

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Lisov M. Nikolina

**DINAMIKA SADRŽAJA BIOLOŠKI AKTIVNIH FENOLNIH
JEDINJENJA GROŽĐA SORTE CABERNET SAUVIGNON
TOKOM FENOFAZA SAZREVANJA, PRIMARNE
PRERADE, VINIFIKACIJE I UTICAJ NA
ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET VINA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Lisov M. Nikolina

**DYNAMICS OF BIOLOGICALLY ACTIVE PHENOLIC
COMPOUNDS OF CABERNET SAUVIGNON GRAPE
VARIETY DURING PHENOPHASES OF MATURATION,
PRIMARY PROCESSING, VINIFICATION AND
INFLUENCE ON WINE ANTIOXIDANT CAPACITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

Mentor

dr Aleksandar Petrović, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije

dr Saša Matijašević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Gorica Vuković, viši naučni saradnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

dr Ljiljana Gojković-Bukarica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Uroš Čakar, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru projekta tehnološkog razvoja “Razvoj tehnologije proizvodnje crvenog vina i dijetetskih proizvoda iz vina bogatih biološki aktivnim polifenolima sa kardioprotektivnim dejstvima” (evidencioni broj projekta TR 31020), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Posebno se zahvaljujem poštovanom mentoru i profesoru, dr Aleksandru Petroviću na velikoj pomoći pri izvođenju kako eksperimentalnog tako i teorijskog dela doktorske disertacije, nesebičnoj podršci i korisnim savetima kad god je to bilo potrebno.

Veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, korisnim savetima i stečenom znanju dugujem dr Veletu Teševiću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i celoj njegovoj istraživačkoj grupi, koji su mi omogućili izradu eksperimentalnog dela doktorske disertacije u laboratorijama Hemijskog fakulteta.

Zahvaljujem se dr Gorici Vuković, višem naučnom saradniku na angažovanju i velikoj pomoći pri obavljanju važnog dela ove doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem i dr Ljiljani Gojković Bukarica, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na saradnji, savetima i podršci u istraživačkom radu.

Dr Urošu Čakaru, naučnom saradniku Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, hvala na zalaganju i nesebičnim sugestijama kako bi ovo istraživanje bilo što jasnije prikazano.

Dr Saši Matijaševiću, vanrednom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem na saradnji, podršci i savetima.

Veliko hvala i kolegama iz Laboratorije za konzervisanje i vrenje Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu na podršci i savetima.

Hvala prijateljima za dobro raspoloženje i neprestano bodrenje, kao i Stefanu za razumevanje, ljubav i podršku na ovom putovanju ka ostvarenju još jednog cilja.

Ovim izazovnim putem bilo je lako koračati uz ljubav, oslonac i podršku mojih roditelja, brata i sestre. Beskrajno hvala!

Nikolina Lisov

DINAMIKA SADRŽAJA BIOLOŠKI AKTIVNIH FENOLNIH JEDINJENJA GROŽĐA SORTE CABERNET SAUVIGNON TOKOM FENOFAZA SAZREVANJA, PRIMARNE PRERADE, VINIFIKACIJE I UTICAJ NA ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET VINA

SAŽETAK

Tokom izrade ove doktorske disertacije cilj je bio pratiti dinamiku sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja koja su prisutna u grožđu sorte Cabernet Sauvignon tokom različitih faza sazrevanja, primarne prerade, raznih vidova vinifikacije kao i ispitati antioksidativni kapacitet novodobijenih vina. Pored vina, značajan deo ove disertacija zauzima istraživanje vezano za kominu koja zaostaje kao nuz proizvod prilikom proizvodnje vina.

Ogledi mikrovinifikacije uz primenu različitih kombinacija kvasaca i enzimskih preparata, postavljeni su sa ciljem praćenja dinamike ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz čvrstih delova grožđa u vino (3, 5, 7, 14 i 21 dana, respektivno) kao i količine zaostalih fenolnih jedinjenja u komini nakon maceracije.

Analizom pripremljenih uzoraka vina identifikovana su sledeća jedinjenja: galna kiselina, protokatehuinska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, siringinska, vanilinska, kafeinska, elaginska, *p*-kumarinska kiselina, katehin, epikatehin i kvercetin. Za svako pojedinačno jedinjenje ispitana je dinamika ekstrakcije, za svaku navedenu varijantu oglada. Rezultati govore da je *p*-hidroksibenzoeva kiselina dostigla najraniji maksimum ekstrakcije i to već 3. dan za varijantu oglada BDX, dok je uz dodati enzimski preparat EXV maksimum dostignut 5. dan maceracije. Među ostalim jedinjenjima najkasniji maksimum i to 21. dan su dostigli katehin, epikatehin, kvercetin, galna i elaginska kiselina za različite kombinacije primene kvasaca i enzimskih preparata. Od svih jedinjenja nađenih u vinu, katehin je imao najviši maksimum ekstrakcije u količini od 36,3108 mg/l u varijanti oglada BDX.

U ovom radu detaljno je analizirana dinamika pojedinih jedinjenja zaostalih u komini, a to su rutin, *trans*-resveratrol, katehin, epikatehin, vanilin i *p*-kumarinska kiselina. Katehin i epikatehin su bila najdominantnija jedinjenja nađena u komini grožđa i to onoj koja je macerirala kraći vremenski period pa je zaključeno da je vreme maceracije značajno uticalo na sadržaj pojedinih jedinjenja u komini. Zaključeno je da ova jedinjenja podležu reakcijama desorpcije sve do 14. dana maceracije, nakon čega dolazi do uspostavljanja ravnoteže ili blage desorpcije ili adsorpcije na ćelije kvasca ili komine. Pored navedenih fenolnih jedinjenja, ostala jedinjenja identifikovana u komini su bila siringinska, galna, kafeinska, ferulinska, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, elaginska, vanilinska kiselina kao i kvercetin, naringenin i kemferol.

Izmerena je i antiradikalska i antioksidativna aktivnost uzoraka vina za sve varijante oglada, gde je nađeno da vreme maceracije značajno utiče na anti-DPPH radikalsku aktivnost vina, ali i to da zasejavanje kljuka različitim kvascima značajno menja antioksidativnost merenu FRAP metodom, u odnosu na antioksidativnost vina spontane fermentacije. Dodatak pojedinih enzimskih preparata tokom maceracije je značajno uticao na antioksidativnu aktivnost vina merenu TEAC testom i FRAP metodom.

Pored oglada dinamike, utvrđen je uticaj rastućeg pritiska ceđenja prevrele komine na povećanje količine pojedinačnih fenolnih jedinjenja u vinu kao i njihovog sadržaja koji je zaostao u komini i komini ceđenoj primenom različitih pritisaka, primenom različitih tehnika vinifikacije kao i tretmana stabilizacije vina.

Na osnovu praćenja dinamike fermentacije uz uključivanje i drugih parametara u tehnološki proces proizvodnje, dobijeni su optimalni uslovi proizvodnje vina sa što većim sadržajem biološki aktivnih komponenata značajnih za zdravlje ljudi.

Ključne reči: crveno vino, dinamika ekstrakcije, maceracija, fenolna jedinjenja, komina, antioksidativni kapacitet

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Nauka o konzervisanju i vrenju

UDK: 634.85:663.251(043.3)

DYNAMICS OF BIOLOGICALLY ACTIVE PHENOLIC COMPOUNDS OF CABERNET SAUVIGNON GRAPE VARIETY DURING PHENOPHASES OF MATURATION, PRIMARY PROCESSING, VINIFICATION AND INFLUENCE ON WINE ANTIOXIDANT CAPACITY

ABSTRACT

During the conducting of this doctoral dissertation, the aim was to monitor the dynamics of the content of certain phenolic compounds present in Cabernet Sauvignon grapes during different stages of maturation, primary processing, various types of vinification and to examine the antioxidant capacity of newly produced wines. In addition to wine, a significant part of this dissertation is occupied by research related to the pomace which is present a by-product of wine production.

Experiments of microvinification with the use of different combinations of yeasts and enzyme preparations were set to monitor the dynamics of extraction of phenolic compounds from pomace (solid parts of grapes) into wine (3, 5, 7, 14 and 21 days, respectively) as well as the amount of phenolic compounds remaining in fermented pomace after maceration.

Through an analysis of prepared wine samples, catechin, epicatechin, quercetin, gallic acid, protocatechuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, vanillic acid, caffeic acid, ellagic acid and *p*-coumaric acid were identified. Dynamics extraction was examined for each identified phenolic compound for each mentioned sort of experiment. The results showed that *p*-hydroxybenzoic acid reached the earliest maximum of extraction on the 3rd day already for the experiment with BDX, while with the added enzyme preparation EXV the maximum was reached on the 5th day of maceration. Among other compounds, catechin, epicatechin, quercetin, gallic and ellagic acid reached the latest maximum on the 21st day for various experiments with different yeast strains and enzyme preparations. Of all the compounds found in wine, catechin had the highest extraction maximum of 36.3108 mg/l during fermentation with BDX yeast.

The dynamics of certain compounds such as rutin, *trans*-resveratrol, catechin, epicatechin, vanillin and *p*-coumaric acid remained in the pomace were analyzed too. Catechin and epicatechin were the most dominant compounds found in grape pomace, the one that macerated for a shorter period of time, therefore it was concluded that the maceration time significantly affected the content of individual compounds in the pomace. It was concluded that these compounds are subject to desorption reactions until the 14th day of maceration, after which equilibrium is established or mild desorption or adsorption on pomace or yeast cells. In addition to these phenolic compounds, other compounds identified in the pomace were syringic, gallic, caffeic, ferulic, protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic, ellagic, vanillic acid as well as quercetin, naringenin and kaempferol.

The antiradical and antioxidant activity of wine samples was measured for all samples, and it was found that the maceration time significantly affects the anti-DPPH radical activity of wine, but also that inoculation with different yeasts significantly changes antioxidant capacity measured by FRAP method, compared to antioxidant capacity of wine obtained by spontaneous fermentation. The addition of enzyme preparations during maceration significantly affected the antioxidant activity of wine measured by TEAC test and FRAP method.

Apart from dynamics experiment, the influence that increasing pressing pressure of fermented pomace has on the increase in the amount of individual phenolic compounds as well as on their content remaining in the pomace and pomace drained after applying different pressures, applying various vinification techniques as well as wine stabilization treatments was determined.

By monitoring the dynamics of fermentation with the inclusion of other parameters in the technological process of production, optimal conditions for wine production were obtained with the highest possible content of biologically active components important for human health.

Key words: red wine, dynamics extraction, maceration, phenolic compounds, pomace, antioxidant capacity

Scientific field: Biotechnical sciences

Scientific subfield: The science of food preservation and fermentation

UDK: 634.85:663.251(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Fenolna jedinjenja grožđa i vina	2
2.2. Zdravstveni značaj fenolnih jedinjenja	9
2.3. Fenolni sastav vina i komine u različitim fenofazama sazrevanja	13
2.4. Fenolni sastav vina od grožđa zahvaćenog sivom plesni <i>Botrytis cinerea</i>	14
2.5. Uticaj primene pritiska pri ceđenju prevrele komine na fenolni sastav vina	15
2.6. Uticaj alkoholne fermentacije i maceracije kljuka na sadržaj fenolnih jedinjenja u budućem vinu i zaostaloj komini.....	16
2.6.1. Dinamika ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja u vino.....	16
2.6.2. Dinamika ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz komine	17
2.7. Uticaj različitih kvasaca i enzimskih preparata na fenolna jedinjenja vina	20
2.8. Dodatak hraniva kvascu tokom fermentacije	21
2.9. Dinamika ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja u vino tokom alkoholne fermentacije i maceracije kljuka crnog grožđa	22
2.10. Antioksidativni kapacitet vina i uzoraka komine	23
2.11. Fenolni sastav vina dobijenih primenom termičke maceracije	25
2.12. Fenolni sastav vina dobijenih primenom karbonske maceracije.....	25
2.13. Uticaj sredstava za bistrenje vina na sadržaj fenolnih jedinjenja.....	26
2.14. Primena stabilizacije vina (askorbinska kiselina, SO ₂ , malolaktička fermentacija, pasterizacija) i uticaj na fenolni sastav	26
2.14.1. Askorbinska kiselina	26
2.14.2. Uticaj SO ₂ na fenolni sastav vina	30
2.14.3. Pasterizacija.....	32
2.14.4. Primena malolaktičke fermentacije	32
2.15. Uticaj odležavanja vina u različitim sudovima na fenolni sastav	33
3. CILJ I ZNAČAJ ISTRAŽIVANJA	33
4. MATERIJAL I METODE	34
4.1. Grožđe kao osnovna sirovina za istraživanje	34
4.2. Sorta vinove loze Cabernet sauvignon	34
4.3. Mikroviniifikacija.....	36
4.4. Korišćeni kvasci i enzimi za mikroviniifikaciju.....	36
4.4.1. Kvasac Uvaferm BDX (BDX).....	36
4.4.2. Kvasac Zimaflor FX10 (FX10)	37
4.4.3. Kvasac Lalvin Qa23 (Qa23).....	37
4.4.4. Enzimski preparat EXV (EXV).....	37
4.4.5. Enzimski preparat Cuvée Blanc (CB)	38
4.4.6. Enzimski preparat Color Plus (CP)	38
4.4.7. Enzimski preparat Caractère (Car)	38
4.5. Ispitivanje uticaja različitog stepena zrelosti grožđa na fenolni sastav vina i komine.....	38
4.6. Ispitivanje uticaja zahvaćenosti grožđa sivom plesni <i>Botrytis cinerea</i> na fenolni sastav vina.....	39
4.7. Ispitivanje uticaja različitog pritiska ceđenja prevrele komine na fenolni sastav vina i komine	39
4.8. Uticaj različitih selekcionisanih vinskih kvasaca (BDX, FX10, Qa23), enzimskih preparata (EXV, CP, Car, CB) i spontane fermentacije na kinetiku ekstrakcije fenolnih jedinjenja i antioksidativni kapacitet vina	39
4.9. Ispitivanje uticaja hraniva za kvasce na fenolni sastav vina	40
4.10. Primena termičke maceracije	40

4.11. Primena karbonske maceracije	41
4.12. Ispitivanje uticaja različitih sredstava za bistrenje na fenolni sastav vina	41
4.13. Ispitivanje uticaja stabilizacije vina na fenolni sastav (askorbinska kiselina, SO ₂ , malolaktička fermentacija, pasterizacija).....	41
4.13.1. Ispitivanje uticaja askorbinske kiseline na fenolni sastav vina	41
4.13.2. Ispitivanje uticaja SO ₂ na fenolni sastav vina	42
4.13.3. Ispitivanje uticaja malolaktičke fermentacije na fenolni sastav vina	42
4.13.4. Ispitivanje uticaja pasterizacije na fenolni sastav vina.....	42
4.14. Poređenje sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja u vinima različitih berbi 2016. i 2018. godine.....	42
4.15. Ispitivanje uticaja starosti zasada vinograda na fenolni sastav vina	43
4.16. Ispitivanje uticaja odležavanja vina u različitim sudovima na fenolni sastav.....	43
4.17. Priprema uzoraka vina i komine sorte vinove loze Cabernet sauvignon za analizu LC-MS/MS tehnikom.....	43
4.17.1. Liofilizacija.....	44
4.18. Priprema uzoraka pokožice i semenke za ekstrakciju i određivanje fenolnog sastava LC-MS/MS tehnikom.....	44
4.18.1. Ekstrakcija iz pokožice.....	44
4.18.2. Ekstrakcija iz semenki	44
4.19. LC-MS/MS	44
4.20. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorcima vina i ekstrakta komine metodom po Folin-Ciocalteu	49
4.21. Određivanje antiradikalne i antioksidativne aktivnosti uzoraka vina i ekstrakta komine ..	49
4.21.1. Anti-DPPH radikalna aktivnost	49
4.21.2. Antioksidativna aktivnost - metoda FRAP	50
4.21.3. Antioksidativna aktivnost - test TEAC.....	50
4.22. Količina slobodnog sumpordioksida	50
4.23. Standardi i hemijski reagensi	51
4.24. Statistička obrada rezultata.....	51

5. REZULTATI I DISKUSIJA	51
5.1. Uticaj stepena zrelosti grožđa na fenolni sastav vina i komine.....	51
5.2. Uticaj zahvaćenosti grožđa sivom plesni <i>Botrytis cinerea</i> na fenolni sastav vina.....	57
5.3. Uticaj primene različitog pritiska ceđenja prevrele komine na fenolni sastav vina i zaostale komine	59
5.3.1. Fenolni sastav vina dobijenog ceđenjem komine pri različitim pritiscima	59
5.3.2. Fenolni sastav komine zaostale nakon presovanja pri različitim pritiscima	61
5.4. Uticaj dodatka hraniva za kvasce na fenolni sastav vina	62
5.5. Kinetika ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu i komini tokom alkoholne fermentacije i maceracije kljuka	64
5.5.1. Uticaj vremena maceracije, spontane fermentacije i zasejavanja kljuka različitim selekcionisanim vinskim kvascima na dinamiku ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu.....	64
5.5.1.1. Poređenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja vina inokulisane fermentacije uz dodatak enzimskih preparata	65
5.5.1.2. Uticaj vremena maceracije i primene enzimskih preparata (EXV, CP i Car) na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja vina berbe 2016.	67
5.5.2. Uticaj vremena maceracije, spontane fermentacije i zasejavanja kljuka različitim selekcionisanim vinskim kvascima na dinamiku ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja u komini	68
5.5.2.1. Uticaj zasejavanja selekcionisanih vinskih kvasaca (BDX, FX10 i Qa23) na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja zaostalih u komini u odnosu na spontanu	

fermentaciju	68
5.5.2.2. Poređenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u prevreloj komini dobijenoj primenom kvasca i enzimskih preparata	70
5.5.2.3. Uticaj maceracije na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja zaostalih u prevreloj komini dobijenoj primenom različitih kvasaca i enzimskih preparata	71
5.6. Kinetika ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja u vinu tokom alkoholne fermentacije i maceracije kljuka uz primenu različitih kvasaca i enzimskih preparata	72
5.6.1. Galna kiselina	72
5.6.2. Protokatehuinska kiselina	74
5.6.3. <i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	75
5.6.4. Siringinska kiselina	76
5.6.5. Vanilinska i kafeinska kiselina	77
5.6.6. Elaginska kiselina	79
5.6.7. <i>p</i> -kumarinska kiselina	80
5.6.8. Katehin i epikatehin	82
5.6.9. Kvercetin	83
5.7. Poređenje maksimalnih ekstrahovanih količina fenolnih jedinjenja spontano i inokulisano fermentisanih uzoraka	89
5.8. Poređenje brzina ekstrakcije fenolnih jedinjenja spontano i inokulisano fermentisanih uzoraka	89
5.9. Analiza glavnih komponenata	89
5.10. Uticaj primene termičke maceracije na fenolni sastav vina	93
5.11. Uticaj primene karbonske maceracije na fenolni sastav vina	96
5.12. Uticaj primene različitih sredstava za bistrenje na fenolni sastav vina	99
5.13. Uticaj stabilizacije vina na fenolni sastav (askorbinska kiselina, SO ₂ , malolaktička fermentacija, pasterizacija)	103
5.13.1. Uticaj dodatka askorbinske kiseline na fenolni sastav vina	103
5.13.2. Uticaj dodatka rastućih koncentracija SO ₂ na fenolni sastav vina	104
5.13.3. Uticaj primene malolaktičke fermentacije (MLF) na fenolni sastav vina	107
5.13.4. Uticaj primene pasterizacije na fenolni sastav vina	111
5.14. Poređenje sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja različitih berbi 2016. i 2018. godine	111
5.15. Uticaj dvogodišnjeg odležavanja vina u različitim sudovima na fenolni sastav	112
5.16. Uticaj starosti zasada vinograda na fenolni sastav vina	112
5.17. Uticaj različitih vinskih selekcionisanih kvasaca i enzimskih preparata na kinetiku ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja komine tokom maceracije	113
5.17.1. Sadržaj rutina u uzorcima prevrele komine	113
5.17.2. Sadržaj <i>trans</i> -resveratrola u uzorcima prevrele komine	115
5.17.3. Sadržaj katehina i epikatehina u uzorcima prevrele komine	118
5.17.4. Sadržaj vanilina u uzorcima prevrele komine	122
5.17.5. Sadržaj <i>p</i> -kumarinske kiseline u uzorcima prevrele komine	124
5.18. Antioksidativni kapacitet uzoraka vina	128
5.18.1. Anti-DPPH radikalska aktivnost	128
5.18.1.1. Anti-DPPH radikalska aktivnost vina iz 2016. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX uz enzimske preparate EXV, CP i Car	128
5.18.1.2. Anti-DPPH radikalska aktivnost vina iz 2018. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX i kvascem BDX i enzimskim preparatima EXV i CB	129
5.18.1.3. Anti-DPPH radikalska aktivnost vina spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10, Qa23)	130
5.18.2. Test TEAC	131
5.18.2.1. Antioksidativni kapacitet vina iz 2016. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX uz enzimske preparate EXV, CP i Car	131

