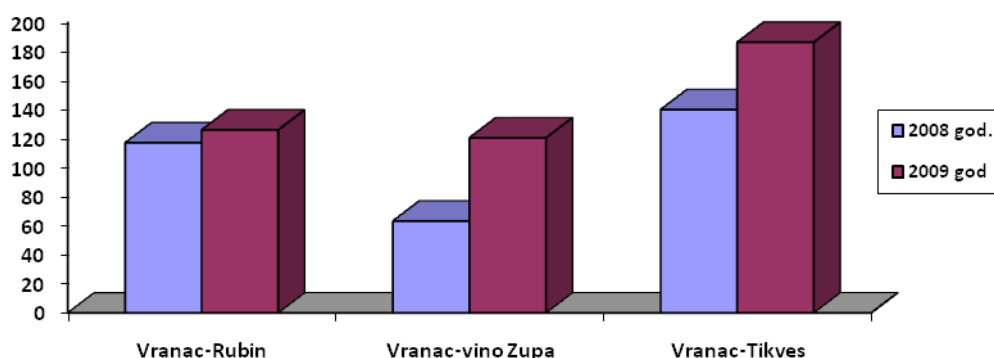
Na sledećoj slici grafički je prikazan procentni odnos svih prisutnih fenolnih kiselina u Vranec - Vilarov iz Stobi vinarije:



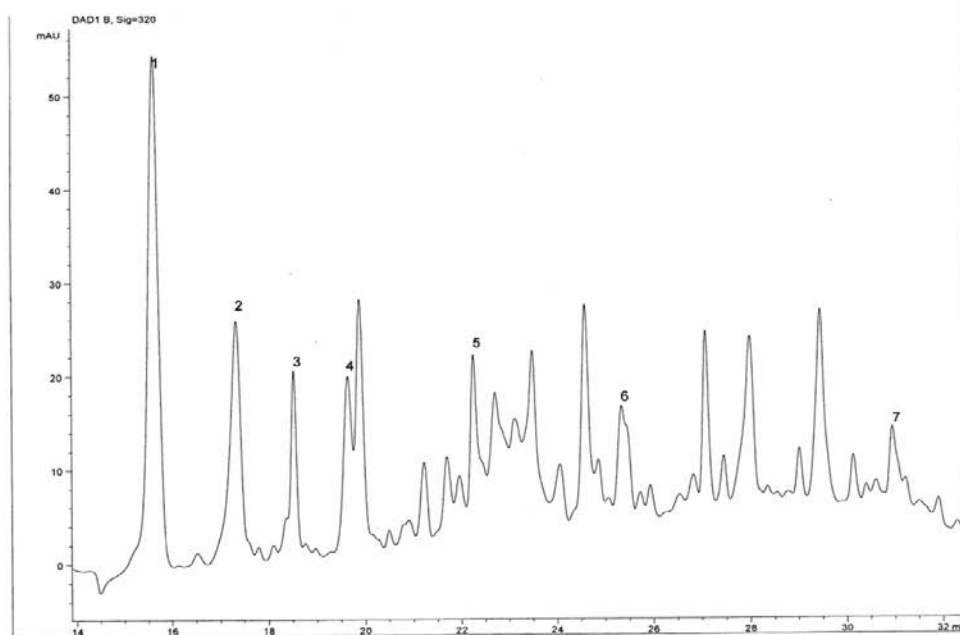
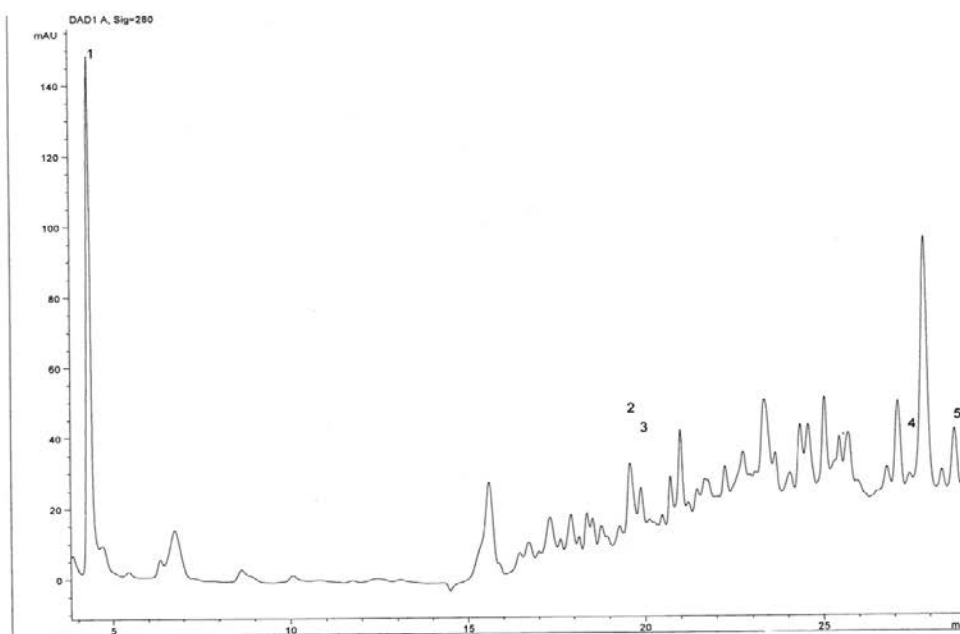
Slika 35. Procentni odnos svih prisutnih fenolnih kiselina u Vranec - Vilarov iz Stobija

Zbog praćenja uticaja meteroloških uslova na zrelost grožđa, ispitivani su izabrani uzorci Vranac vina dve uzastopne godine (2008 i 2009), tri proizvođača (Rubina, Vino Župe i Tikveša).

Rezultati su pokazali da postoji razlika u koncentraciji fenolnih kiselina, tako da Vranac vina proizvedena u 2009 godini imaju povećanu koncentraciju fenolnih kiselina u poređenju sa istim vinima iz 2008 godine. Koncentracija ukupnih fenolnih kiselina se povećava i to: u Vranac vinu iz Rubina za 12,00 %, u Vranac vino iz Vino Župe za 49,23 % i Vranec - Tga za jug iz Tikveša za 25,14 %:



Slika 36. Grafički prikaz uticaja godine berbe (2008 i 2009) na koncentraciju fenolnih kiselina u ispitivanim uzorcima Vranac vina istih proizvođača



Slika 37. HPLC dijagram fenolnih kiselina u Vranac - Vilarov iz Stobija na 280 i 320 nm

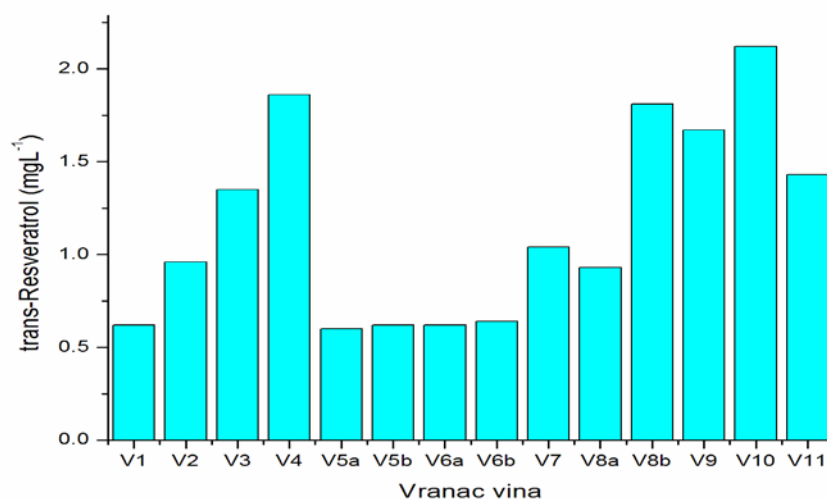
4.2.2.2 HPLC analiza trans-resveratrola u uzorcima Vranac vina

U grupi neflavonoidnih jedinjenja pripada i trans-resveratrol, kao najznačajniji predstavnik stilbena. Kao i kod Cabernet Sauvignon vina i u ovim uzorcima vina detektovana je mala koncentracija trans-resveratrola.

U tabeli 26 su date i na Slici 38 prikazane dobijene vrednosti trans-resveratrola, na osnovu standardne jednačine i apsorpcione vrednosti detektovane na 320 nm:

Tabela 26. Sadržaj trans-resveratrola u analiziranim Vranac vinima na 320 nm
(mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	trans-Resveratrol (7)
V1	0,92 \pm 0,12
V2	0,96 \pm 0,09
V3	2,04 \pm 0,08
V4	1,86 \pm 0,10
V5a	0,60 \pm 0,12
V5b	0,82 \pm 0,02
V6a	0,62 \pm 0,12
V6b	0,64 \pm 0,06
V7	1,04 \pm 0,03
V8a	0,93 \pm 0,10
V8b	1,81 \pm 0,12
V9	1,67 \pm 0,12
V10	2,12 \pm 0,11
V11	1,43 \pm 0,08



Slika 38. Grafički prikaz sadržaja trans-resveratrola u ispitivanim Vranac vinama

Rezultati pokazuju da se trans-resveratrol u ispitivanim uzorcima Vranac vina nalazi u uskom intervalu od 0,60 mg/L u Vranac vinu iz Rubina iz 2008 godine do 2,12 mg/L u Vranec-Vilarov iz 2011 godine. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima ranije analiziranih crvenih vina [Jenadet i sar., 1991; Mark i sar., 2005].

4.2.3 HPLC analiza flavonoidnih jedinjenja u uzorcima Vranac vina

U ovom delu poglavlja data je analiza flavonoidnih jedinjenja prisutnih u izabranim uzorcima Vranac vina, na sličan način kao što su analizirana i Cabernet Sauvignon vina u prethodnom poglavlju.

4.2.3.1 Flavan-3-oli u analiziranim Vranac vinima

U Tabeli 27 date su koncentracije za najzastupljenije flavan-3-ole u ispitivanim uzorcima Vranac vina i to: (+)-katehina, procijanidina B2, odnosno dimera B tipa: (-)-epikatehin-(4 β →8)-(-)-epikatehina, (-)-epikatehina i (-)-epigalokatehingalata, detektovanih fluorescentim detektorom na 275/322 nm. Analizom rezultata može se uočiti da se dobijene vrednosti nalaze u intervalu od 42,88 do 101,13 mg/L.

Najveća vrednost ovih jedinjenja je nađena u vinu Vranec - Tga za jug iz vinarije Tikveš iz 2009 godine. Takođe, visoku koncentraciju ukupnih flavan-3-ola imaju Vranac vina proizvedena u vinarijama Vino Župa, Tikveš, Stobi i Lozar u 2009 i 2011 godine.

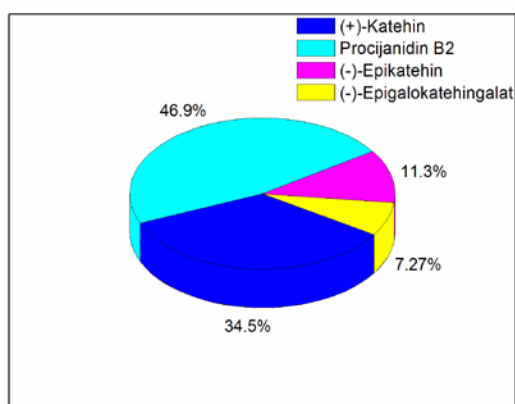
Koncentracija katehina je najveća u Vranac vinu dobijenom iz vinarije Tikveš iz 2009 godine (43,70 mg/L), dok koncentracija (-)-epikatehina je najveća u Vranac vinu iz vinarije Čitluk (28,42 mg/L).

Odnos koncentracija prisustnih flavan-3-ola u ispitivanim uzorcima Vranac vina je sledeći: (+)-katehina > (-)-epikatehin > procijanidin B2 > (-)-epigalokatechingalat

Table 27. Sadržaj flavan-3-oli u Vranac vinima (mg/L \pm SD, n = 3) na 275/322 nm

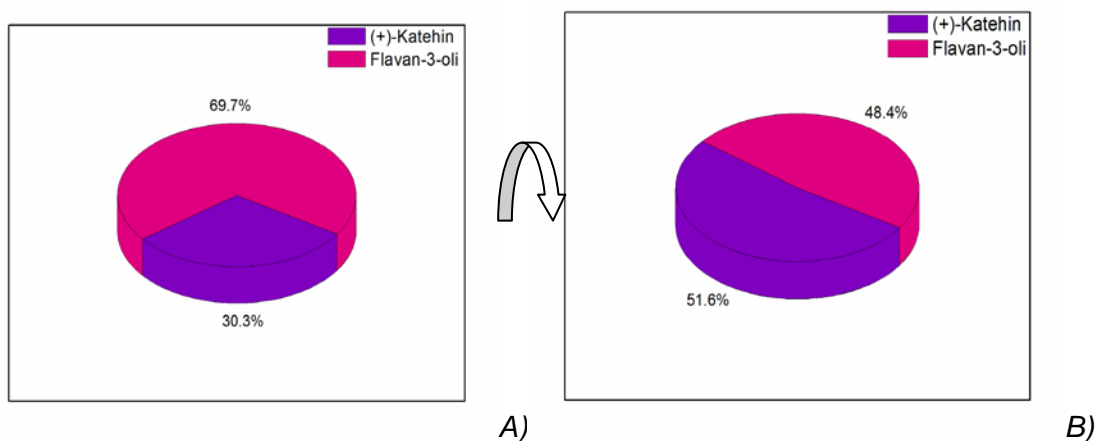
Vino	(+)-Katehin (1)	Procijanidin B₂ (2)	(-)-Epikatehin (3)	(-)-Epigalo- katehingat (4)	Ukupni flavan-3-oli
V1	28,57 \pm 0,63	14,86 \pm 0,67	18,21 \pm 0,17	5,39 \pm 0,23	61,64 \pm 0,22
V2	31,55 \pm 0,56	17,53 \pm 0,16	28,42 \pm 0,45	8,67 \pm 0,17	86,17 \pm 0,65
V3	27,08 \pm 0,63	26,56 \pm 0,65	8,98 \pm 0,07	2,89 \pm 0,23	65,51 \pm 0,12
V4	23,15 \pm 0,27	13,67 \pm 0,13	17,34 \pm 0,61	14,45 \pm 0,65	68,61 \pm 0,17
V5a	27,59 \pm 0,45	13,68 \pm 0,27	12,37 \pm 0,44	4,26 \pm 0,21	57,90 \pm 0,25
V5b	32,57 \pm 0,24	16,03 \pm 0,52	17,75 \pm 0,16	6,92 \pm 0,61	73,27 \pm 0,23
V6a	20,35 \pm 0,23	13,22 \pm 0,35	13,49 \pm 0,62	4,39 \pm 0,61	51,45 \pm 0,71
V6b	31,51 \pm 0,14	29,42 \pm 0,27	24,70 \pm 0,61	8,46 \pm 0,23	94,09 \pm 0,63
V7	26,64 \pm 0,45	25,13 \pm 0,32	17,11 \pm 0,11	6,78 \pm 0,55	75,66 \pm 0,27
V8a	30,13 \pm 0,62	16,39 \pm 0,45	20,16 \pm 0,61	8,44 \pm 0,25	75,12 \pm 0,62
V8b	34,86 \pm 0,37	47,47 \pm 0,43	11,45 \pm 0,23	7,35 \pm 0,62	101,13 \pm 0,38
V9	43,70 \pm 0,62	30,91 \pm 0,65	10,86 \pm 0,45	7,14 \pm 0,63	92,61 \pm 0,75
V10	30,02 \pm 0,19	60,81 \pm 0,16	19,60 \pm 0,17	9,59 \pm 0,45	120,02 \pm 0,65
V11	22,12 \pm 0,65	8,32 \pm 0,15	7,32 \pm 0,64	5,12 \pm 0,12	42,88 \pm 0,62

Na Slici 39 je prikazan procentni odnos određenih flavan-3-ola u vinu Vranec – Tga za jug iz 2009 godine:



Slika 39. Procentni odnos određenih flavan-3-ola u vinu Vranec – Tga za jug iz vinarije Tikveš

Kao i kod uzoraka Cabernet Sauvignon vina, najdominantniji flavan-3-ol u Vranac vinima je (+)-katehin i njegovo prisustvo u odnosu na koncentraciju ukupnih flavan-3-ola iznosi od 30,34% u vinu Vranec-Vilarov do 51,59 % u Vranac vinu iz vinarije Pivke (Tabela 28):

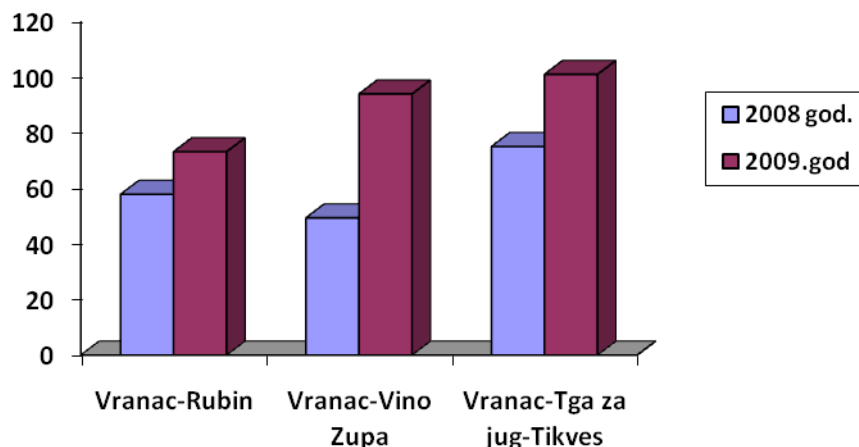


Slika 40. Grafički prikaz procentnog odnosa uzoraka: Vranec – Vilarov (A) i Vranec iz Pivke (B)

Tabela 28. Procentni prinos (+)-katehina u ispitivanim Vranac vinima

Vino	(+)-Katehin (%)
V1	41,48
V2	36,61
V3	34,68
V4	33,74
V5a	47,65
V5b	44,45
V6a	37,11
V6b	33,49
V7	35,21
V8a	40,11
V8b	34,47
V9	47,19
V10	30,34
V11	51,59

Zbog provere uticaja godine berbe grožđa, praćena je i koncentracija flavan-3-ola u Vranac vinima dve uzastopne godine proizvodnje (2008 i 2009), tri ista proizvođača (Rubin, Vino Župa i Tikveš). Rezultati su pokazali da postoji razlika u njihovoj koncentraciji, tako da Vranac vina proizvedena u 2009 godine imaju povećanu koncentraciju flavan-3-ola u poređenju sa istim Vranac vinama iz 2008 godine. Koncentracija ukupnih flavan-3-ola se povećava i to: u Vranac vinu iz Rubina za 21%, u vinu Vranec - Tga za jug iz Tikveša za 25,72%, a najviše u Vranac vinu iz Vino Župe za 47,44%:



Slika 41. Grafički prikaz uticaja godine berbe na koncentraciju flavan-3-ola u Vranac vinima istih proizvođača

4.2.3.2 Flavonoli, flavoni i flavanoni u Vranac vinima

U Tabeli 29 date su određene koncentracije za u Vranac vinama najprisutnijih flavonola, kao što su: kvercetin-3-glikozid, rutin (kvercetin-3-O-rutinozid), miricetin, morin, kvercetin i kemferol. Sva jedinjenja su detektovana na 360 nm na osnovu retencionih vremena i primenom standardnih jednačina (eksperimentalni deo).

Analizom rezultata može se uočiti da se dobijene koncentracijske vrednosti razlikuju, tako da se ukupna koncentracija određenih flavanola nalazi u intervalu od 10,00 do 55,05 mg/L.

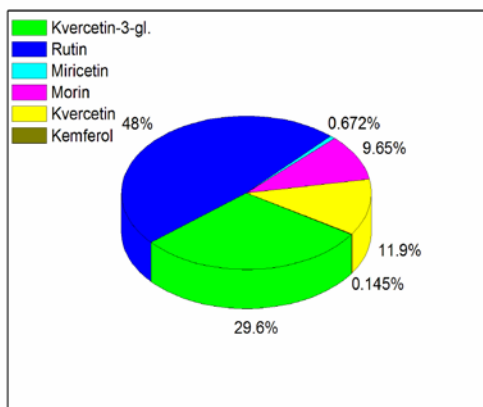
Najveće vrednosti su dobijene za Vranac vina iz vinarije Vukoje iz Trebinja (2008 godine) i Vranec-Tga za jug (2009 godine).

Ako uporedimo flavonole po njihovom prisustvu u ispitivanim Vranac vinima, odnosno po njihovoj koncentraciji odnos je sledeći: kvercetin-3-glikozid > rutin > morin ~ kvercetin > miricetin > kemferol

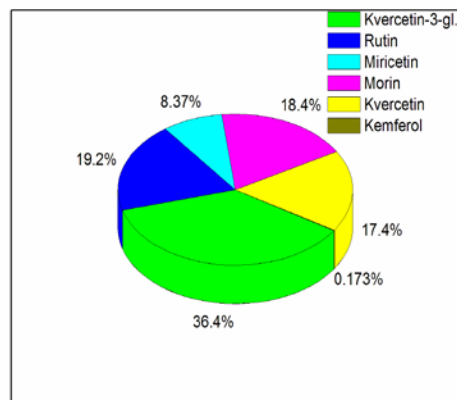
Tabela 29. Sadržaj flavonola u Vranac vinima, detektovanih na 360 nm (mg/L \pm SD, $n = 3$)

Vino	Kvercetin-3-glikozid (1)	Rutin (2)	Miricetin (3)	Morin (4)	Kvercetin (6)	Kemferol (8)	Ukupni flavonoli
V1	23,82 \pm 0,11	18,24 \pm 0,35	2,97 \pm 0,28	3,19 \pm 0,12	6,56 \pm 0,12	0,49 \pm 0,13	55,27 \pm 0,17
V2	6,65 \pm 0,23	1,16 \pm 0,11	1,18 \pm 0,09	2,06 \pm 0,02	2,55 \pm 0,12	0,35 \pm 0,45	13,95 \pm 0,12
V3	23,46 \pm 0,12	18,59 \pm 0,02	6,87 \pm 0,12	5,02 \pm 0,25	6,50 \pm 0,12	0,34 \pm 0,09	54,34 \pm 0,42
V4	11,38 \pm 0,35	5,12 \pm 0,13	1,52 \pm 0,22	5,63 \pm 0,43	7,36 \pm 0,12	/	31,01 \pm 0,11
V5a	5,36 \pm 0,02	4,04 \pm 0,12	/	2,32 \pm 0,11	1,58 \pm 0,12	/	13,30 \pm 0,19
V5b	12,29 \pm 0,13	3,95 \pm 0,31	1,09 \pm 0,13	5,88 \pm 0,46	7,07 \pm 0,252	/	30,28 \pm 0,23
V6a	1,68 \pm 0,12	2,12 \pm 0,15	/	1,83 \pm 0,12	4,37 \pm 0,11	/	10,00 \pm 0,34
V6b	4,72 \pm 0,19	3,13 \pm 0,42	0,91 \pm 0,46	1,85 \pm 0,08	6,56 \pm 0,23	0,44 \pm 0,25	17,61 \pm 0,13
V7	9,17 \pm 0,08	1,15 \pm 0,35	0,47 \pm 0,42	4,32 \pm 0,07	4,56 \pm 0,12	0,41 \pm 0,34	20,08 \pm 0,11
V8a	8,36 \pm 0,12	4,47 \pm 0,12	0,98 \pm 0,09	4,72 \pm 0,12	4,01 \pm 0,07	/	18,54 \pm 0,25
V8b	18,98 \pm 0,31	10,02 \pm 0,10	4,36 \pm 0,67	9,60 \pm 0,19	9,07 \pm 0,09	0,09 \pm 0,12	52,93 \pm 0,17
V9	15,43 \pm 0,33	6,70 \pm 0,45	0,60 \pm 0,35	11,07 \pm 0,15	7,85 \pm 0,12	0,67 \pm 0,11	41,97 \pm 0,67
V10	17,48 \pm 0,12	7,97 \pm 0,71	3,05 \pm 0,12	2,38 \pm 0,18	5,08 \pm 0,78	0,44 \pm 0,02	47,21 \pm 0,16
V11	8,22 \pm 0,22	13,78 \pm 0,11	0,69 \pm 0,52	4,09 \pm 0,12	2,77 \pm 0,47	/	21,55 \pm 0,15

Da bi imali bolju preglednost prisutnih flavonolima u ovim vinima, na sledećoj slici je grafički dat procentni odnos svih prisutnih flavonola kod Vranac vina najbogatijeg ovim jedinjenjima:



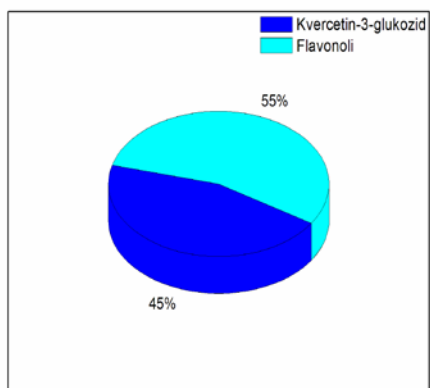
A)



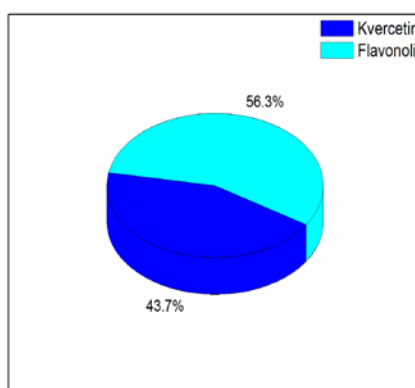
(B)

Slika 42. Grafički prikaz procentnog odnosa detektovanih flavonola na 360 nm u Vranac vinima: Vranac iz vinarije Vukoje (A) i Vranac iz vinarije Tikveš (B)

Od svih prisutnih flavonola najveći doprinos daje kvercetin-3-glikozid, sa učešćem 45,05 % u vinu Vranec - Tga za jug iz 2009 godine i kvercetin sa učešćem 43,70 % u Vranac vinu iz VINO Župe (Tabela 30):



A)



B)

Slika 43. Grafički prikaz procentnog prisustva kvercetin-3-glikozida i kvercetina u odnosu na ukupne flavonole kod uzoraka vina Vranec - Tga za jug iz Tikveša (A) i Vranac vina iz VINO Župe (B)

Tabela 30. Procentni prinos kvercetin i kvercetin-3-glikozida u odnosu na ukupne flavonole u ispitivanim Vranac vinama

Vino	Kvercetin-3-glikozid (%)	Kvercetin (%)	Ukupno (%)
V1	29,63	11,94	41,57
V2	8,32	18,28	26,60
V3	34,67	11,96	46,63
V4	36,70	23,74	60,44
V5a	40,30	11,88	52,18
V5b	40,59	23,35	63,94
V6a	16,80	43,70	60,50
V6b	26,80	37,25	64,05
V7	45,06	22,71	67,77
V8a	45,09	21,63	67,53
V8b	35,86	18,33	54,19
V9	26,22	18,70	44,92
V10	37,03	23,24	60,27
V11	38,14	12,85	50,99

Ukupno procentno prisustvo kvercetina i kvercetin-3-glikozida se nalazi u intervalu od 26,60 do 67,53 i 67,77 % (Vranac vina iz Statusa i Tga za jug iz Tikveša). Kao što se vidi Vranac vina iz Srpskih i Makedonskih rejona su najbogatija (> 60%) ovim biološki aktivnim fenolnim komponentama.

U Tabeli 31 date su dobijene vrednosti za dva flavona: luteolina i apigenina i jednog flavanona – naringina detektovanih DAD detektorom na 360 nm., kao i koncentracija ukupnih flavonoida detektovanih DAD detektorom na 360 nm i fluorescentnim detektorom na 322/275 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$). Analizom dobijenih vrednosti nađeno je da flavoni i flavanon nisu prisutni u većoj količini u vinima.

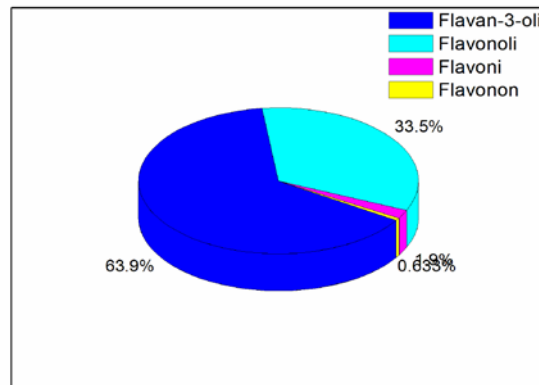
Ukupni flavonoidi se nalaze u intervalu od 59,45 mg/L u Vranac vinu iz Vino Župe do 167,23 mg/L u vinu Vranec - Vilarov iz Stobija iz 2011 godine. Ostala Vranac vina

bogata ovim flavonoidima (> 100 mg/L) su vina iz vinarija: Vukoje, Čitluk, Vinoprodukt Čoka/Ohrid, Rubin i Vino Župa, Tikveš i Stobi.

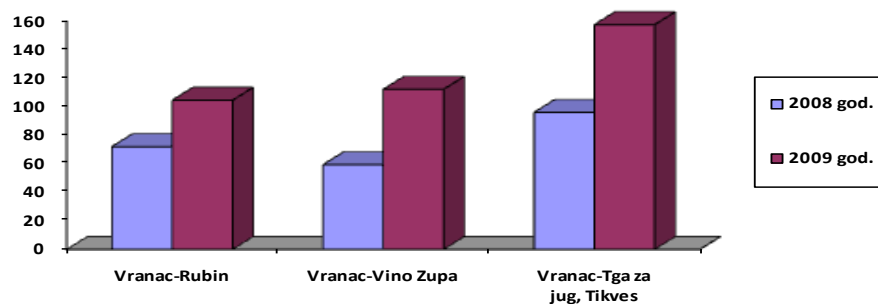
Tabela 31. Sadržaj flavona i flavanona i flavonoida u Vranac vinima (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	Luteolin (5 na 360 nm)	Apigenin (7)	Naringin (5 na 280 nm)	Ukupni flavonoidi
V1	3,22 \pm 0,67	0,86 \pm 0,17	0,85 \pm 0,12	121,84 \pm 0,19
V2	/	0,11 \pm 0,12	0,81 \pm 0,55	101,04 \pm 0,22
V3	2,25 \pm 0,11	1,31 \pm 0,43	/	97,14 \pm 0,15
V4	/	/	0,62 \pm 0,22	100,24 \pm 0,54
V5a	/	/	0,95 \pm 0,09	72,15 \pm 0,22
V5b	/	0,23 \pm 0,02	0,99 \pm 0,12	104,77 \pm 0,15
V6a	/	/	/	61,45 \pm 0,12
V6b	/	0,10 \pm 0,12	0,64 \pm 0,35	112,44 \pm 0,12
V7	0,88 \pm 0,09	/	/	95,47 \pm 0,10
V8a	1,80 \pm 0,23	0,3 \pm 0,02	/	96,15 \pm 0,45
V8b	2,14 \pm 0,55	0,47 \pm 0,22	0,85 \pm 0,12	157,78 \pm 0,19
V9	2,81 \pm 0,21	0,80 \pm 0,18	0,88 \pm 0,09	139,07 \pm 0,32
V10	/	/	0,83 \pm 0,12	167,23 \pm 0,11
V11	/	0,45 \pm 0,32	0,66 \pm 0,43	65,54 \pm 0,32

Na Slici 44 prikazan je procentni odnos flavonoida, određenih DAD-om na 360 nm i 275/322 nm detektovanih fluorescentnim detektorom kod najbogatijeg vina ovim jedinjenjima - Vranec - Tga za jug iz 2009 godine:



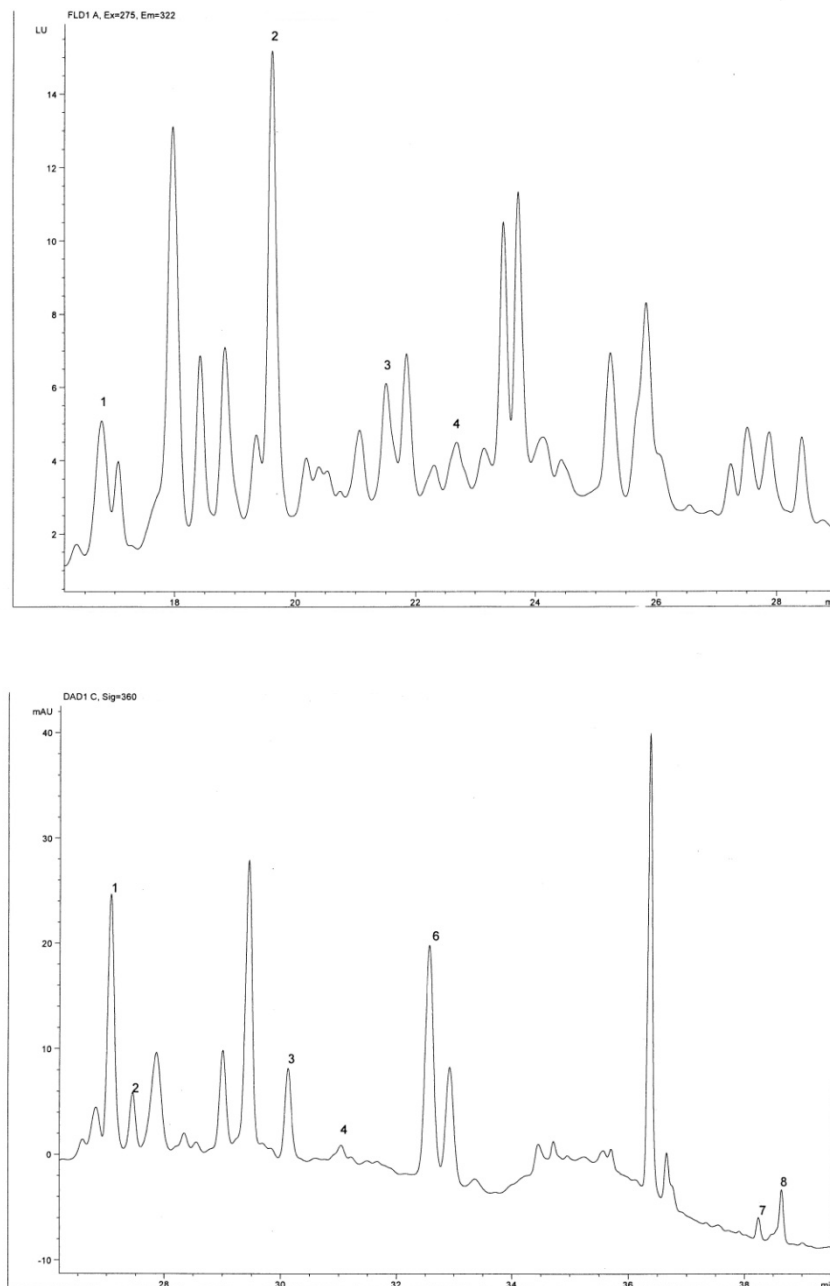
Slika 44. Grafički prikaz procentnog prisustva flavonoida (flavan-3-ola, flavonola, flavona i flavanona) u vinu Vranec - Tga za jug iz 2009 godine



Slika 45. Grafički prikaz uticaja godine berbe na koncentraciju ukupnih flavonoida u Vranac vinima od istih proizvođača

Uticaj godine berbe grožđa praćen je promenom koncentracija ukupnih flavonoida u Vranac vinima iz 2008 i 2009 godine proizvedenih u vinarijama: Rubin, Vino Župa i Tikveš. Rezultati su pokazali da Vranac vina proizvedena 2009 godine imaju

povećanu koncentraciju flavonoida u poređenju sa istim Vranac vinima iz 2008 godine i to: u Vranac vinu iz Rubina za 31,14 %, u Vranac vinu iz VINO župe za 47,13 % i u vinu Vranec – Tga za jug iz Tikveša za 39,06 %.