5.18.2.2. Antioksidativni kapacitet vina spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10, Qa23)	132
5.18.2.3. Antioksidativni kapacitet vina iz 2018. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX i kvascem BDX i enzimskim preparatima EXV i CB	133
5.18.3. Metoda FRAP	134
5.18.3.1. Vrednosti FRAP vina iz 2016. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX uz enzimске preparate EXV, CP i Car	134
5.18.3.2. Korigovane vrednosti FRAP na količinu SO ₂ u vinu	134
5.18.3.3. Poređenje vrednosti FRAP vina iz 2018. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX i kvascem BDX uz enzimске preparate EXV i CB	137
5.18.3.4. Poređenje vrednosti FRAP vina spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10, Qa23)	138
5.19. Antioksidativni kapacitet uzoraka prevrele komine	140
5.19.1. Vrednosti FRAP uzoraka prevrele komine	140
5.19.2. Vrednosti TEAC uzoraka prevrele komine	143
6. ZAKLJUČAK	147
7. LITERATURA	150
8. PRILOG	168
BIOGRAFIJA AUTORA	171
Izjava o autorstvu	172
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	173
Izjava o korišćenju	174

1. UVOD

Uzgajanjem vinove loze dobija se najhranljivije i najplemenitije kontinentalno voće, grožđe. Ostaci vinove loze sreću se u geološkim naslagama starim preko 70 miliona godina što govori da je vinova loza neuporedivo starija od čoveka. Grožđe je osnovna sirovina od koje se proizvodi vino i odavnina se pri pomenu vina misli isključivo na vino od grožđa iako su u poslednje vreme sve popularnija i vina od voća. Druženje čoveka sa vinovom lozom, sa groždem i vinom, seže u daleku istoriju ljudske civilizacije. Prvi pomen enologije datira još 2000 godina pre nove ere. Međutim tek nakon studije o vinu, Luja Pastera (1866. godine), bilo je moguće bolje kontrolisati proces transformacije grožđa u vino. Tom studijom utemeljena je savremena tehnologija vina.

Za tehnologiju vina od presudnog su značaja kvalitativne karakteristike grožđa kao sirovine koja se koristi. Sorta vinove loze i uslovi uzgoja u vinogradu daju glavni pečat i stepen kvaliteta ovog plemenitog i vrlo rasprostranjenog pića. To je vrlo kompleksan postupak dobijanja proizvoda koji je sklon neprestanim modifikacijama i kao što veliki Luj Paster reče - "Jedna buteljka vina sadrži više filozofije nego sve knjige sveta".

Pod vinom se podrazumeva proizvod nastao potpunom ili delimičnom alkoholnom fermentacijom svežeg grožđa, kljuka (izmuljano grožđe) ili šire (groždani sok) sorti vinove loze čije je gajenje dozvoljeno u Republici Srbiji. Najveći broj sorti vinove loze koje se koriste u proizvodnji vina potiče od vrste *Vitis vinifera*.

Ono što razdvaja tehnologiju belih i crvenih vina je upravo maceracija. Crvena vina se drugim rečima nazivaju macerirana vina gde dolazi do fermentacije kljuka, za razliku od belih vina gde čvrsti deo grožđa biva odvojen, a šira odnosno tečni deo se ostavlja da fermentiše.

Maceracija je vrlo složen proces koji podrazumeva ekstrakciju iz čvrstih delova grožđa (posebno pokožice, semenke i eventualno šepurine) koju prati alkoholna fermentacija šire tj. groždanog soka. Dužina i intezitet maceracije zavisi pre svega od sorte kao i željene vrste vina koja se proizvodi. Maceracija je posebno važna posmatrajući sa stanovišta sadržaja fenolnih jedinjenja koja su već duži vremenski period u fokusu interesovanja mnogih istraživača kako sa tehnološkog tako i sa farmakološkog aspekta. Poslednjih dvadeset do dvadesetpet godina došlo se do saznanja da u vinu postoje hemijska jedinjenja koja blagotvorno utiču na zdravlje ljudi. Posebno značajna za normalno funkcionisanje organizma su upravo fenolna jedinjenja.

Nekoliko faktora, uključujući sortu vinove loze, stepen zrelosti, spoljašnje uslove i primenjene tehnološke procedure tokom tehnologije proizvodnje može kvalitativno i kvantitativno uticati na fenolni sastav grožđa, komine, vina i konačno na kvalitet i nutritivne karakteristike. Svaki od ovih faktora podjednako utiče na konačan sadržaj fenolnih jedinjenja prvenstveno u bobici grožđa, a zatim će od primarne prerade, primenjene vinifikacije kao i odležavanja vina zavisiti konačan fenolni sastav.

Nebrojeno je radova napisanih na temu biološki aktivnih jedinjenja i njihovog zdravstvenog značaja. Kao što je rečeno, fenolna jedinjenja iz grožđa se ekstrahuju u vino tokom tehnoloških operacija procesa proizvodnje (muljanje, maceracija, fermentacija), ali veliki deo tih jedinjenja zaostaje u čvrstim ostacima ili delovima grožđa koji se naziva komina. Velika pažnja je poslednjih godina usmerena na eksploataciju ovog nuz proizvoda, pošto se smatra jeftinim izvorom za dobijanje bioaktivnih jedinjenja sa potencijalnom primenom kao antioksidanasa u hrani. Antioksidativna i biološka aktivnost grožđa, vina i komine je upravo povezana sa sadržajem i sinergijom fenolnih jedinjenja i dokazana je pozitivna korelacija njihovog sadržaja i antioksidativnosti. Interesovanje za istraživanje ovih jedinjenja obnovljeno je početkom poslednje decenije prošlog veka. Podstaknuto je rezultatima epidemioloških studija koje ukazuju na negativnu korelaciju između konzumiranja crvenih vina i smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti. Dobro je poznata i paradoksalna situacija u Francuskoj gde je u ishrani prepunoj zasićenih masti zapažena

vrlo niska stopa mortaliteta od koronarnih bolesti za razliku od drugih zemalja. Ključ delimičnog objašnjenja leži u činjenici da je takva ishrana ispraćena raširenom konzumacijom crvenog vina posebno na jugu Francuske. Prvobitno se ovakvo delovanje pripisivalo alkoholu, da bi kasnija istraživanja fenolnih komponenti potvrdila njihovu biološku aktivnost.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Fenolna jedinjenja grožđa i vina

Fenolna jedinjenja igraju veoma važnu ulogu u enologiji. Odgovorna su za sve razlike između crvenih i belih vina, a posebno onih koje se tiču boje i ukusa (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Ova bioaktivna jedinjenja čine vrlo raznovrsnu grupu sekundarnih metabolita koji se nalaze kako u grožđu tako i u vinu. Fenolna jedinjenja igraju važnu ulogu kada su u pitanju senzorske karakteristike grožđa i vina, jer su odgovorni za aromu, boju, ukus, gorčinu i adstringenciju (Garrido i Borges, 2013; Bai et al., 2013).

Fenolna jedinjenja grožđa, šire i vina delimo u dve grupe: flavonoide i neflavonoide. U flavonoide spadaju: antocijani, flavonoli, tanini (polimerizovani flavan-3-oli) i proantocijanidini. U neflavonoide spadaju: fenolne kiseline (derivati benzoeve i derivati hidroksicimetine kiseline) i stilbeni. U derivate benzoeve kiseline spadaju: *p*-hidroksibenzoeva, protokatehuinska, vanilinska, galna, siringinska, salicilna i gentišinska (jorgovanska). U derivate hidroksicimetine ubrajaju se: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska. Takođe u derivate hidroksicimetine kiseline spadaju kumarini (komponente hrasta): eskulin, skopolin (kao glikozidi) ili eskuletin, skopoletin (aglikoni).

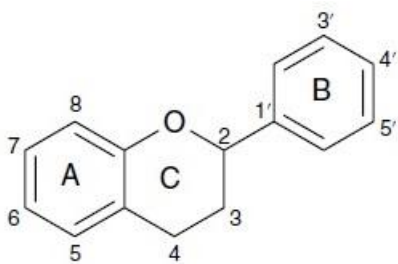
Količina fenolnih jedinjenja koja će se naći u vinu zavisi od sorte, stepena zrelosti, fitosanitarnog stanja, uslova sazrevanja grožđa (način gajenja, sunčeva svetlost, defolijacija, sastav zemljišta, temperatura). Od tehnoloških činilaca najveći uticaj imaju način vinifikacije i dužina maceracije (kontakt tečne i čvrste faze). Za tok fermentacije važna je temperatura, broj potapanja ili orošavanja, soj kvasca kao i primenjeni egzogeni enzimi. Od toga zavisi količina i dinamika nastajanja etanola koja utiče na ekstraktibilnost pojedinačnih fenolnih jedinjenja (količina koja će preći u vino u odnosu na količinu prisutnu u grožđu). Primenjeni pritisak presovanja prevrele komine, način nege i stabilizacija vina (sulfitisanje, tretiranje bistrilima, malolaktička fermentacija) se bitno odražava na njegov fenolni profil. Na kraju, ne manje značajan uticaj imaju uslovi odležavanja vina kao što je vrsta suda (inoks, hrast, staklo), izloženost vina kiseoniku i temperatura podruma (Petrović, 2022).

Iako su fenoli prisutni u soku od grožđa, količina je znatno povećana u vinu zbog njihove veće rastvorljivosti u etanolu nego u čisto vodenim rastvorima (Sacchi et al., 2005).

Flavonoidi

Flavonoidi nađeni u grožđu i vinu imaju iste hidroksilne supstituente na A prstenu, na pozicijama 5 i 7. Razlike u oksidacionom stanju i susptituentu na C prstenu (položaji 2, 3 i 4) definišu različite klase flavonoida. Flavonoli, antocijani, flavan-3-oli i njihovi kondenzovani proizvodi (tanini ili proantocijanidoli) su najzastupljeniji flavonoidni molekuli u grožđu i vinu, a srž njihove strukture prikazana je na slici 1 (Waterhouse et al., 2016).

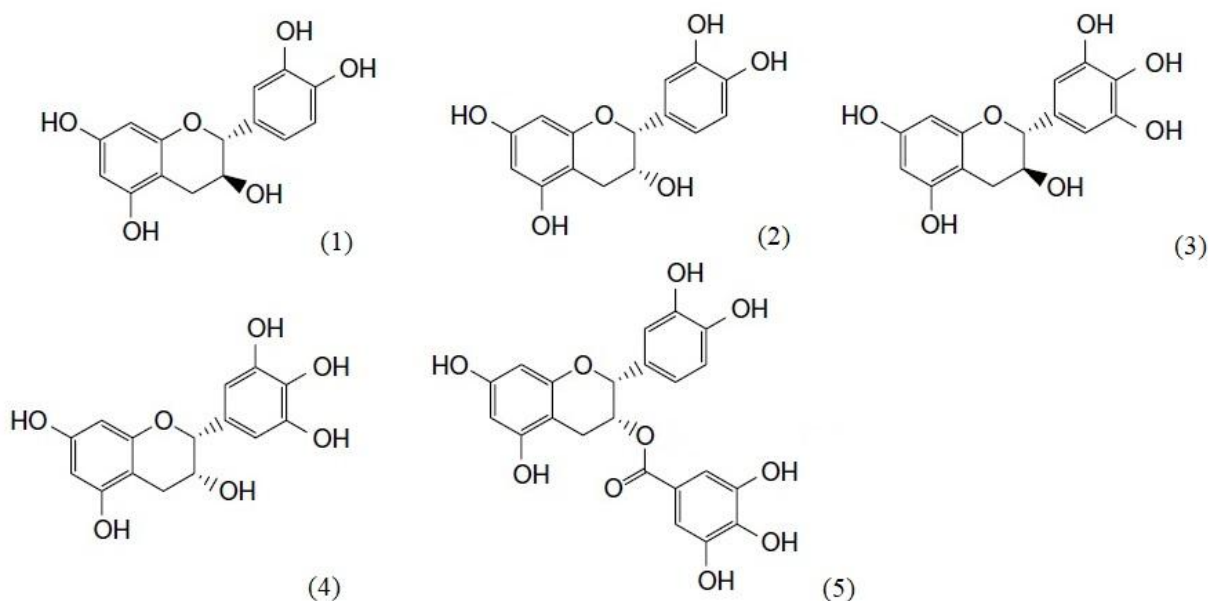
Flavonoidi se ekstrahuju iz pokožice i semenke grožđa tokom fermentacije i maceracije i obuhvataju većinu fenolnih jedinjenja crvenih vina. Etanol se ponaša kao dobar ekstragens za ekstrakciju fenolnih jedinjenja tokom tipične maceracije i fermentacije kljuka crnog grožđa. Pošto se belo vino dobija isključivo iz šire, nivoi flavonoida su veoma niski, manji od 5% u odnosu na crveno vino. Generalno, više od polovine fenola iz pokožice i semenke se ekstrahuje u crveno vino tokom procesa maceracije, zaostajući u komini (Waterhouse et al., 2016).



Slika 1. Osnovni skelet flavonoida (C6-C3-C6)

Flavan-3-oli i tanini

Među flavonoidima najzastupljeniji su flavan-3-oli, čije nakupljanje u bobici grožđa počinje još u fazi pre šarka. Uglavnom se nalaze kao monomeri u vidu katehina i njegovog izomera epikatehina i polimera (proantocijanidina) u semenkama, pokožici kao i delovima šepurine. Proantocijanidini semenke se sastoje od katehina, epikatehina i epikatehin-3-*O*-galata, a pokožični proantocijanidini pored ovih sadrže i epigalokatehin (Cerpa-Calderón i Kennedy, 2008). Na B prstenu, postoje samo dve varijante nađene među flavanolima i to je „normalna“ 3',4'-dihidroksi supstitucija, i verzija „galo“ 3',4',5'. Prema tome, flavan-3-ol sa *cis* supstitucijom na C prstenu i trihidroksi supstituentima na B prstenu je epigalokatehin. Flavan-3-oli se nalaze i kao estri galne kiseline supstitucijom na poziciji 3 što je prikazano na nekim primerima na slici 2 (Waterhouse et al., 2016).



Slika 2. Strukture (+) katehina (1), (-) epikatehina (2), (-) galokatehina (3), (-) epigalokatehina (4) i (-) epikatehin galata (5)

Ova jedinjenja su značajna u enologiji jer doprinose senzorskim karakteristikama vina (polimerizacija, kondenzacija sa antocijanima i oksidacija) i uključena su u procese sazrevanja vina (Petrović, 2022).

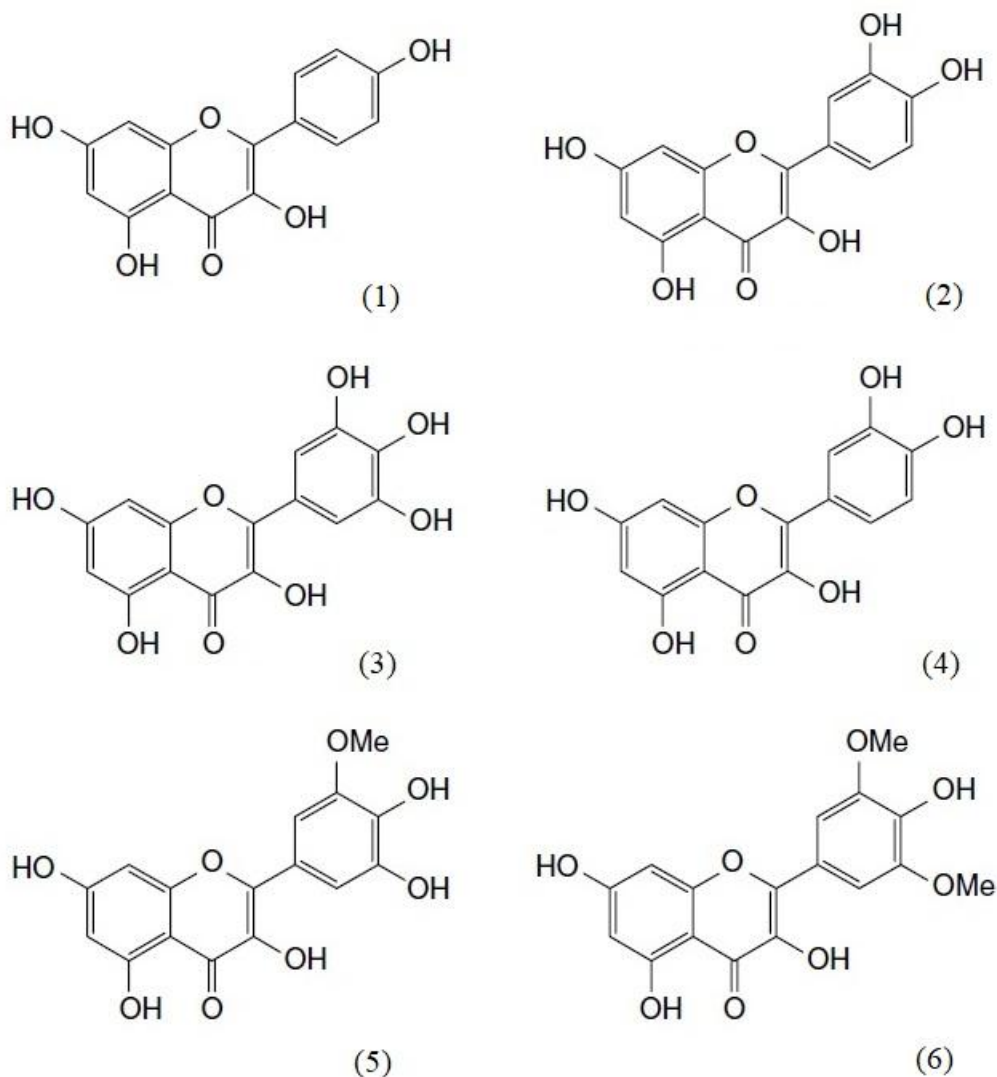
Pored kondenzovanih postoje još kompleksni i hidrolizabilni tanini. To su supstance koje imaju sposobnost da vezuju i talože proteine, i druge biljne polimere kao što su polisaharidi (Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Zhang et al., 2021). Hidrolizabilni tanini uključuju galotanine i elagitanine koji oslobađaju galnu kiselinu i elaginsku kiselinu (Slika 6) nakon kisele hidrolize. Oni takođe sadrže molekul glukoze. Hidrolizabilni tanini nisu pronađeni u grožđu, ali su oni glavni

aditivi koji se koriste za tretiranje vina. Elaginska kiselina u vinu vodi poreklo iz hrastovog drveta, ili iz tanina dodatih u vino, dok je galna kiselina uvek prisutna u vinu, jer vodi poreklo iz pokožice bobice ili semenke (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

Flavonoli

Flavonoli predstavljaju žute pigmente koji su posebno važni za bela vina, mada su zastupljeni i u crvenim vinima samo su markirani antocijanima, tj. crvenim pigmentima. Flavonoli su veoma bitni u reakcijama kopigmentacije u crvenim vinima, tako što poboljšavaju ekstrakciju antocijana tokom vinifikacije što se ogleda u nastajanju vrlo intenzivne crvene boje sa ljubičastom nijansom. Nalaze se u pokožici bobice i njihovo nakupljanje tokom sazrevanja javlja se kao odgovor izloženosti sunčevoj svetlosti (Castillo-Muños et al., 2007). Istraživanja na sorti Pinot noir pokazala su da je pokožica izložena suncu imala znatno viši sadržaj kvercetin glukozida, u odnosu na grožđe koje je sazrevalo u senci. Isto se pokazalo i za sadržaj glukozida kao i aglikona u vinima od takvog grožđa (Price et al., 1995). Vina proizvedena od sorti sa debljom pokožicom kao što je Cabernet sauvignon, sadrže višu količinu flavonola u odnosu na one sa tanjom pokožicom i bez dovoljno sunčeve svetlosti (Flamini et al., 2013).

Što se tiče supstitucije skeleta flavonoida, 4'-hidroksi, 3',4'-dihidroksi i 3',4',5'- trihidroksi flavonoli, poznati kao kemferol (1), kvercetin (2), i miricetin (3), respektivno, pronađeni su u crnom grožđu i vinu (*V. vinifera*), zajedno sa izoramnetinom (4) koji je produkt metoksilacije 3'-OH kvercetina. Na isti način nastaju laricitrin (metoksilacijom C 3' miricetina) i siringetin (metoksilacijom na pozicijama 3' i 5' miricetina) (Castillo-Muños et al., 2007) čije su strukture prikazane na Slici 3.



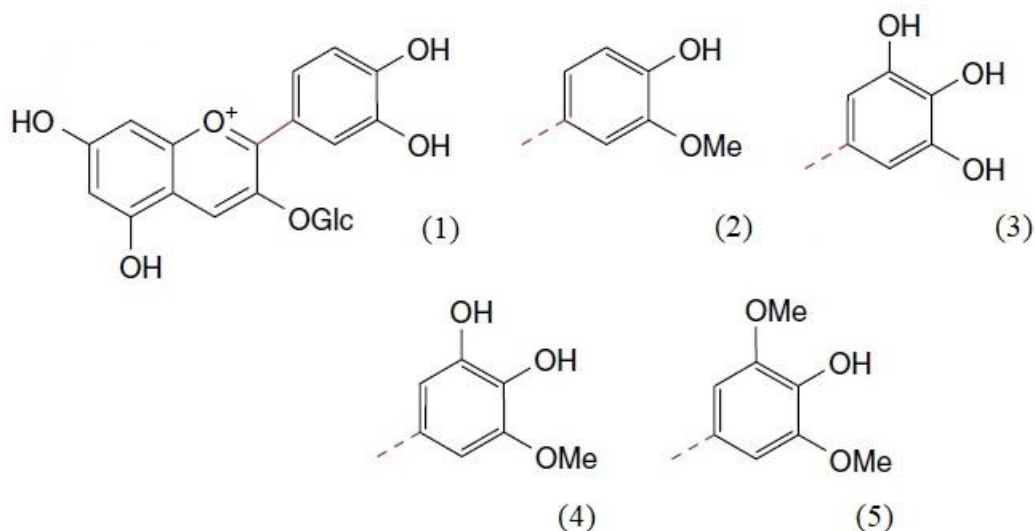
Slika 3. Strukture aglikona flavonola nađenih u vinu, kemferola (1), kvercetina (2), miricetina (3), izoramnetina (4), laricitrina (5) i siringetina (6)

U pokožici grožđa su zastupljeni flavonoli u mnogo manjim količinama u odnosu na antocijane. U crvenim vinima ih ima oko 100 mg/l, a u belim 1 do 3 mg/l. Od jedinjenja iz ove grupe prisutni su kemferol, kvercetin, miricetin, izoramnetin, laricitrin, siringetin, morin, naringenin, rutin, dihidrokvercetin itd. Ovi flavonoli su glikozidi (vezani za glukozu, galaktozu ili galakturonsku kiselinu), a takođe su nađeni i disaharidi (glukozil-galaktozid, glukozil-ksilozid i glukozil-arabinozid) (Petrović, 2022). Glukoza je uobičajeni šećer koji je vezan na C-3 poziciji kemferola, kvercetina, miricetina i izoramnetina. Takođe, kvercetin je nađen u grožđu i u obliku 3-ramnozilglukozida koji se naziva rutin, 3-glukozilgalaktoza i 3-glukozilksilozida kao i kemferol 3-glikozidi uključujući 3-glukozilarabinozid i 3-galaktozid (Castillo-Muños et al., 2007). Rutin je prisutan u grožđu međutim detaljna studija o njegovom sadržaju u vinu je potvrdila da hidrolizuje u roku od 1-2 dana, dok su drugi glikozidi bili stabilni u tom vremenskom roku (Waterhouse et al., 2016).

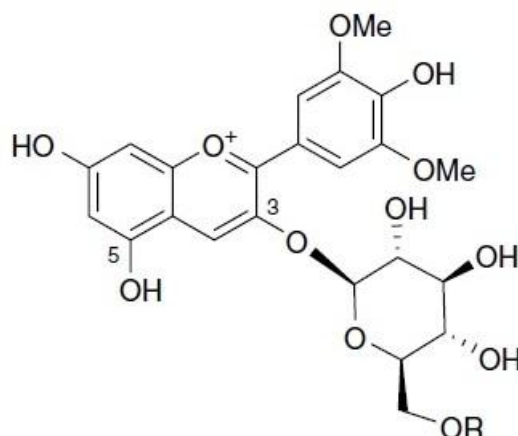
Prethodno istaknuta jedinjenja značajna su u enologiji zbog kopigmentacije sa antocijanima jer pospešuju stabilnost boje crvenih vina. Nalaze se samo u vinima kod kojih je sprovedena maceracija ili ekstrakcija čvrsto-tečno (Petrović, 2022).

Antocijani

Antocijani su crveni pigmenti u grožđu crnih sorti koji se nalaze u spoljašnjim slojevima pokožice bobica, ali ih ima i u mesu bobice (kod bojadisera). Pet molekula antocijana su identifikovana u grožđu i vinu, koji su supstituisani sa dva ili tri supstituenta (OH i OCH₃) na bočnoj strani molekula (Slika 4). Broj hidroksilnih grupa na B prstenu određuje boju antocijana. Antocijani sa manjim brojem hidroksilnih grupa su crvene, a sa većim brojem, plave boje dok se metilovanjem hidroksilnih grupa na prstenu B povećava intenzitet boje. Preradom grožđa, tokom fermentacije i maceracije pod dejstvom ugljen-dioksida i alkohola, antocijani se ekstrahuju iz pokožice, prelaze u širu i vinu daju boju. Od prelaska bojenih materija u vino zavisi intenzitet njegove boje (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Kvalitetnija crvena vina imaju viši sadržaj antocijana koji stupaju u reakcije sa kondenzovanim taninima gradeći stabilne crvene pigmente. Kod vrste *Vitis vinifera* najčešće se nalaze u formi glukozida kao što je npr. malvidin-3-glukozid (Slika 5) koji je najdominantniji (Waterhouse et al., 2016).



Slika 4. Pet različitih struktura B prstena antocijana nađenih u grožđu, cijanidin (1), peonidin (2), delfinidin (3), petunidin (4) i malvidin (5)



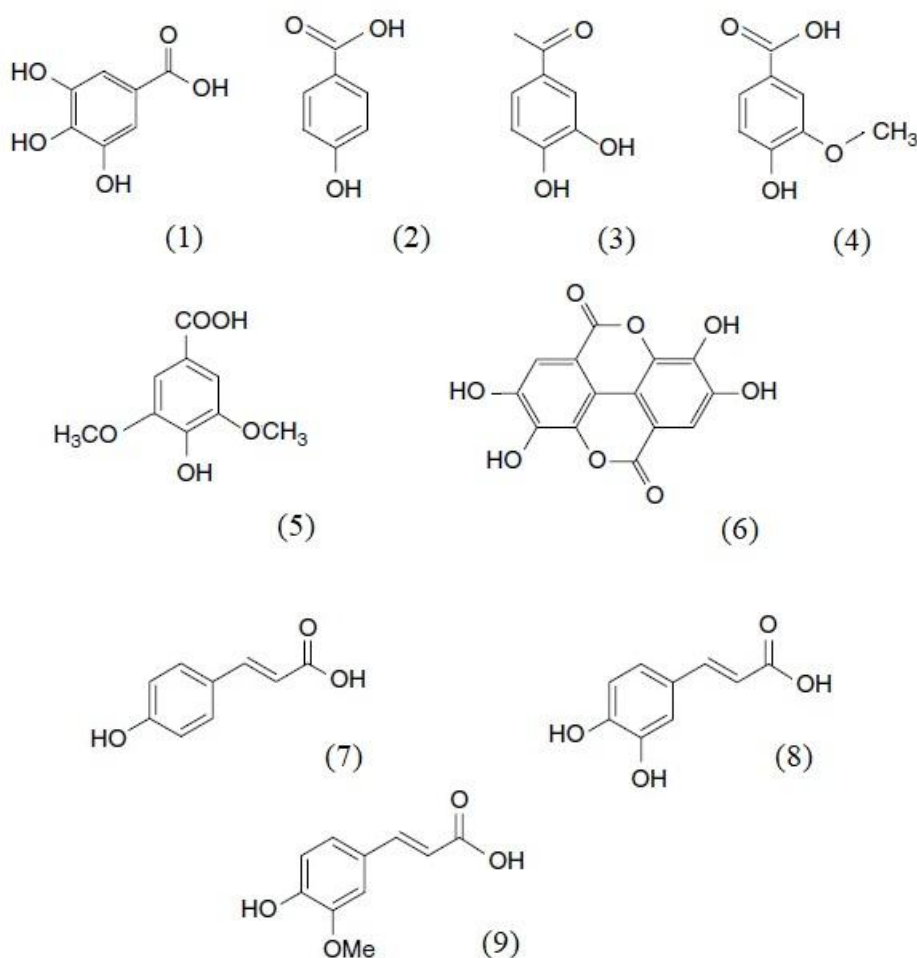
Slika 5. Struktura malvidin-3-glukozida

Neflavonoidi

Neflavonoidi uključuju nekoliko klasa fenolnih jedinjenja, a to su fenolne kiseline i to derivati benzoee kiseline i derivati hidroksicimetne kiseline kao i stilbene. Derivati hidroksicimetne kiseline i stilbeni se nalaze u grožđu dok se derivati benzoee nalaze u grožđu i u hrastu, pa vina koja su odležavala u hrastovim buradima dodatno su oplemenjena ovim jedinjenjima (Waterhouse et al., 2016).

Fenolne kiseline

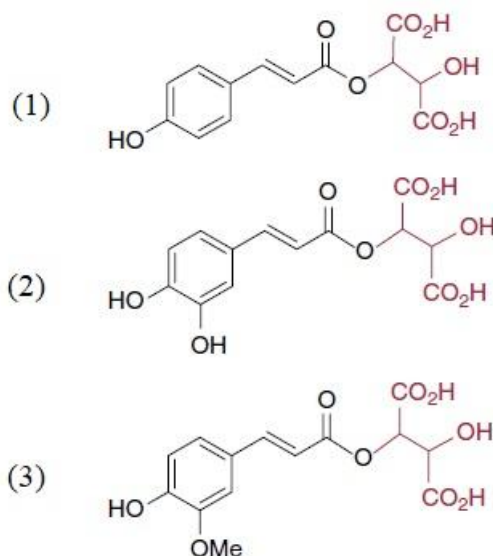
U grožđu i vinu se nalaze derivati benzoee kiseline koji sadrže skelet (C₆-C₁) i derivati hidroksicimetne kiseline koji se odlikuju skeletom (C₆-C₃), a njihove strukture prikazane su na Slici 6. Koncentracije u vinima se kreću od 100 do 200 mg/l u crvenim vinima i od 10 do 20 mg/l u belim vinima (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).



Slika 6. Strukture galne (1), *p*-hidroksibenzoee (2), protokatehuinske (3), vanilinske (4), siringinske (5), elaginske (6), *p*-kumarinske (7), kafeinske (8) i ferulinske kiseline (9)

Fenolne kiseline su u grožđu uglavnom prisutne u glikozidnom obliku iz kojih se oslobađaju kiselim hidrolizom i alkalnom hidrolizom estara (galotanini i elagitanini). Slobodni oblici prevladavaju uglavnom u crvenim vinima, oslobađajući se termičkom degradacijom kompleksa antocijana (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Mali broj derivata hidroksicimetne kiseline je prisutan u grožđu i vinu u slobodnoj formi, nego su uglavnom esterifikovani pogotovo sa vinskom kiselinom

gradeći kutarnu, kaftarnu i fertarnu kiselinu (Slika 7). *Trans*-kutarna i *trans*-fertarna kiselina nađene su uglavnom u mesu bobice pa se lako ekstrahuju tokom muljanja grožđa, dok je *-trans* i *-cis* oblik *p*- kutarne kiseline manje ekstraktibilan i uglavnom lociran u pokožici. Tokom fermentacije dolazi do njihove delimične hidrolize i nastaju slobodne forme koje mogu biti transformisane u etil estre, etil kumarat i etil kafeat (Garrido i Borges, 2013). Estri kafeinske i *p*-kumarinske kiseline sa vinskom kiselinom (kaftarna i kutarna kiselina) su visoko oksidabilne supstance grožđanog soka koji su odgovorni za potamljivanje šire belih vina (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

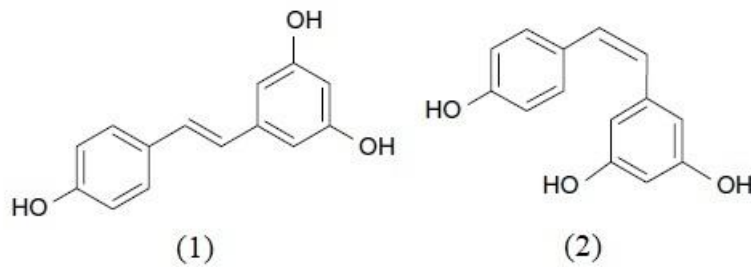


Slika 7. Strukture (1) kutarne (*p*-kumarinska kiselina, estar vinske kiseline), (2) kaftarne (kafeinska kiselina, estar vinske kiseline) i (3) fertarne kiseline (ferulinska kiselina, estar vinske kiseline)

Fenolne kiseline su bezbojne u alkoholnom rastvoru, ali mogu dobiti žutu boju usled oksidacije. One su i prekursori nastajanja isparljivih fenola, koji nastaju radom mikroorganizama kao što su *Brettanomyces* kvasci ili nekih mlečnih bakterija, a to su etil fenol i etil gvajakol u crvenim vinima i vinil fenol i vinil gvajakol u belim vinima, koji u vrlo malim koncentracijama daju neprijatan miris (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

Stilbeni

Stilbeni su fenolna jedinjenja koja se sastoje od dva aromatična prstena povezana etenskim mostom. Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) je stilben koji se najviše spominje kao prisutan u grožđu i vinu. Osim u vinu, identifikovan je u lišću vinove loze i u pokožici grožđa, a poznato je da se njegova koncentracija značajno smanjuje po sazrevanju grožđa (Garrido i Borges, 2013). Postoji nekoliko oblika resveratrola uključujući *cis*- i *trans*- izomere (Slika 8) kao i njihove glikozide. Sintetiše se u pokožici grožđa kao odgovor na gljivičnu infekciju (*Botrytis cinerea*) i to *trans*-oblik, dok svetlost prouzrokuje *cis/trans* izomerizaciju (Waterhouse et al., 2016). Ekstrahuje se tokom fermentacije crnog grožđa i može se naći u koncentracijama od 1-3 mg/l (Ribéreau-Gayon et al., 2006b), dok su u pokožici nađene koncentracije 50-100 µg/g (Petrović, 2011).



Slika 8. Strukture *trans*-resveratrola (1) i *cis*-resveratrola (2)

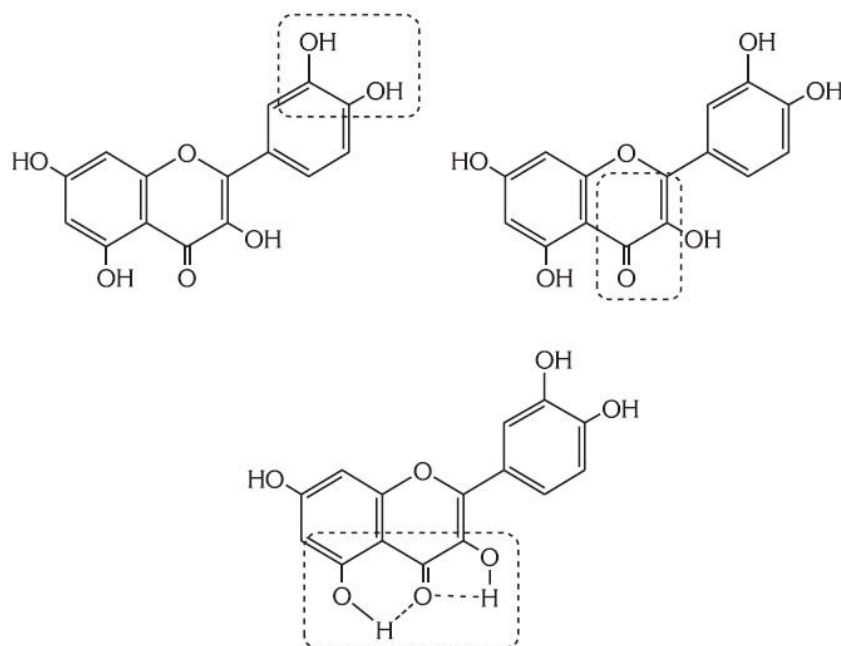
2.2. Zdravstveni značaj fenolnih jedinjenja

Stalna izloženost hemijskim i strukturno različitim zagađivačima životne sredine kao i fizički stres, proizvode slične toksične efekte po zdravlje ljudi. Pokazalo se da zagađivači proizvode ogromne količine slobodnih radikala, što dovodi do oksidativne degradacije lipida, proteina i DNK, aktivacije prokancerogena, inhibicije ćelijskog i antioksidativnog odbrambenog sistema. Izmenjene homeostaze kalcijuma, promene u ekspresiji gena i indukciju abnormalnih proteina značajno doprinose patofiziološkim bolestima ljudi (Bagchi et al., 2000).

Slobodni radikali se razlikuju od drugih hemijskih jedinjenja po tome što poseduju jedan ili više nesparenih elektrona koji dovode do njihove visoke reaktivnosti i nestabilnosti. Najjednostavniji slobodni radikal je atom vodonika pošto sam po sebi ima jedan elektron. Mnogi slobodni radikali postoje u živim sistemima, neki su dobri, neki loši, a neki oboje, mada većina molekula *in vivo* su neradikali. Te hemijske vrste koje izazivaju ili ubrzavaju reakcije oksidacije nazivaju se prooksidansi i mogu biti slobodnoradikalske i neradikalske prirode (Halliwell, 2006). Ipak su neophodni u živim sistemima jer učestvuju u oksidativnoj detoksikaciji i izbacivanju toksina iz organizma. Njihovo nakupljanje u živim organizmima ima toksično dejstvo jer dolazi do narušavanja ćelijskog integriteta oštećujući fosfolipidni sloj (omogućava se prodor virusa i bakterija) i normalno funkcionisanje metaboličkih procesa (Kovač i Pekić, 1991).