Slika 46. HPLC dijagrami flavan-3-ola na 322/275 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$) i flavonola, flavona i flavanona na 360 nm u Vranac - Vilarov iz Stobija

4.2.3.3 HPLC analiza antocijana u Vranac vinima

Kao i u kod Cabernet Sauvignon vina, izvršena je identifikacija i kvantifikacija najprisutnijih antocijana u Vranac vinima (Tabele 32-34). Na osnovu analize dobijenih rezultata očigledno je da je dominantan malvidin-3-O-glikozid i njegov acetatni i kumaratni oblik, kao i piranoantocijan: malvidin-3-O-glikozid piruvinska kiselina (Vitisin A) i malvidin-3-vinilfenol glikozid [Radovanović i sar., 2012b].

Table 32. Sadržaj glavnih monomernih antocijana u obliku glikozida prisutnih u analiziranim Vranac vinima na 520 nm: Dp-3-gl, Cy-3-gl, Pt-3-gl, Pn-3-gl, Mv-3-gl (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	Dp-3-gl (1)	Cy-3-gl (2)	Pt-3-gl (3)	Pn-3-gl (4)	Mv-3-gl (5)	Ukupni 3-glikozidi
V1	/	/	/	6,22 \pm 0,14	30,73 \pm 0,55	36.95 \pm 0,19
V2	/	/	/	/	21,96 \pm 1,09	21.96 \pm 0,54
V3	37,45 \pm 0,07	13,24 \pm 0,75	70,14 \pm 1,02	73,81 \pm 0,05	527,98 \pm 0,01	722.62 \pm 0,12
V4	10,35 \pm 0,75	8,48 \pm 0,77	30,53 \pm 0,71	11,75 \pm 0,75	56,25 \pm 0,75	117.36 \pm 0,24
V5a	13,41 \pm 0,13	7,05 \pm 0,23	21,54 \pm 0,75	23,21 \pm 0,75	112,98 \pm 0,75	178.19 \pm 0,15
V5b	9,01 \pm 0,67	7,41 \pm 0,67	14,64 \pm 0,67	20,89 \pm 0,67	91,35 \pm 0,67	143.30 \pm 0,43
V6a	/	/	/	/	19,72 \pm 0,24	19,72 \pm 0,62
V6b	5,07 \pm 0,25	/	7,15 \pm 0,35	7,80 \pm 0,12	53,98 \pm 0,78	75,00 \pm 0,35
V7	12,80 \pm 0,36	/	29,04 \pm 0,74	25,45 \pm 0,19	122,35 \pm 0,21	189,64 \pm 0,55
V8a	12,26 \pm 0,21	7,57 \pm 0,48	18,03 \pm 0,95	16,77 \pm 0,86	97,54 \pm 1,10	152.17 \pm 0,92
V8b	26,80 \pm 0,75	11,34 \pm 0,35	36,72 \pm 0,23	34,91 \pm 0,75	244,19 \pm 0,73	353.96 \pm 0,26
V9	10,03 \pm 0,28	5,95 \pm 0,24	15,46 \pm 0,43	14,24 \pm 0,36	62,93 \pm 0,45	108.61 \pm 0,68
V10	70,47 \pm 0,55	22,86 \pm 0,76	95,47 \pm 0,37	113,98 \pm 0,68	549,81 \pm 0,65	852,59 \pm 0,45
V11	/	/	5,25 \pm 0,67	5,61 \pm 0,67	21,98 \pm 0,67	32,84 \pm 0,67

Table 33. Sadržaj monomernih antocijana u obliku 3-acetilglikozida ivitisin A prisutnih u analiziranim Vranac vinama na 520 nm ($\text{mg L}^{-1} \pm \text{SD}$, $n = 3$)

Vino	Dp-3-acet. gl. (6)	Cy-3-acet. gl. (8)	Pt-3-acet. gl. (9)	Pn-3-acet. gl. (10)	Mv-3-acetgl. (11)	3-acetil-glikozidi	Vitisin A (7)
V1	/	/	6,46±0,75	/	7,99±0,15	14,45±1,23	14,13±0,75
V2	/	/	/	/	10,19±1,09	10,19±1,09	/
V3	18,93±1,11	9,94±0,55	14,79±0,65	22,62±0,75	95,07±0,23	160,72±1,05	/
V4	6,39±0,71	10,28±0,11	6,90±0,32	11,08±0,25	86,42±0,75	121,07±1,15	/
V5a	/	/	6,38±0,75	/	14,90±0,23	21,28±1,05	18,76±0,67
V5b	/	/	/	11,89±0,67	12,45±0,55	24,34±1,25	/
V6a	/	/	/	/	/	/	3,05±0,17
V6b	/	/	/	/	14,23±0,75	14,23±1,05	/
V7	9,00±0,16	9,75±0,61	/	/	11,48±0,56	30,23±1,05	6,00±0,45
V8a	14,03±0,54	6,43±0,68	/	/	15,32±0,62	35,78±1,05	/
V8b	9,27±1,02	21,03±0,61	8,20±0,67	9,63±0,25	62,58±0,23	110,71±2,57	20,25±0,27
V9	10,66±0,34	8,91±0,55	8,64±0,65	8,46±0,17	12,02±0,67	48,69±1,15	23,85±0,16
V10	26,97±0,63	19,92±0,47	18,01±0,34	11,38±0,26	64,75±0,17	141,03±1,05	57,74±0,65
V11	/	/	/	/	105,28±0,67	105,28±0,63	/

Kada se analiziraju dobijene vrednosti može se uočiti da je koncentracija ukupnih antocijana u obliku 3-glikozida (Tabela 32) u širokom intervalu od 21,96 mg/L u Vranac vinu iz vinarije Čitluk (2007 godine) do 852,59 mg/L u Vranec –Vilarov iz vinarije Stobi i 722,63 mg/L u Vranac vinu iz Plantaže.

Tabela 34. Sadržaj antocijana u obliku 3-p-kumaroilglikozida i malvidin vinilfenilglikozid u analiziranim Vranac vinima na 520 nm i ukupni nađeni antocijani (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	Pt-3- p- kum. gl. (12)	Pn-3-p- kum.gl. (13)	Mv-3-p-kum.gl.- trans (14)	Ukupni 3-p- kumaroil- glikozida	Mv -3- vinyl- fenolglikozid (15)	Ukupni antocijani
V1	9,45 \pm 0,17	13,93 \pm 0,67	32,55 \pm 0,65	58,93 \pm 0,23	11,95 \pm 0,64	136,41 \pm 0,17
V2	/	/	/	/	/	32,76 \pm 0,63
V3	10,26 \pm 0,65	20,04 \pm 0,67	55,93 \pm 0,43	86,23 \pm 0,25	3,01 \pm 0,17	972,58 \pm 0,23
V4	52,17 \pm 0,21	45,81 \pm 0,37	54,12 \pm 0,06	167,36 \pm 0,56	20,90 \pm 0,16	426,69 \pm 0,64
V5a	19,39 \pm 0,63	14,05 \pm 0,45	19,75 \pm 0,07	53,19 \pm 0,61	14,08 \pm 0,32	285,42 \pm 0,27
V5b	8,01 \pm 0,27	10,60 \pm 0,12	12,61 \pm 0,32	31,22 \pm 0,45	/	198,66 \pm 0,91
V6a	/	/	/	/	/	22,70 \pm 3,10
V6b	/	/	5,92 \pm 3,13	5,92 \pm 3,10	/	90,93 \pm 3,19
V7	/	/	/	/	/	225,87 \pm 0,65
V8a	9,61 \pm 0,35	15,07 \pm 0,61	12,18 \pm 0,98	36,86 \pm 0,64	/	224,81 \pm 3,10
V8b	15,29 \pm 0,19	15,27 \pm 0,16	36,28 \pm 0,23	67,36 \pm 0,45	20,79 \pm 0,61	572,21 \pm 0,54
V9	10,21 \pm 0,67	10,34 \pm 0,67	42,90 \pm 0,17	63,45 \pm 0,67	27,42 \pm 0,78	272,02 \pm 0,12
V10	80,91 \pm 0,11	51,65 \pm 0,21	100,68 \pm 0,21cis 122,42 \pm 0,13tr	327,48 \pm 0,67	69,42 \pm 0,17	1448,26 \pm 0,16
V11	/	24,87 \pm 0,17	40,52 \pm 0,85	65,39 \pm 0,65	17,37 \pm 0,16	220,88 \pm 0,63

Antocijani, kao biološki veoma značajna fenolna jedinjenja su predmet istraživanja velikog broja radova [De Galulejacil sar., 1999; Jackson, 2008; Lila, 2004; Mazza i Miniati, 1993; Mazza i sar, 1999; Meiers i sar, 2001; Munoz-Espada i sar., 2004; Wang i sar., 1997]. Njihovo prisustvo u Vranac vinima, kao i kod Cabernet Sauvignon vina, je posledica različitih faktora, kao što su: zrenje grožđa, način proizvodnje vina, čuvanje tj starenje vina itd, tako da njihova koncentracija ima veoma širok interval od 22,70 mg/L u Vranac vinu iz VINO Župe do 1501,79 mg/L u

Vranac vinu Vilarov iz Stobija. Nakon toga po ukupnoj koncentraciji dolazi Vranac vino iz vinarije Plantaža, proizvedenog 2007 godine (972,58 mg/L).

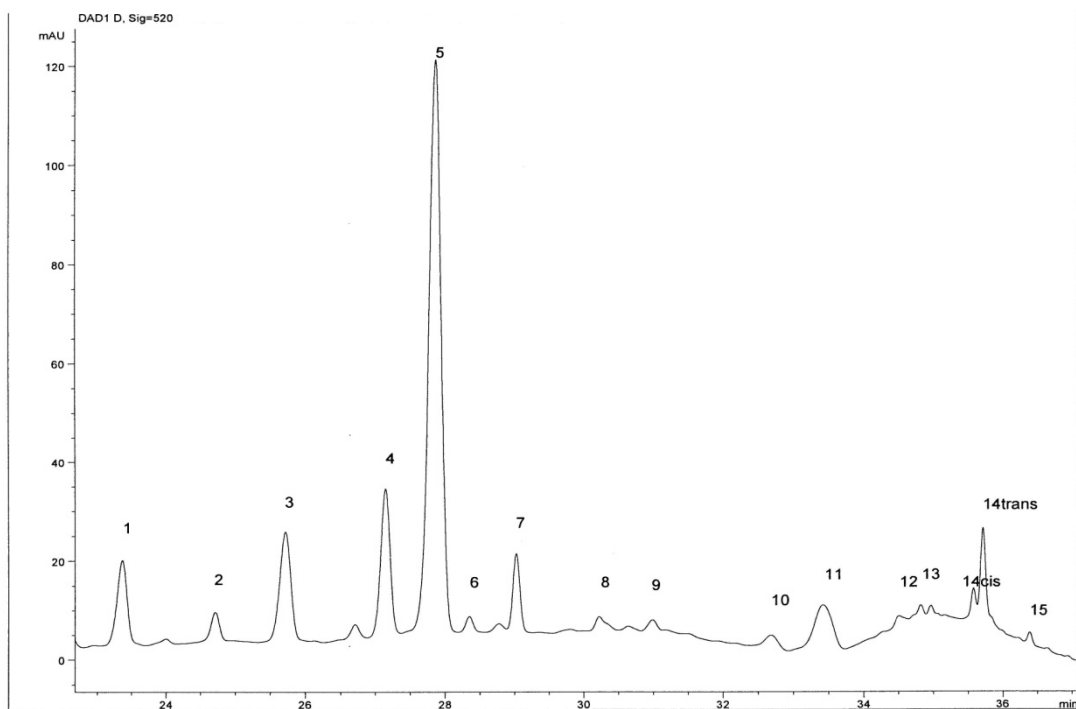
Prisustvo 3-glukozida u odnosu na ukupne antocijane varira od 14,87 % u Vranac vinu iz vinarije Pivka (Negotin) do 85,08% u Vranac vinu iz VINO Župe, proizvedenih 2008 godine.

Prisustvo 3-acetilglukozida u odnosu na ukupne antocijane takođe varira od 7,66 % u Vranac vinu iz Rubina iz 2008 godine do 31,11% u Vranac vinu iz Čitluka iz 2007 godine.

Prisustvo 3-para-kumaroilglikozida je malo u uzorcima Vranac vina i varira od nule u vinima, proizvedenih u vinarijama Čitluk (2007 godine), VINO Župa i Status (2008 godine) do 10,08 % u Vranac vinu iz vinarije Tikveš (2009 godine). Prisustvo Vitisin A i malvidin-3-vinilfenolglikozida, takođe je malo i kreće se u intervalima od nule u većem broju ispitivanih Vranac vina do 8,76 %, odnosno do 10,08 % u Vranac vinu iz Tikveša (2009 godine), kao što je prikazano u tabeli 35:

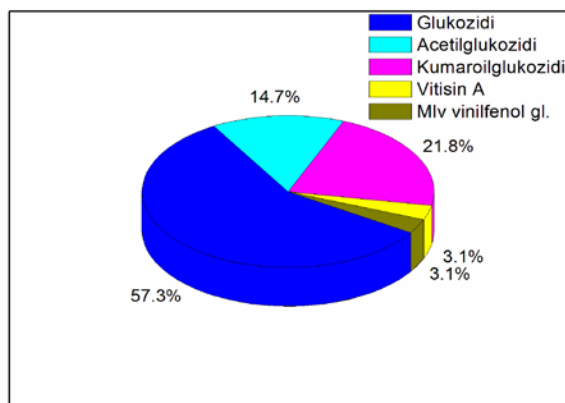
Tabela 35. Procentni odnos prisutnih antocijanskih derivata u ispitivanim uzorcima Vranac vina

Antocijanini (%)	Min. prisutni u uzorku Vranac vina	Max. prisutni u uzorku Vranac vina
3-Glikozidi	14,87 % (V iz Pivke)	85,08% (V iz VINO Župe)
3-Acetilglikozidi	7,66 % (V iz Rubina, 2008.)	31,11% (V iz Čitluka, 2007.)
3-p-Kumaroilglikozidi	0 % (V iz Čitluka, VINO Župe, Statusa)	10,08 % (V iz Tikveša, 2009.)
Vitisin A	0 % (V2, V3, V4, V5, V6, V8, V11)	8,76 % (V iz Tikveša, 2009.)
Mv-3- vinilfenolglikozid	0 % (V2, V6, V7, V8)	10,08 % (V iz Tikveša, 2009.)
Ukupni antocijani	1,55 % (V iz VINO Župe, 2008.)	100 % (V –Vilarov iz Stobija, 2011)



Slika 47. HPLC dijagram antocijana na 520 nm u vinu Vranec - Vilarov iz Stobija

U vinu Vranec-Vilarov iz vinarije Stobi (2011 godine) koje sadrži najveći sadržaj antocijana (1501,79 mg/L) proračunato je da su antocijanini u obliku 3–glikozida prisutni 57,34 %, 3-acetilglukozida ima 14,69 %, 3-para-kumaroilglikozidima ima 21,81 %, dok vitisin A je prisutan sa 3,14 % i malvidin-3-vinilfenolglikozid sa 3,14 % (Tabela 35 i Slika 48):



Slika 48. Grafički prikaz procentnog odnosa antocijana u obliku 3-glikozida, 3-acetilglikozida i 3-para-kumaroilglikozida u vinu Vranec-Vilarov

Iz procentnog odnosa ukupnih glikozida, acetilglikozida i kumaroilglikozida u ispitivanim uzorcima Vranac vina može se zaključiti da je odnos vrsta antocijana u ispitivanim vinima sledeći:

Glikozidi (max 85,08 %) > Acetilglikozidi (max 31,11 %) > Kumaroilglikozidi (max 10,08 %)

Iz Tabele 36, takođe se vidi da su malvidin i njegovi derivati najviše prisutni od svih antocijana u ispitivanim Vranac vinima.

Najveći procenat ukupnih malvidin glikozida (100,00 %) ima Vranac vino (2008 godine) iz VINO Župe, onda Vranac vino iz Čitluka (2007 godine) (98,14 %), a najmanje (19,92 %) ima u vinu Vranec - Tga za jug iz Tikveša (2009 godine).

Glikoni malvidina različito su prisutni u Vranac vinima i to: Malvidin-3-glikozid (9,95 - 85,08 %) > malvidin-3-acetilglikozid (5,39 - 31,11 %) > malvidin-3-p-kumaroil glikozid-trans (0 - 23,86 %)

Tabela 36. Procentni odnos prisutnih malvidin glikona u odnosu na ukupne antocijane u uzorcima Vranac vina

Vino	Malvidin-3-glikozid (%)	Malvidin-3-acetilglikozid (%)	Malvidin-3-p-kumaroil-glikozid (%)	Ukupni malvidin glikozidi (%)
V1	22,53	5,86	23,86	52,25
V2	67,03	31,11	/	98,14
V3	54,29	9,78	5,75	69,82
V4	13,18	20,25	12,68	46,11
V5a	32,02	6,28	6,36	44,66
V5b	39,60	6,80	6,48	52,88
V6a	85,08	14,92	/	100,00
V6b	59,36	15,65	5,41	80,42
V7	54,17	5,08	/	59,25
V8a	43,49	2,91	6,72	53,12
V8b	42,65	10,93	6,34	19,92
V9	23,13	5,39	15,77	44,29
V10	36,61	5,39	14,86	56,86
V11	9,95	47,66	18,34	75,95

4.3 Analiza uzoraka ostalih jednosortnih crvenih vina iz Srbije i Makedonije

Na jugu Balkana, naročito u Srbiji i Makedoniji, pored autohtone vrste grožđa Vranac, zastupljena je i autohtona Vitis Vinifera vrsta crvenog grožđa Kratošija. Od internacionalnih sorti, pored Cabernet Sauvignon grožđa, prisutne su i vrste grožđa kao što je Pinot Noir (Burgundac), Merlot, Frankovka itd. U skladu sa postavljenim ciljem, izvršili smo ispitivanje fenolnog sastava nekih uzoraka jednosortnih crvenih vina, dobijenih od ovih sorti grožđa.

U Tabeli 1 (Eksperimentalni deo) prikazana su šest uzoraka jednosortnih visoko kvalitetnih crvenih vina sa određenim geografskim poreklom i to: vino Kratošija iz Župskog vinogorja (Srbija) i vino Kratošija iz Tikveškog vinogorja (Makedonija), proizvedenih 2009 godine; vino Merlot iz Gročanskog vinogorja (Srbija) i vino Merlot iz Tikveškog vinogorja (Makedonija), proizvedenih 2009 godine; kao i vino Pinot Noir, proizvedenog 2007 godine u vinariji Rubin i vino Frankovka, proizvedeno 2008 godine u vinariji Vršački podrumi u Srbiji [Radovanović i sar., 2008, 2012a, 2012b].

4.3.1 Spektroskopska analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima jednosortnih crvenih vina

U tabeli 37 prikazani su rezultati spektroskopske analize sadržaja ukupnih fenola, estara vinske kiseline i ukupnih flavonola određeni modifikovanom Glories metodom [Mazza i sar., 1999; Radovanović i sar., 2012a,b]. Koncentracija ukupnih fenola, kao i kod ostalih prethodno analiziranih jednosortnih vina, praćena je na 280 nm i predstavljena kao ekvivalent koncentracije galne kiseline, ukupni estri vinske kiseline na 320 nm (ekvivalent koncentracije kafene kiseline) i ukupni flavonoli na 360 nm (ekvivalent koncentracije kvercetina).

Tabela 37. Sadržaj ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola (mg/L), kao i vrednost prisutnog alkohola (%) i pH u izabranim uzorcima jednosortnih crvenih vina

Vino	Alkohol (%)	pH vrednost	Ukupni fenoli	Estri vinske kiseline	Ukupni flavonoli
K1	11,0	2,86	1510,02±2,11	175,74±1,61	106,80±1,41
K2	12,5	3,12	1557,71±2,15	194,66±1,11	126,39±1,21
M1	13,0	3,34	1458,12±0,12	196,87±0,32	97,15±0,73
M2	12,0	3,49	2012,35±0,72	381,55±0,45	184,46±0,22
PN	11,9	3,15	1600,30±1,51	246,42±0,43	95,22±0,54
F	12,6	3,08	1501,70±1,18	246,18±0,98	90,22±0,47

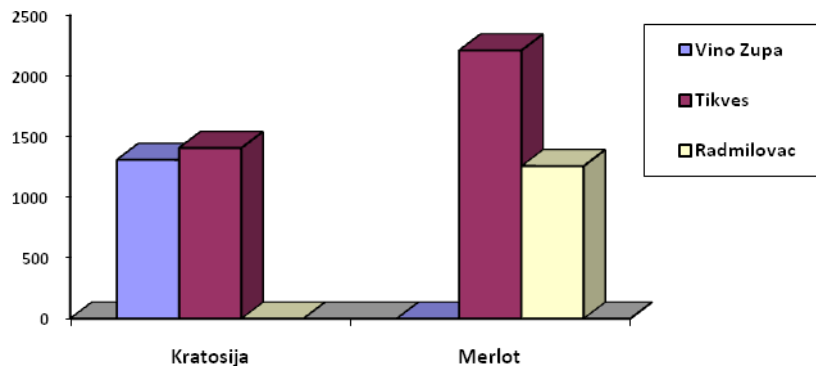
Ova jednosortna crvena vina su slabo kisela, pH od 2,86 (Kratošija iz Vino Župe) do 3,49 (Merlot iz Tikveša), sa koncentracijom alkohola od 11,0 do 12,6 %.

Analiza spektroskopski dobijenih rezultata pokazala je da se dobijene vrednosti razlikuju, tako da koncentracije ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola su najmanje u vinu Merlot iz Oglednog dobra Radmilovac (Srbija), a najveće u vinu Merlot iz Tikveša (Makedonija).

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima i literaturnim podacima za druga ispitivana vina [Cliff i sar., 2007; Lachman i sar., 2007; Piljac i sar, 2005; Simonetti i sar, 1997; Singleton i Rossi, 1965; Stratil i sar.2008].

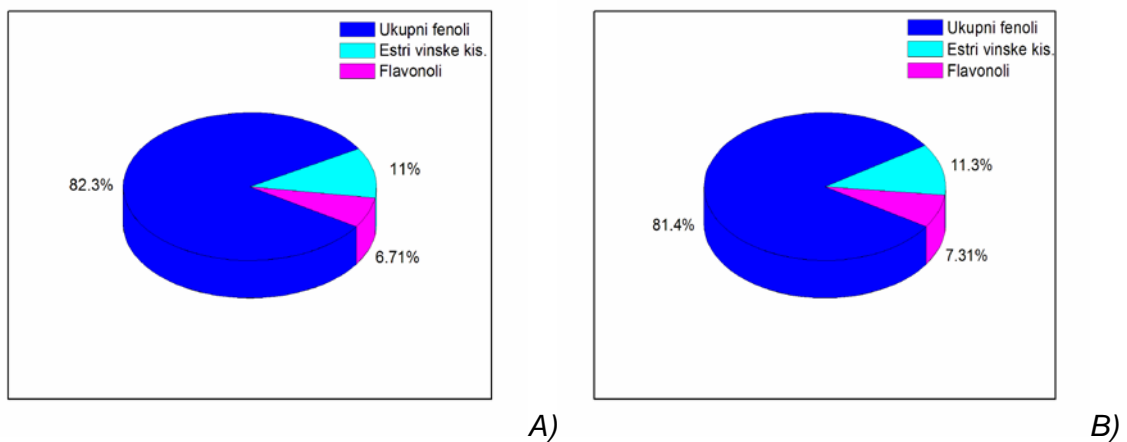
Ako uporedimo vina Kratošija proizvedena u Srbiji i Makedoniji, očigledno je da vino Kratošija iz Tikveša u poređenju sa istoimenim vinom iz Vino Župe ima veću vrednost za fenole za 17 %, za estre vinske kiseline za 9,72 % i za flavonole za 15,50%.

Dok vino Merlot, takođe iz Tikveša ima veće koncentracione vrednosti od istoimenog vina proizvedenog u Radmilovcu i to za fenole za 43,13 %, za estre vinske kiseline za 48,40 % i za flavonole za 47,33 %:

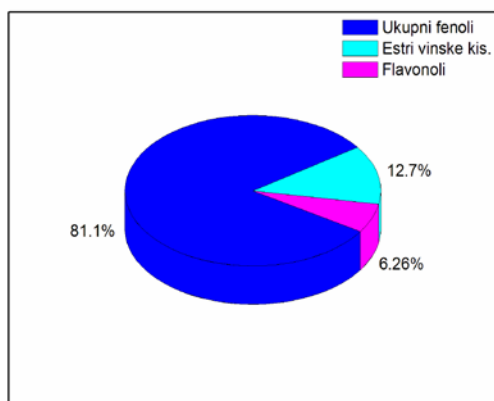


Slika 49. Grafički prikaz odnosa između koncentracija ukupnih fenola istosortnog vina, proizvedenih u Srbiji i Makedoniji od različitih proizvođača

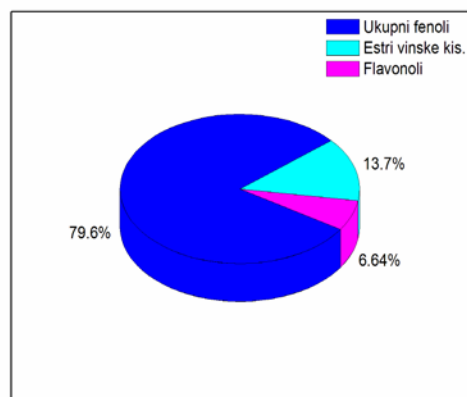
Međutim, procentni odnos, tj prisustvo određenih grupa fenolnih jedinjenja kod svih jednosortnih ispitivanih vina je vrlo sličan nezavisno od vrsta grožđa i to: ukupnim fenolima pripada od 79,6 do 83,3 %, estrima vinske kiseline od 10,6 do 13,7 %, a flavonolima od 4,66 do 7,31 %, kao što je prikazano na sledećim graficima:



Slika 50. Grafički prikaz procentnog odnosa spektroskopski određenih ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u vinima Kratošija iz Vino Župe (A) i Tikveša (B)

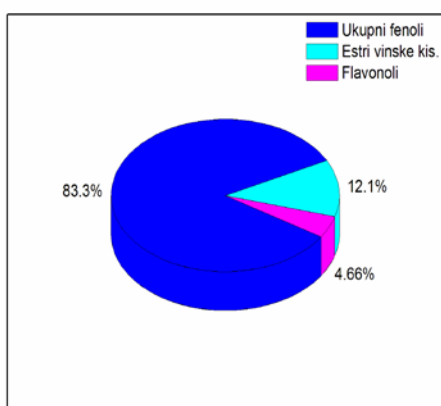


A)

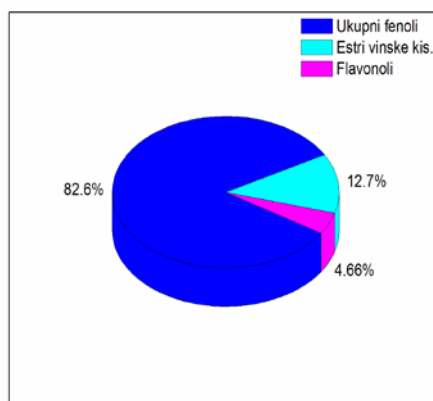


B)

Slika 51. Grafički prikaz procentnog odnosa spektroskopski određenih ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u vinama Merlot iz Radmilovca (A) i Tikveša (B)



A)



B)

Slika 52. Grafički prikaz procentnog odnosa spektroskopski određenih ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u vinu Pinot Noir (A) i u vinu Frankovka (B)

4.3.2 HPLC analiza neflavonoidnih jedinjenja u uzorcima jednosortnih crvenih vina

Kao i kod prethodno analiziranih jednosortnih vina, u ovom poglavlju biće izvršena identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u izabranim uzorcima jednosortnih crvenih vina, da bi se moglo izvršiti upoređivanje dobijenih koncentracijskih vrednosti sa antioksidativnim i antimikrobnim delovanjem vina.

4.3.2.1 HPLC analiza fenolnih kiselina u uzorcima jednosortnih crvenih vina

U izabranim crvenim vinama, kao i kod ostalih do sada analiziranih vina, izvršena je identifikacija i kvantifikacija deset fenolnih kiselina i trans-resveratrola, na osnovu retencionih vremena i apsorpcionih maksimuma njihovih standardnih jedinjenja (eksperimentalni deo).

U Tabeli 38 date su koncentracije značajnih hidroksibenzojevih kiselina prisutnih u ispitivanim uzorcima jednosortnih crvenih vina: galna, vanilinska i siringinska kiselina, određenih na 280 nm:

Tabela 38. Sadržaj hidroksibenzojevih kiselina u izabranim jednosortnim vinima, na 280 (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	Galna kiselina (1)	Vanilinska kiselina (2)	Siringinska kiselina (3)	Elagilnska kiselina (4)	Ukupne hidroksibenzojeve kiseline
K1	58,95 \pm 0,11	/	1,56 \pm 0,09	3,77 \pm 0,71	64,28 \pm 1,15
K2	86,72 \pm 0,23	/	/	/	86,72 \pm 1,16
M1	56,64 \pm 0,72	1,01 \pm 0,02	2,95 \pm 0,07	9,06 \pm 0,26	69,76 \pm 1,28
M2	94,10 \pm 0,44	1,08 \pm 0,72	11,21 \pm 0,22	13,84 \pm 0,46	110,23 \pm 1,22
PN	54,01 \pm 0,78	1,16 \pm 1,11	1,36 \pm 1,18	5,01 \pm 1,18	61,54 \pm 1,18
F	47,25 \pm 0,19	0,10 \pm 1,18	5,34 \pm 1,11	12,65 \pm 1,21	65,34 \pm 1,13

U Tabeli 39 su date koncentracione vrednosti značajnih hidroksicimetnih kiselina prisutnih u ispitivanim uzorcima jednosortnih crvenih vina: *trans*-kaftarna, *trans*-kutarna, hlorogena, kafena, *p*-kumarna i ferulna kiselina, na 320 nm:

Table 39. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u izabranim jednosortnim crvenim vinima, na 320 nm (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	<i>t</i> -kaftarna kis. (1)	<i>t</i> -kutarna kis. (2)	Kafena kis. (3)	Hlorogenska kis. (4)	<i>p</i> -Kumarna kis. (5)	Ferulna kis. (6)	Ukupne hidroksicimetne kiseline
K1	9,31 \pm 0,24	4,32 \pm 0,12	2,68 \pm 0,07	/	4,21 \pm 0,23	0,86 \pm 0,33	21,38 \pm 1,18
K2	2,66 \pm 0,12	3,64 \pm 0,13	2,21 \pm 0,09	/	1,47 \pm 0,52	1,01 \pm 0,11	10,99 \pm 1,15
M1	12,18 \pm 0,72	2,67 \pm 0,09	2,26 \pm 0,08	/	2,78 \pm 0,37	0,91 \pm 0,19	20,80 \pm 1,28
M2	18,62 \pm 0,31	3,40 \pm 0,72	6,70 \pm 0,12	4,21 \pm 0,72	3,85 \pm 0,76	5,71 \pm 0,72	42,49 \pm 1,11
PN	28,59 \pm 0,56	9,98 \pm 0,37	4,14 \pm 0,87	/	4,44 \pm 1,18	0,46 \pm 0,51	47,61 \pm 1,45
F	39,06 \pm 0,21	9,23 \pm 0,12	5,71 \pm 0,08	1.33 \pm 1,18	4,14 \pm 0,09	1,60 \pm 0,23	61,33 \pm 1,25

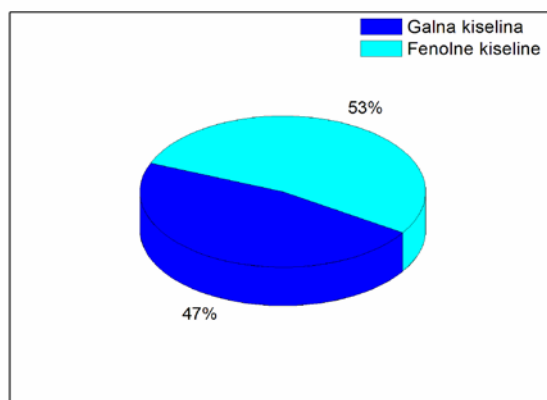
Kao što se može videti od datih vrednosti, koncentracije hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina se razlikuju kako između vina dobijenih od različitih sorti grožđa, tako i između vina istih sorti grožđa ali proizvedenih u različitim vinarijama i sa različitog područja Balkana.