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) uključuju, ali nisu ograničeni na, hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$), superoksidni radikal (O_2^-), vodonik peroksid (H_2O_2) i lipidni peroksid. Slobodni radikali mogu biti uključeni kao pokretači oksidativnih procesa i razvoj određenih bolesti. Kada je odbrambeni sistem ugrožen zbog prekomernog nagomilavanja ROS-a nastaje oksidativni stres ili redoks neravnoteža. Ovo može prouzrokovati oštećenje organizma što dovodi do inicijacije bolesti (kancerogeneze oštećenjem DNK ili promocije tumora). Organizmi proizvode antioksidanse, kao što je katalaza, superoksid dismutaza i mokraćna kiselina, kao sistem odbrane od ROS posredovane ćelijske povrede (Leonard et al., 2003). Antioksidansi služe za smanjenje nivoa slobodnih radikala, dozvoljavajući im da obavljaju korisne biološke funkcije bez previše oštećenja (Halliwell, 2006). Glavne karakteristike flavonoida koje su odgovorne za sposobnost uklanjanja slobodnih radikala (Slika 9) su:

- *o*-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu (daje stabilnost radikalu i omogućava delokalizaciju elektrona);
- 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto-grupom u C-prstenu;
- hidroksilne grupe na položaju 3- i 5- u A prstenu, koje osiguravaju vodonikovu vezu s keto-grupom (López-Vélez et al., 2003; Kazazić, 2004).



Slika 9. Strukturne grupe odgovorne za uklanjanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004)

Antioksidativni sistem se može podeliti na prirodni i sintetički. Prirodni antioksidansi su prisutni u hrani i drugim biološkim materijalima i izazvaju veliko interesovanje zbog svoje pretpostavljene bezbednosti i potencijalno nutritivnih i terapijskih efekata (López-Vélez et al., 2003). Uobičajena podela antioksidanasa je na enzimске (Tabela 1) i neenzimске (Tabela 2) antioksidanase (Petrović, 2011; Flieger et al., 2021).

Tabela 1. Enzimski antioksidansi (Petrović, 2011)

Enzimski antioksidansi		
Antioksidans	Uloga	Napomena
Superoksid-dizmutaza (SOD) <ul style="list-style-type: none"> • Mitohondrijska • Citoplazmatična • Ekstracelularna 	Transformacija : $O_2 \rightarrow H_2O_2$	Sadrži mangan (Mn SOD) Sadrži bakar i cink (CuZn SOD) Sadrži bakar (Cu SOD)
Katalaza	Transformacija : $H_2O_2 \rightarrow H_2O$	Hemoprotein (tetramer) prisutan u peroksizomima
Glutation-peroksidaza (GSHPx)	Inaktiviraju : H_2O_2 i lipidne perokside	Selenoproteini (sadrže Se^{2+}) citozola i mitohondrija
Glutation reduktaza NADPH-hinon reduktaza Hidroksilaza epoksida UDP-glukuronil transferaza Sulfonil tranferaza GSH-S-transferaza Transhidrogenaze za GSSG za konjugate ksenobiotika	Prevodi GSSG u GSH Enzimi konjugacije	Pomoćni enzimi

Tabela 2. Neenzimski antioksidansi (Petrović, 2011)

Neenzimski antioksidansi		
Antioksidans	Uloga	Napomena
α -tokoferol (vitamin E)	Sprečava lipidnu peroksidaciju Hvatač: O_2^- , $\cdot OH$, 1O_2	Vitamini
β -karoten	Hvatač: O_2^- , $\cdot OH$, 1O_2 i peroksi radikala Sprečava oksidaciju vitamina A Helatizuje metalne jone, katalizatore oksidativnog stresa	Liposolubilni
Askorbinska kiselina (vitamin C)	Direktan hvatač: O_2^- , $\cdot OH$, 1O_2 , i peroksi radikala Regeneracija vitamin E	Hidrosolubilni
Selen Mangan Cink	Deo aktivnog centra enzima antioksidanasa	Minerali
Triptofan Histidin Metionin	Helatizuju metalne jone, katalizatore oksidativnog stresa	Aminokiseline Elektron-donori
Fenolne kiseline Flavonoidi Lignani Kumarini Stilbeni Galatni estri (hidrolizabilni tanini)	“Hvatači” slobodnih radikala	Biljna fenolna jedinjenja Donori vodonika Elektron-donori
Mokraćna kiselina	“Hvatač” slobodnih radikala	
Albumin	Helatizuju metalne jone (Fe^{2+} , Cu^{2+}), katalizatore oksidativnog stresa	
Transferin	Vezuje slobodno Fe	Nalaze se u plazmi
Haptoglobin	Vezuje slobodni hemoglobin	
Ceruloplazmin	Helatizuju metalne jone Cu^+	

Danas je dosta popularno unošenje egzogenih antioksidanasa putem ishrane ili na neki drugi način. Poznato je da je grožđe bogato fenolnim jedinjenjima, koji su veoma važna jedinjenja za zdravlje ljudi zbog svojih antioksidativnih, antikancerogenih, antiinflamatornih, antimikrobnih i drugih bioloških svojstava (Katalinić et al., 2010; Radovanović et al., 2010). U različitim delovima grožđa, najveći antioksidativni kapacitet pronađen je u semenkama, zatim u pokožici, a meso je pokazalo najniži antioksidativni kapacitet (Xia et al., 2010).

Fenoli su jedna od glavnih grupa neesencijalnih komponenti ishrane koje su povezane sa inhibicijom ateroskleroze i raka. Bioaktivnost fenola može biti povezana sa njihovim antioksidativnim ponašanjem, što se pripisuje njihovoj sposobnosti da heliraju metale, inhibiraju lipooksigenazu i uklanjaju slobodne radikale (Decker, 1997). Flavonoidna i neflavonoidna jedinjenja različito utiču na antioksidativni kapacitet zbog broja OH i OCH_3 grupa i njihovog

položaja na prstenu, monomernih i polimernih oblika kao i zbog moguće sinergije ili antagonizma različitih klasa fenolnih jedinjenja. Dokazano je i da povećanje OH grupa na prstenu povećava antioksidativni kapacitet, dok supstitucija OCH₃ ima suprotan efekat (Di Majo et al., 2008). Resveratrol zbog svoje *o*-difenoksil grupe poseduje bolji antioksidativni kapacitet u odnosu na ostala jedinjenja (Xia et al., 2010).

Dokazano je da je crveno vino, odnosno fenolna jedinjenja, koji se u njemu nalaze inhibiraju oksidaciju makromolekula kao što su lipidi i proteini u ljudskom organizmu i time sprečavaju aterosklerozu kod ljudi. Fenoli koji vezuju LDL su dobri kandidati za prevenciju lipidne peroksidacije i aterosklerotskih procesa jer su u stanju da spreče autokatalitičku lančanu reakciju peroksidacije masnih kiselina u LDL direktno i/ili očuvanjem drugih antioksidanasa koji prekidaju lance, kao što su tokoferoli (García-Alonso et al., 2006). Konzumacijom crvenog vina konstatovano je povećanje HDL holesterola što je povezano sa kontrolom rizika od nastanka koronarnih bolesti (Xia et al., 2010).

Fenolna jedinjenja u semenkama grožđa, pokazala su značajno antiinflamatorno dejstvo na pacove, miševe i ljude, a molekuli koji doprinose mogu biti flavonoli, flavanoli i procijanidini (oligomerni flavonoidi). Inhibicija ili smanjenje ekspresije gena citokina može biti osnovni put do antiinflamacije za fenole grožđa. Rezultati su pokazali da procijanidini u grožđu inhibiraju upalu na nivoima iRNK. Glavne zdravstvene beneficije fenolnih jedinjenja su smanjenje rizika od bolesti. Nastajanje bolesti povezano je sa ishranom sa visokim sadržajem masti i gojaznošću, čime nastaju kardiovaskularni i metabolički poremećaji (Xia et al., 2010), a različita fenolna jedinjenja ispoljavaju širok spektar bioaktivnosti (Tabela 3).

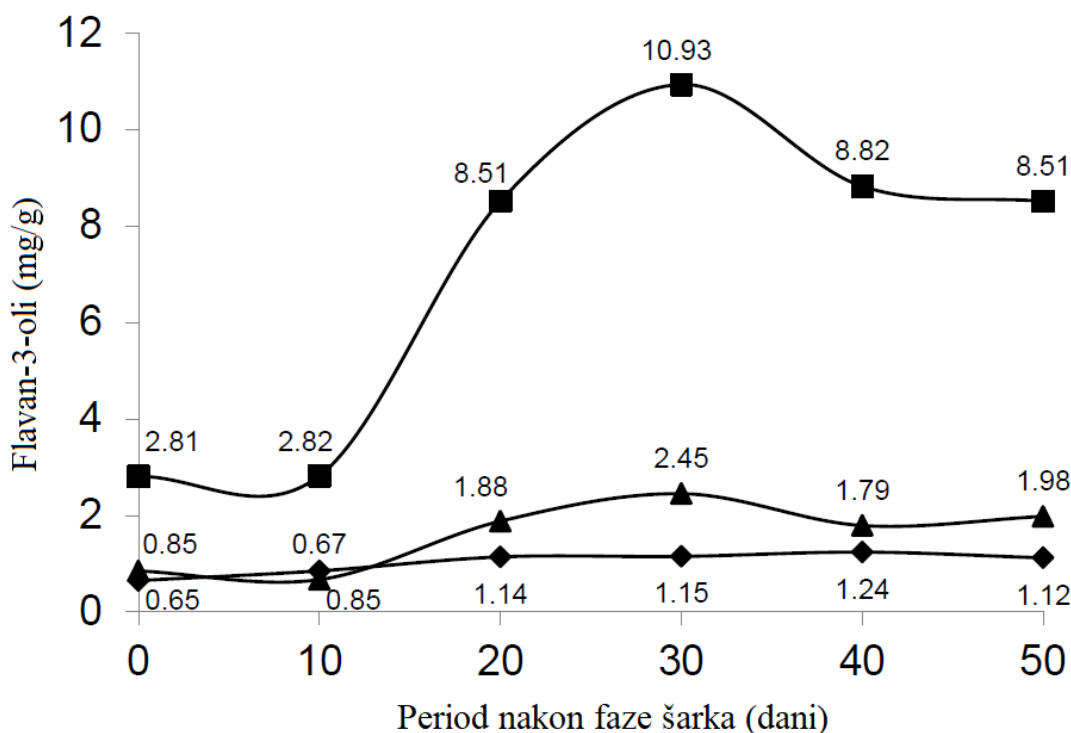
Tabela 3. Bioaktivno delovanje pojedinih fenolnih jedinjenja (Xia et al., 2010)

Fenolna jedinjenja	Bioaktivnost
Resveratrol	<ul style="list-style-type: none"> • uklanjanje slobodnih radikala • antiproliferacija • povećanje nivoa NO u plazmi • regulisanje metabolizma lipida • zaštita od oksidacije ćelijske membrane
Kvercetin	<ul style="list-style-type: none"> • antibakterijsko • povećanje nivoa NO u plazmi
Katehin	<ul style="list-style-type: none"> • antikancerogena • uklanjanje slobodnih radikala • antibakterijska • antiinflamatorna • zaštita od oksidacije ćelijske membrane
Flavoni	<ul style="list-style-type: none"> • antiproliferacija
Flavonoli	<ul style="list-style-type: none"> • uklanjanje slobodnih radikala
Procijanidini	<ul style="list-style-type: none"> • antikancerogena • antinflatorna • antioksidativna • uklanjanje slobodnih radikala
Antocijani	<ul style="list-style-type: none"> • vazorelaksacija • čistač slobodnih radikala • antibakterijska • antioksidans • izazivanje apoptoze
Galna kiselina	<ul style="list-style-type: none"> • uklanjanje slobodnih radikala
Epikatehin	<ul style="list-style-type: none"> • antibakterijska

Fenolna jedinjenja iz različitih delova grožđa pokazala su različita antimikrobna dejstva. Antimikrobna aktivnost fermentisane komine bila je, ili podjednako efikasna, ili znatno bolja od ekstrakta svežeg grožđa. Neka istraživanja su pokazala da su ekstrakti semenki efikasniji antimikrobno od ostalih delova grožđa (Xia et al., 2010). Pokazalo se da fenolna jedinjenja iz vina imaju antimikrobno dejstvo na neke patogene kao što su *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* (Papadopoulou et al., 2005). Resveratrol je pokazao izuzetno antigljivično dejstvo u koncentracijama 10-20 μ l (u slučaju *Candida albicans*). Pored toga što je vrlo značajno, fenolna jedinjenja nisu pokazala indukciju hemolitičke aktivnosti protiv ljudskih eritrocita, u poređenju sa hemijskim lekovima (Jung et al., 2005). Ispitujući vezu strukture fenolnih jedinjenja i antimikrobne aktivnosti, dokazano je da 3,4,5-trihidroksifenil grupe koje se nalaze u strukturi epigalokatehina, epigalokatehina-3-*O*-galata, kastalagina i prodelfinidina su važna za antibakterijsku aktivnost.

2.3. Fenolni sastav vina i komine u različitim fenofazama sazrevanja

Poznato je da se jedinjenja od velikog enološkog značaja (prekusori aroma, fenolna jedinjenja) nakupljaju tokom sazrevanja bobice grožđa (Vicens et al., 2009). Sazrevanje fenola ili kako se još naziva fenolna zrelost grožđa u momentu berbe je jedan od najbitnijih faktora koji utiču na kvalitet vina (Zhou et al., 2019). Prema Ó-Marques et al. (2005) fenolni sastav grožđa i vina uveliko zavisi od faze zrelosti grožđa. Sa porastom bobice dolazi do nakupljanja šećera, dok koncentracija kiselina opada. Faza šarka je period kada bobica prolazi kroz nekoliko promena kao što su promena boje iz zelene u žutozeleno za belo grožđe i u crvenu sa nijansama plave za crno grožđe usled nagomilavanja antocijana u pokožici (Milosavljević i Jović, 1998). Tokom fenofaze šarka dolazi do akumuliranja bojenih materija u bobici grožđa (antocijani u crnom grožđu), aromatičnih materija, tanina i minerala. Stanje kada je grožđe potpuno zrelo naziva se puna zrelost (Ivanova et al., 2011b). Kod crnih sorti kakav je i ispitivani Cabernet sauvignon, u fazi šarka počinje nakupljanje antocijana i raste tokom celog perioda sazrevanja grožđa (Kennedy et al., 2007; Gil et al., 2012). Nasuprot tome, proantocijanidini svoj maksimum u bobici beleže u fazi šarka nakon čega postepeno opadaju do perioda potpune zrelosti posle čega njihova količina ostaje relativno konstantna (Gil et al., 2012; Cadot et al., 2006). Proantocijanidini su zastupljeniji u pokožici i semenkama mada proantocijanidini pokožice imaju najveći stepen polimerizacije (Ó-Marques et al., 2005). Tokom faze šarka omekšavanje bobice dešava se usled promena strukture polisaharida i ćelijskih zidova mezokarpa (Yakushiji et al., 2001). Prema Kennedy et al. (2000) koncentracija fenola semenke se menja tokom sazrevanja bobice i nađeno da količina ekstrahovanih fenola opada sa sazrevanjem. Nedovoljno zrelo grožđe dovodi do slabije ekstraktibilnosti antocijanina i proantocijanidina iz pokožice i veću ekstraktibilnost proantocijanidina iz semenke što može dovesti do adstringentnijih i gorkih vina (Zhou et al., 2019; Gil et al., 2012).



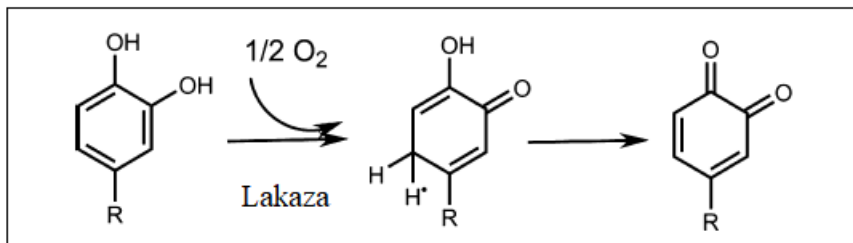
Slika 10. Sadržaj flavan-3-ola: ■ - epikatehin, ▲ - procijanidin B2 i ◆ - katehin u semenkama tokom sazrevanja grožđa (Anđelković et al., 2013)

Proizvodnja tanina počinje u najranijem periodu razvoja bobice sve do faze šarka u pokožici i još dve nedelje posle faze šarka u semenkama. U grožđu su mnoge studije zabeležile značajan pad tanina nakon perioda šarka, što ukazuje na to da se tanini modifikuju što otežava njihovu ekstrakciju (Kennedy et al., 2007). Prema Anđelković et al. (2013) sadržaj katehina u semenkama je zadržao konstantnost od faze šarka dok je sadržaj epikatehina i procijanidina B2 bio u porastu do perioda optimalne zrelosti, a kasnije u blagom padu (Slika 10). Prema Gil et al. (2012) proantocijanidini beleže različitu dinamiku ekstrakcije tokom prve i druge nedelje maceracije grožđa sorti vinove loze Cabernet sauvignon i Tempranillo kada je u pitanju prezrelo grožđe i oslobađa se veća količina pokožičnih pronatocijanidina, dok se proantocijanidini semenke ekstrahuju znatno sporije.

2.4. Fenolni sastav vina od grožđa zahvaćenog sivom plesni *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea je odgovorna za jednu od najozbiljnijih oštećenja grožđa (*Vitis vinifera*), koja je poznatija kao siva plesan. Miris kao i boja crvenih vina može biti izmenjena kao posledica prisustva plesnivog grožđa što se ogleda u pojavi neželjenih aroma (Steel et al., 2013) kao što je geosmin ili pada koncentracije antocijanidina i ostalih fenolnih jedinjenja, koje veoma brzo oksiduje enzim lakaza (Quijada-Morin et al., 2018). Za razvoj *Botrytis*a primarni rizik predstavljaju klimatski i mikroklimatski uslovi. U klimatskim uslovima kada su hladne noći naizmenične sa relativno toplim suvim danima, plesan polako dehidrira bobicu, koncentrišući šećer i formirajući glicerol, uzrokujući sindrom poznat kao plemenita trulež. Botritizirano grožđe sadrži enzim *p*-difenolnu oksidazu poznatiju kao lakaza. Mnoštvo je jedinjenja koja mogu poslužiti kao supstrat za delovanje enzima lakaze ali sve njih karakteriše difenolna struktura, iako je poznato da neki gljivični lakaza enzimi mogu da napadnu i monofenolna jedinjenja. Za razliku od tirozinaze, ovaj enzim je stabilan na pH šire i vina, dosta otporniji na SO₂ i ima izraženu otpornost na alkohol. Male koncentracije SO₂ nisu dovoljne da se uništi aktivnost lakaze (do 5 mg/l), dok tretiranje sa većim koncentracijama (20-30 mg/l) nekoliko dana može u potpunosti zaustaviti njenu aktivnost (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Claus (2017), u svojoj studiji navodi da samo toplotni tretman

može potpuno zaustaviti delovanje lakaze (2 min. na 75°C). Prisustvo polifenoloksidaze iz grožđa može da omogući transformaciju monofenola u difenole koji postaju supstrati za lakazu (Slika 11) i stvaraju hinone koji su nestabilni i izazivaju niz drugih reakcija sve do krajnjeg posmeđivanja vina (Steel et al., 2013; Zinnai et al., 2013). Najčešći supstrati iz grožđa su kafeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, njihovi estri sa vinskom kiselinom, ferulinska kiselina kao i flavonoidi kao što su katehin i epikatehin (Steel et al., 2013).