Iz Tabele 40 može se videti procentno prisustvo galne kiseline, ukupnih hidroksibenzevih i hidroksicimetnih kiselina u ispitivanim uzorcima jednosortnih vina i zaključiti da je galna kiselina najdominatnija fenolna kiselina prisutna u procentnom prinosu od 37,30 % u vinu Frankovka do 88,75 % u vinu Kratošija iz Tikveša.

Očigledno je da distribucija ovih kiselina u crvenim vinama dobijenih od različitih sorti grožđa zavisi ne samo od vrste grožđa, nego i od podneblja, vremenskih uslova i drugih spoljnih faktora, kao što je tehnika proizvodnje i čuvanja, koji zajedno utiču na fenolni sastav vina.

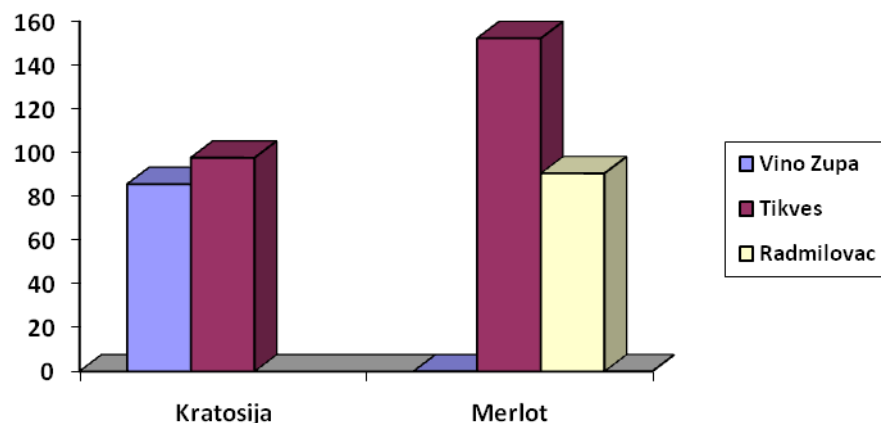
Tabela 40. Ukupne fenolne kiseline (mg/L) i odnos galne kiseline, ukupnih hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina prema ukupnim detektovanim fenolnim kiselinama (%)

Vino	Ukupne fenolne kiseline (mg/L)	Galna kiselina (%)	Hidroksibenzoevih kiselina (%)	Hidroksicimetnih kiselina (%)
K1	85,66±1,18	68,82	75,04	24,96
K2	97,71±1,18	88,75	88,75	11,25
M1	90,56±1,18	62,54	77,03	22,97
M2	152,72±1,18	61,77	76,76	23,24
PN	109,15±1,18	49,48	56,38	43,62
F	126,67 ±1,18	37,30	51,58	48,42



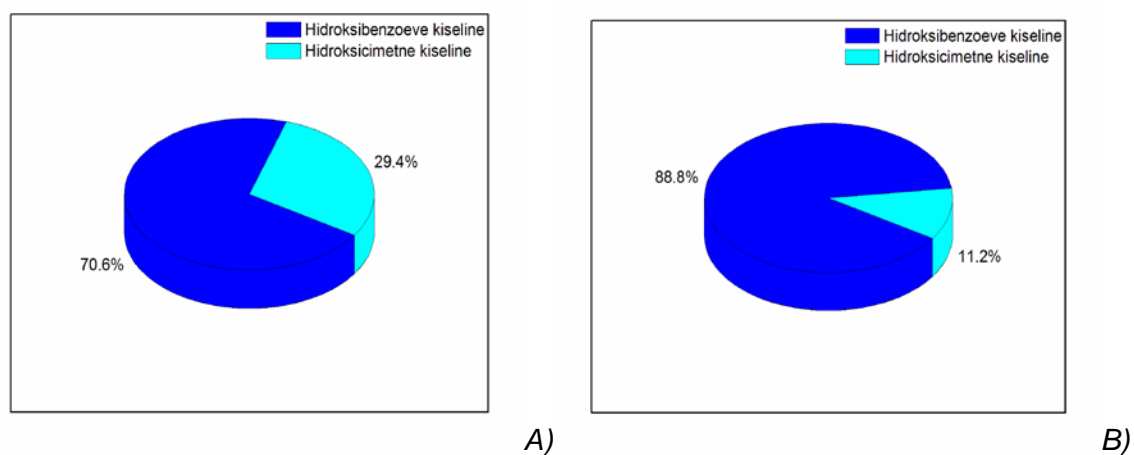
Slika 53. Grafički prikaz procentne vrednosti galne kiseline u odnosu prema ukupnim fenolnim kiselinama u vinu Kratošija iz Tikveša

Takođe, Kratošija vino iz Tikveša ima veću koncentraciju ukupnih fenolnih kiselina za 12,34 % u poređenju sa Kratošijom iz VINO Župe, dok Merlot iz Tikveša ima veću koncentraciju čak za 40,55 % u poređenju sa Merlot vinom iz Radmilovca:



Slika 54. Grafički prikaz koncentracija ukupnih fenolnih kiselina istosortnih vina različitih proizvođača proizvedenih u Srbiji i Makedoniji

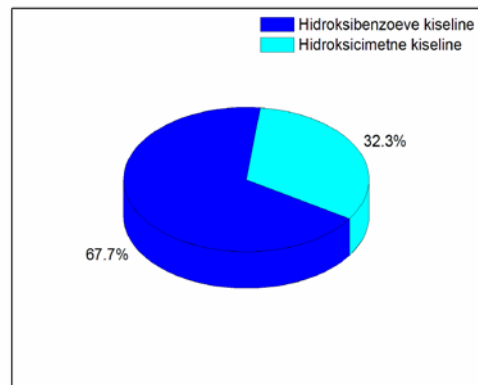
Na sledećim graficima prikazan je odnos hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u ispitivanim crvenim vinima:



Slika 55. Grafički prikaz procentnog odnosa prisutnih hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u uzorcima: A) Kratošija vino iz Vino Župe i B) Kratošija vino iz Tikveša

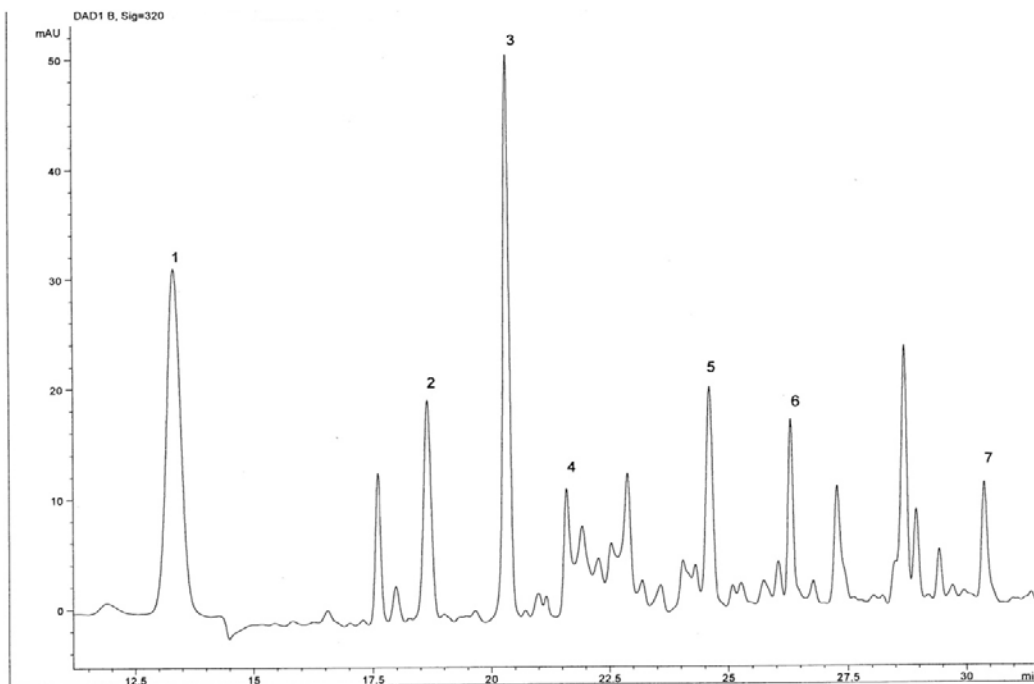
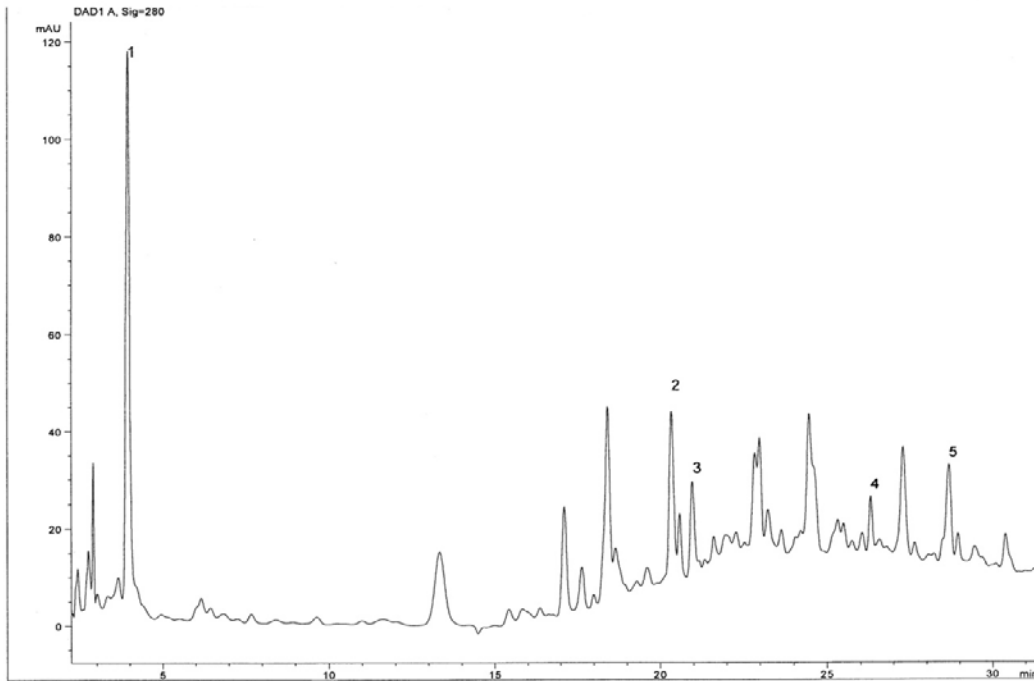


A)



B)

Slika 56. Grafički prikaz procentnog odnosa prisutnih hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u uzorcima: A) Merlot vino iz Radmilovca i B) Merlot vino iz Tikveša



Slika 57. HPLC dijagrami fenolnih kiselina (na 280 i 320 nm) kod Merlot vina iz Tikveša

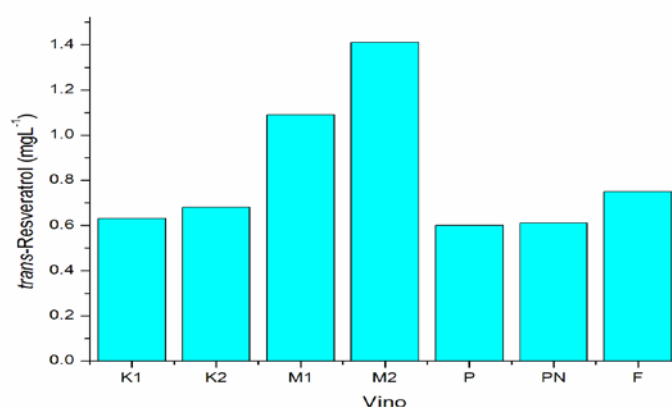
4.3.2.2 HPLC analiza trans-resveratrola u uzorcima jednosortnih crvenih vina

U tabeli 41 date su dobijene vrednosti sadržaja ovog biološki značajnog jedinjenja na osnovu standardne jednačine i apsorpcione vrednosti određene na 320 nm:

Tabela 41. Sadržaj trans-resveratrola u izabranim jednosortnim crvenim vinima na 320 nm (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	trans-Resveratrol (7)
K1	0,60 \pm 0,06
K2	0,68 \pm 0,02
M1	1,09 \pm 0,09
M2	2,41 \pm 0,02
PN	0,66 \pm 0,12
F	0,65 \pm 0,16

Rezultati pokazuju da se trans-resveratrol u ispitivanim uzorcima jednosortnih vina nalazi u intervalu od 0,60 mg/L u vinu kratošija iz Vino Župe do 2,41 mg/L u vinu Merlot u vinariji Tikveš:



Slika 58. Grafički prikaz sadržaja trans-resveratrola u ispitivanim jednosortnim crvenim vinima

4.3.3 HPLC analiza flavonoidnih jedinjenja u jednosortnim crvenim vinima

4.3.3.1 Flavan-3-oli u izabranim jednosortnim crvenim vinima

U Tabeli 43 date su određene koncentracije najzastupljenijih flavan-3-ola u ispitivanim uzorcima vina i to: (+)-katehina, procijanidina B₂, odnosno dimera B tipa: (-)-epikatehin-(4 β →8)-(-)-epikatehina, (-)-epikatehina i (-)-epigalokatehingalata, detektovanih fluorescentim detektorom.

Iz Tabele 43 vidi se da se dobijene koncentracijske vrednosti razlikuju, tako da se ukupna koncentracija određenih flavan-3-ola nalazi u intervalu od 30,06 do 131,30 mg/L. Najmanje vrednosti su dobijene za vino Kratošija iz vinarije Tikveš, dok njihovo vino Merlot je imalo najviše flavan-3-ola:

Tabela 43. Sadržaj flavan-3-oli u jednosortnim crvenim vinima (mg/L \pm SD, n = 3) na 275/322 nm

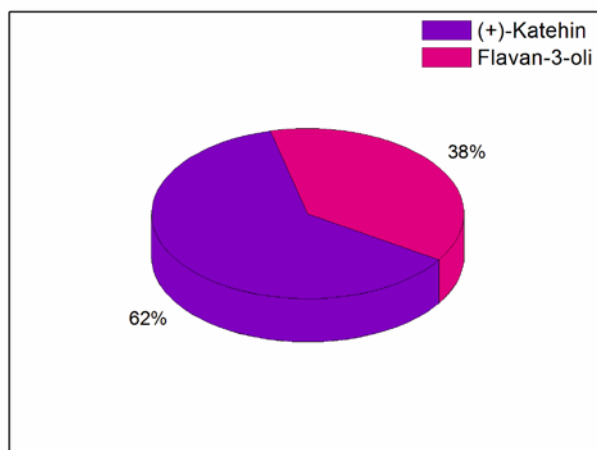
Vino	(+)-Katehin (1)	Procianidin B ₂ (2)	(-)-Epikatehin (3)	(-)-Epigalo catehingalat (4)	Ukupni flavan-3-oli
K1	31,87 \pm 0,72	28,37 \pm 0,75	15,89 \pm 0,32	21,86 \pm 0,70	97,99 \pm 0,19
K2	15,66 \pm 0,13	/	14,40 \pm 0,31	/	30,06 \pm 0,15
M1	29,49 \pm 0,25	38,19 \pm 0,46	35,49 \pm 0,65	12,49 \pm 0,54	115,66 \pm 0,23
M2	29,91 \pm 0,12	41,11 \pm 0,72	41,14 \pm 0,72	20,04 \pm 0,12	132,20 \pm 0,25
PN	36,77 \pm 0,93	15,62 \pm 1,05	14,22 \pm 0,77	4,42 \pm 1,11	71,03 \pm 0,13
F	23,68 \pm 0,19	8,51 \pm 0,23	19,79 \pm 0,23	4,81 \pm 1,18	48,20 \pm 0,17

Iz Tabele 44, očigledno je da najprisutniji flavan-3-ol je (+)-katehin i to najviše je prisutan (36,77 mg/L) u vinu Pinot Noir:

Tabela 44. Procentni prinos (+)-katehina u ispitivanim jednosortnim vinima

Vino	(+)-Katehin (%)
K1	32,52
K2	52,09
M1	25,50
M2	22,09
PN	51,77
F	62,00

Iz ovih podataka se vidi da je (+)-katehin u procentnom iznosu najviše zastupljen u vinu Frankovka, a najmanje u vinu Merlot. Na sledećoj slici grafički je prikazan taj odnos:



Slika 59. Grafički prikaz procentnog odnosa (+)-katehina u poređenju sa ukupnih nađenih flavan-3-ola u vinu Frankovka

4.3.3.2 Flavonoli, flavoni i flavanoni u jednosortnim crvenim vinima

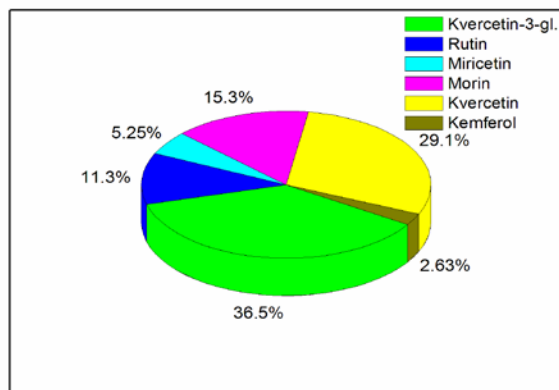
U Tabeli 45 date su određene koncentracije, u ovim jednosortnim vinima, najprisutnijih flavonola i flavonol aglikona kao što su: kvercetin-3-glikozid, rutin (kvercetin-3-O-rutinozid), miricetin, morin, kvercetin i kemferol. Sva jedinjenja su detektovana na 360 nm primenom standardnih jednačina (eksperimentalni deo).

Analizom rezultata može se uočiti da se dobijene koncentracijske vrednosti razlikuju, tako da se ukupna koncentracija određenih flavanola nalazi u intervalu od 2,80 mg/L u vinu Pinot Noir do 53,94 mg/L u vinu Merlot iz Tikveša.

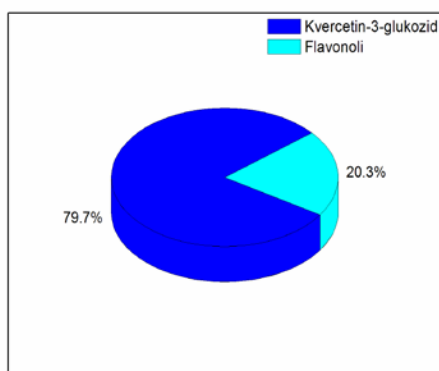
Tabela 45. Sadržaj flavonola u jednosortnim crvenim vinima, na 360 nm (mg/L \pm SD, $n = 3$)

Vino	Kvercetin- 3- glukozid (1)	Rutin (2)	Miricetin (3)	Morin (4)	Kvercetin (6)	Kemferol (8)	Ukupni flavonoli
K1	5,38 \pm 0,34	3,94 \pm 0,13	0,75 \pm 0,23	1,20 \pm 0,21	2,96 \pm 0,22	/	14,23 \pm 0,12
K2	7,98 \pm 0,12	3,67 \pm 0,61	0,79 \pm 0,09	8,16 \pm 0,33	7,02 \pm 0,17	/	27,62 \pm 0,70
M1	7,55 \pm 0,22	6,99 \pm 0,35	1,55 \pm 0,07	2,71 \pm 0,12	1,60 \pm 0,16	1,22 \pm 0,72	21,62 \pm 0,32
M2	19,67 \pm 0,43	12,05 \pm 0,52	2,83 \pm 0,13	8,25 \pm 0,45	15,67 \pm 0,72	1,42 \pm 0,72	59,89 \pm 0,46
PN	2,23 \pm 0,85	0,03 \pm 0,09	0,45 \pm 1,18	1,68 \pm 0,38	0,41 \pm 0,78	/	3,80 \pm 0,03
F	4,25 \pm 0,29	0,02 \pm 0,06	/	0,01 \pm 0,21	1,05 \pm 0,68	/	5,33 \pm 0,22

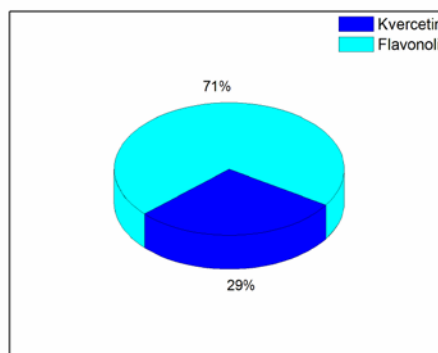
Od svih prisutnih flavonola najveći doprinos daju kvercetin-3-glikozid i kvercetin. Njihova koncentracija je najveća u Merlot vinu iz Tikveša (19,68 i 15,67 mg/L). Dobijeni podaci su u saglasnosti sa literaturnim podacima za druga analizirana vina [Anli i Vural, 2009; Arnous i sar., 2002; Braicu i sar., 2011; Jeffery i sar., 2008; Kallithraka i sar., 2006; McDonald i sar., 1998; Pour Nikfardjam i sar., 2006].



Slika 60. Grafički prikaz procentnog odnosa određenih flavanola na 360 nm u Merlot vinu iz vinarije Tikveš



A)



B)

Slika 61. Grafički prikaz procentnog prisustva kvercetin-3-glikozida u vinu Frankovka (A) i kvercetina u vinu Merlot iz Tikveša (B) u odnosu na ukupne nađene flavonole

Iz Tabele 46 se vidi da se procentno učešće kvercetina i kvercetin-3-glikozida razlikuje u zavisnosti od sorte grožđa i vina. Najveće vrednosti su nađene za kvercetin-3-glikozid (79,74 %) u vinu Frankovka, a za kvercetin (29,05 %) u vinu Merlot iz Tikveša:

Tabela 46. Procentni prinos kvercetin-3-glikozida i kvercetina na osnovu ukupnih flavonola u ispitivanim jednosortnim vinima

Vino	Kvercetin-3-glikozid (%)	Kvercetin (%)	Ukupno (%)
K1	37,81	20,80	52,61
K2	28,89	25,42	34,31
M1	34,92	7,41	42,33
M2	36,48	29,05	65,53
PN	43,93	10,79	54,72
F	79,74	19,70	99,44

U Tabeli 47 su date koncentracije nađenih flavona (luteolina i apigenina) i flavanona (naringina), određenih DAD detektorom na 360 nm, kao i ukupna koncentracija flavonoida ispitivanih jednosortnih crvenih vina detektovanih DAD detektorom na 360 nm i fluorescentnim detektorom na 322/275 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$):

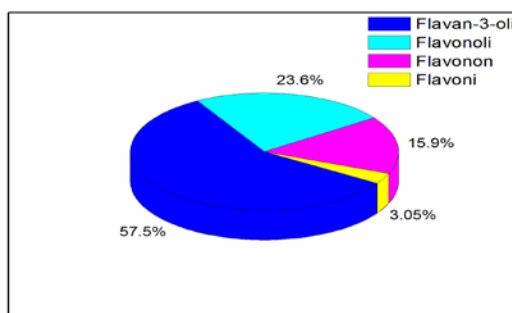
Tabela 47. Sadržaj flavona i flavanona, kao i ukupnih flavonoida u jednosortnim crvenim vinima (mg/L \pm SD, n = 3)

Vino	Luteolin (5 na 360 nm)	Apigenin (7)	Naringin (5 na 280 nm)	Ukupni flavonoidi
K1	/	/	0,70 \pm 0,02	112,92 \pm 0,12
K2	3,01 \pm 0,12	0,43 \pm 0,07	0,90 \pm 0,09	62,02 \pm 0,71
M1	/	0,84 \pm 0,32	0,82 \pm 0,03	138,94 \pm 0,42
M2	5,78 \pm 0,72	1,19 \pm 0,12	1,20 \pm 0,12	200,26 \pm 0,19
PN	/	/	0,98 \pm 0,14	75,81 \pm 0,61
F	/	0,19 \pm 1,18	0,96 \pm 0,29	54,68 \pm 0,32

Analizom dobijenih vrednosti očigledno je da luteolin i apigenin nisu prisutni u velikim kolicinama u ispitivanim crvenim vinima. Najveća koncentracija flavona (6,97 mg/L) i naringina – flavanona (36,29 mg/L) je nađena u Merlot vinu iz Tikveša. Međutim,

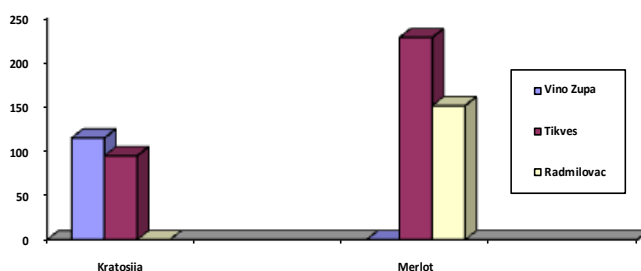
ukupni flavonoidi se nalaze u intervalu od 54,68 mg/L u vinu Frankovka do 193,94 mg/L u vinu Kratošija iz Tikveša. Ostala vina bogata ovim flavonoidima (> 100 mg/L) su vina: Merlot iz Radmilovca (138,94 mg/L) i Kratošija iz Rubina (112,92 mg/L).

Na slici 68 prikazan je procentni odnos flavonoida, detektovanih DAD-om na 360 nm i 275/322 nm fluorescentnim detektorom u Merlot vinu iz Tikveša:

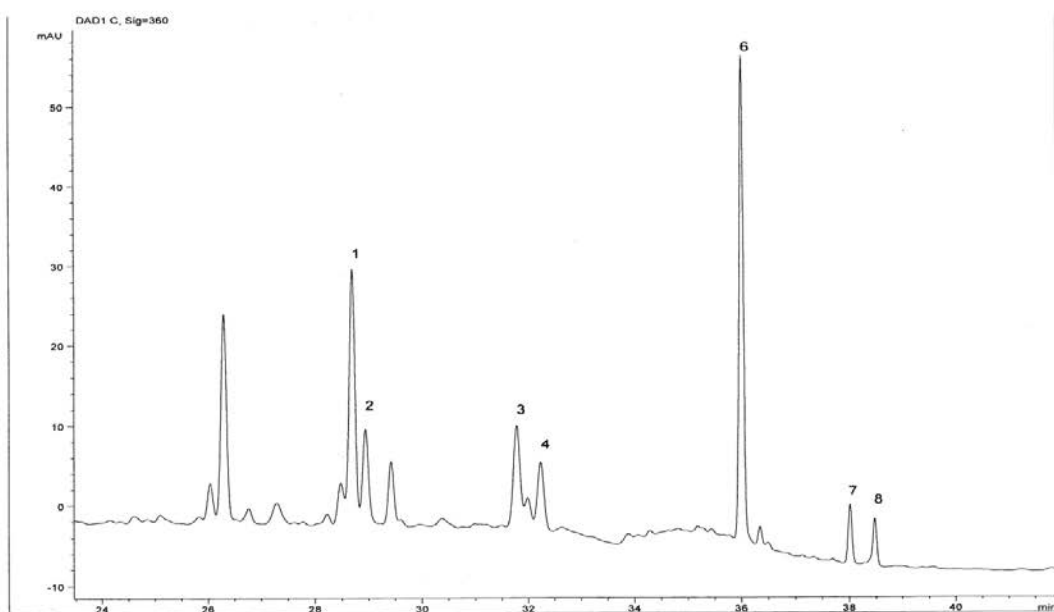
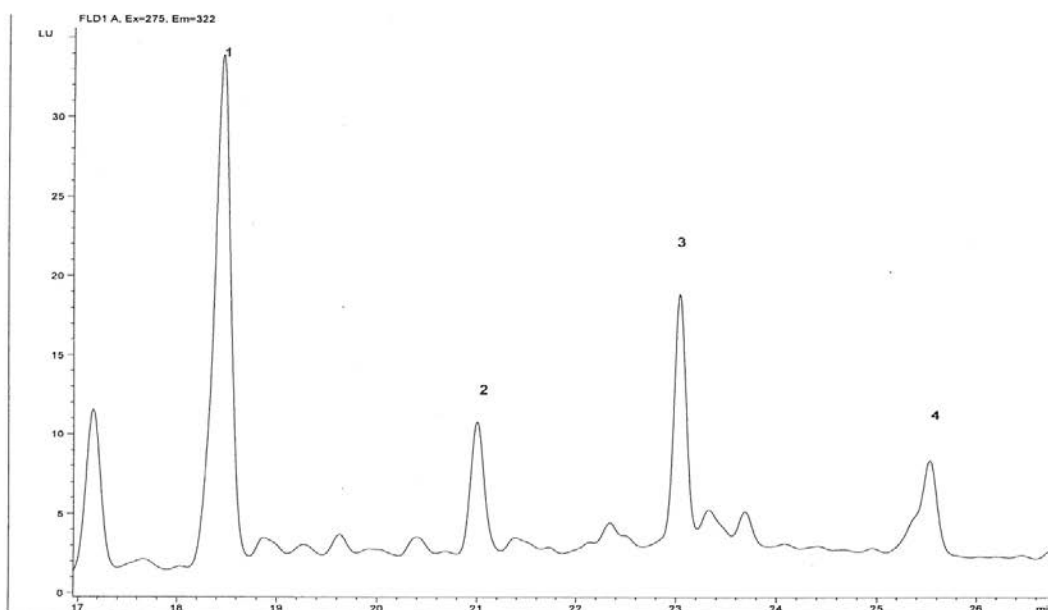


Slika 62. Grafički prikaz procentnog prisustva flavonoida: flavan-3-ola, flavonola, flavona i flavanona u Merlot vinu iz Tikveša

Ako uporedimo ista vina različitih područja Balkana, kao na primer vina Kratošiju i Merlot iz Srpskih rejona sa istosortnim vinama iz Makedonskih rejona, postoji razlika u koncentraciji flavonoida: Kratošija iz Vino Župe je bogatija za 17,50% u poređenju sa Kratošijom iz Tikveša, dok Merlot iz Tikveša ima 33,68% više u poređenju sa vinom Merlot iz Radmilovca:



Slika 63. Grafički prikaz koncentracija ukupnih flavanoida istosortnih vina, proizvedenih u Srbiji i Makedoniji od različitih proizvođača



Slika 64. HPLC dijagrami flavan-3-ola na 322/275 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$) i favonola, flavona i flavanona na 360 nm u Merlot vinu iz Tikveša

4.3.3.3 HPLC analiza antocijana u izabranim jednosortnim crvenim vinima

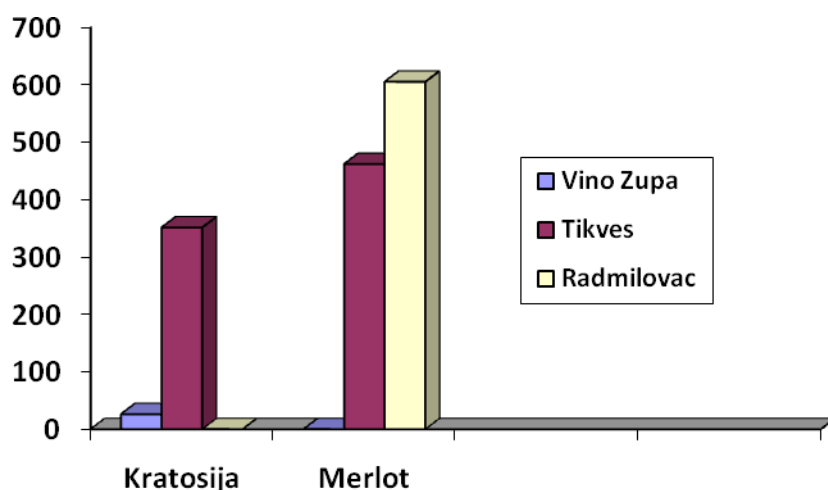
U Tabeli 48 su date koncentracione vrednosti za detektovane antocijane na 520 nm:

Table 48. Sadržaj glavnih monomernih antocijana u obliku glikozida prisutnih u analiziranim jednosortnim vinima na 520 nm (mg/L \pm SD, n = 3)

Antocijani	K1	K2	M1	M2	PN	F
Dp-3-gl (1)	/	/	23,37 \pm 0,02	19,59 \pm 0,08	/	8,09 \pm 1,18
Cy-3-gl (2)	/	/	11,17 \pm 0,09	6,20 \pm 0,52	/	/
Pt-3-gl (3)	/	/	32,44 \pm 0,11	22,74 \pm 0,65	/	/
Pn-3-gl (4)	/	/	75,83 \pm 0,72	17,44 \pm 0,32	/	11,01 \pm 1,13
Mv-3-gl (5)	21,86 \pm 0,72	157,12 \pm 0,72	228,99 \pm 0,52	133,06 \pm 0,78	7,66 \pm 1,18	90,09 \pm 1,23
Dp-3-acetgl (6)	/	/	14,55 \pm 0,09	8,77 \pm 0,52	/	/
Cy-3-acetgl (8)	/	/	13,60 \pm 0,22	9,98 \pm 0,76	/	/
Pt-3-acetgl (9)	/	/	20,01 \pm 0,24	9,03 \pm 0,35	/	/
Pn-3-acetgl (10)	/	/	23,34 \pm 0,35	8,50 \pm 0,07	/	/
Mv-3-acetgl (11)	/	39,81 \pm 0,72	48,42 \pm 0,72	41,49 \pm 0,09	/	6,31 \pm 1,31
Vitisin A (7)	4,34 \pm 0,72	29,35 \pm 0,72	14,72 \pm 0,65	20,02 \pm 0,45	/	21,01 \pm 1,19
Pt-3--kumgl(12)	/	31,17 \pm 0,72	32,51 \pm 0,71	55,82 \pm 0,17	/	/
Pn-3-p-kumgl(13)	/	28,54 \pm 0,72	22,34 \pm 0,32	35,77 \pm 0,12	/	/
Mv-3-kumgl(14)	/	38,75 \pm 0,72	28,51 \pm 0,02	53,93 \pm 0,05	/	/
Mv-3-vinyl fenolgl (15)	/	29,05 \pm 0,72	17,31 \pm 0,09	10,07 \pm 0,08	4,29 \pm 1,18	13,57 \pm 1,25
Ukupni 3-gl	21,86 \pm 0,72	157,12 \pm 0,72	371,80 \pm 0,52	189,03 \pm 0,13	7,61 \pm 1,18	109,19 \pm 1,34
Ukupni 3-acetilgl	/	39,81 \pm 0,72	119,92 \pm 0,70	77,77 \pm 0,71	/	6,31 \pm 1,11
Ukupni 3-p-kumaroilgl	/	96,46 \pm 0,72	83,36 \pm 0,72	166,01 \pm 0,72	/	13,27 \pm 1,18
Ukupni antocijani	26,20 \pm 0,72	351,32 \pm 0,72	607,42 \pm 0,72	462,90 \pm 0,72	11,95 \pm 0,72	163,27 \pm 0,72

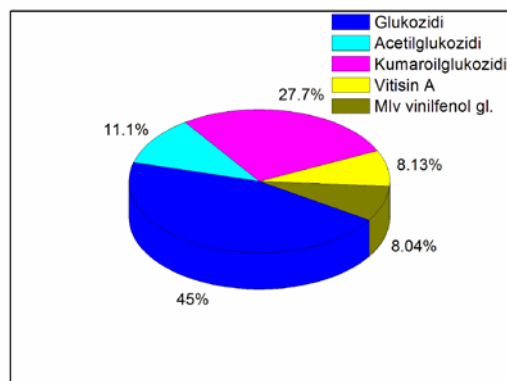
Kada pogledamo rezultate analize antocijana u ovim jednosortnim vinima, možemo zaključiti da je prisustvo derivata kumaroilglikozida u vinima Kratošija i Merlot veće nego u vinima Vranac i Cabernet Sauvignon.

S druge strane, analizom dobijenih vrednosti može se uočiti da je koncentracija ukupnih antocijana veoma različita, od 11,95 mg/L u vinu Pinot Noir do 607,42 mg/L u vinu Merlot iz Radmilovca. Razlike su značajne i između uzoraka istosortnih vina. Vino Kratošija iz Tikveša je bogatije antocijanima od vina Kratošije iz Vino Župe, i obrnuto vino Merlot iz Tikveša ima manju koncentraciju ukupnih antocijana nego Merlot vino iz Radmilovca. Upoređivanje nije moguće, jer veliki broj faktora utiče na njihov sastav i sadržaj.

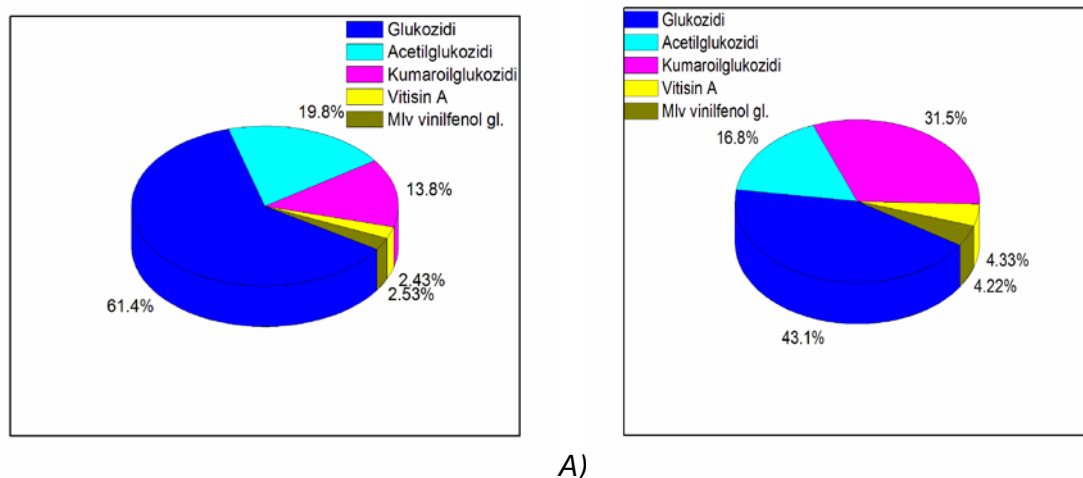


Slika 65. Grafički prikaz koncentracije ukupnih antocijana istosortnog vina, proizvedenih u Srbiji i Makedoniji od različitih proizvođača

Na sledećim slikama prikazan je procentni odnos prisutnih antocijaninskih derivata u jednosortnim vinima:



Slika 66. Grafički prikaz procentnog odnosa antocijanina u obliku 3-glikozida, 3-acetilglikozida i 3-para-kumaroilglikozida u vinu Kratošija iz Tikveša

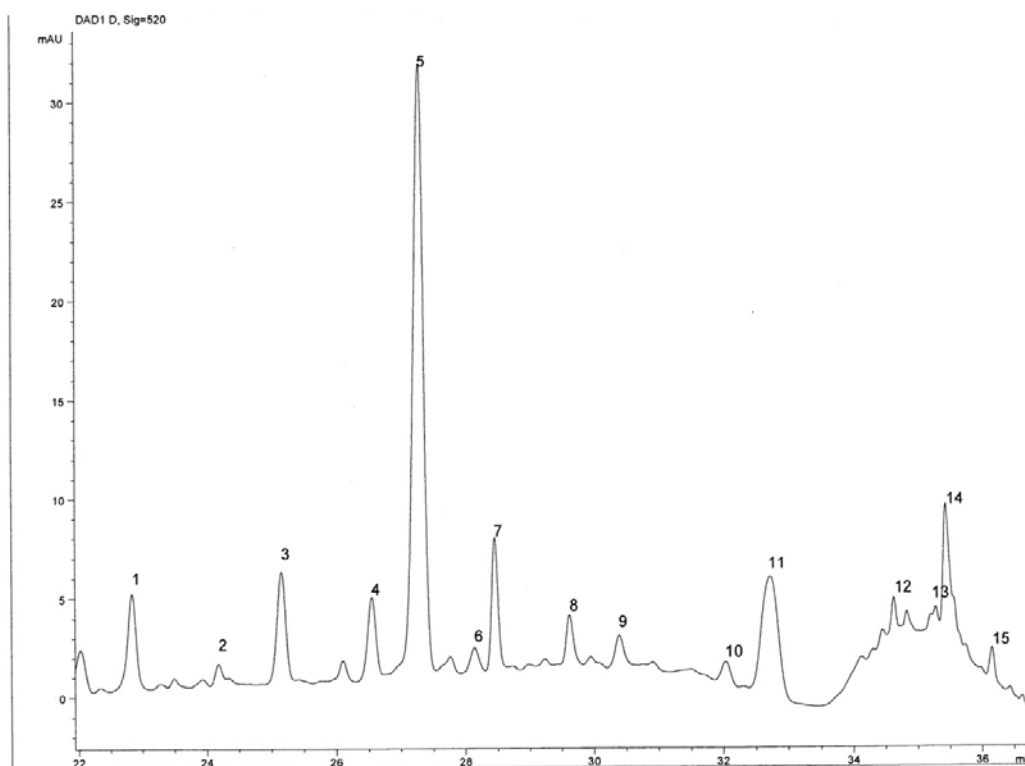


Slika 67. Grafički prikaz procentnog odnosa antocijanina u obliku 3-glikozida, 3-acetilglikozida i 3-para-kumaroilglikozida u vinima Merlot iz Radmilovca (A) i Tikveša (B)

U svim analiziranim jednosortnim vinima malvidin derivati su najprisutniji, nalazi se u intervalu od 49,36 do 83,44 %, kao što se vidi iz sledeće tabele:

Tabela 49. Procentni prinos malvidin glikozida i njegovih derivata u odnosu na ukupne antocijane u ispitivanim jednosortnim crvenim vinima

Vino	Malvidin-3-glikozid (%)	Malvidin-3-acetilglikozid (%)	Malvidin-3-p-kumaroil-glikozid (%)	Ukupni malvidin glikoni (%)
K1	83,44	/	/	83,44
K2	44,72	11,33	11,03	67,08
M1	37,70	7,97	4,69	50,36
M2	28,75	8,96	11,65	49,36
PN	64,10	/	/	64,10
F	55,18	3,86	/	59,04



Slika 68. HPLC dijagram antocijana na 520 nm u vinu Merlot iz Tikveša

4.4 Analiza uzoraka višesortnih crvenih vina iz Župskog vinogradarskog i vinskog rejona

Najpoznatiji vinogradarski rejon u Srbiji je Zapadno-moravski, u okviru koga se nalazi Župski podrejon sa nadmorskom visinom od 180 do 750 m. Prvi pisani zapisi o proizvodnji vina u ovom delu Srbije potiču iz 1196 godine kada je Stefan Nemanja, poveljom obavezao seljake iz Župe da za "potrebe manastira Studenice rade na proizvodnji vina dan i noć".

U ovom delu biće analizirani uzorci Župskih crvenih vina, proizvedeni od strane dva velika proizvođača: vinarije Rubin i vinarije Vino Župa, proizvedeni 2008 i 2009 godine.

Na tržištu Srbije, pa i šire najčešće se koriste poznata pod trgovačkim imenom sledeća Župska vina: Međaš, Crno, As, Medveđa krv i dr., koji su dobijeni od različitih autohtonih i internacionalnih sorti grožđa.

Ispitivana su: vino Međaš (Vino Župa) dobijeno od internacionalnih sorti grožđa: Merlot, Game i Burgundac; vino Medveđa krv (Rubin) dobijeno od domaćih sorti grožđa: Vranac i Prokupac; vino As (Vino Župa) dobijeno od sorti grožđa: Vranac, Prokupac i Game i vino Crno (Vino Župa) i Crno (Rubin) od sorti grožđa: Vranac, Prokupac i Burgundac (Tabela 1, Eksperimentalni deo).

4.4.1 Spektroskopska analiza različitih grupa fenolnih jedinjenja u uzorcima višesortnih Župskih crvenih vina

U tabeli 50 prikazani su rezultati spektroskopske analize sadržaja ukupnih fenola, estara vinske kiseline i ukupni flavonoli određeni po modifikovanoj Glories metodi [Mazza i sar., 1999; Radovanović i sar., 2008; 2012a,b] u ispitivanim uzorcima vina. Koncentracija ukupnih fenola je praćena na 280 nm i predstavljena kao ekvivalent

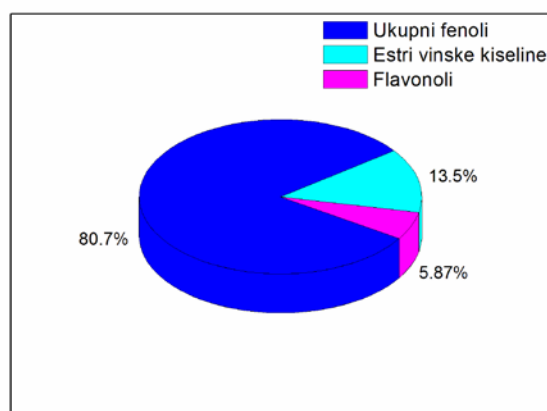
koncentracije galne kiseline, ukupni estri vinske kiseline na 320 nm (ekvivalent koncentracije kafene kiseline) i ukupni flavonoli na 360 nm (ekvivalent koncentracije kvercetina).

Tabela 50. Sadržaj ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola (mg/L), vrednost prisutnog alkohola (%) i pH u izabranim uzorcima Župskih crvenih vina

Vino	Alkohol (%)	pH vrednost	Ukupni fenoli	Estri vinske kiseline	Ukupni flavonoli
Međaš	11,5	2,85	1533,05±1,14	256,65±1,04	138,17±1,21
As	11,0	2,86	1480,10±2,06	171,30±1,81	108,62±1,04
Crno VŽ	11,2	2,87	1582,87±2,20	172,46±2,04	109,05±0,71
Crno R	11,0	2,92	1732,50±0,91	300,27±0,52	137,51±1,11
M.krv	11,5	3,02	1720,20±0,81	288,84±1,21	125,71±1,31

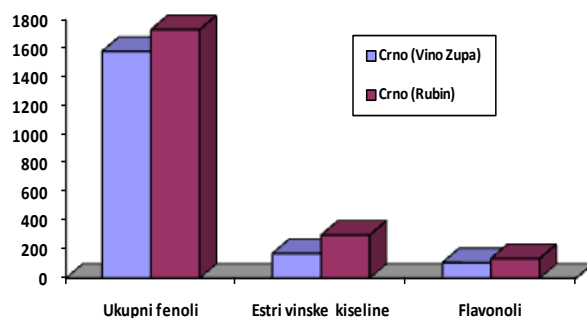
Ispitivana crvena vina imaju pH vrednost od 2,86 (As vino iz Vino Župe) do 3,02 (Medveđa krv iz Rubina) sa koncentracijom alkohola od 11 do 11,5 %. Analiza spektroskopski dobijenih rezultata je pokazala da se dobijene vrednosti ne razlikuju mnogo, tako da koncentracije ukupnih fenola (1480,10 – 1732,50 mg/L), estara vinske kiseline (171,30 – 300,27 mg/L) i flavonola (108,62 – 138,17 mg/L) su najmanje u vinu As, a najveće u vinu Crno iz Rubina. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima za druga ispitivana vina [Cliff i sar., 2007; Lachman i sar., 2007; Piljac i sar, 2005; Simonetti i sar, 1997; Singleton i Rossi, 1965; Stratil i sar.2008].

Na sledećoj slici grafički je prikazan odnos spektroskopski određenih koncentracija grupa fenolnih jedinjenja u vinu Medveđa krv:



Slika 69. Grafički prikaz procentnog odnosa spektroskopski određenih ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u vinu Medveđa krv

Može se primetiti da se vina sličnog sastava ali različitih proizvođača kao što su Crno proizvedeno iz Vino Župe i Crno iz Rubina razlikuju, ukupni fenoli vina Crno iz Rubina su veći za 13,81%, estri vinske kiseline za 34,72% , a flavonoli za 6,89%:



Slika 70. Grafički odnos ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u vinima: Crno iz Vino Župe i Crno iz Rubina, proizvedenih 2008 godine

4.4.2 HPLC analiza neflavonoidnih jedinjenja u izabranim uzorcima višesortnih Župskih crvenih vina

Fenolna jedinjenja, kao i kod ostalih uzoraka do sada analiziranih vina, biće identično analizirana da bi mogli da izvršimo upoređivanje dobijenih koncentracijskih vrednosti sa antioksidativnim i antimikrobnim delovanjem vina.

4.4.2.1 HPLC analiza fenolnih kiselina u višesortnim Župskim crvenim vinima

U izabranim Župskim crvenim vinama, kao i kod ostalih do sada analiziranih vina, izvršena je identifikacija i kvantifikacija 10 fenolnih kiselina i trans-resveratrola, kao glavnog vinskog stilbena na osnovu retencionih vremena i apsorpcionih maksimuma njihovih standardnih jedinjenja (eksperimentalni deo).

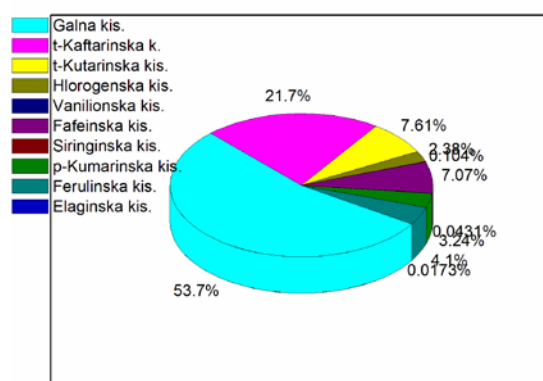
U tabeli 51 su date koncentracione vrednosti određenih fenolnih kiselina u ispitivanim uzorcima župskih vina i to, hidroksibenzoevih kiselina: galna, vanilinska i siringinska kiselina (određenih na 280 nm) i hidroksicimetnih kiselina: trans-kaftarna, trans-kutarna, hlorogenska, trans-kafena, para-kumarna i ferulinska kiselina (određenih na 320 nm).

Kada se analiziraju dobijene rezultate može se uočiti da vrednosti razlikuju u zavisnosti od sastav vina i proizvođača, tako da hidroksibenzoevih kiselina se nalaze u intervalu od 62,40 do 8413 mg/L, hidroksicimetnih kiselina od 22,01 do 53,51 mg/L, dok ukupno nađene fenolne kiseline su u granicama od 87,20 do 117,49 mg/L. Jedino vino As sadrži najmanje koncentracije fenolnih kiselina, dok ostala ispitivana vina su veoma slični. Kao najbogatije vino fenolnim kiselinama se pokazalo vino Međaš (117,49 mg/L), sastavljeno od Merlot, Game i Burgundac sorte grožđa (Vino Župa) i vino Medveđa krv (115,91 mg/L) sastavljeno od Vranac i Prokupac sorte grožđa (Rubin).

Tabela 51. Sadržaj fenolnih kiselina u izabranim uzorcima višesortnih Župskih vina, određeni na 280 i 320 nm (mg/L \pm SD, n = 3)

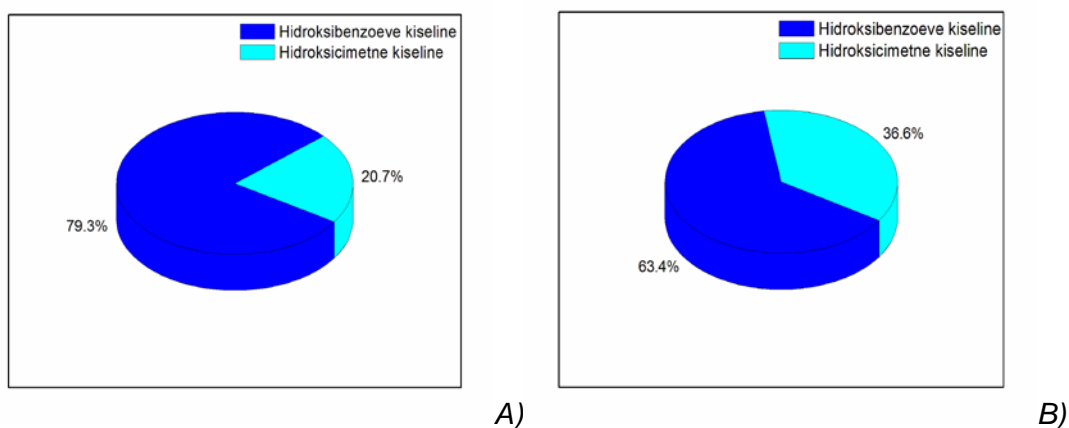
Fenolne kiseline	Međaš	As	Crno VŽ	Crno R	M.krv
Galna kis. (1)	83,59 \pm 0,15	56,82 \pm 0,08	76,54 \pm 0,06	64,67 \pm 1,05	62,24 \pm 0,08
t-Kaftarna kis. (2)	11,25 \pm 0,23	11,83 \pm 0,23	9,96 \pm 0,08	23,43 \pm 0,09	25,21 \pm 0,19
t-Kutarna kis.(3)	8,09 \pm 0,11	6,65 \pm 0,17	3,40 \pm 0,08	8,48 \pm 0,07	8,82 \pm 0,16
Hlorogenska kis. (4)	2,46 \pm 0,19	0,03 \pm 0,19	0,23 \pm 0,15	1,99 \pm 0,15	2,76 \pm 0,15
Vanilinska kis. (5)	0,05 \pm 0,05	0,20 \pm 0,06	0,05 \pm 0,15	0,05 \pm 0,15	0,12 \pm 0,15
Kafena kis. (6)	4,00 \pm 0,57	1,72 \pm 0,05	1,62 \pm 0,08	2,98 \pm 0,17	8,19 \pm 0,08
Siringinska kis. (7)	0,03 \pm 0,32	5,46 \pm 0,15	7,54 \pm 0,09	8,06 \pm 0,15	0,04 \pm 0,05
p-Kumarna kis. (8)	3,76 \pm 0,26	2,70 \pm 0,11	1,97 \pm 0,03	1,74 \pm 0,09	3,76 \pm 0,03
Ferulna kis.(9)	1,01 \pm 0,17	2,24 \pm 0,10	0,37 \pm 0,05	3,35 \pm 0,15	4,75 \pm 0,07
Elaginska kis. (10)	3,25 \pm 0,15	/	4,46 \pm 0,72	/	0,02 \pm 0,01
Ukupne hidroksi-benzoeve kis.	83,67 \pm 0,12	62,48 \pm 0,25	84,13 \pm 0,85	72,78 \pm 0,11	62,40 \pm 0,11
Ukupne hidroksi-cimetne kis.	33,82 \pm 0,09	24,72 \pm 0,05	22,01 \pm 0,15	41,97 \pm 0,25	53,51 \pm 0,18
Ukupne fenolne kiseline	117,49 \pm 0,15	87,20 \pm 0,07	106,14 \pm 0,11	114,75 \pm 0,19	115,91 \pm 0,09

Na sledećoj slici prikazan je procentno prisustvo svih detektovanih fenolnih kiselina kod vina Medveđa krv:



Slika 71. Procentni odnos svih prisutnih fenolnih kiselina kod vina Medveđa krv

Vino Crno iz vinarije Vino Župa i vino Crno iz vinarije Rubin, koja imaju veoma sličan sastav su pokazala različit sastav fenolnih kiselina (106,14 I 114,75 mg/L). Vino Crno iz Rubina je bogatije za 15,83% hidroksicimetnim kiselinama. Ako se napravi procentni odnos između prisutnih hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u ovim vinama dobijaju se sledeće grafičke vrednosti:

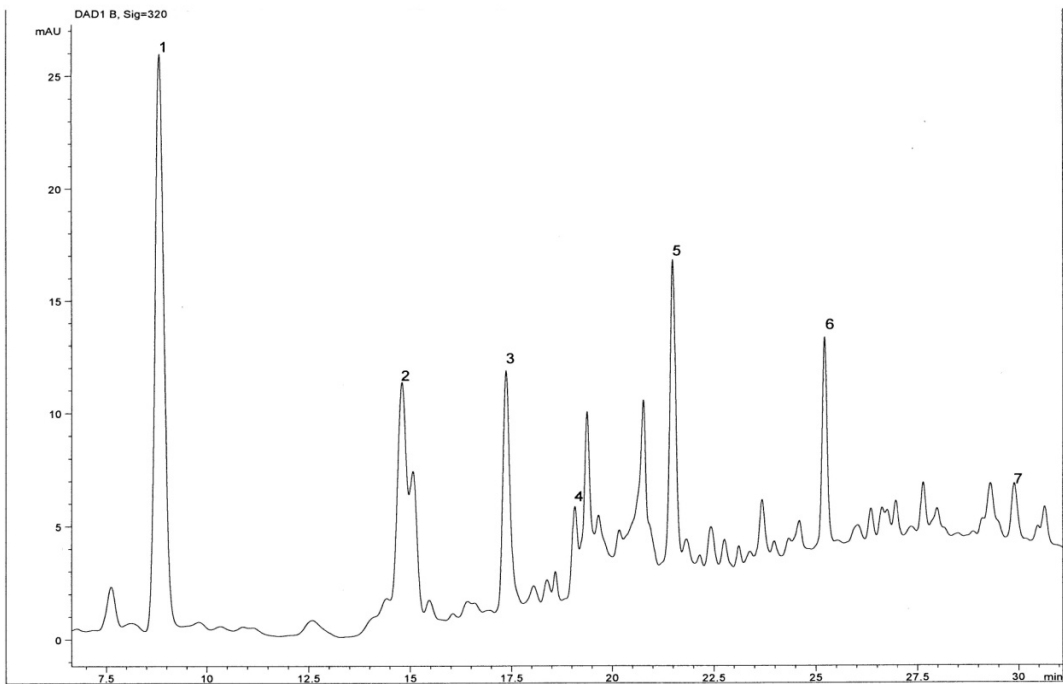
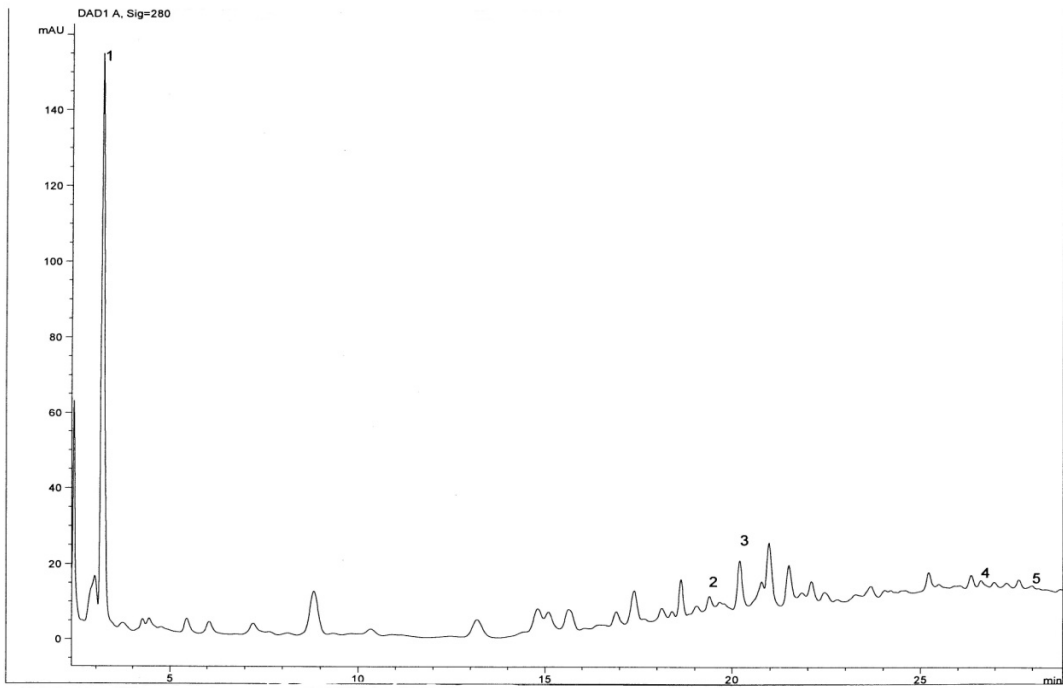


Slika 72. Grafički prikaz procentnog odnosa prisutnih hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u Crno vino iz Vino Župe (A) i Crno vino iz Rubina (B)

U svim uzorcima ispitivanih vina galna kiselina je dominantna fenolna kiselina i najviše je ima u vino Crno iz VINO Župe (72,11 %) i vino Međaš (71,15 %):

Tabela 52. Prisustvo galne kiseline, kao i ukupne hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina (u procentima) u odnosu na ukupno detektovanih fenolnih kiselina u višesortnim Župskim vinima (%)

Vino	Galna kiselina (%)	Hidroksibenzoeve kiseline (%)	Hidroksicimetne kiseline (%)
Međaš	71,15	71,21	28,78
As	64,79	71,24	28,76
Crno VŽ	72,11	79,26	20,74
Crno R	56,36	63,42	36,57
M.krv	53,70	53,83	46,16



Slika 73. HPLC dijagrami fenolnih kiselina na 280 nm i 320 nm u Međaš vino

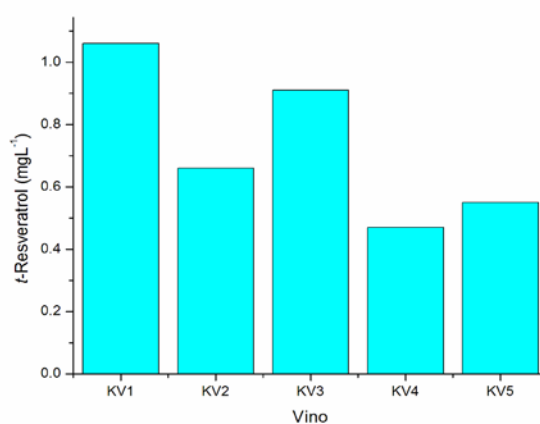
4.4.2.2 HPLC analiza trans-resveratrola u višesortnim Župskim crvenim vinima

U Tabeli 53 date su dobijene vrednosti o sadržaju ovog biološki značajnog stilbena na osnovu standardne jednačine i apsorpcione vrednosti na 320 nm (eksperimentalni deo):

Tabela 53. Sadržaj trans-resveratrola u višesortnim Župskim vinima na 320 nm (mg/L \pm SD, n=3)

Vino	trans-Resveratrol (\bar{x})
Međaš	1,06 \pm 0,11
As	0,60 \pm 0,19
Crno VŽ	0,64 \pm 0,10
Crno R	0,67 \pm 0,15
M.krv	0,65 \pm 0,23

Rezultati pokazuju da se trans-resveratrol u ispitivanim uzorcima vina nalazi u uskom intervalu od 0,47 mg/L kod vino Crno iz Rubina do 1,06 mg/L kod vina Međaš iz Vino Župe:



Slika 74. Grafički prikaz sadržaja trans-resveratrola u ispitivanim župskim vinama

4.4.3 HPLC analiza flavonoidnih jedinjenja u izabranim uzorcima višesortnih Župskih crvenih vina

Kao i kod ostalih do sada analiziranih vina i u izabranim uzorcima župskih višesortnih vina je izvršeno detektovanje i kvantifikacija prisutnih flavonoidnih jedinjenja na isti način kao što je ranije objašnjeno.

4.4.3.1 Flavan-3-oli u višesortnim Župskim crvenim vinima

U Tabeli 54 date su određene koncentracije najzastupljenijih flavan-3-ola u ispitivanim uzorcima vina i to: (+)-katehin, procijanidin B2, odnosno dimer B tipa: (-)-epikatehin-(4 β →8)-(-)-epikatehin, (-)-epikatehin i (-)-epigalokatehin galat, detektovanih fluorescentnim detektorom na 275/322 nm.

Analizom rezultata može se uočiti da se dobijene koncentracijske vrednosti razlikuju, kao što se moglo i očekivali u zavisnosti sastava i proizvođača vina. Tako da ukupna koncentracija određenih flavan-3-ola se nalazi u intervalu od 44,79 do 73,13 mg/L. Najmanje vrednosti su dobijene u vinu Medveđa krv, dok vino As iz Vino župe je najbogatije flavan-3-olima.