Slika 11. Oksidacija difenolnih jedinjenja do hinona dejstvom lakaze (Steel et al., 2013)

U slučaju zahvaćenosti grožđa sivom plesni *Botrytis cinerea*, opasnost od oksidacije fenolnih jedinjenja je još više pojačana, posebno kod crnih sorti. Fenolna jedinjenja, uključujući važne vinske fenole (fenolne kiseline, katehine, antocijane, tanine i stilbene) se transformišu u odgovarajuće hinone stvarajući tamno obojene polimere koji su većinom nerastvorljivi u vodi pa se talože u širi i vinu. U literaturi se može naći svega nekoliko studija koje se bave uticajem na pojedina fenolna jedinjenja ne računajući resveratrol. Podaci za relativnu aktivnost lakaze sa pojedinim fenolnim jedinjenjima iz vina, nađeni u publikacijama, prikazani su u Tabeli 4 (Claus, 2017).

Tabela 4. Aktivnost gljivične lakaze sa fenolnim i nefenolnim jedinjenjima vina (Claus, 2017)

Klasa jedinjenja	Jedinjenje (5mM)	Relativna aktivnost (%)*
		Lakaza iz <i>Botrytis cinerea</i> P16
Derivati benzojeve kiseline	Galna kiselina	89
	Vanilinska kiselina	12
	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0
Derivati hidroksicimetne kiseline	Kafeinska kiselina	69
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	0
	Ferulinska kiselina	55
Flavonoidi	Kvercetin	82
	Rutin	57
	Katehin	58
	Naringenin	8
Stilbeni	Resveratrol	61

*Merena potrošnjom kiseonika.

2.5. Uticaj primene pritiska pri ceđenju prevrele komine na fenolni sastav vina

U literaturi su nađeni podaci o presovanju komine grožđa prilikom proizvodnje belih vina (Chardonnay, Manzoni i Garganega). Zaključeno je da se pritisak od 0,5-1 bara činio najpogodniji u pogledu ekstrakcije fenolnih jedinjenja, a uzimajući u obzir i nisku stopu posmeđivanja vina što je vrlo bitno kod belih vina. Sadržaj pojedinačnih fenola nije pratio ujednačen trend iako je primećen opšti porast sa povećanjem pritiska ceđenja (Ferreira-Lima et al., 2016). Ispitivajući sortu Sangiovese sa tri lokaliteta u Toskani, italijanski autori su nakon 12 dana maceracije dobili dve frakcije vina, samotok i preševinu dobijenu pri pritisku od 1,5 bara. U ovim vinima sadržaj flavan-

3-ola je bio u porastu u uzorcima preševine, dok su uzorci samotoka bili bogatiji prodelphinidima. Istakli su da različiti faktori kao što su klonovi, agrotehnične i ampelotehničke mere, vremenski uslovi, mogu pozitivno ili negativno uticati na ekstraktibilnost fenolnih jedinjenja (Rinaldi et al., 2020).

2.6. Uticaj alkoholne fermentacije i maceracije kljuka na sadržaj fenolnih jedinjenja u budućem vinu i zaostaloj komini

2.6.1. Dinamika ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja u vino

Nivo fenolnih jedinjenja u groždanom soku i u vinu umnogome zavisi od sorte, vinogorja, klimatskih faktora, agro i ampelotehničkih mera, stepena zrelosti i vremena berbe (Di Majo et al., 2008). Uz sve navedeno od velike važnosti su i proizvodne operacije kao što su muljanje, presovanje, sulfitisanje, vreme maceracije, odležavanje i sazrevanje vina. Maceracija predstavlja ekstrakciju komponenti iz čvrstih delova grožđa i to je jedna od najvažnijih operacija tokom proizvodnje crvenih vina dajući mu karakteristična svojstva što ga razlikuje od belih vina (Jordão et al., 2011).

U literaturi su nađeni rezultati eksperimenta na sorti Aglianico di taurasi, gde je rađena post maceracija do čak 90 dana nakon burne alkoholne fermentacije. Zabeležen je porast fenolnih jedinjenja sa povećanjem vremena maceracije koji je dostigao maksimalnu vrednost od 854,9 mg/l posle 90 dana maceracije. Ipak, najveća brzina ekstrakcije zabeležena je tokom prvih 40 dana maceracionog perioda. Nakon 40 dana došlo je do opadanja fenolnog sadržaja do 50. dana maceracije što je kasnije praćeno tendencijom rasta do 90. dana (Francesca et al., 2014).

Prema Budić-Leto et al. (2008), koji su ispitali uticaj maceracije u periodima od 5, 8 i 17 dana na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ustanovili su da je značajno povećanje sadržaja tokom produžene maceracije grožđa sorte vinove loze Plavac mali. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja mladih vina sorte Plavac mali se kretao od 2467 do 2723 mg GAE/l (eqv. gallic acid).

Prema Damijanić et al. (2012), sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoidi i neflavonoidi u vinu Teran su bili u porastu tokom celog perioda maceracije od 21 dan, s tim što je značajno povećanje zapaženo između trećeg i sedmog dana maceracije. Kasnije se nastavio trend porasta bez značajnih promena u koncentracijama. Drugi autori su ispitali efekat dužine maceracije (5, 10, 15 i 20 dana) na istoj sorti, i zaključili značajno povećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, produženjem perioda maceracije, a koji se kretao od 1455 do 2718 mg GAE/l (Plavša et al., 2012).

U studiji Villaño et al. (2006), vršena je maceracija sorti Cabernet sauvignon, Tempranillo i Syrah gde je dobijen eksponencijalni porast ukupnih fenolnih jedinjenja tokom 14 dana maceracije, gde je maksimum ekstrakcije za Cabernet sauvignon i Tempranillo bio već posle 4. dana maceracije, dok je za sortu Syrah koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja bila u porastu do 14. dana.

Pokazano je da je kontakt pokožice tokom fermentacije u periodu od 10 dana, povećao koncentraciju antocijanina i tanina određenu u momentu flaširanja nasuprot vinima koja su macerirala 4 ili 5 dana. Nakon odležavanja u periodu od jedne godine, vina duže maceracije, sadrže više polimernih pigmenata (Gómez-Plaza et al., 2001).

Studija koja je upoređivala maceraciju grožđa vinove loze sorte Cabernet sauvignon u periodima od 7, 13 i 21 dan, ustanovila je da sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavanoli i galna kiselina zadržavaju tendenciju porasta tokom celog perioda kontakta čvrstih delova i šire (Auw et al., 1996).

Kod grožđa vinove loze sorte Merlot, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je bio u porastu čak do 36 dana maceracije, iako je došlo do usporavanja ekstrakcije oko 10. dana maceracije.

Pigmenti su bili u ubrzanom porastu do 4. dana maceracije, a nakon toga je zabeleženo njihovo opadanje (Yokotsuka et al., 2000).

Prema Ivanova et al. (2012), eksperimenti na sorti Vranac u pogledu ispitivanja optimalne dužine maceracije (3, 6 i 10 dana) pokazali su da je najviša koncentracija fenolnih jedinjenja bila u vinu čija je maceracija trajala 6 dana. Najviši sadržaj flavan-3-ola bio je u vinu posle 10 dana maceracije.

Kocabey et al. (2016) su u svojoj studiji ispitivali uticaj tri perioda maceracije (5, 10 i 15 dana) na hemijske parametre Karaoglan vina, među kojima su ispitivali sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Prema tim rezultatima vina maceracije od 15 dana su imala značajno viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja ($3866,04 \pm 77,19$ mg GAE/l) od vina kraćih perioda maceracije (5 i 10 dana).

2.6.2. Dinamika ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz komine

Komina grožđa sastoji se od ostataka pokožice, mesa, šepurine kao i semenki grožđa. Njen sastav zavisi od sorte, klimatskih uslova, vinogorja kao i same tehnike vinifikacije. Utrvrđeno je da komina grožđa sadrži veliku količinu antocijanina, katehina, flavonola, stilbena i ostalih fenolnih jedinjenja, koja imaju farmaceutsku i agronomsku primenu jer ispoljavaju antikancerogene, antifungalne i antibakterijske aktivnosti (Cotoras et al., 2014; Moldovan et al., 2020; Messina et al., 2021). Groždana komina predstavlja dobar izvor fenolnih jedinjenja koja imaju i ulogu neutralizacije slobodnih radikala u biološkim sistemima. Ekstrakcija je veoma bitna kod izolacije, identifikacije i upotrebe fenolnih jedinjenja i ne postoji jedinstvena i standardna ekstrakciona metoda. Čvrsto tečna ekstrakcija sa različitim rastvaračima je najčešća tehnika za izolaciju ovih jedinjenja. Za opis mehanizma ekstrakcije najčešće se koristi drugi Fikov zakon difuzije (Bucić Kojić et al., 2007). Vrlo važni parametri koji utiču na ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz komine grožđa su temperatura, dodatak SO₂ ali i vreme maceracije (Andrich et al., 2005). Posebno je bitan sadržaj fenolnih jedinjenja u bobici grožđa i njihova ekstraktibilnost. Ekstrakcija tanina može se opisati kao difuzioni proces iako tanini pokožice i semenke imaju različitu kinetiku ekstrakcije. Brzina difuzije tanina iz pokožice i semenke je različita upravo zbog njihove pozicije i strukture. Tanini semenke sporo difunduju ali samo dok se ne stvori dovoljna količina etanola tokom fermentacije koja će na njih delovati kao ekstragens i ubrzati difuziju. Najveći deo pokožičnih tanina započinje ekstrahovanje zajedno sa antocijanima iako je to spor proces (Bautista-Ortín et al., 2016). Ekstrakcija ukupnih tanina iz grožđa je brza tokom nekoliko prvih dana maceracije (Bautista-Ortín et al., 2016), što znači da bi njihov sadržaj u zaostaloj komini trebao da bude u padu u tom periodu. Nakon toga (posle par dana maceracije) manifestuje se stabilizacija ekstrakcije sporijom difuzijom u vino što se može tumačiti adsorpcionim procesima na čvrste delove komine čime se sadržaj tih jedinjenja u komini može povećavati. Ispitivajući brzinu difuzije tanina na tri sorte, Bautista-Ortín et al. (2016) zaključili su da je kod sorte Syrah bila najveća brzina difuzije, zatim kod sorte Cabernet sauvignon i najmanja kod sorte Monastrell. Prema Cerpa Calderón i Kennedy (2008), samo 32% dostupnih pokožičnih proantocijanidina i 42% proantocijanidina iz semenke je ekstrahovano tokom procesa maceracije, što znači da više od 50% zaostane u komini posle fermentacije.

Tokom procesa vinifikacije, fenolna jedinjenja se ekstrahuju iz bobica grožđa (pokožice i semenki) u širu na dva načina i to kao početno curenje prilikom nagnječenja bobica tokom muljanja i sporiji proces difuzije kroz čvrste slojeve koja se javlja tokom celog perioda maceracije. Uopšteno, ekstrakcija rastvorene supstance iz poroznih čvrstih biljnih delova tokom difuzije, uključuje četiri koraka:

1. Difuzija rastvarača u poroznu čvrstu supstancu,
2. Disperzija rastvorka u rastvaraču,

3. Difuzija rastvorene supstance ka površini čestice,

4. Difuzija rastvorene supstance sa površine čestica u okolni rastvarač.

Koraci 1 i 3 ograničavaju brzinu ekstrakcije za većinu fenolnih jedinjenja tokom difuzije zbog same fizičke strukture biljnog materijala, koji daju prirodan otpor na prodiranje tečnosti i kretanje rastvorene supstance unutar biljke (Setford et al., 2017).

Proces ekstrakcije iz čvrstih delova bobice može biti objašnjen drugim Fikovim zakonom difuzije gde je brzina difuzije funkcija gradijenta rastvorene supstance i unutrašnjeg koeficijenta difuzije.

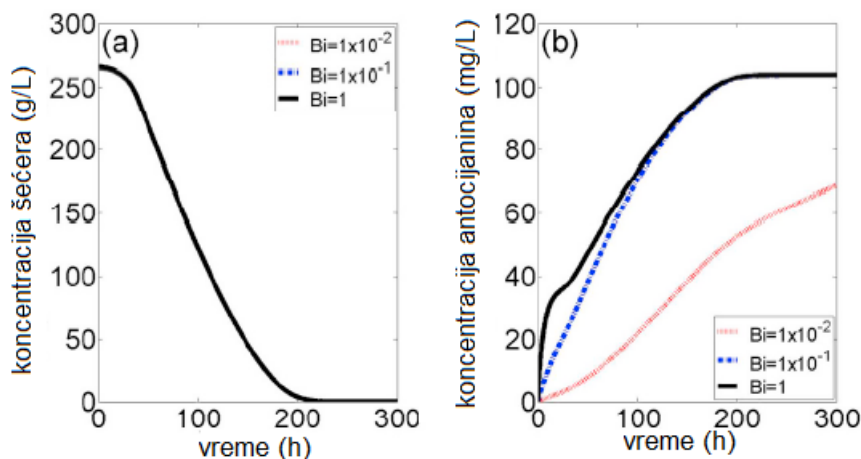
U procesu koji se kontroliše difuzijom gde se fenolna jedinjenja kreću od regiona visoke koncentracije do regiona niže koncentracije, unutar čvrste materije postoji nekoliko varijabli procesa. Pomenute varijable će verovatno imati uticaj na ukupnu stopu ekstrakcije utičući na unutrašnje i spoljne brzine difuzije. Ovi faktori uključuju vrstu rastvarača, temperaturu i raspoloživu površinu kontakta.

Faktori koji utiču na koncentraciju fenolnih jedinjenja koja će se ekstrahovati u vino i koja će zaostati u komini zavise od procesa ekstrakcije i posledičnih reakcija. Uporedo sa ekstrakcijom dešavaju se i pomenute reakcije oksidacije, kopigmentacije, adsorpcije i nastajanja novih pigmenata. Proces ekstrakcije obuhvata difuziju i isticanje iz ćelija bobice (samotok). Proces difuzije umnogome je uslovljen vrstom rastvarača, površinom kao i dužinom trajanja kontakta i molekularnom strukturom rastvorene supstance (Setford et al., 2017).

Pri povećanim koncentracijama etanola i sumpor dioksida (SO_2) u vodi, relativna permitivnost (dielektrična konstanta) rastvarača se smanjuje, što smanjuje solvataciju molekula. Dakle, povećanje koncentracije ovih molekula u rastvaraču bi smanjilo njihovu interakciju sa molekulima rastvorene supstance i povećalo brzinu unutrašnje difuzije (Setford et al., 2017).

Za kinetičko modelovanje fenolne ekstrakcije iz komine grožđa Bucić-Kojić et al. (2007) i Zanoni et al. (2010) su koristili fiksnu vrednost za konstantu brzine ekstrakcije. Međutim, u radu Setford et al. (2017) se pominje da ako se komina grožđa nalazi u rastvoru u kome se stalno povećava koncentracija etanola, unutrašnji difuzioni koeficijent ne bi mogao zadržati konstantnost tokom procesa fermentacije. Etanol ima značajan uticaj na brzinu kao i na produženje ekstrakcije fenola iz komine grožđa (Setford et al., 2017). Ipak, nalazi u literaturi koji govore o ekstrakciji fenolnih jedinjenja su ograničeni. Odličan opis osnovnih principa ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz grožđa dali su Setford et al. (2019a), koji su govorili o nestacionarnom izluživanju antocijanina iz čvrstih delova grožđa. Tema rada odnosila se na transfer mase antocijanina, adsorpcijom fenola na čvrste delove grožđa, kao i reakcijama fenolnih jedinjenja u rastvoru (Setford et al., 2019a). Dokazan je pozitivan efekat koncentracije etanola kao i temperature na brzinu ekstrakcije kao i na ekstraktibilnost fenolnih jedinjenja iz čvrstih delova grožđa (Cacace i Mazza, 2003; Setford et al., 2019b). Uključivanjem šećera u tečnu fazu, došlo je do smanjenja ekstrakcije antocijanina što bi se moglo dovesti u vezu sa promenom fizičkih svojstava tj. povećanjem dinamičkog viskoziteta i gustine. Ove promene ometaju slobodnu difuziju u tečnu fazu, inhibiranjem difuzije kroz poroznu čvrstu materiju (Setford et al., 2019b). Modelovanjem procesa fermentacije, Setford et al. (2019b), zaključili su da kinetika ekstrakcije antocijanina tokom procesa fermentacije ne može zadržati statičnost uključujući brzinu prenosa mase i konstantu distribucije. Na kinetiku ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz čvrstih delova grožđa tj. spoljašnju brzinu prenosa mase utiče i Biot-ov broj ($\text{Bi} = \beta * l/D$), koji predstavlja odnos konvektivnog prenosa mase u odnosu na difuziju (Slika 12). Od toga zavisi i sama kinetika fermentacije, a ne samo od podešavanja uslova kao što su temperatura fermentacije ili dodatak hraniva za kvasce. Taj spoljašnji otpor može itekako uticati na ekstrakciju antocijanina i ograničiti brzinu ekstrakcije što produžava vreme potrebno za dostizanje maksimuma koncentracije antocijanina (Setford et al., 2019b), ali i ostalih fenolnih jedinjenja. Spoljašnji otpor

može biti neutralisan ukoliko je Biotov broj jednak ili veći od 1, i pokazano je da početna faza ekstrakcije antocijanina može biti drastično ometena smanjenom brzinom konvekcije tečne faze. Ovo je očekivano obzirom da je difuzija unutar čvrste faze (čvrstih delova grožđa) ograničena koncentracijom na površinskom graničnom sloju na koji direktno utiče brzina spoljašnjeg prenosa mase. Unutrašnji i spoljašnji maseni transfer pri niskim konvektivnim uslovima (kao što je većina fermentacija crnog grožđa) su podjednako važni za brzinu ekstrakcije, pokazujući da je oba potrebno uzeti u obzir kada je u pitanju modelovanje ekstrakcije fenolnih jedinjenja tokom fermentacije kljuka crnog grožđa.



Slika 12. (a) Simulirana kinetika fermentacije sa fiksnim koncentracijama hranljivih materija i temperaturom, ali sa promenljivim spoljnim koeficijentima prenosa mase podešavanjem Biotovog broja i (b) rezultirajuća simulirana ekstrakcija antocijanina (Setford et al., 2019b)

Tokom istovremenog procesa maceracije i fermentacije, čvrsti delovi grožđa, tj. komina isplivava na površinu stvarajući klobuk pod uticajem oslobođenog ugljen-dioksida. Da bi čvrsti i tečni deo bili u kontaktu vrši se potapanje komine dvaput dnevno ali i zbog sprečavanja mikrobiološkog kvarenja. Lerno et al. (2017), su ispitivajući sadržaj fenolnih jedinjenja tokom maceracije od 6 i 14 dana u slojevima komine (klobuk) i u tečnoj fazi, sa različitim varijantama potapanja komine, zaključili da se različita dinamika ekstrakcije događa za pokožične i fenole semenke. Za pokožične fenole se pretpostavlja da se oslobađaju pasivnom difuzijom kada se naruši ćelijska struktura bobice, oslobađajući se u fermentišuće vino sve dok se koncentracija u čvrstom i tečnom delu ne izjednači. Nakon toga ekstrakcija fenolnih jedinjenja se usporava i dolazi do zasićenja. Tokom dva dana veće promene u koncentraciji su se dešavale u slojevima komine, dok je koncentracija u tečnom delu bila prilično konstantna. Kod pokožičnih fenola (malvidin-3-glukozid, kao i kvercetin glukozid) posle trećeg dana, oko 8h nakon potapanja klobuka je došlo do zasićenja. Za fenole semenke, zapažena je kontinualna ekstrakcija tokom 14 dana fermentacije i u slojevima komine i u slojevima tečne faze (Lerno et al., 2017). Koncentracija katehina na kraju trećeg dana je bila veća u odnosu na drugi dan, ukazujući na to da se ekstrakcija i dalje događala i u uslovima bez potapanja i da nije došlo do zasićenja kao kod pokožičnih fenola. Poredeći koncentraciju antocijanina u sloju komine i sloju fermentišuće šire tokom fermentacije, Lerno et al. (2017) su zapazili da je ekstrakcija započeta u ranoj fazi fermentacije, dostižući maksimum u sloju komine (nakon 3 dana), posle čega se ekstrakcija usporila i koncentracija opadala. Za to vreme u tečnoj fazi, porast antocijanina je bio pretežno linearan sve do 4. dana, nakon čega je došlo do opadanja.