Table 54. Sadržaj flavan-3-oli u ispitivanim višesortnim Župskim vinima (mg/L \pm SD, n = 3) na 275/322 nm

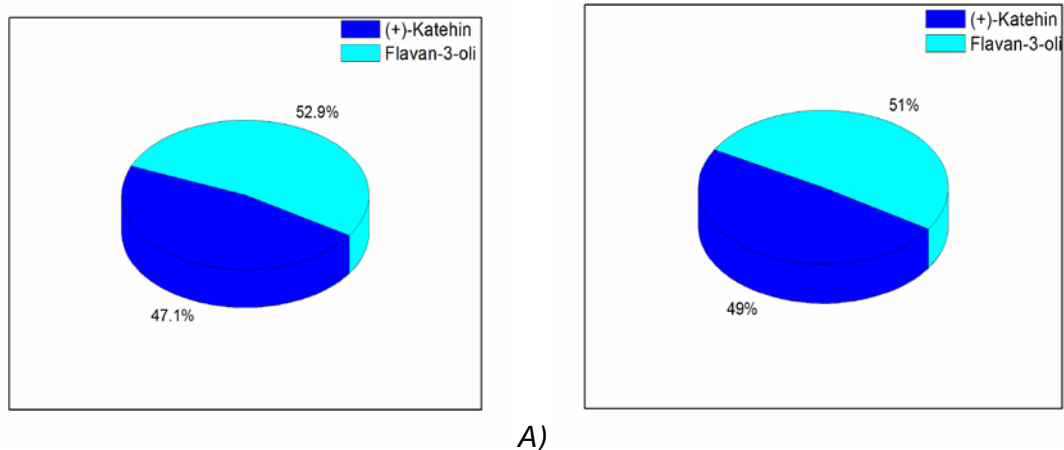
Vino	(+)-Katehin (1)	Procianidin B2 (2)	(-)-Epikatehin (3)	(-)-Epigalocatehingalat (4)	Ukupni flavan-3-oli
Međaš	28,13 \pm 0,55	12,72 \pm 0,12	24,44 \pm 0,69	7,84 \pm 0,11	73,13 \pm 0,15
As	25,32 \pm 0,10	13,77 \pm 0,11	28,44 \pm 0,18	5,53 \pm 0,14	73,06 \pm 0,47
Crno VŽ	21,11 \pm 0,34	10,37 \pm 0,19	13,31 \pm 0,46	/	44,79 \pm 0,13
Crno R	25,83 \pm 0,35	12,92 \pm 0,65	13,98 \pm 0,15	/	52,73 \pm 0,15
M.krv	25,38 \pm 0,14	12,89 \pm 0,68	12,26 \pm 0,25	/	50,53 \pm 0,75

Očigledno je da i kod ovih crvenih vina koncentracija (+)-katehina najveća i nalazi se u intervalu od 32,53 % (vino As) do 83,13 % (vino Medveđa krv):

Tabela 55. Procentno prisustvo (+)-katehina u ispitivanim Župskim vinima

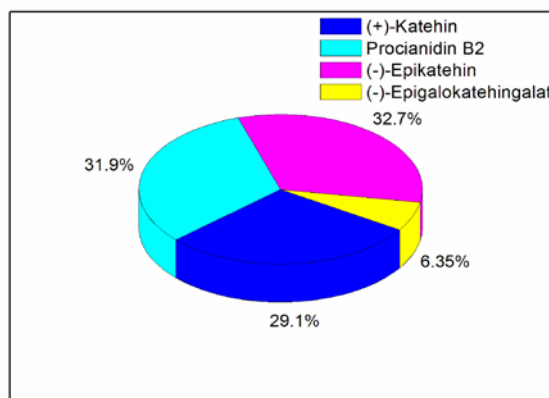
Vino	(+)-Katehin (%)
Međaš	34,91
As	32,53
Crno VŽ	47,13
Crno R	48,98
M.krv	83,13

Analiza je pokazala da vino Crno iz vinarije Vino Župa i vino Crno iz vinarije Rubin, koja imaju sličan sastav grožđa, imaju i približno isti sastav flavan-3-ola (44,79 i 52,73 mg/L). Vino Crno iz Rubina je bogatije za 15,06% ovim jedinjenjima:



Slika 75. Procentni odnos prisutnog (+)-katehina u odnosu na ukupne flavan-3-ole u vinima Crno iz Vino Župe (A) i Crno iz Rubina (B)

Na slici 76 je prikazan procentni odnos određenih flavan-3-ola u As vinu:



Slika 76. Procentni odnos određenih flavan-3-ola u As vinu

Dobijene vrednosti su u saglasnosti sa literaturnim podacima za vina iz Hrvatske, Grčke i Turske [Anli i Vural, 2009; Katalinić i sar., 2004; Kallithraka i sar., 2006; Piljac i sar., 2005] I ostalih ispitivanih vina [Bartolome, 1996; Luiz 2011; Seruga i sar, 2011; Singleton I Trousdale, 1992].

4.4.3.2 Flavonoli, flavoni i flavanoni u uzoraka višesortnih Župskih crvenih vina

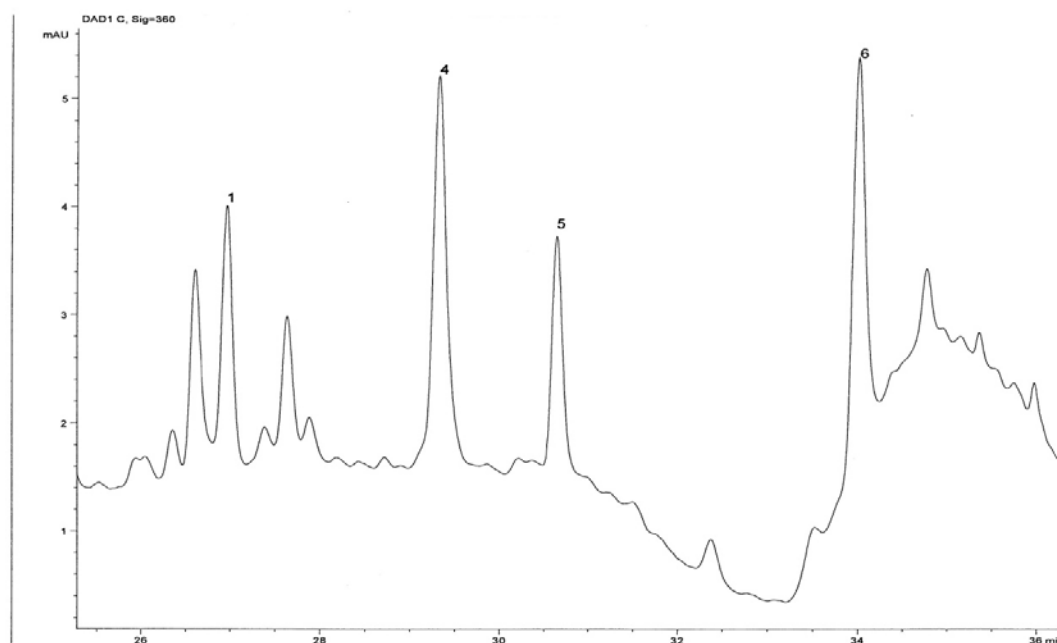
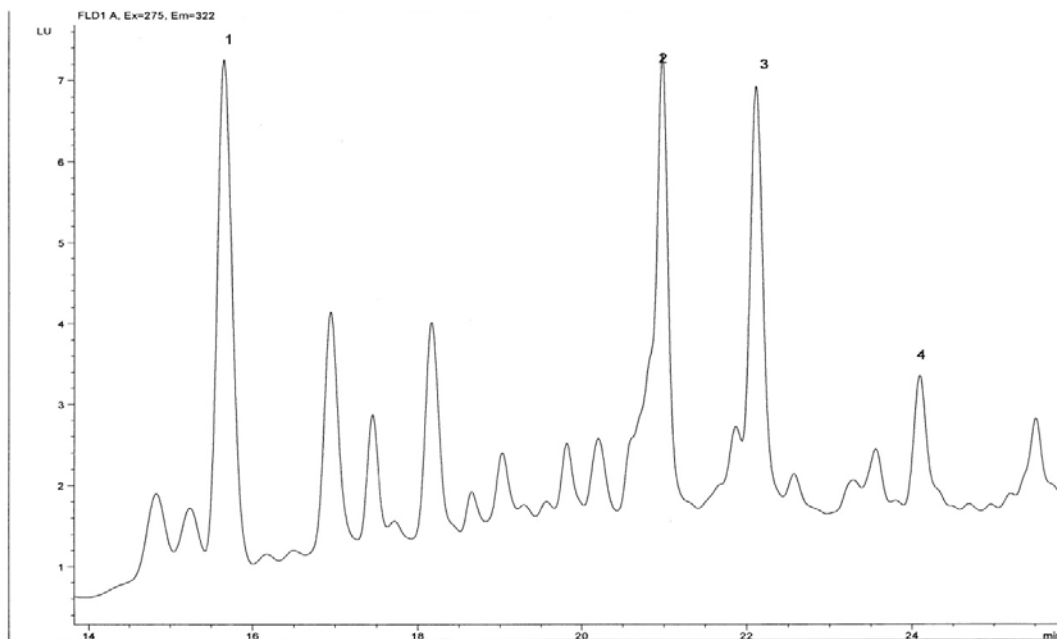
U Tabeli 56 date su određene koncentracije najprisutnijih flavonola i flavonol glikona u ispitivanim Župskim vinima: kvercetin-3-glikozida, rutina, morina, kvercetina i flavanona – naringina. Sva jedinjenja su detektovana na 360 nm primenom standardnih jednačina (eksperimentalni deo).

Analizom rezultata se može uočiti da se dobijene koncentracijske vrednosti ne razlikuju mnogo, odnosno nalaze se u intervalu od 11,99 do 13,80 mg/L. Najmanje vrednosti su dobijene za vino Međaš, dok Medveđa krv ima najveću koncentraciju flavanola:

Tabela 56. Sadržaj flavonola, flavanona ukupnih flavonoida u višesortnim Župskim vinima, detektovanih na 360 nm i 322/275 nm (mgL \pm SD, n = 3)

Flavonoidi	Međaš	As	Crno VŽ	Crno R	M.krv
Kvercetin- 3- gl.(1)	4,06 \pm 0,12	4.06 \pm 0,13	6,02 \pm 0,11	8,75 \pm 0,32	5,38 \pm 0,15
Rutin (2)	2,05 \pm 0,19	2.05 \pm 0,26	3,14 \pm 0,15	3,51 \pm 0,11	3,51 \pm 0,67
Naringin (3)	0,74 \pm 0,65	0,91 \pm 0,12	0,95 \pm 0,78	0.85 \pm 0,19	1.05 \pm 0,12
Morin (5)	2,45 \pm 0,34	2,45 \pm 0,78	2,45 \pm 0,91	2,45 \pm 0,45	2,69 \pm 0,65
Kvercetin (7)	2,69 \pm 0,25	3,72 \pm 0,65	0,60 \pm 0,19	0,75 \pm 0,35	0,75 \pm 0,48
Ukupni flavonoli	11,99 \pm 0,67	13,19 \pm 0,10	13,16 \pm 0,11	16,31 \pm 0,13	13,80 \pm 0,59
Ukupni flavonoidi (322/275 i 360 nm)	85,12 \pm 0,11	86,25 \pm 0,15	57,95 \pm 0,55	69,04 \pm 0,18	64,33 \pm 0,11

Dobijeni podatci su u saglasnosti sa literaturnim podacima za druga analizirana vina [Anli i Vural, 2009; Arnous i sar., 2002; Braicu i sar., 2011; Jeffery i sar., 2008; Kallithraka i sar., 2006; McDonald i sar., 1998; Pour Nikfardjam i sar., 2006].



Slika 77. HPLC dijagrami flavan-3-ola na 322/275 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$) i ostalih flavonoida na 360 nm u vinu Međaš

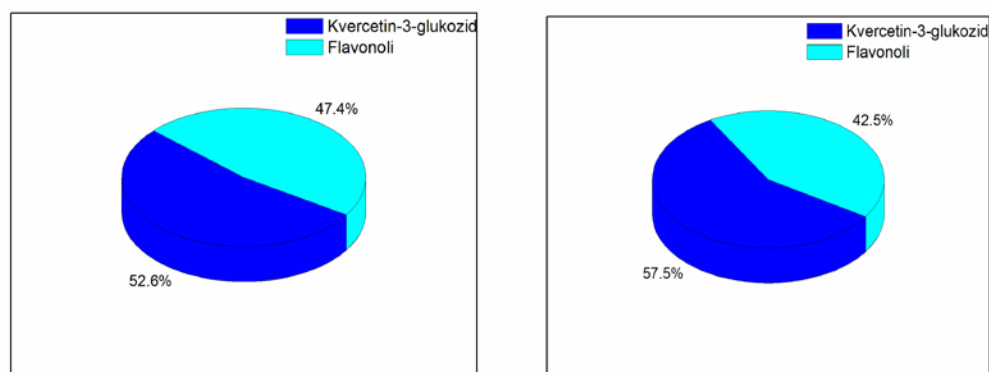
Ako uporedimo flavonole po njihovom prisustvu u ispitivanim Župskim vinima, vidi se da je kvercetin-3-glukozid dominantan u svim uzorcima. Ukupno procentno prisustvo kvercetina i kvercetin-3-glukozida u ovim vinima se nalazi u intervalu od

53,34 do 60, 09 i 60,24 % u vinima Crno i Međaš iz Rubina. Može se reći da su ova ispitivana vina bogata (iznad 55 %) flavanolima.

Tabela 57. Procentni prinos kvercetin-3-glikozida i kvercetina u odnosu na prisutnie flavonole u uzorcima Župskih crvenih vina

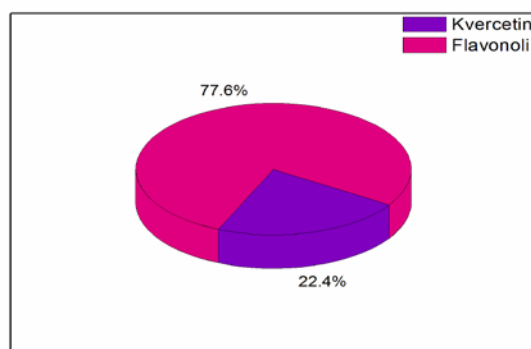
Vino	Kvercetin-3-glikozid (%)	Kvercetin (%)	Ukupno (%)
Međaš	37,38	22,44	60,24
As	29,39	28,20	57,59
Crno VŽ	52,58	4,56	57,14
Crno R	57,49	4,60	60,09
M.krv	46,90	5,44	53,34

Iz ovih podataka može se videti da vina Crno iz Vino Župe i Crno iz Rubina imaju sličnu i najveću koncentraciju kvercetin-3-glikozida:



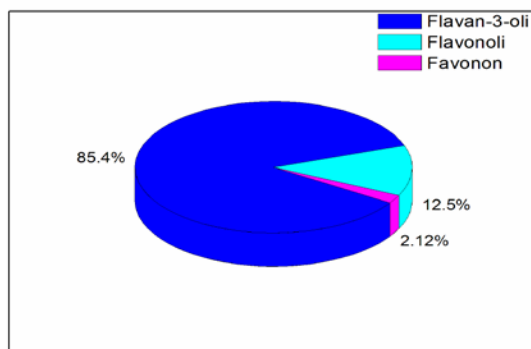
Slika 78. Grafički prikaz procentnog prisustva kvercetin-3-glukozida u odnosu na procentni prinos ukupnih nađenih flavanola u vinima Crno iz Vino Župe (A) i Crno iz Rubina (B)

Vino sa najvećim procentno prisustvom kvercetinom u odnosu na ostala ispitivana vina (4,56 -5,44 %) je Župsko vino Međaš (22,44 %):



Slika 79. Grafički prikaz procentne prisutnosti kvercetina u odnosu na ukupnih flavonola u vinu Međaš

Sabiranjem dobijenih vrednosti za ukupnu koncentraciju flavanol-3-ola, detektovanih fluorescentnim dektektorom na 275/322 nm sa koncentracionim vrednostima flavonola i flavanona, detektovanih na 360 nm dobijaju se koncentracijske vrednosti ukupnih flavonoida. Kao najbogatije vino flavonoidnim jedinjenjima je vino As iz Vino Župe (86,25 mg/L), koje je sastavljeno od sorta grožđa: Vranac, Prokupac i Game:



Slika 80. Grafički prikaz procentnog odnosa određenih flavanoidnih jedinjenja u As vinu

4.4.3.3 HPLC analiza antocijana u uzoraka višesortnih Župskih crvenih vina

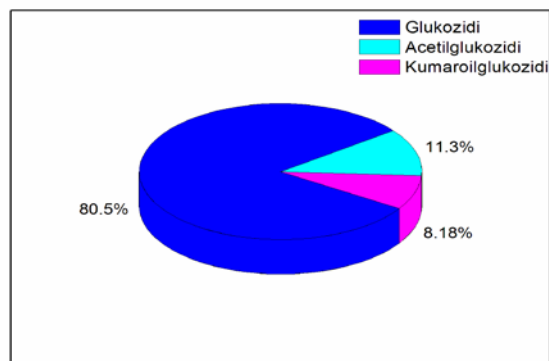
U Tabeli 58 date su određene koncentracione vrednosti za antocijane na 520 nm. Na osnovu analize dobijenih rezultata očigledno je da je dominantan malvidin-3-O-glikozid i njegovi acetatni i kumaratni oblici:

Table 58. Sadržaj glavnih monomernih antocijanina prisutnih u analiziranim višesortnim Župskim vinima na 520 nm (mg/L \pm SD, n = 3)

Antocijani	Međaš	As	Crno VŽ	Crno R	M. krv
Dp-3-gl (1)	/	7,58 \pm 0,46	/	/	17,01 \pm 0,25
Cy-3-gl (2)	/	/	/	/	8,01 \pm 0,12
Pt-3-gl (3)	/	/	/	7,95 \pm 0,42	27,55 \pm 0,43
Pn-3-gl (4)	7,37 \pm 0,15	2,12 \pm 0,35	4,02 \pm 0,24	9,17 \pm 0,46	33,35 \pm 0,45
Mv-3-gl (5)	9,50 \pm 0,25	19,44 \pm 0,25	11,80 \pm 0,16	36,39 \pm 0,68	168,4 \pm 0,11
Pn-3-acetgl (9)	/	/	/	/	7,71 \pm 0,19
Mv-3-acetgl (10)	/	/	/	/	27,92 \pm 0,48
Pn-3-p-kumgl (13)	/	/	/	/	6,02 \pm 0,12
Mv-3-p-kumgl (14)	8,19 \pm 0,11	/	/	6,96 \pm 0,11	19,82 \pm 0,47
Ukupni 3-gl	16,87 \pm 0,23	/	11,80 \pm 0,18	53,51 \pm 0,15	254,26 \pm 0,13
Ukupni 3-acetilgl	/	/	/	/	35,63 \pm 0,55
Ukupni 3-p-kumaroilgl	/	/	/	/	25,84 \pm 0,78
Ukupni antocijani	25,06 \pm 0,10	29,14 \pm 0,11	15,82 \pm 0,45	60,47 \pm 0,55	315,73 \pm 0,49

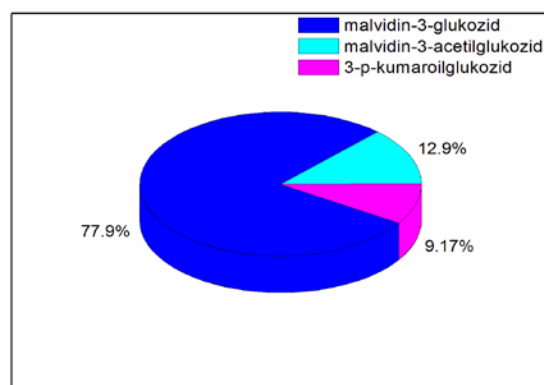
Analizom dobijenih rezultata se može uočiti da se vrednosti za ukupne antocijane nalaze u širokom intervalu od 15,82 mg/L u vinu Crno iz Vno Župe do 315,73 mg/L u vinu Medveđa krv iz Rubina.

Zanimljiv je podatak da su najviše prisutni antocijani u obliku 3-glikozida, sa izuzetkom kod vina Medveđa krv gde ih ima i u obliku 3-acetilglikozida i 3-p-kumaroilglikozida, kao što je grafički prikazano:



Slika 81. Grafički prikaz međusobnog odnosa (u procentima) prisutnih antocijana u obliku 3-glikozida, 3-acetilglikozida i 3-para-kumaroilglikozida kod vina Medveđa

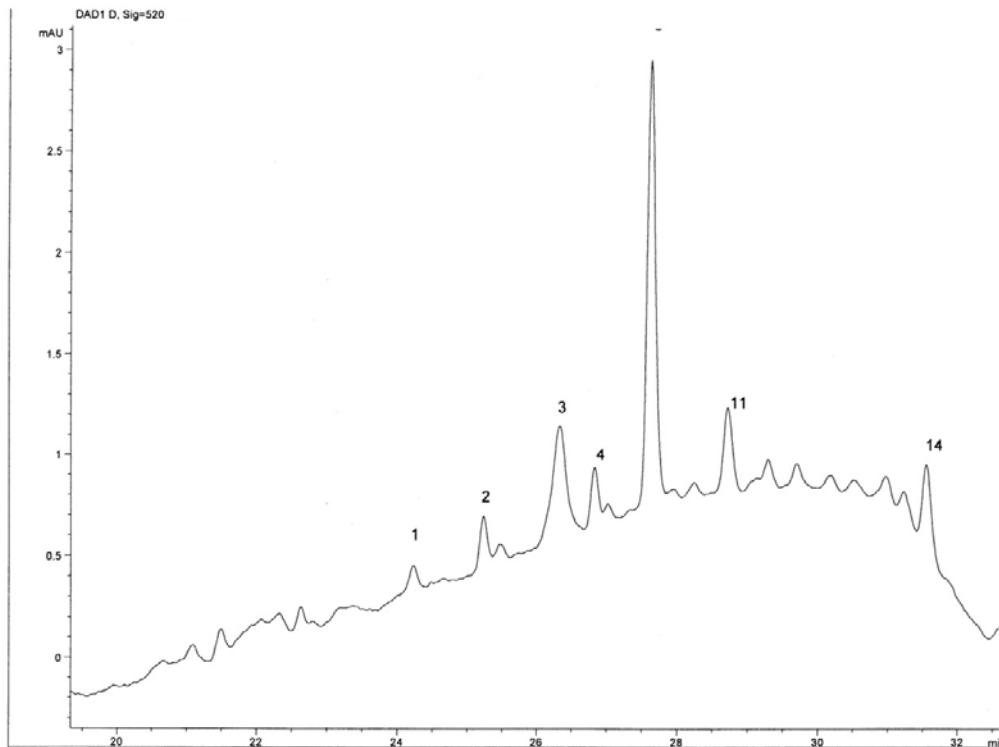
Malvidin-3-glukozid je prisutan u sledećim procentima: 37,91% (Međaš vino), 66,71% (As vino), 74,59 % (Crno vino iz Vino Župe) i 60,18% (Crno vino iz Rubina).



Slika 82. Grafički prikaz međusobnog odnosa (u procentima) malvidin-3-glikozida, malvidin-3-acetilglikozida i malvidin-3-para-kumaroilglikozida u vinu Medveđa krv

Jedino kod vina Medveđa krv je prisutan u svim oblicima i to: 53,32 % (kao malvidin-3-glikozid), 8,84 % (kao malvidin-3-acetilglikozid) i 6,28% (kao 3-p-kumaroilglikozid) ili ukupno ga ima 68,44 % u odnosu na ostale prisutne antocijane.

Ako uporedimo vina Crno iz VINO Župe i Crno iz Rubina, vidi se da imaju različit sadržaj antocijana (15,82 i 60,47 mg/L) iako su istog sastava i iste godine proizvodnje. VINO crno iz Rubina je 73,84% bogatije ovim jedinjenjima.



Slika 83. HPLC dijagram antocijana na 520 nm u Međaš vino

4.5 Antioksidaciona aktivnost i njena korelacija sa sadržajem fenolnih jedinjenja u izabranim uzorcima crvenih vina Balkana

Još od prošlog veka je poznato da fenolna jedinjenja nemaju nutritivni značaj, ali pomažu u očuvanju ljudskog organizma zbog visokog antioksidativnog potencijala [Hertog i sar. 1995]. Jedan čas nakon unošenja 300 mL crvenog vinskog seruma antioksidacioni kapacitet se povećava za 18%, što je uporedivo sa povećanjem od 22% nakon unošenja 1 g C vitamina [Whitehead i sar., 1995].

Polifenoli koji se nalaze u crvenim vinima inhibiraju neke degenerativne bolesti kao što su: kardiovaskularne bolesti, neurogenetske poremećaje, dijabetes, poboljšavaju insulinsku osetljivost, sprečavaju oksidaciju LG holesterola, usporavaju kancerogene procese u organizmu, do 80 % inhibiraju virus HIV-a, usporavaju Alzheimer-ovu bolest, starenje, asme, hipertenzije, slabokrvnost i smanjuju ukupni oksidativni stres [Bertelli, 2007; Gey, 1990; German i Walzem, 2000; Grotewold, 2006; Doll, 1990; Hertog, 1995; Havsteen, 2002; Hou, 2003; Edeas, 2001; Klepacka i sar., 2011; Macheix i sar., 1990; Mimić-Oka i sar., 1999; Olas I Wachowich, 2002; Pereira i sar., 2009; Renaud i de Lorgeril, 1992; Shahidi i Wanasundara, 1992; Soleas i sar, 2002]. Ovi farmakološki efekti polifenolnih jedinjenja povezani su sa njihovom antioksidacionom delovanju.

Dr Cristobal Miranda (1954.) i Dr Donald R. Buhler (1962.), dobitnici Nobelove nagrade za istraživanja antioksidacione aktivnosti flavonoida, potvrdili su da ona zavisi od strukture molekula tj. od prisutnih hidroksilnih grupa na benzenovom prstenu i dvogubih veza.

Iz navedenih razloga u ovom poglavlju biće dati rezultati ispitivanja korelacije antioksidacione aktivnosti najzastupljenijih crvenih vina Balkanskog regiona sa nađenim koncentracijama prisutnih fenolnih jedinjenja.

4.5.1 Antioksidaciona aktivnost određena DPPH slobodnoradikalском metodom i njena korelacija sa sadržajem fenolnih jedinjenja u izabranim uzorcima crvenih vina

Primenom 2,2'-difetil-1-pikrihidrazil radikala (DPPH \cdot) određena je antiradikalска ili antioksidaciona aktivnost izabranih uzoraka crvenih vina (datih u Eksperimentalnom delu). Po ovoj metodi, nastala redoks reakcija između uzorka vina i, DPPH slobodnog radikala se prati promenom apsorbancije na 517 nm. Kao što je poznato, DPPH \cdot radikal ima ljubičastu boju zbog prisustva nesparenog elektrona i nakon reakcije sa kiseonikovim atomom iz fenolnih jedinjenja prisutnih u vinu, formira žuto obojeno 2,2'-difetil-1-pikrihidrazilin (DPPH-H) jedinjenje.

U tabeli 58 date su vrednosti za antioksidacionu aktivnost izabranih uzoraka crvenih vina, proračunate u procentnom prinosu i u EC₅₀ vrednostima, odnosno preko potrošnje DPPH \cdot radikala, zbog lakšeg upoređivanja rezultata između različitih uzoraka.

Za analizu antioksidacione aktivnosti izabrana su prethodno spektrofotometrijski i hromatografski analizirani uzorci vina, od kojih šest uzoraka su vrste Cabernet Sauvignon vina, šest uzoraka su Vranac vina, pet uzoraka su od ostalih jednosortnih vina i pet uzoraka višesortnih Župskih vina.

Analizirani uzorci Cabernet Sauvignon vina su: Cabernet Sauvignon vino iz vinarije Kraljevski vinogradi (2009 godine), Cabernet Sauvignon – Terra Lazarica iz vinarije Rubin (2008 godine), Cabernet Sauvignon vino, takođe iz Rubina (2009 godine), Cabernet Sauvignon – Alexandrija (2009 godine) iz vinarije Tikveš, Cabernet Sauvignon – Čardak (2009 godine) iz vinarije Lozar i Cabernet Sauvignon vino (2008 godine) Sekulovića. Dobijeni rezultati su pokazali da eksperimentalno određena antioksidaciona aktivnost u Cabernet Sauvignon vinima nalazi u graničnim procentnim vrednostima od 83,52 % do 91,83 %. Njihove koncentracijske vrednosti izražene kao EC₅₀ se nalaze u intervalu od 83,25 do 49,24 mL/g (Tabele 59 i 60).

Analizirani uzorci Vranac vina su: Vranac vino (2008 godine) iz vinarije Rubin, Vranac vino (2008 godine) iz vinarije Vino Župa, Vranec vino (2009 godine) iz vinarije Tikveš, Vranec – Vilarov (2011 godine) iz vinarije Stobi, Vranac – Hercegovački (2008 godine) iz vinarije Vukoje i Vranac- Crnogorski (2007 godine) iz vinarije Plantaža. Dobijeni rezultati su pokazali da se eksperimentalno određena antioksidaciona aktivnost u ispitivanim Vranac vinima nalazi u graničnim procentnim vrednostima od 65,82 % do 89,96 %. Njihove koncentracijske vrednosti izražene kao EC_{50} se nalaze u intervalu od 145,83 do 50,56 do mL/g (Tabele 57 i 58).

Ispitivana je antioksidaciona aktivnost Merlot vina iz vinarije Radmilovac, Merlot vina iz vinarije Tikveš, Pinot Noir vina iz vinarije Rubin i Frankovke vina iz vinarije Vršački podrum. Dobijeni rezultati su pokazali da se eksperimentalno određena antioksidaciona aktivnost u ispitivanim Merlot vinima nalazi u procentnim vrednostima od 80,45 % do 90,25 %. Njihove koncentracijske vrednosti izražene kao EC_{50} se nalaze u intervalu od 55,30 do 49,85 do mL/g. Utvrđeno je da vino Pinot Noir ima manji antioksidacioni kapacitet, EC_{50} iznosi 112,84 mL/g, a vino Frankovka ima najmanji, EC_{50} iznosi 129,33 mL/ u odnosu na ostala ispitivana jednosortna crvena vina (Tabele 57 i 58).

Takođe, praćena je antioksidaciona aktivnost svih prethodno ispitivanih crvenih vina iz Župskog rejona i dobijene su procentne vrednosti od 69,55% do 83,98 %. Njihove koncentracijske vrednosti izražene kao EC_{50} se nalaze u intervalu od 140 do 95,03 mL/g (Tabele 57 i 58).

Tabela 59. Antioksidaciona aktivnost izabranih uzoraka crvenih vina

<i>Ime vina i vinarije</i>	<i>Antioksidaciona aktivnost (%)</i>	<i>Antioksidaciona aktivnost, EC₅₀ (mL/g)</i>
<i>C.Sauvinjon (Čardak)</i>	<i>91,83±0,26</i>	<i>47,17±0,43</i>
<i>C. Sauvignon (Oplenac)</i>	<i>89,53±0,56</i>	<i>49,24±0,26</i>
<i>C. Sauvignon - Alexandria (Tikveš)</i>	<i>86,78±0,26</i>	<i>60,67±0,34</i>
<i>C. Sauvignon - T. Lazarica (Rubin)</i>	<i>88,93±1,02</i>	<i>80,03±0,32</i>
<i>C. Sauvignon (Rubin)</i>	<i>85,89±0,26</i>	<i>83,25±0,24</i>
<i>C. Sauvignon (Sekulović)</i>	<i>83,52±0,26</i>	<i>97,75±0,15</i>
<i>Vranac (Tikveš)</i>	<i>89,96±0,26</i>	<i>50,56±0,26</i>
<i>Vranec- Vilarov (Stobi)</i>	<i>88,96±0,26</i>	<i>54,31±0,29</i>
<i>Vranac - Hercegovački (Vukoje)</i>	<i>87,02±0,26</i>	<i>64,96±0,16</i>
<i>Vranac- Pro corde (Plantaža)</i>	<i>87,32±0,26</i>	<i>74,08±0,03</i>
<i>Vranac (Rubin)</i>	<i>80,72±0,15</i>	<i>104,11±0,22</i>
<i>Vranac (Vino Župa)</i>	<i>65,82±0,26</i>	<i>145,83±0,17</i>
<i>Merlot (Tikveš)</i>	<i>90,25±0,26</i>	<i>47,85±0,56</i>
<i>Merlot (Radmilovac)</i>	<i>86,45±0,26</i>	<i>65,30±0,55</i>
<i>Pinot Noir (Rubin)</i>	<i>79,01±0,21</i>	<i>112,84±0,21</i>
<i>Frankovka (Vršački podrumi)</i>	<i>80,45±0,26</i>	<i>129,33±1,05</i>
<i>Međaš (Vino Župa)</i>	<i>83,98±0,21</i>	<i>95,03±0,33</i>
<i>Crno (Rubin)</i>	<i>83,41±0,30</i>	<i>101,29±0,45</i>
<i>Medveđa krv (Rubin)</i>	<i>80,60±0,42</i>	<i>105,42±0,12</i>
<i>Crno (Vino Župa)</i>	<i>80,24±0,26</i>	<i>106,43±0,18</i>
<i>As (Vino Župa)</i>	<i>69,55±0,44</i>	<i>140,29±0,25</i>

U Tabeli 60 date su granične vrednosti za antioksidacionu aktivnost pojedinih vrsta ispitivanih vina od kojih se može videti da Cabernet Sauvignon vina pokazuju najače delovanje.

Tabela 60. Granične vrednosti za antioksidacionu aktivnost pojedinih vrsta crvenih vina koja su ispitivana u ovom radu

<i>Vrsta crvenih vina</i>	<i>Antioksidaciona aktivnost (EC₅₀, mL/g)</i>
<i>Cabernet Sauvignon vina</i>	<i>49,24±0,15 - 83,25±0,28</i>
<i>Vranac vina</i>	<i>50,56±0,32 - 145,83±0,25</i>
<i>Jednosortna vina (Merlot, P.Noir, Frankovka)</i>	<i>49,85±0,55 - 129,33±0,21</i>
<i>Višesortna vina iz Župskog rejona</i>	<i>95,03±0,05 – 140,29±0,20</i>

Na osnovu datih EC₅₀ vrednosti evidentno je da ispitivana crvena vina pokazuju dosta visoku antioksidacionu aktivnost. Smatra se da fenolna jedinjenja kao antioksidansi imaju sposobnost terminacije slobodnoradikalskih reakcija i konstantne brzina ovih reakcija određuju antioksidacionu aktivnost.

Aktivnost fenolnih jedinjenja zavisi od mnogih faktora kao što su energija disocijacije veze O-H, mogućnost delokalizacije i rezonantne stabilizacije nesparenog elektrona slobodnog radikala fenolnog jedinjenja i sternih smetnji voluminoznih grupa vezanih za aromatični prsten [Shahidi i Naczka, 1995].

Neki autori su pokazali da inhibitorni efekat fenolnih kiselina, naročito hidrosicimetne kiseline zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa u molekulu. Hidroksilne grupe utiču na antioksidacionu aktivnost, ne samo kao izvor vodonikovih atoma sposobnih da neutraliziraju slobodnodne radikale, nego i povećanjem stabilnosti radikala flavonoida otpuštanjem još jednog vodonikovog atoma iz druge hidroksilne grupe. A razlika u antioksidacionoj aktivnosti vina je posledica različitog sadržaja i različite reaktivnosti prisutnih fenolnih jedinjenja.

Tako da se antioksidaciona aktivnost nekih flavonoida kao što su flavonoli pripisuje: broju hidroksilnih grupa u prstenu B, O-dihidroksilne grupe B prstena, 2,3-dvostrukoj vezi piranskog prstena u konjugaciji sa keto-grupom na C₄-atomu (zbog

delokalizacije) i hidroksilnim grupama na položajima C₃ i C₅ kao „hvatačima“ slobodnih radikala i njihovoj sposobnosti stvaranja vodoničnih veza sa keto grupom ili heliranjem jona metala u toku oksidacione reakcije [Espinoza i sar., 2009; Marinova i Yanishieva, 1992; Rice-Evans i sar., 1995].

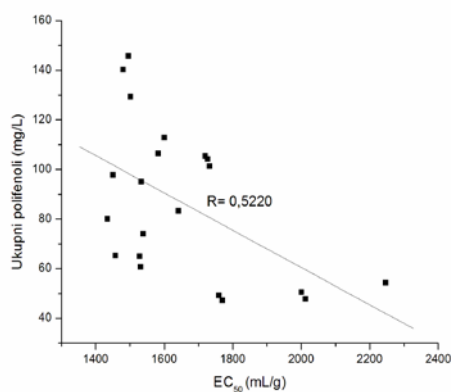
U literaturnim radovima (prethodno citiranim) nalazimo različite korelacione analize između nekih fizioloških aktivnih komponenata i antioksidacionog kapaciteta prirodnih uzoraka, kao što je grožđe i vino. U našim radovima pokušali smo da otkrijemo dali postoji korelacija između koncentracije prethodno određenih koncentracija fenolnih jedinjenja i eksperimentalno dobijenih EC₅₀ vrednosti za antioksidacionog kapaciteta izabranih uzoraka crvenih vina [Radovanović i sar, 2008; 2010a, 2010b; 2012a; 2012b].

Iz prethodno prikazanih UV/VIS spektroskopskih analiza ispitivanih uzoraka crvenih vina (Tabele 5, 21, 36 i 48) pokušali smo da uspostavimo korelaciju između EC₅₀ vrednosti i spektroskopski dobijenih vrednosti za ukupne fenole, estre vinske kiseline i flavonole. Korelacioni indeksi dati u Tabeli 61 pokazuju da postoji dobra korelacija:

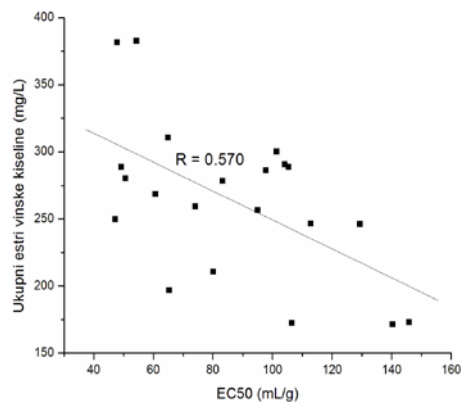
Tabela 61. Korelacioni indeksi za koncentracije ukupnih estara vinske kiseline i ukupnih flavonola, određenih UV/VIS spektroskopijom (mg/L) i antioksidaciona aktivnost u ispitivanim uzorcima crvenih vina (EC₅₀, mL/g)

Korelacije	R	SD	P
Ukupni polifenoli vs EC ₅₀	0,5220	26,9547	0,0055
Ukupni estri vinske kiseline vs EC ₅₀	0,5695	49,1090	0,0050
Ukupni flavonoli vs EC ₅₀	0,6060	21,6040	0,0035

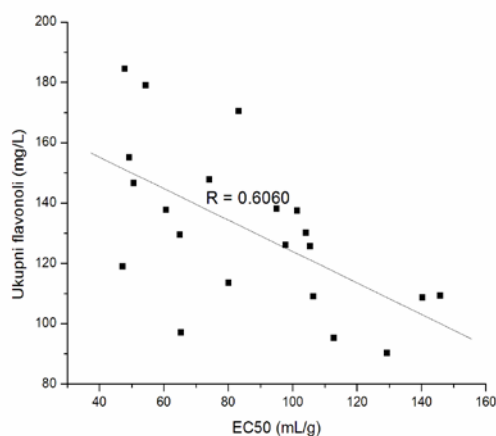
Na Slici 84 grafički su prikazane korelacije između koncentracija ukupnih polifenola (A), estara vinske kiseline (B) i ukupnih flavonola (C) i antioksidacione aktivnosti ispitivanih uzoraka crvenih vina:



A)



B)



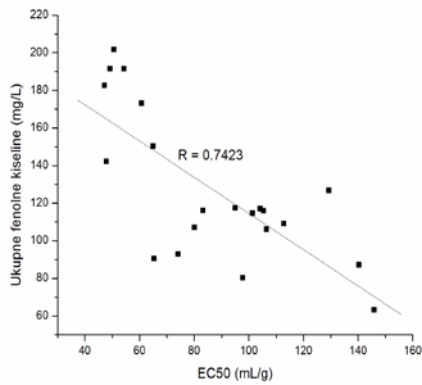
C)

Slika 84. Grafički prikaz korelacije između koncentracija (mg/L) ukupnih polifenola (A), estara vinske kiseline (B) i ukupnih flavonola (C), detektovanih UV/VIS spektroskopijom i antioksidacione aktivnosti (EC_{50} , mL/g) ispitivanih uzoraka crvenih vina datih u tabeli 59

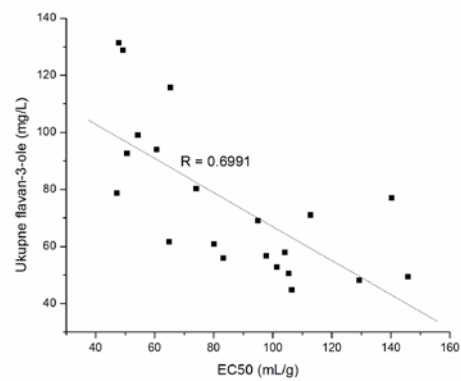
Takođe, ispitivana je mogućnost korelacije između koncentracija ukupnih fenolnih kiselina (Tabele 9, 25, 39, 49), flavan-3-ola (Tabele 11, 27, 41, 52), flavonola (Tabele 13, 29, 43, 54), flavonoida (Tabele 15, 31, 45, 54) i ukupnih antocijana (Tabele 18, 33, 46, 56), detektovanih HPLC metodom i antioksidacione aktivnosti izabranih uzoraka crvenih vina. Njihovi korelacioni indeksi su dati u Tabeli 62 i grafički prikazani na Slici 85.

Tabela 62. Korelacioni indeksi za koncentracije ukupnih fenolnih kiselina, ukupnih flavan-3-ola, ukupnih flavonola i ukupnih flavonoida (mg/L), određenih HPLC metodom i antioksidacione aktivnosti (EC_{50} , mL/g) u ispitivanim uzorcima crvenih vina

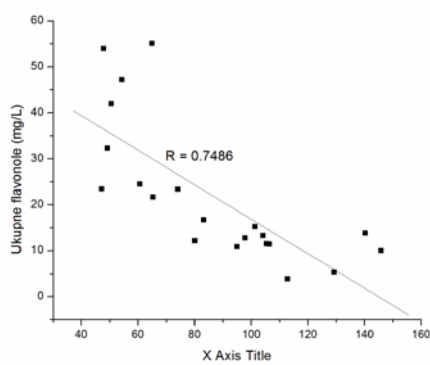
Korelacije	R	SD	P
<i>Ukupne fenolne kiseline vs EC_{50}</i>	0,7423	27,4829	0,0001
<i>Ukupne flavan-3-ole vs EC_{50}</i>	0,6991	19,2772	0,0004
<i>Ukupne flavonole vs EC_{50}</i>	0,7486	10,4961	< 0,0001
<i>Ukupne antocijane vs EC_{50}</i>	0,5941	22.1015	< 0,0005
<i>Ukupne flavonoide vs EC_{50}</i>	0,8595	21.2075	< 0,0001



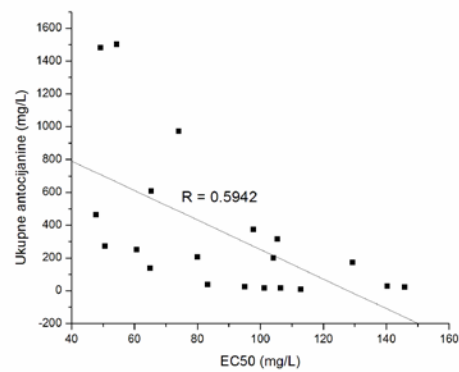
A)



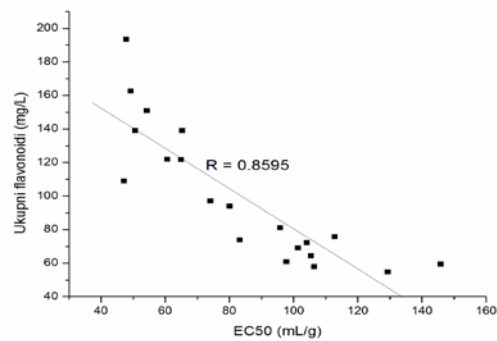
B)



C)



D)



E)

Slika 85. Grafički prikaz korelacije između koncentracija (mg/L) ukupnih fenolnih kiselina (A), ukupnih flavan-3-ola (B), ukupnih flavonola (C), ukupnih antocijana (D) i ukupnih flavonoida (E), detektovanih HPLC metodom i antioksidacione aktivnosti (EC_{50} , mL/g) uzoraka crvenih vina

Analiza dobijenih vrednosti pokazuje da postoji veoma dobra korelacija za sve ove grupe fenolnih jedinjenja, detektovanih HPLC metodom sa EC_{50} vrednostima, a kao najbolja se pokazala sa ukupnim flavonoidima (0,8595), što potvrđuje činjenicu da različite grupe flavonoida daju sinergistički doprinos ukupnom antioksidacionom kapacitetu vina.

Antocijani su posebna velika grupa fenolnih jedinjenja koja imaju značajno biološko delovanje, ali njihovo prisustvo i sadržaj u crvenim vinima je pod uticajem različitih faktora, kao što su: sorte grožđa, zrenje grožđa, godine i način proizvodnje vina, čuvanje tj starenje vina itd, tako se njihove koncentracije u ispitivanim crvenim vinima veoma razlikuju, kao što je u prethodnoj diskusiji pokazano.

Prethodno date HPLC analize uzoraka crvenih vina pokazale su da je u svakoj određenoj grupi fenolnih jedinjenja dominantna jedna njihova komponenta. HPLC analiza fenolnih kiselina, detektovanih DAD-om na 280 i 320 nm, pokazala je da je od ukupno određenih hidrosibenzoevih i hidrosicimetnih kiselina najprisutnija galna kiselina, maksimalnim učešćem od 88,75 % u Kratošija vinima; dok u ukupnim detektovanim flavan-3-olima na 275/322 nm, najprisutnija komponenta je (+)-katehin sa maksimalnim učešćem od 55,30 % u Cabernet Sauvignon vinima i kod ukupno određenih flavonola na 360 nm, najzastupljenija komponenta je kvercetin-3-glikozid, maksimalno do 57,58 % u Župskim višesortnim vinima (Tabeli 63):

Tabela 63. Granične procentne vrednosti nekih fenolnih jedinjenja, određene HPLC metodom

<i>Vrste vina</i>	<i>Galna kiselina (%)</i>	<i>(+)-Katehin (%)</i>	<i>Kvercetin-3-gl (%)</i>
<i>C. Sauvignon vina</i>	36,55 - 63,92	30,96 – 55,30	12,37 – 38,35
<i>Vranac vina</i>	45,20 – 71,88	33,49 – 51,59	16,80 – 45,09
<i>Kratošija vina</i>	68,82 – 88,75	32,52 – 52,09	28,89 – 37,81
<i>Merlot vina</i>	61,77 – 62,54	22,09 – 25,50	34,92 – 36,48
<i>Pinot Noir vino</i>	49,48	51,77	43,93
<i>Frankovka vino</i>	37,30	62,00	79,74
<i>Župska višesortna vina</i>	53,70 – 71,15	32,53 – 48,98	29,39 – 57,58

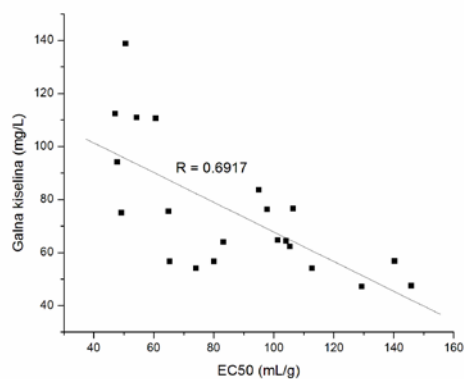
Zbog toga je ispitivana mogućnost korelacije između koncentracija galne kiseline (Tabele 7, 23, 37, 49), (+)-katehina (Tabele 11, 27, 41, 52) i kvercetin-3-glikozida (Tabele 13, 29, 43, 54) i antioksidacione aktivnosti odabranih uzoraka crvenih vina.

Dobijeni rezultati, dati u Tabeli 64 i grafički prikazani na Slici 93 (A, B i C) pokazuju da postoji veoma dobra korelacija između koncentracije ovih fenolnih jedinjenja i antioksidacione aktivnosti ispitivanih crvenih vina, što će biti i potvrđeno posebnom korelacijom između ovih fenolnih jedinjenja i dobijenih EC_{50} vrednosti ispitivanih vina (Tabeli 62).

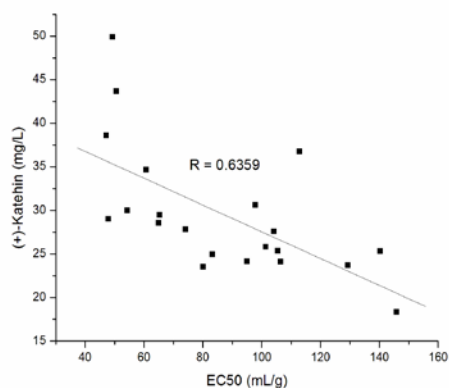
Takođe, ispitivana je korelacija između koncentracije trans-resveratrola (Tabele 10, 26, 40, 51) kao predstavnika stilbena i antioksidacione aktivnosti ispitivanih uzoraka crvenih vina. Dobijeni korelacioni indeks (Tabela 62) grafički prikazan na Slici 86 (D) potvrđuje da postoji veoma dobra korelacija:

Tabela 64. Korelacioni indeksi za koncentracije galne kiseline, (+)-katehina, kvercetin-3-glikozida i trans-resveratrola (mg/L), određenih HPLC metodom i antioksidacione aktivnosti (EC_{50} , mL/g) u ispitivanim uzorcima crvenih vina

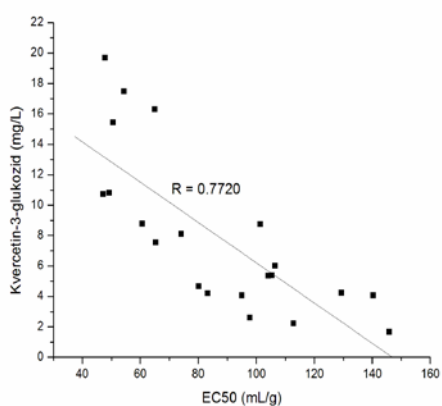
Korelacije	R	SD	P
Galna kiselina vs EC_{50}	0,6917	18,4398	0,0005
(+)-Katehin vs EC_{50}	0,6912	22,8353	0,0005
Kvercetin-3-glikozid vs EC_{50}	0,7719	3,4454	< 0,0001
trans-Resveratrol vs EC_{50}	0,7404	21,2444	0,0001



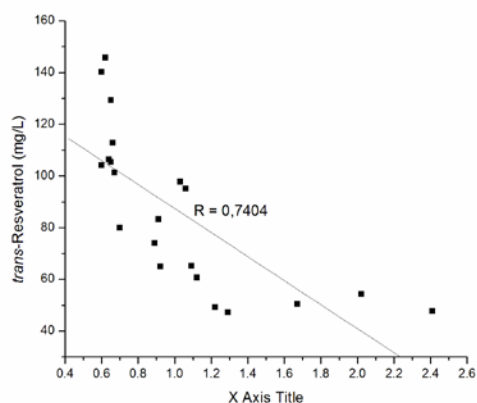
A)



B)



C)



D)

Slika 86. Grafički prikaz korelacije između koncentracije (mg/L) galne kiseline (A), (+)-katehina (B), kvercetin-3-glikozida (C) i trans-resveratrola (D) i antioksidacione aktivnosti (EC_{50} , mg/L) uzoraka crvenih vina

Primenom DPPH slobodoradikalnom reakcijom je određena antioksidaciona aktivnost i nekih posebnih ("čistih") fenolnih komponenata. Od fenolnih jedinjenja prisutna u vinima ispitivana su: galna kiselina, askorbinska kiselina, kvercetin i rutin, a od sintetičkih oksidanasa: troloks i 2-terc-butyl-4-hidroksianizol (BHA). Njihove dobijene vrednosti, ukazuju da kvercetin u poređenju sa ostalim supstancama ima najjači antioksidacioni kapacitet, a nakon njega dolazi galna kiselina i rutin:

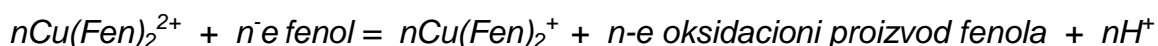
Tabela 65. EC_{50} vrednosti za neke čiste supstance, izražene u mg/g i $\mu\text{mol/g}$

Supstance	EC_{50}, mg/g DPPH'	EC_{50}, $\mu\text{mol/g}$ DPPH'
<i>Kvercetin</i>	7,29	24,12
<i>Galna kiselina</i>	55,15	325,00
<i>Askorbinska kiselina</i>	107,43	609,95
<i>Rutin</i>	129,96	212,86
<i>Troloks</i>	130,00	520,00
<i>BHA</i>	142,84	792,41

Od svih do sada postavljenih korelacija može se zaključiti da se najbolja korelacija dobija praćenjem koncentracije ukupnih nađenih flavonoida u crvenim vinima, kojima pripadaju i daju svoj antioksidativni doprinos grupe: flavan-3-oli, flavonoli, flavoni i flavanoni, određeni na 360 nm DAD-om i 275/322 nm fluorescentnim detektorom, što ukazuje na postojanje sinergističnog efekta između određenih biohemijskih aktivnih fenolnih komponenata i ukupne antioksidacione aktivnosti crvenih vina.

4.5.2 Antioksidaciona aktivnost određena Cu(II)-1,10-fenantrolin-skom redoks reakcijom i njena korelacija sa sadržajem fenolnih jedinjenja u izabranim uzorcima crvenih vina

Antioksidaciona aktivnost prirodnih uzoraka, kao što su grožđe i vino može se izračunati na više načina. U ovom delu biće dati rezultati određivanja antioksidacione aktivnosti primenom novog oksidacionog agensa Cu(II)-1,10-fenantrolin agensa. U ovoj redoks metodi, hromogeni oksidant Cu(II)-1,10-fenantrolin redukuje se do Cu(I)-1,10-fenantrolina u prisustvu antioksidacionog fenolnog jedinjenja iz analiziranog uzorka vina i pokazuje maksimum apsorpcije na 450 nm:



Da bi potvrdili upotrebljivost ove nove bakarno redukujuće (CR) metode za određivanje antioksidacione aktivnosti uzoraka vina, izvršeno je upoređivanje dobijenih rezultata sa rezultatima dobijenim poznatom DPPH metodom, kao što je prikazano u Tabeli 64.

Kao i kod DPPH metode, upotrebljena su ista fenolna jedinjenja (galna kiselina, kvercetin i rutin) za dobijanje standardne jednačine:

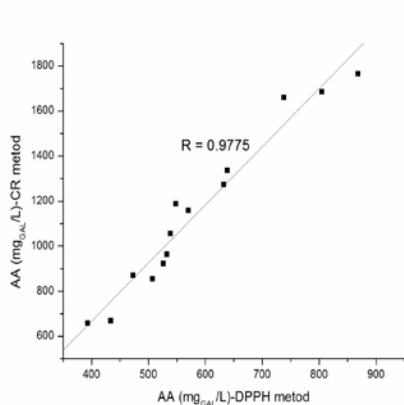
Tabela 66. Antioksidaciona aktivnost (mg_{std}/L) izabranih uzoraka crvenih vina, određena primenom DPPH i CR metode

Ime vina i vinarije	DPPH			CR		
	mg_{GAL}/L	mg_{QUE}/L	mg_{RUT}/L	mg_{GAL}/L	mg_{QUE}/L	mg_{RUT}/L
C. Sauvignon (Oplenac), 2009	868,21	124,86	2021,91	1764,87	1070,46	779,38
C. Sauvignon (Oplenac), 2008	804,39	114,37	1876,20	1685,38	1006,84	744,29
C. Sauvignon - Alexandrija (Tikveš)	737,99	103,45	1724,63	1659,96	1006,84	733,07
C. Sauvignon – T. Lazarica (Rubin)	638,98	87,17	1498,59	1336,95	810,94	590,49
C. Sauvignon (Rubin), 2009	632,52	86,11	1483,83	1273,51	772,46	562,49
Međaš (Rubin)	569,89	75,81	1340,87	1158,07	702,45	511,53
Crno (Rubin)	547,86	72,19	1290,57	1188,93	721,17	525,16
Vranac (Rubin)	538,51	70,65	1269,22	1055,66	640,34	466,33
Medveđa krv (Rubin)	532,49	69,66	1255,47	963,34	578,28	421,16
Crno (Vino Župa)	526,12	68,62	1240,94	922,16	559,37	407,40
Pinot Noir (Rubin)	506,77	65,44	1196,76	855,31	518,83	377,89
Frankovka (Vršачki vinogradi)	472,64	59,82	1118,84	871,07	510,19	371,60
As (Vino Župa)	433,96	53,47	1030,53	668,89	405,76	295,60
Vranac (Vino Župa)	393,56	46,82	938,31	657,97	399,14	290,78

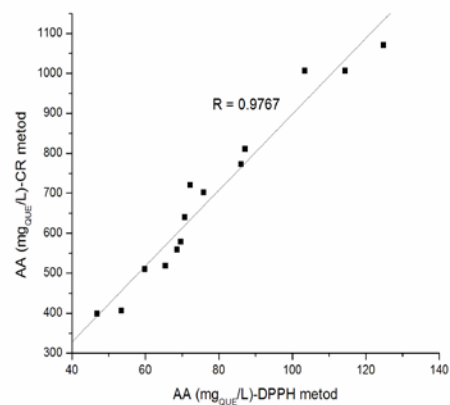
U Tabeli 66 i na Slici 87 prikazani su korelacioni indeksi i možemo videti da postoji odlična korelacija (0,9767 - 0,9775) između antioksidacione aktivnosti nađene novom CR metodom u odnosu na antioksidacione aktivnosti određene DPPH metodom. Zbog toga, nije bilo neophodno, uspostavljati korelacije između vrednosti za antioksidacionu aktivnost dobijenu CR metodom i određenih koncentracija fenolnih jedinjenja, nađenih u crvenim vinima.

Tabela 67. Korelacioni indeksi za antioksidacionu aktivnost (AA) izabranih uzoraka crvenih vina, određenih DPPH i CR metodama, a proračunati preko ekvivalenta galne kiseline, kvercetina i rutina (mg/L)

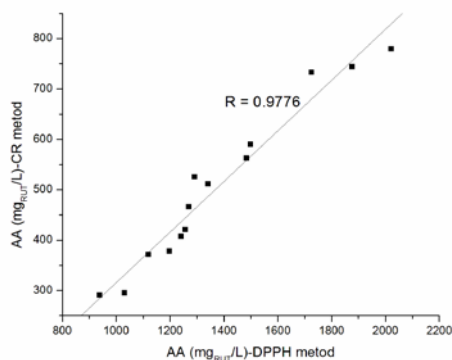
Korelacije	R	SD	P
AA (mg _{GAL} /L)-DPPH vs AA (mg _{GAL} /L)-CR	0,9775	79,6006	<0,0001
AA (mg _{QUE} /L)-DPPH vs AA (mg _{QUE} /L)-CR	0,9767	49,0769	<0,0001
AA (mg _{RUT} /L)-DPPH vs AA (mg _{RUT} /L)-CR	0,9776	35,3089	<0,0001



A)



B)



C)

Slika 87. Grafički prikaz korelacija između antioksidacione aktivnosti (AA) određene DPPH i CR agensima, a proračunate preko ekvivalenta A) galne kiseline, B) kvercetina i C) rutina

4.6 Antimikrobna aktivnost i njena korelacija sa sadržajem fenolnih jedinjenja u izabranim uzorcima crvenih vina Balkana

*U okviru mnogobrojnih ispitivanja u kojima se razmatra korišćenje biljnih proizvoda za proizvodnju lekova protiv različitih bolesti, postoji i veliki broj epidemioloških radova koji ukazuju da umereno konzumiranje crvenog vina ima antibakterijski efekat po zdravlje čoveka, iako mehanizam delovanja još uvek nije jasan. Utvrđeno je da antimikrobno delovanje pokazuju neka fenolna jedinjenja protiv određenih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija [Cowan, 1999; Cushnie i Lamb, 2005, 2011; Daglia i sar., 2007; Ikigai i sar., 1993; Just i Daeschel, 2003; Fikselova i sar., 2010; Macheix i Fleuriet, 1998; Mori i sar., 1987; Papadopoulou i sar., 2005; Palma i Taylor 1999; Rauha i sar., 2000; Radovanović i sar., 2008, 2010; Rodríguez Vaquero i sar., 2007; Russell, 2002; Sugita-Konishi i sar., 2001; Tenore i sar. 2011; Tesaki i sar., 1999; Thimothe i sar, 2007; Weisse i sar, 1995]. Antibakterijsko delovanje crvenih vina je postalo zanimljivo polje istraživanja zadnjih godina, tako na primer, ispitivan je antibakterijski efekat vina u model stomačnom sistemu prema *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua* i *Campylobacter jejuni* [Just and Daeschel, 2003; Carneiro i sar., 2008]. Just and Daeschel (2003) u svojim in vitro istraživanju su pokazali da vino ima jače antibakterijsko dejstvo u poređenju sa drugim alkoholnim pićama iste etanolske koncentracije (10 – 13 % v/v). Kao razlog navode činjenicu da je etanol u vinima u kombinaciji sa organskim kiselinama (vinska, jabučna, mlečna i sirćetna kiselina), čije delovanje je pojačano niskim pH uslovima koji postoje u vinima, bliskim stomačnom humanom soku (pH ~ 1,8). Ovo tumačenje antimikrobne aktivnosti vina su podržali činjenicom da sok od grožđa ima veoma malu antimikrobnu aktivnost prema *Escherichia coli* O157:H7 i *Salmonella* spp. Takođe, Paulo i sar. (2011) su pokazali antibakterijsko delovanje dva komercijalna crvena vina iz Portugalije i posebno resveratrola prema gram-negativnom *Helicobacter pylori*.*

*U našem radu dali smo doprinos ispitivanju antimikrobne aktivnosti vina tako što smo pratili antimikrobno delovanje izabranih uzoraka crvenih vina sa prostora Balkana, protiv šest sojeva gram-pozitivnih (*Clostridium perfringens* ATCC 19404, *Bacillus cereus* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ili *Listeria innocua* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 8538 and *Sarcina lutea* ATCC 9341) i šest sojeva gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* ATCC 25931 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031) i kvasca – *Candida albicans*, kao i antimikrobno delovanje nekih fenolnih supstanci koji su dominantni u vinu (Eksperimentalni deo).*

Za analizu antimikrobne aktivnosti izabrana su prethodno analizirana crvena vina, od kojih sedam uzoraka su vina vrste Cabernet Sauvignon, pet uzoraka su Vranac vina, vina Merlot, Pinot Noir i Frankovka, kao i tri uzoraka Župskih višesortnih crvenih vina. Analizirana su sledeća Cabernet Sauvignon vina: Cabernet Sauvignon (2009 godine) iz vinarije Kraljevski vinogradi, Cabernet Sauvignon – Terra Lazarica (2008 godine) iz vinarije Rubin, Cabernet Sauvignon (2009 godine) iz vinarije Rubin, Cabernet Sauvignon – Alexandrija (2009 godine) iz vinarije Tikveš, Cabernet Sauvignon – Čardak (2009 godine) iz vinarije Lozar, Cabernet Sauvignon iz vinarije Plantaža i Cabernet Sauvignon (2008 godine) iz vinarije Sekulović. Analizirani uzorci Vranac vina su: Vranac vino iz vinarije Rubin, Vranac vino iz vinarije Vino Župa, Vranec - Tga za jug (2009 godine) iz vinarije Tikveš, vino Vranec – Vilarov (2011 godine) iz vinarije Stobi, Vranac - Hercegovački iz vinarije Vukoje i Vranac - Crnogorski iz vinarije Plantaža. Takođe, ispitivana je antimikrobna aktivnost drugih jednosortnih vna, kao što su Merlot vina, proizvedenih u vinarijama Tikveš i Rubin, vino Pinot Noir iz vinarije Rubin i vino Frankovka iz vinarije Vinoprodukt Čoka. Praćena je antimikrobna aktivnost i nekih vina iz Župskog rejona, kao što su Međaš vino iz vinarije Vino Župe i vina Crno i Medveđa krv iz vinarije Rubin. U Tabeli 68 i 69 su date minimalna inhibitorska koncentracija (MIC)/minimalna baktericidna koncentracija (BMC) izabranih uzoraka crvena vina (500 - 0,2 µL/mL), fenolnih komponenata (10,0 – 0,002 µg/mL) i referentnih antibiotika, određenih mikrodilucionom metodom prema gram-pozitivnim i gram – negativnim bakterijskim sojevima i kvascu:

Tabela 68. MIC/BMC izabranih uzoraka crvena vina, fenolnih komponenata i antibiotika, određenih mikro-dilucionom metodom prema gram-pozitivnim bakterijama i kvascu ($\mu\text{L}/\text{mL}$ i $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Ime uzorka vina, polifenola i standarda	C. perfrin- gens	Bacillus cereus	Staphylococcus aureus	Listeria monocytogenes	Sarcina lutea	Micrococcus flavus	Candida albicans
C. Sauvignon Plantaža)	125/125	250/250	125/125	62,5/62,5	125/250	125/125	/
C. Sauvignon (Sekulović)	125/250	62,5/250	125/250	125/125	125/125	/	125/125
CS- Alexandria (Tikveš)	125/250	125/250	125/250	125/125	125/125	/	125/125
CS-Čardak (Lozar)	125/250	250/250	125/250	125/250	125/125	/	125/125
C. Sauvignon (Oplenac), 2009	62,5/62,5	125/250	125/125	25/250	62,5/125	125/250	/
CS- Terra Lazarica (Rubin)	62,5/62,5	250/250	250/250	125/250	125/125	125/250	/
C. Sauvignon (Rubin)	62,5/62,5	250/250	250/250	125/125	125/125	125/250	/
Vranac (Vukoje)	62,5/250	62,5/125	125/250	125/125	125/125	/	125/125
Vranec- Tga za jug (Tikveš)	62,5/250	62,5/125	125/250	62,5/125	125/125	/	125/125
Vranec- Vilarov(Stobi)	125/250	125/250	125/250	125/250	125/125	/	250/250
Vranac (Rubin)	125/125	250/250	125/125	125/125	250/250	125/250	/
Vranac (V. Župa)	125/125	250/250	125/125	250/250	125/250	125/125	/
Merlot (Tikveš)	62,5/250	125/250	125/250	125/125	125/125	/	125/125
Pinot Noir (Rubin)	125/125	125/250	250/250	125/250	125/125	250/250	/
Frankovka (Vinopr.-Čoka)	125/125	125/250	250/250	125/125	125/125	250/250	/
Međaš (Vino Župa)	125/125	125/125	125/125	125/125	125/250	125/250	/
Crno (Rubin)	125/125	250/250	125/125	125/125	125/250	125/125	/
Medveđa krv (Rubin)	125/125	250/250	250/250	125/250	125/250	250/250	/
Galna kiselina	125/125	62,5/62,5	250/250	7,8/12,5	125/125	125/125	/
t-Kumarna kiselina	2,5/5,0	0,63/1,25	2,5/2,5	0,63/1,25	2,5/5,0	/	0,63/0,63
(+)-Katehin	0,6/1,2	1,2/2,3	0,6/1,2	0,2/1,2	2,3/4,7	1,2/2,3	/
Kvercetin	0,125/0,25	0,5/0,5	1,0/1,0	0,03/0,06	0,5/1,0	0,125/0,25	/
Chloraphenicol	4,0/8,0	4,0/8,0	2,0/4,0	2,0/2,0	0,5/1,0	1,0/1,0	/
Tetracyclin	0,9/0,9	0,9/0,9	0,12/0,9	0,46/0,9	0,06/0,06	0,4/0,9	/
Nystatin	/	/	/	/	/	/	1,0/1,0

Tabela 69. Minimalna inhibitorska koncentracija (MIC)/minimalna baktericidna koncentracija (BMC) izabranih uzoraka crvena vina, fenolnih komponenata i antibiotika, određenih mikro-dilucionom metodom prema gram-negativnim bakterijama ($\mu\text{L/mL}$ i $\mu\text{g/mL}$)

Ime uzorka vina, polifenola i standarda	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa	Salmonella enteritidis	Shigella sonnei	Klebsiella pneumoniae	Proteus vulgaris
C. Sauvignon (Plantaža)	250/250	125/125	125/125	125/250	125/125	62,5/62,5
C. Sauvignon (Sekulović)	250/250	250/250	250/250	125/250	250/250	/
C. Sauvignon-Alexandria (Tikveš)	250/250	125/125	125/250	125/250	250/250	/
C. Sauvignon-Čardak (Lozar)	250/250	250/250	250/250	125/250	125/250	/
C. Sauvignon (Oplenac), 2009	250/500	250/250	250/250	250/250	/	/
C. Sauvignon-Terra Lazarica (Rubin)	250/250	250/250	250/250	250/250	/	/
C. Sauvignon (Rubin)	250/250	125/250	250/250	250/250	/	/
Vranac (Vukoje)	250/250	250/250	250/250	125/125	250/250	/
Vranec – Tga za jug (Tikveš)	250/250	250/250	125/125	125/250	250/250	/
Vranec-Vilarov (Stobi)	250/250	250/250	250/250	125/250	250/250	
Vranac (Rubin)	250/250	250/250	250/250	250/250	250/250	125/125
Vranac (Vino župa)	250/250	125/125	250/250	250/250	250/250	125/125
Merlot (Tikveš)	250/250	250/250	125/125	125/250	250/500	/
Pinot Noir (Rubin)	250/250	125/250	250/250	500/500	/	/
Frankovka (Vinoprodukt-Čoka)	250/250	250/250	250/250	500/500	/	/
Međaš (Vino Župa)	250/250	125/125	125/250	250/250	250/250	125/125
Crno (Rubin)	250/250	125/125	250/250	125/250	125/125	125/125
Medveđa krv (Rubin)	250/250	250/250	250/250	500/500	/	/
Galna kiselina	125/125	62,5/62,5	125/125	125/125	/	/
Kumarna kiselina	2,50/2,50	1,25/1,25	1,25/2,50	5,00/5,00	5,00/5,00	/
(+)-Katehin	1,2/1,2	1,2/1,2	0,6/1,2	4,7/4,7	/	/
Kvercetin	0,25/0,25	0,125/0,25	0,125/0,25	0,5/1,0	/	/
Streptomycin	8,0/8,0	4,0/8,0	4,0/4,0	8,0/8,0	nt	Nt
Tetracyclin	3,8/7,5	7,5/7,5	0,9/1,9	0,06/0,12	0,9/1,9	1,9/1,9

Ako pogledamo dobijene vrednosti za MIC/BMC, prema gore označenim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijskih vrstama i kvascu, očigledno je da svako

vino u zavisnosti od sorte grožđa, sastava, podneblja berbe grožđa i proizvođača pokazuje slično antimikrobno delovanje prema istoj sorti bakterijske vrste .