Porast pokožičnih fenola u ranim fazama fermentacije, upravo se javlja kao razlika između količine jedinjenja koja je neekstrahovana u čvrstom delu i količine koja se nalazi u rastvoru, ukazujući na zavisnost prvog reda od pogonske sile koncentracije ili vođenu difuziju (Miller et al., 2019).

Fenolna jedinjenja zbog posedovanja hidrofobnog aromatičnog prstena i hidrofilnih hidroksilnih grupa, mogu da se istovremeno vežu za nekoliko pozicija na površini drugih molekula. Zidovi kvašćevih ćelija *Saccharomyces cerevisiae* sastavljeni su od manoproteina vezanih za oligopolisaharide (sa različitim polaritetom zavisno od vrste), dozvoljavajući adsorpciju molekula kao što su tanini (Cerpa-Calderón i Kennedy, 2008), antocijanini i isparljiva jedinjenja koja se oslobađaju u procesu maceracije. Ustanovljeno je da temperatura i koncentracija etanola utiču na adsorpciju antocijanina od strane kvašćevog taloga, povećavajući adsorpciju na višim temperaturama, dok povećana koncentracija alkohola ima suprotan efekat (Setford et al., 2017).

2.7. Uticaj različitih kvasaca i enzimskih preparata na fenolna jedinjenja vina

Mnoge studije do sada su bile fokusirane na ulogu kvasca na koncentraciju i sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu (Caridi et al., 2004), pre svega adsorpcijom na ćelijskom zidu. Naročito, kvasci mogu zadržati antocijanine (Morata et al., 2003) i mogu modifikovati antioksidativni kapacitet vina (Brandolini et al., 2007).

Danas se većina vina proizvodi zasejavanjem komercijalnim selekcionisanim sojevima *Saccharomyces* vrsta i mali broj vinarija vrši selekciju svojih sopstvenih sojeva da bi ih koristila kao starter kulture. *Saccharomyces cerevisiae* je glavni kvasac koji se koristi u vinarstvu zbog njegovog velikog fermentacionog kapaciteta. Tokom spontane fermentacije, druge vrste kvasaca mogu uticati na tok fermentacije kao i karakteristike proizvedenog vina, mada su ovi efekti varijabilni i teško ih je sa sigurnošću predvideti. Više od 200 različitih *Saccharomyces cerevisiae* vrsta je danas dostupno za korišćenje u vinarstvu sa veoma različitim fermentacionim karakteristikama. Kvasac koji se primenjuje u vinarstvu mora da zadovolji određene kriterijume, a to su: tolerancija na etanol, visoka fermentaciona aktivnost, visoke koncentracije šećera, otpornost na SO₂ i njegovu nisku proizvodnju, nizak nivo proizvodnje vodonik sulfida i isparljivih kiselina, dobar enzimski profil.

Pojedini autori su istakli važnost izbora komercijalnog kvasca i u pogledu proizvodnje manoproteina i za poboljšanje boje crvenih vina kroz njihove interakcije sa fenolnim jedinjenjima (Moine-Ledoux i Dubourdieu, 2002; Medina et al., 2005).

S druge strane, postoje polemike da spontana fermentacija donosi bolju punoću ukusa pojedinih vina. Navodi se da su takva vina mekša i kremastija na ukusu u odnosu na vina koja su proizvedena korišćenjem starter kultura kvasaca. Međutim ova tvrdnja nije naučno pokrivena osim pretpostavke da se na grožđu nalazi vrlo raznolika mikroflora kvasaca koja može da doprinese takvom ukusu vina. Spontana fermentacija kao takva ne iziskuje dodatne troškove, ali mane su joj duže vreme fermentacije kao i veća verovatnoća kvarenja vina (Frantzeskaki, 2017).

Prema Ivanova-Petropulos et al. (2015), koji su ispitivali uticaj primene različitih kvasaca (Lallemand i Vinalco) na fenolni sadržaj u vinu, nađen je viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinima koja su fermentisala uz Vinalco selekcionisane kvasce. Dobijeni rezultati su tumačeni tako što dolazi do manje adsorpcije fenolnih jedinjenja na ćelije pomenutog kvasca u odnosu na Lallemand-ov.

Moć kvasaca da utiče na ekstrakciju fenolnih jedinjenja u vinu, već je uveliko privukla pažnju mnogih istraživača. Koristeći dve različite vrste kvasaca tokom fermentacije grožđa vinove loze sorte Pinot noir, nije ustanovljena značajna razlika u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijanina i inteziteta boje (Girard et al., 2001).

Maceracija se tradicionalno koristi u proizvodnji crvenih vina i njeno trajanje je krucijalan korak za dobijanje stabilnih vina sa dobrom bojom koja će ostati stabilna tokom perioda sazrevanja. Dok se kratkom maceracijm dobijaju vina sa nižom količinom antocijanina i slabijom bojom, duža maceracija može prouzrokovati vina sa nestabilnim bojenim karakteristikama (Generalčić Mekinić et

al., 2019). Zbog toga je porebno pronaći optimalno vreme maceracije kao i najpogodnije kvasce i enzime za ekstrakciju pojedinih fenolnih jedinjenja.

Upotreba enzimskih preparata da bi se olakšala ekstrakcija je dobro poznata još od davnina. Njihova primena olakšava ekstrakciju, povećava randman šire, olakšava filtraciju i intenzivira miris kao i boju vina. Pošto tradicionalnom maceracijom dolazi do 60% ekstrakcije antocijanina, uobičajena je primena enzimskih preparata da bi se dobila visoko obojena vina sa dodatnom biološkom vrednošću (Generalić Mekinić et al., 2019). Enzimi ubrzavaju ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz pokožice, i to najviše ukoliko se primenjuju prilikom kraćih maceracija. Produženjem perioda maceracije efekat enzima se smanjuje, pa sadržaj fenola u kontrolnom vinu bude približno jednak onom koje je tretirano enzimima (Romero-Cascales et al., 2008; Bautista-Ortín et al., 2005). Enzimi tokom maceracije razgrađuju pektino-celulozne zidove pokožice bobice delimičnom hidrolizom gradivnih polisaharida. Propustljivost ćelijskih zidova olakšava proces difuzije fenolnih jedinjenja iz vakuola pokožice u širu tokom fermentacije (Romero-Cascales et al., 2008; Río Segade et al., 2015).

Prvi enzimi korišćeni u vinarstvu su pektinaze, koje obično mogu sadržati poligalakturonaze, pektin esteraze kao i pektin liaznu aktivnost kojima su dodate male količine celulaze i hemicelulaze s ciljem da se što bolje razore ćelijski zidovi i oslobodi boja. Osim poboljšanja boje, enzimi doprinose stabilnosti, strukturi i ukusu crvenih vina, tako što bivaju oslobođeni i tanini vezani za ćelijske zidove (celulaznom i hemicelulaznom aktivnošću) koji doprinose kako stabilizaciji boje tako i celokupnom ukusu vina (Bautista-Ortín et al., 2005).

Varijabilnost u rezultatima može biti povezana sa različitim vrstama enzimskih preparata, različitom prirodom i njihovom aktivnosti, kao i prisustvom nekih bočnih aktivnosti kao što su β -glukozidaze (Río Segade et al., 2015). Prema Romero-Cascales et al. (2008), koji su okarakterisali 6 različitih enzimskih preparata, navode da visoka aktivnost pektin i pektat liaze, srednja poligalakturonaza i aktivnost pektin metil esteraze bez celulaze i β -glukozidaze su imali najveći efekat na ekstrakciju antocijanina tokom maceracije Monastrell pokožice. Odsustvo β -glukozidazne aktivnosti u enzimskom preparatu moglo bi sprečiti oslobađanje aglikona i spontanu transformaciju u bezbojne oblike (Río Segade et al., 2015).

2.8. Dodatak hraniva kvascu tokom fermentacije

Biosinteza aminokiselina i njihovih polimera (tj. proteina) neophodnih za rast kvasca predstavlja glavni utrošak azota tokom fermentacije. Proteini su neophodni za katalizu ključnih metaboličkih puteva (enzimi), a glikoproteini deluju kao strukturna komponenta ćelijskih zidova kvasca (manoproteini). U poređenju sa drugim hranljivim materijama kao što su ugljeni hidrati, sumpor i fosfor, šira obično sadrži niske koncentracije azota u obliku koji je asimilovan kvascem. Dostupan azot je često ograničavajući faktor i za rast kvasca i za brzinu fermentacije. Vinari u određenoj meri prihranjuju širu ili kljuk azotom (obično u neorganskom obliku), ali prekomerna korekcija može dovesti do mikrobiološke nestabilnosti, ili neželjene promene ukusa vina. Azotna jedinjenja kvasci ne asimiluju pasivnom difuzijom već dolazi do aktivne apsorpcije membranskim enzimima koji se nazivaju proteaze (Waterhouse et al., 2016). Tokom fermentacije *Saccharomyces cerevisiae* može jedino asimilovati amonijum i aminokiseline sa izuzetkom prolina koga asimiluje samo u aerobnim uslovima (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Dodatak izvora azota tokom alkoholne fermentacije najviše utiče na aromatski kompleks budućeg vina i menja kinetiku fermentacije dok skoro da nema radova na temu uticaja dodatka hraniva za kvasce tokom fermentacije na fenolni sastav vina. Fermentacija u ovakvim slučajevima završava ranije i sadržaj alkohola u njima biva znatno viši nego u kontroli (Hernández-Orte et al., 2006).

2.9. Dinamika ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja u vino tokom alkoholne fermentacije i maceracije kljuka crnog grožđa

Prema Plavša et al. (2012), porast količine flavan-3-ola (katehina i epikatehina) je bio ostvaren tokom celog perioda maceracije koji je trajao 20 dana na sorti Teran. Katehin i epikatehin su dostigli maksimalane sadržaje posle 20 dana maceracije, s tim što su veće vrednosti nađene za katehin (23,15 mg/l) nego za epikatehin (17,56 mg/l). Do sličnih rezultata za istu sortu, došli su Damijanić et al. (2012) kao i Budić-Leto et al. (2008) za sorte Plavac mali i Babić gde je koncentracija flavan-3-ola bila u porastu tokom celog perioda maceracije i dostila maksimum 21. dan.

Derivati benzoeve i hidroksicimetne kiseline (osim ferulinske kiseline) su pokazali značajan porast produženjem vremena maceracije i dostigli maksimum 20. dan maceracije. U ovim Teran vinima najprisutnije jedinjenje je bila galna kiselina (u koncentraciji od 9,15 do 11,89 mg/l) i kafeinska kiselina (od 8,11 do 9,34 mg/l). Osim ovih jedinjenja zabeležen je porast siringinske kiseline, protokatehuinske kiseline, vanilinske kao i *p*-kumarinske kiseline. Kocabey et al. (2016) su u svojoj studiji izneli da je takođe galna kiselina bila najzastupljenija od svih fenolnih kiselina, ali su u ovim vinima sorte Karaoglan nađene znatno više koncentracije i to od 129,37–154,03 mg/l.

U širi i vinu sorte Cabernet sauvignon, poreklom iz Meksika, tokom 16 dana fermentaciono maceracionog procesa nađeno je 29 fenolnih kiselina i njihovih derivata, među kojima su glavne bile galna, kafeinska, ferulinska i siringinska kiselina. Kvercetin, miricetin, elaginska kiselina i njihovi derivati nađeni su tokom 15 dana maceracije u ovim vinima. Od stilbena *trans*-resveratrol je nađen tokom 14 dana maceracije nakon čega je došlo do opadanja njegovog sadržaja (Muños Bernal et al., 2020). Slični rezultati nađeni su u studiji Lingua et al. (2016), gde je najveća ekstrakcija količine *trans*-resveratrola ustanovljena tokom fermentacije, a po završetku toga jedinjenje je bilo podložnije promenama što je izazvalo smanjenje sadržaja. Dužina maceracije od 5, 10 i 15 dana sorte Karaoglan nije imala značajan uticaj na promenu sadržaja *trans*-resveratrola ($p > 0,05$) u dobijenim vinima.

Lingua et al. (2016) su u svom radu predstavili fenolni sadržaj vina Cabernet sauvignon, Syrah i Merlot poreklom iz Argentine, gde je nađeno da su glavni predstavnici flavanola bili katehin, epikatehin i epikatehin galat. U istraživanju Alencar et al. (2017) zabeležen je njihov porast tokom perioda maceracije, kao i u radovima drugih autora (Kovač et al., 1992; Artem et al., 2021). Katehin je predstavljao dominantno jedinjenje i u drugim istraživanjima (Generalić Mekinić et al., 2019; Soto-Vázquez et al., 2010; Bautista-Ortín et al., 2007). U vinu Karaoglan, tokom maceracije u periodima od 5, 10 i 15 dana nađeno je 25 fenolnih jedinjenja, među kojima su najdominantniji bili derivati benzoeve i hidroksicimetne kiseline kao i flavan-3-oli. Koncentracija galne kiseline tokom celog perioda maceracije je bila u porastu, kao i katehin i epikatehin čija je koncentracija posle 15 dana skoro udvostručena u odnosu na vino od 5 dana maceracije. Sadržaj derivata benzoeve i hidroksicimetne kiseline u Karaoglan vinima je značajno promenjen pod uticajem različitih perioda maceracije, pa je sadržaj galne, *p*-hidroksibenzoeve, siringinske, vanilinske, hlorogene i *trans*-kaftarne kiseline bio viši u vinima maceracije od 15 dana u odnosu na vina proizvedena uz kraće periode maceracije (Kocabey et al., 2016). Od flavanola najzastupljeniji je bio kvercetin, čija se koncentracija nije značajno menjala produženjem vremena maceracije (od 3,34 mg/l u vinu od 5 dana maceracije do 5,53 mg/l posle 15 dana maceracije), dok je u studiji Alencar et al. (2017) nađeno od 4,71 do 20,73 mg/l tokom maceracije grožđa vinove loze sorte Syrah.

Prema Kocabey et al. (2016), sadržaj elaginske kiseline je bio u blagom porastu tokom celog perioda maceracije koji je trajao 15 dana. U istraživanju Ivanova et al. (2011a) pri proizvodnji Vranac vina, primenjena je maceracija u trajanju od 3, 6 i 10 dana. U vinima posle 10 dana maceracije dobijena je najveća koncentracija flavan-3-ola, obzirom da se tanini iz pokožice i semenke oslobađaju u kasnijim fazama vinifikacije, kada je formirana određena količina alkohola.

Kasnija istraživanja na sortama Cabernet sauvignon, Stanušina i Vranac navode da je galna kiselina bila u porastu do 9. dana maceracije koliko je i trajao eksperiment (Ivanova-Petropulos et al., 2016).

Slično kao i u navedenim istraživanjima, Francesca et al. (2014) u svom radu navode da su najdominantnija jedinjenja tokom maceracije, koja je trajala neuobičajeno duži vremenski period od 90 dana, bila flavanoli, kao i derivati benzoeve i hidroksicimetne kiseline. Svoj maksimum pomenuta jedinjenja dostigla su posle 40 dana maceracije. Pored galne kiseline koja je dominirala, najveći sadržaj izmeren je za siringinsku kiselinu 13. i 20. dan (35,82–49,04 mg/l) i njena koncentracija nije bitno varirala kroz ceo eksperiment. Što se tiče sadržaja katehina i epikatehina, njihovi maksimumi nađeni su na kraju procesa maceracije, što može biti objašnjeno sporijom kinetikom ekstrakcije zato što prolaze nekoliko supstitucija i imaju veće molekulske mase. Ono što je interesantno sa senzornog aspekta, a vezano je za ovo istraživanje, je to što je u vinu od 40 dana maceracije dobijen najveći odnos sadržaja katehina i epikatehina. Obzirom da epikatehin ima veću adstringenciju, ova produžena maceracija povoljno deluje na zaokruženost vina na ukusu, i na visok sadržaj fenolnih jedinjenja (Francesca et al., 2014).

U istraživanju gde je analizirana količina ekstrahovanih fenolnih jedinjenja tokom maceracionog procesa na svakih 5 dana, kao i u dobijenom vinu, ustanovljena je značajna razlika u sadržaju fenolnih jedinjenja osim kada su u pitanju fenolne kiseline, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina. Kao što je već pomenuto, fenolni profil se menjao tokom perioda maceracije, a najdominantnije fenolne kiseline su bile galna i hlorogenska kiselina. Zabeleženo je opadanje sadržaja kafeinske kiseline tokom perioda maceracije od 30 dana.

U radu Generalić Mekinić et al. (2019), najdominantnija među fenolnim kiselinama bila je galna kiselina posebno u vinima koja su proizvedena uz dodatak enzimskih preparata u procesu maceracije. Slična tvrdnja nađena je u radu Artem et al. (2021), gde su eksperimenti izvedeni na rumunskoj crnoj sorti Fetească neagră, čija se koncentracija kretala od 9,77 do 57,44 mg/l i ustanovljen je porast tokom perioda maceracije.

Fenolni sastav komine može varirati u zavisnosti od sorte, vremena berbe i stepena zrelosti grožđa, kao i primenjenog načina vinifikacije (Moldovan et al., 2020).

Prema Wang et al. (2017) komina crnog grožđa je posebno bogata fenolnim kiselinama (1,64 mg/g), što čini 83% od ukupnih fenolnih jedinjenja komine crnog grožđa. Najprisutnije među njima su galna, elaginska i protokatehuinska kiselina. Među ukupnim flavonolima (0,30 mg/g) najdominantniji su bili kvercetin i njegov glukozid kao i kemferol-3-glukozid (Wang et al., 2017).

Prema literaturi sadržaj *trans*-resveratrola u komini crnog grožđa bio je relativno nizak, u rasponu od 6 do 64 µg/g suve komine grožđa (Careri et al., 2003; Rockenbach et al., 2011).

Poredeći naše rezultate sa ostalim istraživanjima možemo zaključiti i da raspon sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja kao i kvalitativni sadržaj pojedinačnih fenola može biti različit i zavisi od sorte, spoljašnjih uslova kao i same tehnologije proizvodnje. Naposljetku, svaki način ekstrakcije fenolnih jedinjenja i pripreme za kvantifikovanje se razlikuje pa samim tim dobijeni rezultati mogu varirati u većoj ili manjoj meri.

2.10. Antioksidativni kapacitet vina i uzoraka komine

Maceracija je proces koji se odigrava istovremeno sa alkoholnom fermentacijom, i karakteriše ga vreme kontakta čvrstih delova grožđa sa tečnim delom (široj), pod uslovima kontrolisane temperature kako bi se sačuvala senzorske karakteristike budućeg vina i izbeglo kvarenje. Obično ovaj proces traje 5 dana, međutim u literaturi je opisano i znatno duže trajanje maceracije (Plavša et al., 2012; Budić-Leto et al., 2008; Francesca et al., 2014; Ivanova et al., 2011a) koje je pogodovalo kvalitetu vina. Produženjem vremena maceracije, dolazi do povećanja

konecentracije antocijanina, fenolnih jedinjenja, a samim tim i antioksidativnih svojstava vina (Alencar et al., 2017; Kelebek et al., 2006).

Fenolna jedinjenja imaju funkcionalnu i fiziološku ulogu u organizmu jer se ponašaju kao antioksidansi koji reaguju sa slobodnim radikalima koji nastaju u organizmu kao rezultat mnogobrojnih biohemijskih reakcija. Fenolna jedinjenja povećavaju antioksidativni kapacitet organizma i doprinose povoljnim zdravstvenim efektima posle konzumacije crvenog vina (Di Majo et al., 2008; Čakar et al., 2017). Vina kao bogat izvor fenolnih jedinjenja, koja obuhvataju stilbene među kojima se izdvaja resveratrol, ispoljavaju antiinflamatorna i antikancerogena svojstva ali i igraju veoma bitnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Gojković-Bukarica et al., 2019).

Mnoge studije (Fernández-Pachón et al., 2004; Damijanić et al., 2012; Villaño et al., 2006) su pokazale uticaj koncentracije fenolnih jedinjenja, flavan-3-ola (pretežno katehina), fenolnih kiselina (posebno galne kiseline) na antioksidativnu aktivnost crvenih vina. Tokom maceracije, glavne promene u ekstrakciji fenolnih jedinjenja dešavaju se tokom prvih dana maceracije. Menja se sadržaj prvenstveno antocijanina zatim i flavan-3-ola kao posledica nastajanja sve veće količine alkohola kako odmiče alkoholna fermentacija (Čakar et al., 2019; Sun et al., 2011; Gómez-Plaza et al., 2001; Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Villaño et al., 2006), a to uzrokuje i promenu antioksidativnih svojstava vina (Jordão et al., 2011). Prema Fernández-Pachón et al. (2004), frakcija ekstrahovanih flavan-3-ola i antocijanina je odgovorna za oko 40% antioksidativne aktivnosti crvenih vina određene DPPH i ABTS metodama. Damijanić et al. (2012) koji su pratili promenu antioksidativnih svojstava vina tokom 21 dan maceracije, ustanovili su da sa povećanjem ekstrakcije fenolnih jedinjenja dolazi i do porasta antioksidativnosti vina. Antioksidativna svojstva vina od 3 dana maceracije bila su znatno niža nego kod vina dužeg vremena maceracije.

Eventualne razlike koje se mogu javiti merenjem antioksidativnog kapaciteta istih uzoraka različitim metodama mogu se objasniti različitom reaktivnošću fenolnih jedinjenja prema radikalima primenjenih metoda. Radikali ABTS⁺ i DPPH imaju različitu stehiometrijsku strukturu i drugačiji način nastajanja, pa nakon reakcije sa antioksidansima, pružaju kvalitativno različit odgovor na inaktivaciju njihovog radikala. Radikalska aktivnost vina nije samo zasnovana na svojstvu pojedinačnih fitohemijskih jedinjenja već na mnoštvu i sinergističkom mehanizmu fenolnih jedinjenja. Lako oksidujući fenoli se regenerišu manje aktivnim fenolima (Jordão et al., 2011). Mnoge studije su pokazale i visoku korelaciju sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (Jordão et al., 2011; Di Majo et al., 2008; Ivanova-Petropulos et al., 2015; Burns et al., 2000; Wojdyło et al., 2021; Maletić et al., 2009; Plavša et al., 2012; Mihnea et al., 2016) ali i sadržaja katehina i epikatehina (Generalić Mekinić et al., 2019) sa antioksidativnom aktivnošću ispitivanih uzoraka vina merenih FRAP i DPPH testom. Prema Di Majo et al. (2008), italijanska vina sorti Syrah i Nero d'avola istovremeno su pokazala niži antioksidativni kapacitet i viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Sorte Merlot i Cabernet sauvignon su bile bogatije fenolnim jedinjenjima i imale veći antioksidativni kapacitet. Isto istraživanje je navelo da su sorte kao što su Merlot i Cabernet sauvignon sadržale visoku koncentraciju katehina koja je bila u pozitivnoj korelaciji sa antioksidativnim svojstvima vina. Ovim svojstvima u većoj meri doprinose galna kiselina i miricetin dok su ostala jedinjenja imala znatno niže koeficijente korelacije. Prema Plavša et al. (2012), sadržaj ukupnih fenola u vinima od 5, 10, 15 i 20 dana maceracije je bio u jakoj korelaciji sa antioksidativnim svojstvima merenim metodom FRAP (R=0,98). U istom istraživanju veći antioksidativni kapacitet dobijen je ABTS⁺ nego DPPH radikalom. Primenom DPPH radikala dolazi do reakcije sa lipofilnim antioksidansima, dok ABTS⁺ radikal reaguje i sa lipofilnim i sa hidrofilnim antioksidansima. Prema Muños-Bernal et al. (2020), primenom DPPH radikala nije bilo značajne razlike između antioksidativnosti vina od 0 i 15 dana maceracije. Primenom metode FRAP i ABTS⁺ radikala pokazana je statistički značajna razlika između vina prvog i poslednjeg dana maceracije.

Bitno je napomenuti da proces vinifikacije (zajedno sa maceracijom) igra značajnu ulogu u prirodi i sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu, i posledično doprinosi njihovoj različitoj antioksidativnoj aktivnosti (Jordão et al., 2011).

2.11. Fenolni sastav vina dobijenih primenom termičke maceracije

Sadržaj fenolnih jedinjenja u crvenim vinima zavisi od sorte, uslova gajenja, a posebno je uslovljen tehnološkim procesom proizvodnje (tehnike maceracije, fermentacija, sazrevanje). Da bi se povećao sadržaj fenolnih jedinjenja u crvenim vinima adekvatna maceracija je neophodna. Visoke temperature primenjene tokom maceracije izazivaju destrukciju ćelija, a takođe mogu dovesti i do degradacije osetljivih jedinjenja kao što su antocijani (Wojdyło et al., 2021). Da bi se ustanovio najpogodniji pre-tretman u proizvodnji crvenih vina, Wojdyło et al. (2021) su poredili mikrotalasnu ekstrakciju, enzimski tretman i termičku maceraciju na nemačkoj sorti Dornfelder i zaključili da termička maceracija obezbeđuje najveću koncentraciju fenolnih jedinjenja. Prema Borazan i Bozan (2013) protektivni zdravstveni efekat crvenih vina može biti poboljšan zagrevanjem kljuka pre fermentacije više nego dodavanjem enzimskih preparata u toku maceracije, s obzirom na krajnji fenolni sadržaj u dobijenim vinima. Tokom tradicionalne maceracije samo oko 40% antocijana i 20% tanina iz pokožice grožđa prelazi u vino (Boulton, 2003). Ovako ograničena ekstrakcija rezultat je nedovoljne propustljivosti ćelijskih zidova i citoplazmatične membrane, što su različiti autori analizirali ali i pronašli najbolje rešenje za ekstrakciju fenolnih jedinjenja (El Darra et al., 2016; Netzel et al., 2003; Aguilar et al., 2016; Sacchi et al., 2005; Ghanem et al., 2019).

2.12. Fenolni sastav vina dobijenih primenom karbonske maceracije

Tokom karbonske maceracije, cele bobice ili grozdovi se nalaze u atmosferi ugljendioksida i delimična fermentacija započinje dejstvom glikozidolitičkih enzima koji su prisutni u grožđu. Pod ovim anaerobnim uslovima, niz transformacija unutar cele bobice je indukovana aktivnošću endogenih enzima prisutnih u grožđu (Pace et al., 2014; Gonzáles-Arenzana et al., 2020). U celim bobicama dolazi do fermentacije i proizvodnje alkohola, razgradnje jabučne kiseline, dejstva pektinolitičkih i proteolitičkih enzima, stvaranja isparljivih jedinjenja i difuzije fenolnih jedinjenja iz pokožice u meso (Gonzáles-Arenzana et al., 2020). Posle određenog vremenskog perioda (u zavisnosti od temperature, zrelosti grožđa i sorte) grožđe se presuje i zasejava vinskim selekcionisanim kvascem da bi se dovršila fermentacija (Sacchi et al., 2005; Pace et al., 2014). Ova tehnika vinifikacije se koristi najčešće za dobijanje lakših vina voćnih aroma koja se konzumiraju bez dužeg odležavanja (Sacchi et al., 2005). Prema literaturi teško je opisati uticaj karbonske maceracije na pojedinačna kao i ukupna fenolna jedinjenja, jer su pronađeni neusaglašeni i kontradiktorni rezultati za proučavane različite sorte. Poredeći primenjenu karbonsku i običnu maceraciju na grožđe različitih sorti vinove loze potvrđeno je da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja zavisio od izabrane sorte (Pellegrini et al., 2000). Primena karbonske maceracije na sorti Cabernet franc dala je lako vino sa manjim intezitetom boje u odnosu na klasičnu maceraciju i termičku maceraciju čija vina su bila punija sa intezivnijom bojom i boljom ravnotežom mirisa i ukusa (Rizzon et al., 1999). Mlada italijanska vina dobijena karbonskom maceracijom odlikovala su se višim sadržajem ukupnih antocijana u odnosu na tradicionalno dobijena vina (Pellegrini et al., 2000), dok je prosečan sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavanola bio sličan u jednim i drugim vinima (Tabela 5). Suprotno tome, crvena vina portugalske sorte Tinta miuda dobijena karbonskom maceracijom odlikovala su se nižim sadržajem antocijanina u odnosu na kontrolu, dok je sadržaj katehina, oligomernih i polimernih proantocijanidina bio dosta viši (Sun et al., 2001). Do kontradiktornih rezultata može doći zbog širokog spektra uzroka kao što je sorta, stepen zrelosti grožđa, berba ili uslovi vinifikacije (temperatura alkoholne fermentacije, vreme maceracije, oblik i veličina fermentora, dodavanje CO₂, upotreba aditiva) (Gonzáles-Arenzana et al., 2020).

Tabela 5. Koncentracija ukupnih fenola i flavanola tri crvena vina dobijena karbonskom i tradicionalnom maceracijom (Pellegrini et al., 2000)

Vino	Ukupni fenoli (mg GAE/l)	Ukupni flavanoli (mg CE/l)
19a	1034,9± 1,7	246,2±9,1
19b	617,1±25,5	155,4±5,9
20a	1979,1±51,3	520,9±75,4
20b	1704,1±46,6	426,6±20,3
21a	1225,6±42,9	328,3±13,1
21b	1787,4±44,7	472,1±23
prosek ±SD ^a (n=3)	1413,2±499,3	365,1±141
prosek ±SD ^b (n=3)	1369,5±653	351,4±171,2

19: Cabernet, Merlot, Barbera, Nebbiolo; Lombardija; 20: Corvone, Rondinella; Veneto
21: Pinot nero; Emilija-Romanja (a- karbonska; b- tradicionalna)

2.13. Uticaj sredstava za bistrenje vina na sadržaj fenolnih jedinjenja

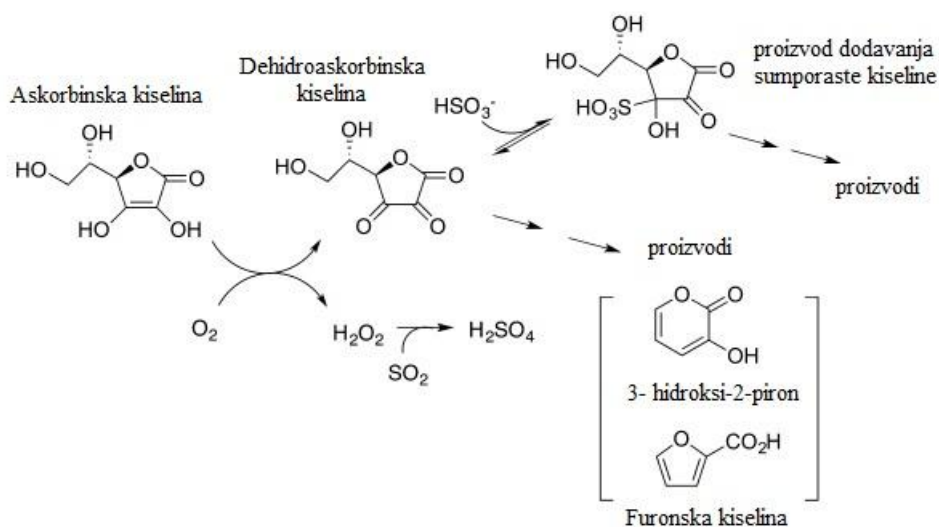
Bistrenje je jedno od najjeftinijih operacija tokom proizvodnje vina, ali i jedna od najbitnijih od čega zavisi kvalitet vina. Bistrenje treba uvek izvoditi u nekoliko nivoa (doza), kako bi se sa najnižom koncentracijom sredstva za bistrenje postigao cilj (Morris i Main, 1995). U novije vreme sve više je aktuelna upotreba biljnih proteina za bistrenje vina nasuprot upotrebi tradicionalnih sredstava za bistrenje koja su životinjskog porekla, što je ispitala grupa italijanskih autora na sorti Sangiovese. Oni su ustanovili da efikasnost bistrenja u vinima sa višom koncentracijom tanina, zavisi više od doze dodatog sredstva, a ne da li je taj protein biljnog ili životinjskog porekla. Ipak kod vina sa niskom koncentracijom antocijana, bolje su se pokazali biljni proteini kada je u pitanju stabilnost boje prilikom odležavanja vina (Rinaldi et al., 2021). Prema Gonzáles-Neves et al. (2014) koji je vršio oglede na vinu sorte Tannat, svako primenjeno sredstvo za bistrenje (želatin, biljni proteini, belance jajeta, albumin) ima različit uticaj na fenolni sastav vina, a samim tim i na stabilnost boje. Dodatkom kazeina belim vinima, primećen je pad sadržaja monomernih i oligomernih flavanola, dok su polimerni proantocijanidini u belim i crvenim vinima više sniženi dodatkom želatina (Braga et al., 2007). Različiti rezultati nađeni u literaturi na ovu temu (Donovan et al., 1998; Castellari et al., 1998; Cosme et al., 2012; Rinaldi et al., 2021) pokazuju različitu dinamiku snižavanja pojedinih fenolnih jedinjenja u vinu.

2.14. Primena stabilizacije vina (askorbinska kiselina, SO₂, malolaktička fermentacija, pasterizacija) i uticaj na fenolni sastav

2.14.1. Askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina je prirodno prisutna u grožđu, ali se obično brzo troši nakon muljanja zbog vezivanja kiseonika i nastajanja dehidroaskorbinske kiseline čime sprečava oksidaciju *o*-fenola. Prilikom proizvodnje belih vina, askorbinska kiselina se dodaje kod flaširanja mada se može koristiti u različitim fazama tehnološkog procesa proizvodnje (Barril et al., 2009). Askorbinska kiselina se može dodati uz SO₂ jer reaguje direktno sa molekularnim kiseonikom, iako u prisustvu metalnih jona, sprečava reakcije oksidacije u početku procesa proizvodnje. Time se fenolna jedinjenja vraćaju u svoj matični oblik inhibirajući promene boje tokom vinifikacije i odležavanja vina (Clark et al., 2010; Peng et al., 1998). Količina dodate askorbinske kiseline može značajno varirati, ali uglavnom se koristi doza od 50-150 mg/l. Askorbinska kiselina dodaje se belom vinu zbog svoje sposobnosti da efikasno uklanja molekularni kiseonik, pri čemu prelazi u svoj oksidovani oblik dehidroaskorbinsku kiselinu i oslobađa se vodonik peroksid. Posle se dehidroaskorbinska brzo razgrađuje u brojne karboksilne kiseline, ketone i aldehidna jedinjenja.

Vodonik peroksid dalje reaguje sa SO_2 gradeći sumpornu kiselinu, dok se dehidroaskorbinska može reverzibilno vezati za SO_2 (Barril et al., 2016; Waterhouse et al., 2016) (Slika 13).



Slika 13. Reakcija askorbinske kiseline sa kiseonikom u prisustvu sumpor dioksida/sumporaste kiseline i dobijeni proizvodi (Barril et al., 2016)

U odsustvu askorbinske kiseline, potrošnja kiseonika u vinu bi išla različitim putevima. U tom slučaju, reakcija između O_2 i dihidroksifenolnih jedinjenja rezultirala bi stvaranjem *o*-hinona i vodonik peroksida. Oba ova produkta su dalje uklonjena sa SO_2 i fenolna jedinjenja se vraćaju u matični oblik ili stvaraju derivate sa sulfonskom kiselinom. Nizak redoks potencijal askorbinske kiseline u poređenju sa fenolnim jedinjenjima (0,55 V nasuprot 0,78 - 1,07 V pri pH 3,5) (Danilewicz et al., 2003) obezbeđuje da će prikazana reakcija (Slika 13) biti dominantnija u odnosu na reakciju fenolnih jedinjenja sa kiseonikom uz prisustvo SO_2 kada je askorbinska kiselina dodata u vino (Barril et al., 2016).

Povećana brzina posmeđivanja u vinima koja sadrže askorbinsku kiselinu može nastati reakcijom askorbinske kiseline sa molekularnim kiseonikom pri čemu nastaju superoksidi, a zatim i vodonik peroksid. Dalje ubrzanje oksidacije vina može se odvijati u prisustvu fenola koji reaguju sa $\bullet\text{O}_2^-$, pri čemu nastaju semihinoni. Semihinoni dalje mogu reagovati sa O_2 i dati hinone i $\bullet\text{O}_2^-$ u lančanoj reakciji. Vodonik peroksid će nastati od $\bullet\text{O}_2^-$ pri niskim pH vrednostima. Sa sigurnošću se ne može tvrditi da li SO_2 reaguje brže sa radikalima kiseonika ili su to pak fenoli iz vina (Peng et al., 1998; Kilmartin et al., 2001).

Oksidativno potamnjivanje fenolnih jedinjenja može se predstaviti kao lančana reakcija:

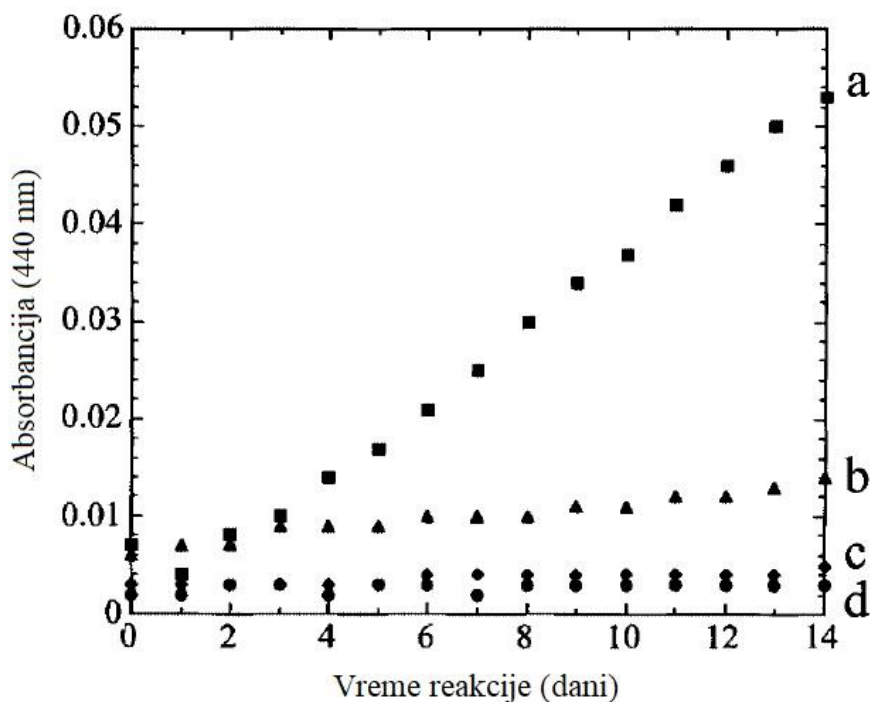
katehini- semihinoni- hinoni- obezbojeni dimeri- žuti dimeri- smeđi produkti.