Kako razlike između delovanja ispitivanih Cabernet Sauvignon i Vranac vina nisu velike u sledećoj tabeli je dato MIC/BMC delovanje svih ispitivanih vina prema različitim sojevima:

Tabela 70. Intervali MIC/BMC delovanja ispitivanih crvenih vina prema 12 bakterijskih vrsta

Gram(-) bakterija	Interval MIC/BMC (µL/mL)	Gram-(+)-bakterija	Interval MIC/BMC (µL/mL)
<i>Escherichia coli</i>	250/250 - 250/500	<i>Clostridium perfringens</i>	62,5/62 - 125/250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	125/125 - 250/250	<i>Bacillus subtilis</i>	62,5/125 - 250/250
<i>Salmonella enteritidis</i>	125/125 - 250/250	<i>Staphylococcus aureus</i>	125/125 - 250/250
<i>Shigella sonnei</i>	125/250 - 500/500	<i>Listeria monocytogenes</i>	62,5/62,5 - 250/250
<i>Klebsiella pneumonia</i>	125/125 - 250/500	<i>Sarcina lutea</i>	62,5/125 - 250/250
<i>Proteus vulgaris</i>	62,5/62,5 - 125/125	<i>Micrococcus flavus</i>	125/125 - 250/250

Odnos intervala MIC/BMC delovanja prema gram-pozitivnim bakterijskim sojevima je sledeći:

C. Sauvignon vina (62,5/62,5 - 250/250 µL/mL) > Vranac vina (125/125 - 250/250 µL/mL) > Merlot vino (62,5/250 - 250/500 µL/mL) > Pinot Noir ~ Frankovka ~ Župska mešana vina (125/125 - 250/250 µL/mL)

Odnos intervala MIC/BMC delovanja prema gram-negativnim bakterijskim sojevima na osnovu sorti grožđa od kojih je sastavljeno vino je sledeći:

Cabernet Sauvignon vina (62,5/62,5 - 250/250 µL/mL) > Vranac vina (62,5/125 - 250/250 µL/mL) > Merlot vino (125/125 - 125/125 µL/mL) > Pinot Noir ~ Frankovka ~ Župska vina (125/125 - 500/500 µL/mL)

Antimikrobna aktivnost Vranac vina prema kvascu *Candida albicans* je zadovoljavajući, jer interval MIC/BMC delovanja iznosi 125/125 - 250/250 µL/mL.

Na osnovu datih podataka može se zaključiti da intenzitet antimikrobne aktivnosti ispitivanih crvenih vina prema testiranim gram - pozitivnim bakterijama ima sledeći odnos:

Clostridium perfringens > *Bacillus subtilis* ~ *Listeria monocytogenes* ~ *Sarcina lutea*
> *Staphylococcus aureus* ~ *Micrococcus flavus*

Dok, intenzitet antimikrobne aktivnosti prema testiranim gram–negativnih bakterijama je sledeći:

Proteus vulgaris > *Pseudomonas aeruginosa* ~ *Salmonella enteritidis* > *Klebsiella pneumonia* > *Shigella sonnei*

U Tabelama 68 i 69 date su i minimalne inhibitorske i minimalne baktericidne koncentracije (MIC/BMC) za fenolna jedinjenja, koja su zastupljena u crvenim vinima: galna kiselina, trans-kumarna kiselina, kvercetin i (+)-katehin u koncentracijama od 10,0 do 0,002 µg/mL.

Da bi procenili jačinu antimikrobnog delovanja ovih čistih fenolnih jedinjenja izvršili smo upoređivanje njihovih graničnih vrednosti delovanja sa delovanjem poznatih antibiotika (*chloramphenicol*, *streptomycin*, *tetracyclin* i *nystatin*) prema istim bakterijama.

Na osnovu toga vidi se da ispitivana fenolna jedinjenja ima sledeći redosled i opseg delovanja prema gram-pozitivnim bakterijama:

Kvercetin (0,03/0,06 - 1,0/1,0 µg/mL) > (+)-Katehin (0,2/1,2 - 2,3/4,7 µg/mL) > trans-Kumarna kiselina (0,63/1,25 - 2,5/5,0 µg/mL) > Galna kiselina (7,8/12,5- 125/125 µg/mL)

Dok, fenolna jedinjenja imaju sledeće redosled i opseg delovanje prema gram-negativnim bakterijama:

Kvercetin (0,125/0,25 - 0,5/1,0 µg/mL) > (+)-Katehin (0,6/1,2- 4,7/4,7 µg/mL) > trans-Kumarna kiselina (1,25/1,25 - 5,00/5,00 µg/mL) > Galna kiselina (62,5/62,5 - 125/125 µg/mL)

Ove vrednosti ako se uporede sa graničnim vrednostima standardnih jedinjenja (0,06/0,06 - 8,0/8,0 µg/mL), pokazuju da crvena vina zaista mogu da imaju preventivnu zaštitu od ispitivanih bakterijskih vrsta.

Zanimljivo je da nađeno antimikrobno delovanje trans-kumarne kiseline prema *C. albicans* kvasca je bolje (0,63/0,63 µg/mL) u poređenju sa standardom-nistatinom (1,0/1,0 µg/mL).

Ispitivana je i antimikrobna aktivnost nekih uzoraka crvenih vina disk difuzionom metodom i dobijeni rezultati, proračunati u mm inhibicione zone su dati u Tabelama 69 i 70. Ispitivano je delovanje tri Cabernet Sauvignon vina, tri Vranac vina, vina Pinot Noir i Frankovka, kao i Župska vina: Međaš, Medveđa krv i Crno iz Rubina (50 µL/disc). Takođe, ovom metodom je ispitivano antimikrobno delovanje sledećih fenolnih jedinjenja: galne kiseline (5 µg/disk), (+)-katehina (5 µg/disk) i kvercetina (0,05 µg/disk), kao i referentnih antibiotika (0,05 µg/disk).

Da bi lakše sagledali određeno antimikrobno delovanje ovom metodom, u tabeli 71 su dati mm inhibicije prema testiranim gram-pozitivnim- i gram-negativnim bakterijama. Analiza pokazuje da ispitivana vina imaju inhibicionu zonu delovanja do 20,0 mm za neke bakterijske sojeve, što je prilično dobro u poređenju sa inhibicionom zonom delovanja standardnih antibiotika: streptomicina, tetracyclina i chloraphenicola (16,0 – 35,0 mm) i sa inhibicionom zonom delovanja čistih fenolnih jedinjenja: galne kiseline, kvercetina i (+)-katehina (14,5 – 21,8 mm).

Tabela 71. Antimikrobna aktivnost prikazana dijametrom inhibicione zone (u mm) za neke uzorke crvenih vina (50 µL/disc), fenolna jedinjenja (0,05-5 µL/disc) i referentne antibiotike (30 µL/disc) prema gram-pozitivnim bakterijskim sortama

Ime vina, polifenola i standarda	C. perfringens	Bacillus subtilis	Staphylococcus aureus	Listeria innocua	Sarcina lutea	Micrococcus flavus
C.Sauvignon (Oplenac) 2009	0	17,4±0,7	14,5±1,1	17,5±1,1	17,5±1,4	14,5±0,9
C. Sauvignon-Terra Lazarica (Rubin)	0	19,0±2,5	18,6±2,2	17,0±2,4	16,0±1,6	18,6±1,2
C. Sauvignon (Rubin)	0	17,0±1,6	17,7±1,2	16,3±1,1	16,0±1,7	17,7±1,4
Vranac (Plantaža)	13,6±1,2	13,8±0,7	14,5±1,0	13,0±1,1	14,4±1,2	13,4±0,8
Vranac (Rubin)	12,4±0,5	14,2±1,7	14,9±1,4	12,9±1,3	15,2±1,4	12,7±1,2
Vranac (Vino Župa)	12,1±0,9	13,5±0,5	14,8±0,7	12,0±0,6	14,5±0,5	12,3±0,6
Pinot Noir (Rubin)	0	16,7±1,4	19,3±1,4	0	15,5±1,4	19,3±1,4
Frankovka (Vinoprodukt)	0	17,5±1,1	0	0	15,6±1,7	0
Međaš (Vino Župa)	12,2±0,9	13,7±1,1	14,8±0,	13,1±0,8	14,7±1,6	12,9±0,4
Crno (Rubin)	12,2±0,9	13,7±1,1	14,8±0,	13,1±0,8	14,7±1,6	12,9±0,4
Medveđa krv (Rubin)	0	15,8±1,1	17,0±2,1	16,2±3,2	17,0±0,9	17,0±0,8
Galna (5 µg/disk)	0	19,7±1,3	21,8±1,7	0	19,0±1,2	21,8±1,6
Kvercetin (0,05 µg/disk)	0	18,5±0,9	20,0±0,5	0	19,0±1,1	20,0±1,4
Katehin (2 µg/disk)	20,0±1,7	15,8±1,4	19,4±1,3	0	17,1±0,2	19,4±0,4
Chloraphenicol	/	26,0±0,8	25,0±0,4	18,0±0,9	38,0±0,8	35,0±0,6
Tetracyclin	/	29,0±0,7	23,9±0,9	18,5±0,2	18,7±0,2	20,0±0,2

*Vrednosti inhibicije su date kao srednje vrednosti tri ispitivanja (n=3);

Tabela 72. Antimikrobna aktivnost prikazana dijametrom inhibicione zone (u mm) za neke uzorke crvenih vina (50 µL/disc), fenolna jedinjenja (0,05-5 µL/disc) i referentne antibiotike (30 µg/disc) prema gram-negativnim bakterijskim sortama

Ime vina, polifenola i stand.	Escheri- chia coli	P. aerugin- osa	Salmonel -la enter- itidis	Shigella sp	Klebsiella pneumon- iae	Proteus vulgaris
C.Sauvignon (Oplenac)	16,5±1,4	15,8±1,1	15,0±0,9	17,6±1,2	/	/
C. Sauvignon- Terra Lazarica (Rubin)	20,0±1.2	16.0±2.6	15.5±3.1	18,0±0,8	/	/
C. Sauvignon (Rubin)	16,7±1,6	16,7±1,6	0	16,3±1,5	/	/
Vranac (Plantaža)	16,8±1,1	14,4±1,3	16,0±0,7	14,9±1.5	12,2±1.2	13,7±1,4
Vranac (Rubin)	13,5±1,0	13,2±1,1	13,6±0,9	14,0±1,2	12,8±2,0	13,6±0,3
Vranac (Vino Župa)	12,8±0,5	12,6±0,6	12,2±0,3	13,7±0,6	12,1±0,2	12,1±0,2
Pinot Noir (Rubin)	17,6±1,4	17,1±1,4	0	/	17,6±1,4	17,1±1,4
Frankovka (Vinoprodukt)	16,8±3,3	17,0±3,4	0	15,8±1,5	/	/
Međaš (Vino Župa)	15,8±2.2	13.6±1.4	14.3±1.8	15.4±1.2	0	13,4±1,1
Crno (Rubin)	17.7±1.2	12,8±1.3	14.4±2.1	13,5±1,8	0	12.9±0.8
Medveđa krv (Rubin)	17.8±2.3	15.2±1.3	0	16.5±2.0	17.8±2.3	15.2±1.3
Galna (5 µg/disk)	17,5±0,9	15,5±0,7	19,0±0,4	0	0	0
Kvercetin (0,05 µg/disk)	16,0±0,7	14,5±0,6	18,6±1,0	/	/	/
Katehin (2 µg/disk)	16,5±1,0	19,5±0,6	20,5±0,4	/	/	/
Streptomycin	16,0±0,4	23,0±0,7	18,0±0,9	19,0±0,8	/	/
Tetracyclin	23,2±0,2	20,8±0,5	23,3±0,3	31,1±0,8	23,6±0,6	19,2±0,5

Odnos inhibicione zone delovanja ispitivanih vina prema gram-pozitivnim bakterijama (Tabela 71) je sledeći:

Cabernet Sauvignon vina (0 - 19.0 mm) > Pinot Noir (0 - 19,3 mm) > Frankovka (0 - 17,5 mm) ~ Župska mešana vina (12.2 - 17.0 mm > Vranac vina (12,0 - 14.9 mm)

Odnos antimikrobnog delovanja poređenog prema inhibicionoj zoni delovanja za različite vrste crvenih vina koja su testirana prema gram-negativnim bakterijama je sledeće (Tabela 72):

Cabernet Sauvignon vina (15,0 -20,0 mm) > Pinot Noir (17,1 -17,6 mm) ~ Župska mešana vina (12,8 - 17.8 mm) ~ Frankovka (15,8 - 17,0 mm) ~ Vranac vina (12,1 - 16,8 mm)

Iz ovih podataka se može zaključiti da Cabernet Sauvignon vina imaju jače antimikrobno delovanje u poređenju sa ostalim ispitivanim vinama. Najače delovanje je pokazao Cabernet Sauvignon - Terra Lazarica i to prema prema gram-pozitivnim bakterijama: *Bacillus subtilis* (19,0 mm) i *Bacillus subtilis* (18,6 mm) i gram-negativnim bakterijama: *Escherichia coli* (20, 0 mm) i *Shigella sp* (18,0 mm), što je u saglasnosti sa njihovom najvećom koncentracijom ukupnih flavonoida (163,63 mg/L), ukupnih fenolnih kiselina (143,19 mg/L) i ukupnih antocijana (1480,56 mg/L), detektovanih HPLC metodom u poređenju sa ostalim analiziranim vinima.

Da bismo odredili prema kojim bakterijskim sojevima testirana vina su antimikrobno najdelotvornija, određen je interval inhibicije u mm (Tabela 71). Iz ovih podataka, može se zaključiti da vina imaju najače antimikrobno delovanje prema gram-pozitivnim bakterijama: *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* i prema gram-negativnoj bakteriji *Escherichia coli*.

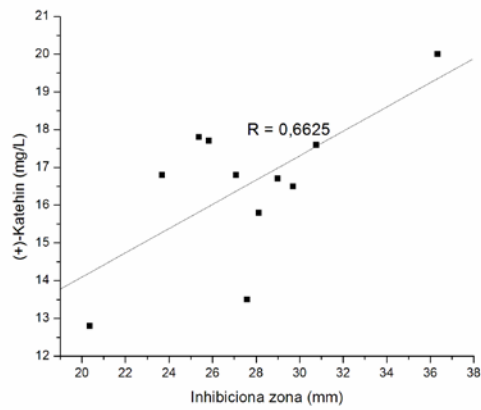
Tabela 73. Intervale inhibicione zone (mm) nekih uzoraka crvenih vina prema šest gram-pozitivnim i šest gram-negativnim bakterijama

Gram(-) bakterija	Interval inhibicione zone (mm)	Gram-(+)-bakterija	Interval inhibicione zone (mm)
<i>Escherichia coli</i>	12,8 - 20,0	<i>Clostridium perfringens</i>	0 - 13,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,6 - 17,1	<i>Bacillus subtilis</i>	13,7 - 19,0
<i>Salmonella enteritidis</i>	0 - 16,0	<i>Staphylococcus aureus</i>	0 - 19,3
<i>Shigella sonnei</i>	13,5 - 17,5	<i>Listeri inocua</i>	0 - 17,5
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0 - 17,8	<i>Sarcina lutea</i>	14,4 - 17,5
<i>Proteus vulgaris</i>	12,1 - 15,2	<i>Micrococcus flavus</i>	0 - 18,6

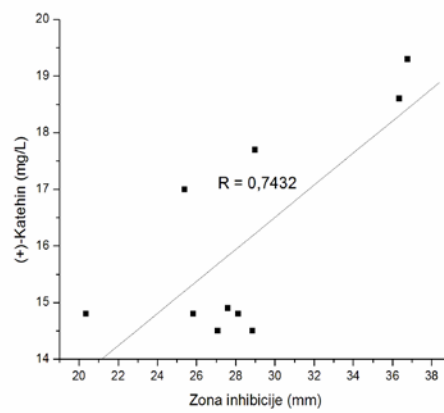
Ispitivana je mogućnost korelacije između određenih koncentracija galne kiseline (Tabele 7, 23, 39, 51), (+)-katehina (Tabele 11, 27, 43, 54), kvercetina i kvercetin-3-glikozida (Tabele 13, 29, 45, 56), kao i ukupnih fenolnih kiselina, flavonoida i antocijana i antimikrobne aktivnosti određene disk difuzionom metodom nekih uzoraka vina prema gram-pozitivnoj bakteriji *Staphylococcus aureus* i prema gram-negativnoj bakteriji *Escherichia coli* (Tabele 71 i 72). Rezultati su pokazali da postoje neke korelacije koje su date u Tabeli 74 i grafički prikazane na Slikama 88 i 89:

Tabela 74. Korelacioni indeksi za koncentracije (+)-katehina, ukupnih kiselina i antocijana (mg/L), određenih HPLC metodom i antimikrobne aktivnosti (zone inhibicije u mm) ispitivanih uzoraka crvenih vina prema *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*

Korelacije	R	SD	P
(+)-Katehin vs <i>Escherichia coli</i>	0,6625	1,5785	0,0101
Ukupne fenolne kiseline vs <i>Escherichia coli</i>	0,7333	1,4327	0,0102
Ukupni antocijani vs <i>Escherichia coli</i>	0,5222	1,7972	0,0099
(+)-Katehin vs <i>Staphylococcus aureus</i>	0,7433	1,3273	0,0131
Ukupne fenolne kiseline vs <i>Staphylococcus aureus</i>	0,5121	1,7041	0,0130

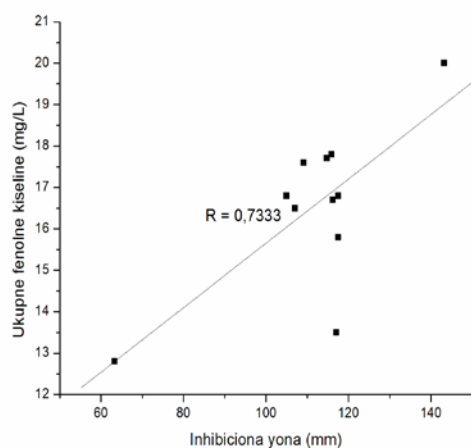


A)

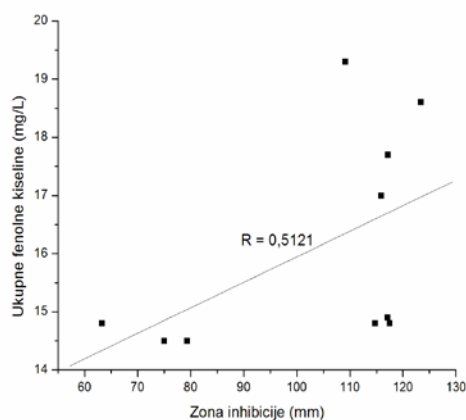


B)

Slika 88. Grafički prikaz korelacije između koncentracija katehina (mg/L) i antimikrobne aktivnosti (Zone inhibicije u mm) ispitivanih uzoraka crvenih vina prema *Escherichia coli* (A) i *Staphylococcus aureus* (B)



A)



B)

Slika 89. Grafički prikaz korelacije između koncentracija ukupnih fenolnih kiselina (mg/L) i antimikrobne aktivnosti (Zone inhibicije u mm) ispitivanih uzoraka crvenih vina prema *Escherichia coli* (A) i *Staphylococcus aureus* (B)

Antimikrobno delovanje ispitivanih fenolnih komponentata izraženo preko zone inhibicije prema gram-pozitivnih bakterija ima sledeći odnos:

Galna kiselina (19,0– 21,8 mm) > (+)-Katehin (15,8 -20,0 mm) ~ Kvercetin (18,5 – 20,0 mm)

Dok, antimikrobno delovanje istih jedinjenja prema gram-negativnim bakterijama ima sledeći odnos:

(+)-Katehin (16,5 -20,5 mm) > Galna kiselina (15,5 – 19,0 mm) > Kvercetin (14,5 – 18,6 mm)

Ovi podatci nam govore da ispitivana bioaktivna fenolna jedinjenja, koja čine veći deo ukupnih fenolnih jedinjenja u crvenim vinima i veoma su značajna za njihovu antioksidacionu aktivnost, kada su izolovana ne pokazuju neku značajnu jaču antimikrobnu aktivnost u poređenju sa antimikrobnim delovanjem samog vina.

5 ZAKLJUČAK

U radu su prikazani rezultati ispitivanja fenolnog sastava, antioksidacione i antimikrobne aktivnosti četrdeset crvenih vina, dobijenih iz vinogradarskih i vinskih rejona Balkana, odnosno iz Bosne i Hercegovine, Hrvatske, Srbije, Crne Gore, Makedonije i Bugarske, proizvedenih u periodu od 2007. do 2011. godine od petnaest različitih proizvođača.

Izabrana su crvena vina internacionalnih Vitis vinifera sorti grožđa: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Frankovka i Game i autohtonih sorti grožđa: Vranac i Kratošija.

Ispitivanja fenolnog sastava odabranih uzoraka vina obuhvatila su spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola na 280 nm, estara vinske kiseline na 320 nm i flavonola na 360 nm, kao i HPLC analizu četrdeset pojedinačnih fenolnih jedinjenja. HPLC identifikacija fenolnih jedinjenja izvršena je primenom DAD detektora na 280, 320, 360 i 520 nm i fluorescentnim detektorom na 275/322 nm, na osnovu retencionih vremena i spektara standardnih supstanci, a kvantifikacija na osnovu njihovih kalibracionih jednačina.

Na taj način identifikovana su jedanaest neflavonoidna jedinjenja najprisutnija u vinima (galna, vanilinska, siringinska, hlorogenska, elagilna, trans-kaftarna, trans-kutarna, trans-kafena, para-kumarna i ferulna kiselina) na 280 i 320 nm i trans-resveratrol na 320 nm.

Na isti način su određena dvadeset i devet flavonoidna jedinjenja, od kojih četiri su flavan-3-oli: (+)-katehin, procijanidin B₂, (-)-epikatehin i (-)-epigalokatehingalat, detektovani fluorescentnim detektorom na 275/322 nm; šest su flavonoli: kvercetin-3-glikozid, rutin, miricetin, morin, kvercetin i kemferol; dva flavona: luteolin i apigenin i jedan flavanon - naringin, određeni DAD detektorom na 360 nm.

Kao posebna velika i značajna flavonoidna grupa koja je određena u ispitivanim crvenim vinima su antocijani: malvidin-3-glikozid, peonidin-3-glikozid, delphinidin-3-glikozid, cijanidin-3-glikozid i petunidin-3-glikozid, njihovi 3-acetilglikozidi i p-kumaroilglikozidi derivati, kao i Vitisin A i malvidin-3-vinilfenolglikozid, na 520 nm.

Određena je i pH vrednost svih uzoraka vina i utvrđeno je da se nalazi u intervalu od 3,08 do 3,67 za vina Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir i Frankovku i od 2,80 do 3,65 za vina Vranac i Kratošija. Sva ispitivana vina pripadaju grupi slabo kiselih vina.

Rezultati ispitivanja svih analiziranih uzoraka vina ukazuju da spektrofotometrijski određeni sadržaji ukupnih fenola, estra vinske kiseline i flavonola, kao i koncentracija pojedinačnih HPLC-om identifikovanih fenolnih jedinjenja zavisni od više faktora. Pre svega od sorte Vitis vinifera grožđa, mesta položaja vinograda (vinogradarskog i vinskog rejona Balkana) odnosno od vremenskih uslova vinogorja koji određuju vreme sazrevanja i branja grožđa, kao i od godine berbe grožđa, pa sve do primenjene tehnologije proizvodnje od strane različitih proizvođača, načina čuvanja, skladištenja i starenja vina, što posebno može da utiče na sastav i sadržaj antocijana.

U tom cilju, praćen je sadržaj fenolnih jedinjenja u toku dve uzastopne godine zrenja grožđa i proizvodnje vina (2008 i 2009 godine) istih vinarija. Cabernet Sauvignon vina proizvedena od vinarskih proizvođača: Rubin, Kraljevski vinogradi i Tikveš; Vranac vina proizvedena od Rubin, Vino Župa i Tikveš vinarije, kao i Kratošija i Merlot vina od vinarije Rubin i Tikveš. Određene koncentracije fenolnih jedinjenja su pokazale da je 2009 godina bila klimatski povoljnija za njihovu sintezu, odnosno veći stepen fenolne zrelosti grožđa što se reflektovalo na fenolni sastav ispitivanih uzoraka vina.

HPLC analiza neflavonoidnih jedinjenja tj. fenolnih kiselina je pokazala da se koncentracija hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina veoma razlikuje, čak i između istosortnih vina iz različitih vinarija. U Cabernet Sauvignon vinima koncentracija hidroksibenzoevih kiselina se nalazi u intervalu od 19,72 do 130,77 mg/L, koncentracija hidroksicimetnih kiselina od 11,65 do 46,90 mg/L, a koncentracija ukupnih fenolnih kiselina u intervalu od 38,94 do 176,67 mg/L.

Procentni odnos između hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina se kreće od 41,45 do 67,88 %. Može se zaključiti da Cabernet Sauvignon vina iz vinarije Plantaža (Podgorica) i iz vinarije Laguna (Poreč) imaju veći procenat hidroksicimetnih kiselina (> 50 %) u poređenju sa ostalim ispitivanim Cabernet Sauvignon vinima. Najdominantnija fenolna kiselina - galna kiselina je prisutna do 63,92 i 65,06 % u Cabernet Sovinjon vinima iz vinarija Tikveš i Sekulović.

U ispitivanim uzorcima Vranac vina ukupne fenolne kiseline su više zastupljene i to od 63,25 do 204,60 mg/L, od kojih na koncentraciju hidroksibenzoevih kiselina pripada od 50,23 do 150,53 mg/L, a na koncentraciju hidroksicimetnih kiselina od 13,19 do 72,94 mg/L. Podatci ukazuju da jedino Vranac vino iz vinarije Plantaža ima veći procenat (> 50 %) hidroksicimetnih kiselina u poređenju sa ostalim ispitivanim Vranac vinima. Galna kiselina, kao najdominantnija fenolna kiselina prisutna je do 71,88 i 75,15 % u Vranac vinima iz vinarija Tikveš i Vino Župa.

Kod ostalih ispitivanih jednosortnih vina: Kratošija, Merlot, Pinot Noir i Frankovka, procentni odnos koncentracija hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina je veoma različit od 75,04 do 24,95 %, a galna kiselina je prisutna do 88,75 % (Kratošija iz vinarije Tikveš). Upoređivanjem dva ista proizvođača iz iste godine proizvodnje pokazalo se da su vina Kratošija i Merlot dobijena iz vinarije Tikveš bogatija fenolnim kiselinama do 40,55 % u poređenju sa istim vinima dobijena iz istih vinarija (Vino Župa i Radmilovac).

U višesortnim crvenim vinima iz Župskog vinogradarskog i vinskog rejona, proizvedenim od proizvođača Rubin i Vino Župa, određen je procentni odnos hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u sličnom intervalu od 71,24 do 28,76 %. Najveći procenat galne kiseline (71,15 i 72,11 %) je nađen u vinima Međaš i Crno iz vinarije Vino Župa .

HPLC analiza trans-rezveratrola, najznačajnijeg stilbena u crvenim vinima je pokazala da se u svim analiziranim vinima nalazi u intervalu od 0,74 (vino Crno iz vinarije Vino Župa) do 2,41 mg/L (vino Merlot iz vinarije Tikveš).

Kod svih ispitivanih vina odnos sadržaja detektovanih fenolnih kiselina je sledeći: galna kiselina > trans-kaftarinska kiselina > trans-kutarinska kiselina > siringinska kiselina > flagilna kiselina > p-kumarinska kiselina > kafeinska kiselina > hlorogenska kiselina > ferulinska kiselina > vanilinska kiselina.

HPLC analiza flavonoidnih jedinjenja je pokazala da je njihovo prisutvo veoma različito u istosortnim uzorcima crvenih vina. U Cabernet Sauvignon vinima flavan-3-oli se nalaze od 49,20 do 143,75 mg/L (Cabernet Sauvignon vino iz vinarije Kraljevski Vinogradi, proizvedeno 2009 godine), u Vranac vinima od 42,88 do 101,13 mg/L (Vranec - Tga za jug iz vinarije Tikveš, proizvedenog 2009 godine), u ostalim jednosortnim vinima od 30,06 mg/L (Kratošija vino iz vinarije Tikveš) do 131,30 mg/L (Merlot vino iz vinarije Tikveš) i u višesortnim Župskim vinima od 44,79 do 73,13 mg/L u vinu Međaš iz Vno Župe.

U svim ispitivanim uzorcima vina najdominantniji flavan-3-ol je (+)-katehin i njegovo procentno prisustvo u Cabernet Sauvignon vinima se nalazi u intervalu od 30,96 do 54,01 i 55,30 % (Cabernet Sauvignon vina iz vinarija Pivka i Sekulović); u Vranac vinima od 30,34 do 51,59 % (Vranac vino iz vinarije Pivka); 22,09 % u vinu Merlot i 52,09 % u vinu Kratošija iz vinarije Tikveš, kao i 62,00 % u vinu Frankovka iz vinarije Vinoprodukt Čoka. Dok Župska višesortna vina su bogatija (+)-katehinom i nađeno je do 83,13 % u vino Medveđa krv iz vinarije Rubin.

Kod svih ispitivanih vina odnos sadržaja flavan-3-ola je sledeći: (+)-katehina > (-)-epikatehin > procijanidin B2 > (-) - epigallokatehingalat.

Druga značajna flavonoidna grupa prisutna u vinima su flavonoli, koji u uzorcima Cabernet Sauvignon vina nalaze se u intervalu od 11,80 do 35,15 mg/L (Cabernet Sauvignon vino iz vinarije Plantaža); u Vranac vinima od 10,00 do 54,34 i 55,05 mg/L (Vranac - Hercegovački iz vinarije Vukoje i Vranac - Pro Corde iz vinarije Plantaža); u ostalim jednosortnim vinima najveću koncentracija flavonola (53,94 mg/L) je detektovana je u Merlot vinu iz vinarije Tikveš, dok u višesortnim Župskim vinima u vinu Crno iz vinarije Rubin (16,31 mg/L).

U svim ispitivanim uzorcima vina najdominantniji flavonol je kvercetin u obliku kvercetin-3-glikozida. Njihovo procentno prisustvo u Cabernet Sauvignon vinima se

nalazi u intervalu od 20,79 do 51,58 i 57,58 % (Cabernet Sauvignon iz vinarije Plantaža i Cabernet Sauvignon - Terra Lazarica iz vinarije Rubin, 2009 godine); u Vranac vinima od 26,60 do 60 % (Vranac vina iz Srpskih I Makedonskih rejona); u ostalim jednosortnim vinama i višesortnim vinima njihovo procentno učešće je veoma različito (iznad 60 % u Merlotu iz Tikveša, Frankovki iz Vinoprodukt Čoka i Međašu i Crnom iz Rubina).

HPLC analiza je pokazala da ostala flavonoidna jedinjenja: flavoni i flavanoni nisu mnogo prisutni u ispitivanim uzorcima crvenih vina, ali daju svoj doprinos u ukupnim nađenim flavonoidima. Koncentracija ukupnih detektovanih flavonoida na 360 i 275/322 nm u Cabernet Sauvignon vinima se nalazi u intervalu od 60,88 do 163,63 i 166,63 mg/L (Cabernet Sauvignon vina iz Kraljevskih vinograda i Katarzyna vinograda); u Vranac vinima od 61,45 do 150,88 i 157,78 mg/L (Vranec - Tga za jug, 2009 iz Tikveša i Vranec - Vilarov, 2011 iz Stobija). U jednosortnim vinima ukupni flavonoidi su prisutni od 54,68 mg/L u vinu Frankovka do 112,92 mg/L u vinu Kratošija iz Rubina i do 200,26 mg/L u vinu Merlot iz vinarije Tikveš. U višesortnim Župskim vinima koncentracija flavonoida je manja do 85,12 i 86,25 mg/L u vinima Međaš i As.

Uzorci vina koji imaju iznad 100 mg/L flavonoida su: Cabernet Sauvignon iz Plantaže, Cabernet Sauvignon iz Radmilovca, Cabernet Sauvignon - Alexandrija iz Tikveša, Vranac - Hercegovački iz Vukoje, Vranac iz Čitluka, Vranac iz Vinoprodukt Čoka, Vranac (2009 godine) iz Rubina, Vranac (2009 godine) iz Vino Župe, Vranec - Tga za jug (2009 godine) iz Tikveša, Vranec (2009 godine iz Tikveša), Vranec - Vilarov iz Stobija, Kratošija iz Vino Župe, Merlot iz Radmilovca, a najbogatije vino je Merlot iz Tikveša (200,26 mg/L).

Veoma značajna flavonoidna grupa koja utiče na boju, senzorna i biohemijska svojstva crvenih vina su antocijani. Njihovo prisustvo u Cabernet Sauvignon vinima dostiže maksimalnu vrednost do 1480,56 mg/L (Cabernet Sauvignon, 2009 godine iz Kraljevskih vinograda); u Vranac vinima do 972,58 i 1501,79 mg/L (Vranac - Pro corde iz Plantaže i Vranec - Vilarov iz Stobija); u vinu Merlot iz Tikveša do 607,42 mg/L, dok višesortna Župska vina imaju manju koncentraciju do 315,73 mg/L (vino Medveđa krv iz Rubina).

U svim ispitivanim uzorcima vina najdominantniji antocijan je malvidin-3-glikozid i njegovi acetil- i p-kumaroil derivati, tako da ukupni procenat malvidin derivata u Cabernet Sauvignon vinima dostiže maksimalnu vrednost do 86,47 % (Cabernet Sauvignon, 2009 godine iz Rubina); u Vranac vinima do 100,00 % (Vranac iz VINO Župe), u Kratošija vino iz Rubina do 83,44 %, u Merlot, Pinot Noir i Frankovka vinama iznad 50%.

U svim ispitivanim vinima prisustvo tipa antocijana ima sledeći odnos: Glikozidi > Acetilglikozidi > p-Kumaroilglikozidi > Mv-3-vinilfenolglikozid > Vitisin A.

Ispitivani uzorci crvenih vina pokazuju antioksidaciono delovanje na DPPH radikale u širokom opsegu EC₅₀ vrednosti od 47,17 i 49,24 mL/g (Cabernet Sauvignon vina iz vinarija Čardak i Kraljevski vinogradi), preko 47,85 i 50,56 mL/g (Merlot i Vranac vina iz vinarije Tikveš) do 145,83 mL/g (Vranac iz vinarije VINO Župe). Ili izraženo u procentima antioksidaciona aktivnost istih vina se nalazi u intervalu od 91,83 do 69,55%.

Korelacionom analizom je utvrđeno da postoji dobra korelacija (konstanta korelacije do 0,6060) između spektroskopskih nađenih koncentracija ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola i nađene antioksidacione aktivnost ispitivanih vina, izražene u EC₅₀ vrednostima. Utvrđena je odlična korelacija (konstante korelacije do 0,8595) između HPLC detektovanih koncentracija ukupnih fenolnih kiselina, ukupnih flavan-3-ola, ukupnih flavonola, ukupnih antocijana i nađene antioksidacione aktivnost uzoraka. Najmanji korelacioni indeks su dali antocijani, što ukazuje da njihovo prisustvo u crvenim vinima zavisi od mnogo različitih faktora, pored sorte grožđa i od načina proizvodnje, od vremena i načina čuvanja tj. starenja vina.

Prethodno date HPLC analize različitih uzoraka crvenih vina su pokazale da je u svakoj biološki značajnoj grupi fenolnih jedinjenja dominantna određena komponenta. Korelaciona analiza je pokazala da postoji veoma dobra korelacija sa nađenim koncentracijama najdominantnijih fenolnih komponenata: galne kiseline (0,6917), (+)-katehina (0,6912), kvercetin-3-glikozida (0,7719) i trans-resveratrola (0,7404).

Primenom DPPH slobodoradikalske reakcije, zbog lakšeg utvrđivanja antioksidacionog kapaciteta ispitivanih crvenih vina, je određena antioksidaciona aktivnost i nekih posebnih biološko značajnih jedinjenja, kao što su: galna kiselina, askorbinska kiselina, kvercetin, rutin, troloks i BHA. Analiza je pokazala da kvercetin ima najače izraženo antioksidaciono delovanje (EC_{50} iznosi 24,12 mg/g).

Ispitivanje antioksidacione aktivnosti crvenih vina, je izvršeno i novom novom redoks reakcijom, odnosno primenom bakar (II)-1,10-fenatrolina kao oksidanta. Dobijeni rezultati izraženi preko ekvivalenta potrošnje galne kiseline, kvercetina i rutina (mg/L) za iste uzorke vina su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim DPPH metodom, što je potvrđeno korelacionom analizom. Dobijeni korelacioni indeksi se nalaze u intervalu od 0,9775 do 0,9776.

Antimikrobna aktivnost izabranih uzoraka crvenih vina je ispitivana primenom disk-difuzione i mikro-dilucione metode prema šest gram-pozitivnih bakterija: *Clostridium perfringens* ATCC 19404, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Sarcina lutea* ATCC 9341 and *Micrococcus flavus* ATCC 40240 i šest gram-negativnih: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Klebsiella pneumonia* ATCC 10031 i *Proteus vulgaris* ATCC 8427), kao i prema kvascu – *Candida albicans*.

Dobijeni rezultati za minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) i minimalnu bakterijsku koncentraciju (MBC) ukazuju da svako vino u zavisnosti od sorte grožđa, sastava, podneblja berbe grožđa i proizvođača pokazuje različito antimikrobno delovanje prema istoj bakterijskoj vrsti. Redosled MIC/BMC delovanja gram-pozitivnih- i gram-negativnih bakterijskih sojeva na osnovu sorti grožđa od kojih je sastavljeno vino je sledeći: Cabernet Sauvignon > Vranac > Merlot > Pinot Noir ~ Frankovka ~ Mešana vina iz Župskog regiona.

Antimikrobna aktivnost Vranac vina prema kvascu *Candida albicans* je zadovoljavajuća, jer interval MIC/BMC delovanja iznosi od 125/125 do 250/250 μ L/mL.

Ispitivana crvena vina pokazuju antimikrobnu aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama na sledeći način: *Clostridium perfringens* > *Bacillus subtilis* ~ *Listeria monocytogenes* ~ *Sarcina lutea* > *Staphylococcus aureus* ~ *Micrococcus flavus*.

Antimikrobna aktivnost prema testiranim gram-negativnim bakterijama je sledeća: *Proteus vulgaris* > *Pseudomonas aeruginosa* ~ *Salmonella enteritidis* > *Klebsiella pneumonia* > *Shigella sonnei*.

Ispitivanje MIC/BMC delovanja galna kiseline, trans-kumarne kiseline, kvercetina i (+)-katehina (u koncentraciji od 10,0 do 0,002 µg/mL) je pokazalo da njihovo antimikrobno delovanje ima sledeći odnos: kvercetin > (+)-katehin > trans-kumarna kiselina > galna kiselina.

trans-Kumarna kiselina je pokazala izraženo antimikrobno delovanje prema *Candida albicans* kvascu (0,63/0,63 µg/mL).

Analiza pokazuje da ispitivana vina (50 µL/disc) imaju inhibicionu zonu delovanja do 20,0 mm prema nekim bakterijskim sojevima, što je uporedljivo sa inhibicionom zonom delovanja standardnih antibiotika (16,0 – 35,0 mm) i nekih fenolnih jedinjenja, kao što su: galna kiselina, kvercetin i (+)-katehin (14,5 – 21,8 mm).

Antimikrobno delovanje različitih crvenih vina, izraženo zonom inhibicije, ima sledeći odnos: Cabernet Sauvignon vina > Pinot Noir ~ Župska vina ~ Frankovka ~ Vranac vina. Ovo dovodi do zaključka da Cabernet Sauvignon vina imaju jače antimikrobno delovanje u poređenju sa ostalim ispitivanim vinima. Od kojih najače delovanje pokazuje Cabernet Sauvignon - Terra Lazarica vino i to prema gram-pozitivnim bakterijama: *Bacillus subtilis* (19,0 mm) i *Bacillus subtilis* (18,6 mm) i prema gram-negativnim bakterijama: *Escherichia coli* (20,0 mm) i *Shigella sp* (18,0 mm), što je u saglasnosti sa njegovom najvećom koncentracijom ukupnih flavonoida (163,63 mg/L), ukupnih fenolnih kiselina (143,19 mg/L) i ukupnih antocijana (1480,56 mg/L), detektovanih HPLC metodom.

Korelacionom analizom je potvrđeno da postoji dobra korelacija između antimikrobnog delovanja prema *Escherichia coli* i nađenih koncentracija za (+)-katehin (0,6625) i ukupnih fenolnih kiselina (0,7333), kao i između *Staphylococcus aureus* i nađenih koncentracija za (+)-katehin (0,7433) i ukupnih fenolnih kiselina (0,5121).

Redosled antimikrobnog delovanja fenolnih komponenata izraženih zonom inhibicije prema gram-pozitivnim bakterijama je: galna kiselina (19,0– 21,8 mm) > (+)-katehin (15,8 -20,0 mm) ~ kvercetin (18,5 –20,0 mm) i prema gram-negativnim bakterijama je: (+)-katehin (16,5 -20,5 mm) > galna kiselina (15,5 – 19,0 mm) > kvercetin (14,5 – 18,6 mm).

Urađena analiza antioksidacione i antimikrobne aktivnosti ispitivanih vina je pokazala da se najbolje korelacije uspostavljaju sa ukupnom koncentracijom detektovanih flavonoida, pa se može zaključiti da je biohemijsko delovanje crvenih vina, posledica sinergističkog delovanja većeg broja biološkoaktivnih komponenata. Dobijeni rezultati bi daju mogućnost za proizvodnju kvalitetnih crvenih vina sa povećanim fenolnim sadržajem, koji uz bi uz bolji marketing bili konkurentni na svetskom tržištu.

6 LITERATURA

Alcalde-Eon C., Escribano-Bailon, M.T., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563, 238-254.

Anli R.E., Vural N. (2009) Antioxidant phenolic substances of Turkish red wines from different wine regions. *Molecules* 14, 289–297

Apak R., Cuclu K., Ozyrek M., Karademir S.E. (2004) Curc ion reducing antioxidant capacity for food antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

Arnous A., Markis D.P., Kefals P. (2002) Correlation of pigment of flavonol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece, *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655-665.

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

Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Truck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.

Baxter R.A. (2008). Anti-aging properties of resveratrol: Review and report of a potent new antioxidant skin care formulation, *Journal Cosmetics*, 7, 2-7.

Beecher G.R. (2003). Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake, *Journal of Nutrition*, 133/10, 3248S-3254S.

Bertelli A.A.E. (2007). Wine, research and cardiovascular disease: Instructions for use. *Atherosclerosis*, 195 (2), 242-247.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11), 317-333.

- Bergqvist J., Dokoozlian N., Ebisuda N. (2001) Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 1-7.
- Braicu C., Pilecki V., Balacescu O., Irimie A., Neagoe J.B. (2011). The relations between biological activities and structure of flavan-3-ols. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 9342–9353
- Burns J., Jokota T., Ashihara H., Lea E.J.M., Crozier A. (2002). Plant food and herbal sources of resveratrol, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3337-3340.
- Camont L, Cottart C., Rhaeym Y, Nivetantoine V., Djelidi R., Collin F., beaudeux J., Bonnefontrousselot D. (2009). Simple spectrophotometric assessment of the trans/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions, *Analytica Chimica Acta*, 634/1, 121-128.
- Carluccio M.A., Siculella L., Ancora M.A., Massaro M., Scoditti E., Storelli C., Visioli F., Distante A., De Caterina R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23, 622-629.
- Carneiro A, Couto J.A., Mena, C., Queiroz J., Hogg T. (2008). Activity of wine against *Campylobacter jejuni*, *Food Control*, 19, 800-805.
- Cliff M.A., King M.C., Schlosser J. (2007) Anthocyanin, phenolic composition and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*, 40, 92–100
- Connor A.M., Finn C.E., Alspach P.A (2005). Genotypic and environmental variation in antioxidant activity and total phenolic content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(4), 527–533.
- Cowan M. (1999). Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.

De Galulejac N.S., Glories Y., Vivas N. (1999). Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines, *Food Research International*, 35 (5), 327-333.

Crippen D.D., Morrison J.C. (1986). The effects of sun exposure on the compositional development of Cabernet Sauvignon berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 235-247.

Cushnie Y.P.T., Lamb A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.

Cushnie Y.P.T., Lamb A.J. (2011). Recent advances in understanding of the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99–107.

Curhan G.C., Willett W.C., Speizer F.E., Stampfer M.J. (1998). Beverage use and risk for kidney stones in women, *American International Medicinal*, 128, 534-540.

Daglia M., Papeti A., Grisoli P., Aceti C., Dacarro C., Gazzani G. (2007) Antibacterial activity of red and white wine against oral Streptococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5038-5042.

Davis W, Lamson M.S., Mattheus S., Brignall N.D. (2005). Antioxidants and cancer III:n Quercetin, *Altern Med Rev*, 5/3, 196-208.

De Beer D., Joubert E., Gelderblom W.C.A., Manley, M. (2003) Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 902-909.

De Beer D., Joubert E., Gelderblom W.C.A., Manley M. (2005) Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines and selected phenolic compounds: In vitro inhibition of microsomal lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 569-577.

Deloire A., Lopey F, Carbonneau A. (2002). Reponses de la vigne et terroir: Elements pour une method d'etude. *Le progress Agricole et Viticulture*, 119/4, 78-86.

Docherty J.J., Fu M.M., Tsai M. (2001). Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 239-246.

Doll R. (1990). AN overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer, *Proceeding of Nutrition and Society*, 49, 119-131.

Downey M.O., Harvey J.S., Robinson J.S. (2003a). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 15-27.

Downey M.O., Harvey J.S., Robinson J.S. (2003b) Synthesis of flavonoids and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Charodnnay (*Vitis Vinifera L.*), *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 110-121.

Edeas M., Lindenbaum A. (2001). Protective effects of various flavonoids compounds on HIV infection, *XXV Congress Mondial de la Vigne et du vine Wine and Health*, 57-61.

Espinoza M., Olea-Azar C., Speisky H., Rodrigez J. (2009). Determination of reaction between free radical and selected Chilean wines and transition metals by RSR and UV-Vis technique. *Spectrochimica Acta Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71/5, 1638-1643.

Falquera V., Forns M., Ibray A. (2012). Effect of Ub-vis irradiation of must on Cabernet Franc and X arello wines chemical quality, *International Journal of Food Science & Technology*, 47/9, 2015-2012.

Fang F., Li J-M., Pan Q-H., Huang W-D. (2007). Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging, *Food Chemistry*, 101/1, 428-433.

Fernandez-Pachon M.S., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. (2007). Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chemistry*, 95, 394-404.

Fikselova M., Kačaninova M., Mellen M. (2010). Antioxidant and antimicrobial effects of Slovak Tokaj wines, *Acta Alimentaria*, 39, 256 – 264.

Frankel E.N., Waterhouse A.L., Teissedre P.L: (1995). 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.

German J.B., Walzem R.L. (2000) *The health benefits of wine. Annual Review of Nutrition*, 20, 561–593

Gey, K.F. (1990). *The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms, Biochemical Society Transactions*, 18, 1041-1045

Gil-Munoy R., Vila-Lopey R., Martiney_Cutillas A. (2010), *Anthocyanin profile in Monastrell grapes in six different areas from Denomination of Origen Jumilla during ripening stage, International Journal of Food Science & Technology*, 45/9, 1870-1877.

Ginjon I., D'Arcy B., Caffin N., Gidley M. (2011) *Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. Food Chemistry*, 125, 823–834.

Gómez-Serranillos M.P., Martín S., Ortega T., Palomin O.M., Prodanov M., Vacas V., Hernández T., Estrella I., Carretero A.(2009) *Study of Red Wine Neuroprotection on Astrocytes. Plant Foods Human Nutrition*, 64, 238–243.

Gorelik S., Ligumsky M., Kohen R., Kanner J. (2008). *The stomach as a „bioreactor“: when red meat meets red wine. Journal Agriculture of Food Chemistry*, 56, 5002-5007.

Grotewold E. (2006). *The Science of Flavonoids*, Springer Science, USA.

Gry, J., Black, L., Eriksen, F.D., Pilegaard, K., Plumb, J., Rhodes, M. (2007). *A combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods. Trends in Food Science and Technology*, 18(8), 434–444.

Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W. (1998). *High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants, Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 1887-1892.

- Hakkinen S.D., Karenlampi S.O., Heinonen I.M. (1998). HPLC Method for Screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *Journal of Science and Food Agriculture*, 77, 543-551.
- Harborne J.B., Williams, C.A. (2001). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Report*, 18, 310-333.
- Harris V., Jiranek V, Ford C.M., Grbin P.R. (2010) Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 721-729.
- Havsteen B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutic*, 96,67-202.
- Heinonen I.M., Meyer A.S., Frankel E.N. (1998) Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4107–4112.
- Hertog M.G.L., Kromhout D., Aravanis C., Blackburn H (1995). Flavonoid intake and longterm risk coronary health disease and cancer in the seven countries study, *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386.
- Hou D.X. (2003). Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins, *Current Molecular Medicine*, 3 (2), 149-159.
- Just J.R., Daeschel M.A. (2003). Antimicrobial effects of wine on *E.coli* 0157:H7 and *Salmonella typhimurium* in a model stomach system. *Journal of Food Science*, 68/1, 285-290.
- Ikigai H., Nakae T., Hara Y., Shimamura T. (1993) Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1147, 132-136.
- Jackson S.J. *Wine science principles and applications*, Third edition, Academic press, 2008.
- Jackson D.I., Lombard P.B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 409-430.

Jeffery D.W., Parker M., Smith P.A. (2008). *Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14, 153-161.

Jenadet P., Bessis R., Gautheron B. (1991). *Production of resveratrol by grape berries in different development stages. American Journal of Enology and Viticulture*, 42/1, 41-46.

Jones G.V., White M.A., Cooper O.R., Storchmann K.H. (2005). *Climate change and global wine quality. Climatic Change*, 73, 319-343.

Jones G. (2006). *Climate change and wine: observations, impacts and future implications. Wine Industry Journal*, 21, 21-26.

Just J.R., Daeschel M.A. (2003) *Antimicrobial effects of wine on Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium in a model stomach system, Journal of Food Science*, 68, 285-90

Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P. (2006) *Principal phenolic compounds in Greek red wines. Food Chemistry*, 99, 784-793.

Katalinić V.M., Milos D., Modun I., Musić M., Boban M. (2004). *Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)catechin, Food Chemistry*, 86, 593-600

Klepacka J., Gujska E., Michalak J. (2011) *Phenolic Compounds as Cultivar- and Variety-distinguishing Factors in Some Plant Products. Plant Foods Human Nutrition*, 66(4), 307–312.

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

Lachman J., Sulc M., Schilla M. (2007) *Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine-making process. Food Chemistry*, 103, 802–807

Landroult N., Poucheret P., Ravel P., Gasc F., Cros G. (2001). *Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages, Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 311-318.

Lapidot T., Harel S., Akiri B., Granit R., Kanner J. (1999) pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 67-70.

Lila, M.A. (2004). Anthocyanins and humans health: In vitro investigative approach, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306-313.

Liu Q.S., Pilone J.G. (2000). Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4311-4314.

Luiz M. (2011) Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines, *Food Chemistry*, 126, 213–220.

Macheix J.J., Fleuriet A. (1998). Phenolic acids in fruits. In *Flavonoids in health and disease*. Rice-Evans, C.A., Packer, L., Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, 35-59.

Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. *Fruit Phenolics*, CRS: Boca Raton, Fl. 1990.

Marinova E.M., Yanishieva N.Y. (1992). Inhibited oxidation of lipids. II. Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids, *Fat Science Technology*, 94, 428-432.

Mark L., Nikfardjam M.S., Avar P., Ohmacht R. (2005). A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in Hungarian wines. *Journal of Chromatographic Science*, 43/9, 445-449.

Mazza G., Miniati E. (1993). *Anthocyanins in Fruits, vegetables and Grains*, CRC Press, Boca Raton, FL.

Mazza G., Fukumoto, P., Delaquis, B., Girard, & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4009-4017.

McDonald M.S., Hunhes M., Burns J., Lean M., Matthews D., Crozier A. (1998). Survey of the free and conjugated myricetin, and quercetin content of red wines of different geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 368–375.

- Meyer A.S., Yi O.S., Pearson D.A., Waterhouse A.L., Frankel E.N. (1997). Inhibition of human low-density lipoproteins oxidation in relation to composition of phenolic antioxidant in grapes (*Vitis vinifera*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1638-1643.
- Meiers S., Kmeny D., Weyand U., Gastpar R., Von Anger E., Marko D. (2001). The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 958-962.
- Mimić-Oka J., Simić D., Simić T. (1999). Free radicals in cardiovascular diseases. *Facta Universitatis, Medicine and Biology*, 6/1, 11-22.
- Mori A., Nishino C., Enoki N., Tawata S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26, 2231-2234.
- Moretro T., Daeschel M.A. (2004). Wine is bactericidal to foodborne pathogens, *Journal of Food Science*, 69/9, 251-257.
- Minussi R.C., Rossi M., Bologna J., Cordi J., Rotilio D., Pastore M., Duran N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chemistry*, 82, 409-416.
- Munoz-Espada A.C., Wood K.V., Bordelon B., Watkins B.A. (2004). Anthocyanin Quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton and Marechal Foch grapes and wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6779-6786.
- Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen M.A., Pfaller R.H., Tenover F.C., Tenover F.C. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*, 1 (8th ed), ASM, Press., Washington.
- Olas B., Wachowicz B. (2002) Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets, *Thrombosis Research*, 106, 143-148.
- Papadopoulou C., Soulti K, Roussis I.G. (2005). Potential antimicrobial activity of red and white wines phenolic extracts against strains of *S. aureus*, *E. Coli* and *C. Albicans*. *Food Technology and Biotechnology* 43, 41-46.

Palma M., Taylor L.T. (1999). Fractional extraction of compounds from grape seeds by super-critical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5044-5048.

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

Paulo L., Oleastro M., Gallardo E., Queiroz J.A., Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine. *Food Research International*, 44, 964-969.

Pereira D.M., Valentao P., Pereira J.A., Andrade P.B. (2009) Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14, 2202-2211.

Piljac J., Martiney S., Valek L., Stipčević T., Kovačević Ganić K. (2005). A comparison of methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of Croatian wines, *Food Technology and Biotechnology*, 43 (3), 271-276.

Pour Nikfardjam M.S., Mark L., Avar P., Figler M., Ohmacht R. (2006). Polyphenols, anthocyanins and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villany region. *Food Chemistry*, 98, 453-462.

Radovanović A., Radovanović B., Jovančičević B. (2008). Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines, *Food Chemistry* 117, 326–333.

Radovanović BC, Radovanović AN, Souquet JM (2010a). Phenolic profile and free radical-scavenging activity of Cabernet Sauvignon wines of different geographical origins from the Balkan region. *Journal of Science and Food Agriculture*, 90, 2455-2461

Radovanović B., Radovanović A. (2010b). Free Radical Scavenging Activity and Anthocyanin Profile of Cabernet Sauvignon Wines from the Balkan Region. *Molecules*, 15, 4213-4226.

Radovanovic B, Radovanovic A., Tomic V. (2012a). Relations between the phenolic composition and free radical scavenging and antibacterial activities of red wines from

different cultivars of Vitis Vinifera L., International Journal of Food Properties, 15/ 4, 725-735.

Radovanović A., Jovančičević B., Radovanović B., Mihajilov-Krstev T., Zvezdanović J. (2012b) Antioxidant and antimicrobial potentials of Serbian red wines produced from international Vitis vinifera grape varieties, Journal of the Science of Food and Agriculture, 92/10, 2154–2161.

Rauha J-P., Remes S., Heinonnen M., Hopia A., Kahkonen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorela P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds, International Journal of Food Microbiology, 56, 3-12.

Revilla E., Alonso E., Kovač V. (1997). The content of catechins and procyanidins in grapes and wines as affected by agroecological factors and technological practices, American Chemical Society, 69-80.

Revilla E., Alonso E., Kovač V., Namanić J. (1998). The effect of the addition of supplementary seeds and skins during fermentation on the chemical and sensory characteristics of red wines, Analysis and Packaging Influences, 583-596.

Renaud S., de Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, plateles and the French paradox for conorary heart disease, Lancet, 339, 1523-1526.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu, D., Dončche, B., Lonvaud A. (1988). Red winemaking. In Handbook of Enology; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, United Kindom, Vol. 1, 295-358.

Riberau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., lonvaud A.(1999). Handbook of Enolgy, Vol.1, John Wiley & sons LTD, New York

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P. M., Pridham J. B. (1995). The relative antioxidant activites of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Research, 22, 375-383.

Rodríguez Vaquero M.J., Alberto M.R., Manca de Nadra M.C. (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. Food Control, 18, 93-101.

- Rodrigo R., Miranda A., Vergara L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease, *Clinica Chimica Acta*, 412, 410-424.
- Roussis I.G., Lambropoulos I., Soulti K. (2005). Scavenging capacities of some wines and wine phenolic extracts, *Food Technology and Biotechnology*, 43, 351-358.
- Russell A.D. (2002). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 92, 121-135.
- Sanchez-Moreno J., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. (1999). Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines, *Journal of Science and Food Agriculture*, 79, 1301-1304.
- Sato M., Ramarathnam N., Suzuki Y., Ohkubo T., Takeuchi M., Ochi H. (1996). Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 37-41.
- Shahidi F., Wanasundara P. K. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Shahidi F, Naczki M. (1995). *Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*, Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster.
- Seruga M., Novak I., Jakobek L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods, *Food Chemistry*, 124, 1208-1216.
- Simonetti P., Pietta P., Testolin G. (1997). Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *Journal of Science and Food Agriculture*, 45, 1152-1255.
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Calorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphtungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

- Soleas G.J., Grass L., Josephy P.D., Goldberg D.M., Diamandis E.P. (2002) A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35, 119-124.
- Stratil P., Kuban V., Fojtova J. (2008). Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods, *Czech Journal of Food Sciences*, 26/4, 242-253.
- Sun B, Spranger I., Roque-do Vale F., Leandro C., Belchior P (2001). Effect of different winemarking technologies on phenolic composition in Tinta Miuda red wines. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5809-5816.
- Sugita-Konishi Y., Hara-Kudo Y., Iwamoto T., Kondo K (2001). Wine has activity against entero-pathogenic bacteria *in vitro* but not *in vivo*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65, 954-957.
- Tarko T., Duda-Chodan A., Sraka P., Satora P., Jurasz E. (2008). Physicochemical and antioxidant properties of selected polish grape and fruit wines, *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*, 7(3), 34-45.
- Tenore G.C., Basile A., Novellino E. (2011). Antioxidant and antimicrobial properties of polyphenolic fractions from selected Moroccan red wines. *Journal of Food Science*, 11/76, 342-348.
- Tesaki S., Tanabe S., Moriyama M., Fukushi E., Kawabata J., Watanabe M. (1999). Isolation and identification of an antibacterial compound from grapes and its application to foods. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 73, 19-22.
- Thimothe J., Bonsi I.A., Padilla-Zakour O.I., Koo H. (2007) Chemical Characterization of Red Wine Grape (*Vitis vinifera* and *Vitis Interspecific Hybrids*) and Pomace Phenolic Extracts and Their Biological Activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10200-10207
- Tian R-R., Pan Q-H., Yhen J-Ch., Li J-M., Wan S-B., Yhang Q-H., Huang W-D- (2009), Comparison of phenyl acids and flavan-3-ols during wine fermentation of grapes with different harvest times, *Molecules*, 14, 827-838.

Timbola A.K., de Souza C.D., Giacomelli C., Spinelli A. (2006). *Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17/1, 139-148

Timberlake C.F., Bridle P. (1976). *The effect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines*, *Vitis*, 15, 37-49.

Van Asker, S.A.B.E., van den Berg, D. J. Tromp, M. N. J. L., Griffione, D. H., van Bennekom, W. P., van der Vijgh, W. J. F., Bast A. (1996). *Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids*, *Free Radical Biology and Medicine* 20 (3), 331-342

Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. (2006). *Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines*, *Food Chemistry*, 95, 394-404.

Vivas N., Glories Y. (1996). *Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging*, *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 103-107.

Wang H., Cao G., Prior R. L. (1997). *Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3495-3500.

Weisse M.E., Eberly B., Person D.A. (1995). *Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine*, *British Medical Journal*, 311, 1657-1660.

Whitehead T.P., Robinson D., Allaway S., Syms J. Hale A. (1995). *Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum*, *Clinical Chemistry*, 41, 32-35.

Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F (2001). *Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidant potential*, *Annals of Science*, 17, 599-604.

Yoshihito Sakata Y., Zhuang H., Kwansa H., Koehler R.C., Doré S. (2010). *Resveratrol protects against experimental stroke: Putative neuroprotective role of heme oxygenase*. *Experimental Neurology*, 224/11, 325-329.

Youdim K., McDonald J., Kalt W., Joseph J. (2002). *Potential role of dietary flavanoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and anti-inflammatory insults*, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (5), 282-288.

Urqiaga I., Leighton F. (2000) Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. Biological Research, 33/2, 55–64.

BIOGRAFIJA

Mr Aleksandra Radovanović je rođena 9.11.1978. godine u Skoplju (Makedonija). 2005. godine je diplomirala na Univerzitetu „Ćiril i Metodij“ u Skoplju, Prirodno-matematičkom fakultetu, Institutu za hemiju i stekla zvanje diplomirani profesor hemije. 20.07.2011. godine, nakon položenih ispita je odbranila magistersku tezu pod nazivom: „Uticaj sadržaja fenolnih jedinjenja na antioksidativnu aktivnost crvenih vina Srbije“, na Univerzitetu u Beogradu, Hemijskom fakultetu, pod mentorstvom prof. dr Branimira Jovančičevića i stekla zvanje magistra hemijskih nauka.

Od decembra 2005. godine do oktobra 2006. godine radila je kao profesor hemije u gimnaziji „Svetozar Marković“ u Nišu. A od oktobra 2006. godine do jula 2008. godine radila je kao profesor hemije i ekologije u Internacionalnoj srednjoj školi „Nova“ u Skoplju. Početkom 2008. god. je stekla ovlašćenje College board-a iz SAD-a za predavača Advanced Placement Chemistry programa.

Od septembra 2008. do septembra 2009. godine radila je kao istraživač-pripravnik, a od oktobra 2011. do oktobra 2012. godine kao istraživač-saradnik na internacionalnom FP7- Regpot projektu «Chromlab-Antioxidant», No. 204756, na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu. U okviru ovog projekta od oktobra do 17 decembra 2009. godine bila je na studijskom boravku u laboratorijama CSIC - CEBAS Instituta u Mursiji (Španija), gde se obučavala za rad na HPLC instrumentima.

U okviru razmene studenata DAAD projekta „International Masters and Postgraduate Programme in Materials Science and Catalysis“, u organizaciji Univerziteta u Lapcigu (Nemačka), od 6 novembra do 30 decembra 2011 godine je bila na studijskom boravku na Prirodno-matematičkom fakultetu, Departmantu za hemiju u Skoplju, gde se obučavala za rad na cikličnom voltametri.

Trenutno radi kao profesor hemije u srednjim školama „Marija Kiri Skolodovska“ i „Vlado Tasevski“ u Skoplju (Makedonija).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а : мр Александра Ненад Радовановић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

: „Карактеризација и корелација биоактивних фенолних једињења црвених вина Балкана и њихова антиоксидациона и антимикуробна својства“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 08.02.2014.

А. Радовановић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: мр Александра Ненад Радовановић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада: „Карактеризација и корелација биоактивних фенолних једињења црвених вина Балкана и њихова антиоксидациона и антимикробна својства“

Ментор: проф др Бранимир Јованчичевић

Потписани : Александра Радовановић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 08.02.2014.

A Radovanovic

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Карактеризација и корелација биоактивних фенолних једињења црвених вина Балкана и њихова антиоксидациона и антимикуробна својства“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 08.02.2014.

Илија Јовановић

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6.