Askorbinska kiselina može da promeni pravac reakcije i da od hinona nastanu hinoli što bi dovelo do redukcije stepena posmeđivanja. Redukcija hinona je najvažnija uloga askorbinske kiseline kao antioksidansa u vinu. Prema Peng et al. (1998), ustanovljeno je da je efikasnost askorbinske kiseline u redukciji posmeđivanja Colombard vina u ranoj fazi odležavanja, smanjena sa povećanjem koncentracije SO_2 . Askorbinska kiselina može imati i anti-oksidativnu i pro-oksidativnu ulogu u vinu i to zavisi od uslova i vremena odležavanja.

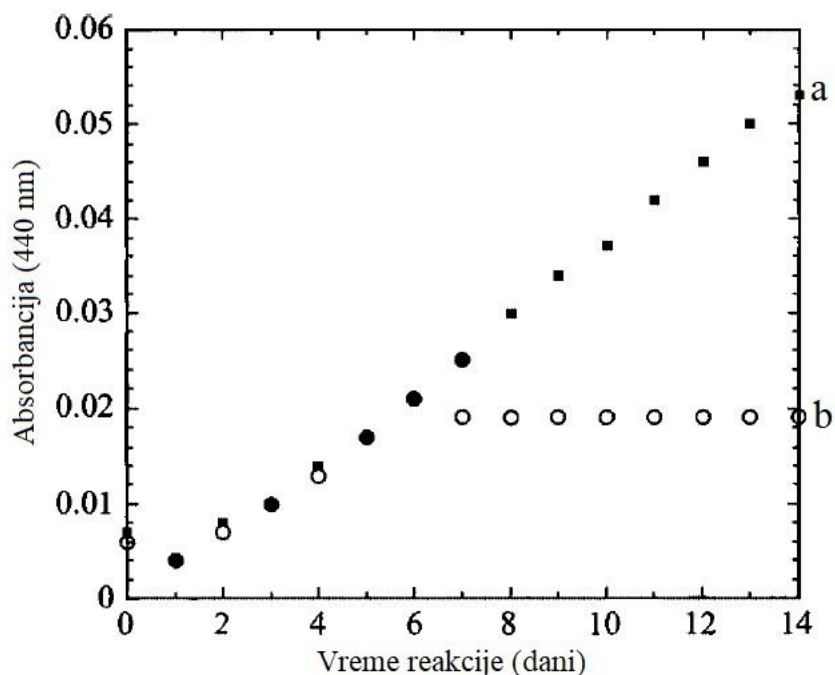
Dokle god vino sadrži dovoljne količine slobodnog SO₂ da veže stvoreni vodonik peroksid, askorbinska kiselina može sačuvati vino od oksidativnog potamnjenja (Peng et al., 1998). Posmeđivanje model vina koja su sadržala katehin i kafeinsku kiselinu tokom 6 meseci odležavanja je bilo manje u slučaju povećanja koncentracije SO₂ uz konstantan sadržaj askorbinske kiseline, dok je uz povećanje askorbinske kiseline uz jednak sadržaj SO₂ posmeđivanje model vina bilo intezivnije. Model vino bez dodatih fenolnih jedinjenja, katehina i kafeinske kiseline, nije rezultiralo promenom boje pod istim uslovima skladištenja, što znači da je za potamnjenje presudna bila oksidacija katehina i kafeinske kiseline. Prema ovom eksperimentu askorbinska kiselina je pospešila dok je SO₂ smanjio posmeđivanje model vina. Askorbinska kiselina povećava posmeđivanje od drugog dana, dok SO₂ ima suprotan efekat (Peng et al., 1998). Prema Peng et al. (1998), za bilo koji nivo slobodnog SO₂ (0 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 40 mg/l) u Chardonnay vinima dodatak askorbinske kiseline (30 mg/l, 60 mg/l, 100 mg/l) izazvao je povećanje stope posmeđivanja merenjem absorbancije posle 132 dana skladištenja na 20°C.

Totalna zamena sumpordioksida askorbinskom kiselinom nije preporučljiva zbog oksidacije askorbinske kiseline kojom nastaje vodonik peroksid koji je glavni oksidant u vinu. Askorbinska kiselina se pre koristi kao dodatak sumpordioksidu, jer i u molekularnom obliku i u obliku sumporaste kiseline ima sposobnost vezivanja vodonik peroksida pri pH vina. Dodatak askorbinske kiseline model vinu dovela je do povećane stope posmeđivanja katehina, oksidabilnog fenolnog jedinjenja koje je dodato u model vino (Bradshaw et al., 2004). Prema Peng et al. (1998), askorbinska kiselina pospešuje posmeđivanje vina bez obzira na koncentraciju sumpordioksida. Očigledno je da, kako se askorbinska kiselina oksiduje, sumpordioksid se troši i to utiče na antimikrobnu ulogu sumpordioksida kao i njegovu antioksidativnu ulogu (Bradshaw et al., 2004).

U model vinu koje sadrži sumpordioksid, askorbinsku kiselinu i katehin, posle 14 dana, zapažena je najveća potrošnja sumpordioksida, čak do 73% u odnosu na kombinaciju katehina i sumpordioksida, gde je potrošnja SO₂ iznosila 26% (Bradshaw et al., 2004). Evidentno je da askorbinska kiselina izaziva oksidaciju katehina, što je prikazao i Bradshaw et al. (2004) u svom radu (Slika 14). Primećeno je da katehin (100 mg/l) u kombinaciji sa askorbinskom kiselinom (200 mg/l) ima tendenciju povećanja posmeđivanja tj. oksidacije do kraja perioda eksperimenta (14 dana). Kada je isti eksperiment postavljen i dodat kalijum metabisulfit u sedmom danu eksperimenta, zapažen je pad vrednosti absorbancije (A₄₄₀) i zadržana konstantnost do kraja merenja čime je zaustavljena oksidacija katehina (Slika 15).



Slika 14. Promene u posmeđivanju model vina tokom 14 dana. a- katehin sa askorbinskom kiselinom (200 mg/l), b- katehin (100 mg/l), c- katehin sa askorbinskom kiselinom i sumpordioksidom i d- katehin sa sumpor dioksidom (200 mg/l) (Bradshaw et al., 2004)



Slika 15. Uticaj askorbinske kiseline na posmeđivanje katehina u slučaju aktivnosti SO₂ sedmog dana trajanja eksperimenta. a- katehin sa askorbinskom kiselinom i sumpordioksidom i b- katehin sa askorbinskom kiselinom i sumpordioksidom (kalijum metabisulfit dodat 7. dan, 200 mg/l) (Bradshaw et al., 2004)

Ranija istraživanja su pokazala povećanu proizvodnju fenolnih pigmentata u model vinima sa askorbinskom kiselinom i katehinom. Takođe je pokazano da su produkti degradacije askorbinske kiseline sposobni da reaguju sa katehinom (flavan-3-olima) i formiraju specifične žute

pigmente- ksantilijum katjone. Glioksilna kiselina koja nastaje kao proizvod oksidacije vinske kiseline u vinu, u prisustvu katehina može dovesti do njihovog nastajanja. Produkti degradacije askorbinske kiseline su pretežno aldehidne prirode pa bi SO₂ ukoliko je prisutan u vinu vezao iste (Barril et al., 2009; Bührle et al., 2017; Peng et al., 1998; Barril et al., 2016; Bradshaw et al., 2004). Pad vrednosti absorbancije (A₄₄₀), nakon dodavanja sumpordioksida sugerise na gubitak obojenih pigmenata koji su prisutni u vinu. Obezbojavanje flavilijum katjona SO₂ je dobro poznato u hemiji crvenih vina, čija je hemijska struktura slična ksantilijum katjonima. Ksantilijum katjoni poseduju aldehidne grupe za koje će se vezati SO₂ (Bradshaw et al., 2004).

Prema Bradshaw et al. (2004) prilikom flaširanja belih vina, ako se dodaje askorbinska kiselina potrebno je dodati i veću koncentraciju SO₂ (Barril et al., 2016). Ovim postupkom sprečavaju se oksidacioni procesi izazvani vodonik peroksidom ili uopšte ne dodavati askorbinsku kiselinu.

Hidroksicimetine kiseline smanjuju prinos žutih ksantilijumskih katjona, ali povećavaju proizvodnju drugih fenolnih pigmenata koji pojačavaju smeđu nijansu, nasuprot žutom intenzitetu modela vina (Barril et al., 2016).

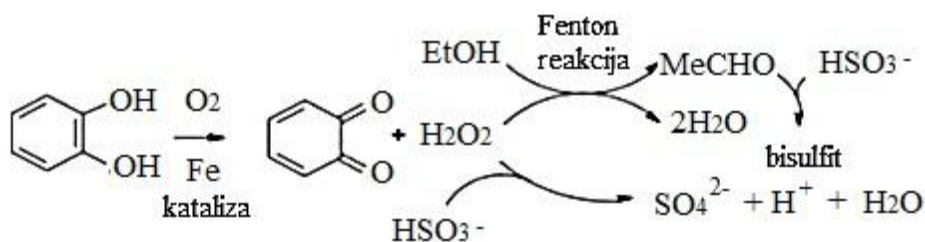
2.14.2. Uticaj SO₂ na fenolni sastav vina

Sumpordioksid (SO₂) se vekovima koristi u vinarstvu kao konzervans zbog njegovog antimikrobnog i antioksidativnog dejstva. Ponaša se kao slaba, diprotonska kiselina u vodenom okruženju, a glavni oblik pri pH vina su uglavnom bisulfiti (HSO₃⁻). Bisulfiti su nukleofili koji se mogu vezati sa aldehidima i drugim elektrofilnim komponentama u vinu (Waterhouse et al., 2016). U širi i vinu SO₂ se nalazi u slobodnom i u vezanom stanju. Kod normalnih doza sulfitisanja količina slobodnog sumpordioksida je daleko niža od količine vezanog. Slobodni SO₂ se uglavnom nalazi u obliku sumporaste kiseline, a mali deo je u gasovitom stanju, i kao takav predstavlja direktan antioksidans i antiseptik (Daničić, 1988).

Odgovarajuće sulfitisanje šire i vina dovodi do niza pozitivnih efekata koji olakšavaju proizvodnju i čuvanje vina, među kojima je potrebno istaći: stvaranje ili poboljšavanje antiseptičkih uslova; antioksidativno delovanje SO₂; poboljšano ekstrahovanje bojenih materija iz pokožice bobice grožđa; selektivno delovanje na različite vrste i sojeve kvasaca i onemogućavanje aktivnosti nepoželjnih mikroorganizama (Daničić, 1988).

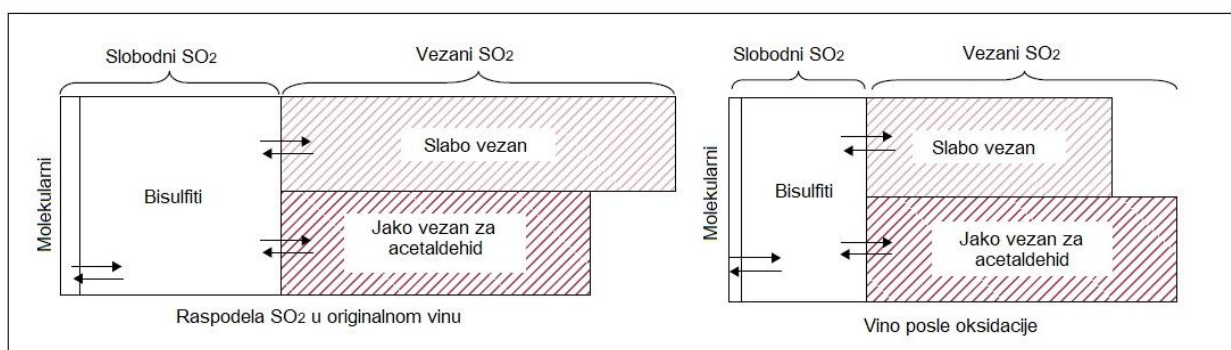
Pokazao se kao veoma moćno sredstvo za sprečavanje enzimske aktivnosti što potvrđuje primer inaktivacije polifenoloksidaze grožđa, gde dodatak SO₂ u širu, usporava oksidacione procese odgovorne za potamnivanje šire. Što se tiče antimikrobnog dejstva, molekularni SO₂ ima sposobnost inhibicije rasta širokog spektra mikroorganizama, uključujući bakterije i kvasce. Mehanizam inhibicije može biti različit, uključujući smanjenje kofaktora i vitamina (NAD⁺, FAD, tiamin), redukciju disulfidnih mostova u proteinima ili reakcije sa nukleinskim kiselinama (Waterhouse et al., 2016).

Prema Ribéreau-Gayon et al. (2006b), SO₂ reaguje direktno sa kiseonikom štiteći fenole i druge oksidabilne komponente vina od oksidacije. Međutim, ogleđi na model vinima (uzimajući u obzir količinu alkohola i pH) bez prisustva fenola, su pokazali da je reakcija između kiseonika i SO₂ veoma spora. Od strane drugih autora zaključeno je da je primarna funkcija SO₂ da veže vodonik peroksid (Danilewicz, 2007; Danilewicz, 2011). Indirektnom oksidacijom *o*-difenola (uz prelazne metale kao što su Cu ili Fe) nastaju hinoni i H₂O₂. Hinoni su jaki elektrofilni koji će potom reagovati sa bisulfitima i na taj način zaustaviti oksidaciju. Ukoliko ne bi bilo dovoljno bisulfitu u vinu koji bi vezali nastali H₂O₂, došlo bi do Fe(II)-katalizovanih Fenton-ovih reakcija (Slika 16) kojima nastaju aldehidi i drugi oksidovani oblici (Waterhouse et al., 2016).



Slika 16. Vezivanje vodonik peroksida nastalog oksidacijom katehola od strane SO_2 i sprečavanje Fenton reakcija (Waterhouse et al., 2016)

Iako SO_2 ne reaguje direktno sa O_2 u vinskom medijumu, ima sposobnost da redukuje oksidovana fenolna jedinjenja i da ukloni perokside (Tao et al., 2007; Ferreira et al., 2015; Barril et al., 2012). Od fenola koji se nalaze u vinu, oni koji sadrže katehol grupu su više podložniji oksidaciji nego ostali. U belim vinima oni uključuju kafeinsku kiselinu, katehin i epikatehin. U crvenim vinima to su mnogo više koncentracije katehina i epikatehina, zajedno sa njihovim oligomerima i polimerima koji se nazivaju kondenzabilni tanini. Kada je u model vino dodato jedinjenje 4-metil katehol, imitirajući crveno vino bogato fenolima, u prisustvu gvožđa i bakra, primećen je znatan pad slobodnog SO_2 u odnosu na model vina bez dodatka fenolnih jedinjenja (Danilewicz, 2007).



Slika 17. Šema raspodele različitih oblika SO_2 u hipotetičkom belom vinu pre i posle oksidacije (Waterhouse et al., 2016)

Prikazana šema (Slika 17) pokazuje preraspodelu oblika SO_2 tokom procesa oksidacije koji će smanjiti sadržaj slobodnog SO_2 (molekularni i bisulfitni oblik). Može doći i do hidrolize slabo vezanog SO_2 , čime se povećava sadržaj njegovog slobodnog oblika (u malim koncentracijama), a time i antioksidativno dejstvo. Sulfitisanjem tek fermentisanog vina kreće se u koncentraciji oko 50 mg/l i nije začuđujuće ako se više od polovine te koncentracije veže, posebno ako je u vinu prisutan visok sadržaj acetaldehida. Kasnijim sulfitisanjem došlo bi do povećanja slobodnog SO_2 jer je došlo do zasićenja kada je u pitanju vezani SO_2 (Waterhouse et al., 2016).

Kao što je pomenuto, slobodni bisulfiti mogu biti utrošeni tokom oksidacije vina, reakcijama sa vodonik peroksidom (H_2O_2) ili vezivanjem za acetaldehid ili druge elektrofile iz vina. Disocijacija između slobodnog i vezanog SO_2 se odvija neprestano u vinu (Waterhouse et al., 2016). Količine slobodnog i vezanog SO_2 u vinu se nalaze u stanju dinamičke ravnoteže. Odnos slobodnog i vezanog SO_2 prvenstveno je pod uticajem temperature vina i njegovog hemijskog sastava. Povećavanjem temperature vina raste sadržaj slobodnog SO_2 . Neposredno po dodavanju u vino SO_2 je uglavnom u slobodnoj formi, a posle određenog vremena se uspostavlja ravnoteža između slobodnog i vezanog SO_2 . Nakon narušavanja jedne ravnoteže potrebno je vreme od nekoliko dana i stabilni uslovi da se uspostavi novi odnos (Daničić, 1988).

2.14.3. Pasterizacija

Pasterizacija se od davnina koristi u industriji pića da bi se izbeglo mikrobiološko kvarenje, međutim u vinskoj industriji najčešće se u tu svrhu koristi SO₂, dok se za pasterizaciju smatra da može negativno uticati na kvalitet šire i vina. Ipak zbog nekih negativnih strana SO₂, pasterizacija u pomenutu svrhu se komercijalno koristila samo u Nemačkoj, Italiji, Južnoj Africi i Australiji. U ovim zemljama pasterizacija je predstavljala atraktivan način sprečavanja malolaktičke fermentacije i eliminisanja posmeđivanja, a tehnički je jednostavnija i možda jeftinija od sterilne filtracije (Malletroit et al., 1991).

2.14.4. Primena malolaktičke fermentacije

Primena malolaktičke fermentacije (MLF) je veoma važna jer bitno utiče na kvalitet vina. Odigrava se pod dejstvom bakterija mlečnog vrenja kao što su *Oenococcus oeni*, formalno *Leuconostoc Oenos* pretežno zbog velike tolerancije i prilagodljivosti uslovima koje vino diktira. To je najprilagodljiviji soj bakterija mlečnog vrenja koji je sposoban da raste pod otežavajućim okolnostima kakve su niska pH vrednost i visok sadržaj alkohola. *O.oeni* je podložna inaktivaciji od strane pojedinih fenolnih kiselina koje se nalaze u vinu. Rast bakterije *Lactobacillus plantarum* može biti ugrožen slobodnim hidrosicimetnim kiselinama (García-Ruiz et al., 2008). Danas se mnogi sojevi koriste u enologiji kao starter kulture za MLF, jer je spontana fermentacija koja može započeti u vinu spora i ne daje adekvatne rezultate. To je proces u kome jabučna kiselina enzimskom dekarboksilacijom prelazi u mlečnu kiselinu pri čemu se oslobađa ugljen-dioksid.

Pored šećera i organskih kiselina, fenolna jedinjenja su takođe vrlo značajna grupa jedinjenja prisutnih u grožđu i vinu. Mnogi faktori tokom primarne prerade i vinifikacije utiču na sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu pa samim tim i malolaktička fermentacija. Prema Wojdyło et al. (2020), sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja posle primenjene malolaktičke fermentacije je značajno snižen u odnosu na kontrolni uzorak. Različiti sojevi bakterija mlečnog vrenja su se različito ponašali u smislu redukcije fenolnih jedinjenja.

Koncentracija pojedinih fenolnih jedinjenja u vinu posle MLF zavisi i od ravnoteže između reakcija oksidacije i polimerizacije. Oksidacija dovodi do smanjenja količine ovih jedinjenja, dok hidroliza visoko polimerizovanih oligomera povećava njihov sadržaj u vinu. U istoj studiji, objavljeno je da različiti sojevi bakterije *Oenococcus oeni*, dovode do smanjenja koncentracije flavan-3-ola u vinu čak 68%. Promena u sadržaju ovih jedinjenja može biti usled reakcija razgradnje ili formiranja polimera procijanidina.

Kada su u pitanju fenolne kiseline, ista studija govori da u zavisnosti od sorte može doći do smanjenja ili povećanja njihovog sadržaja posle MLF. Prema Campos et al. (2009), neke fenolne kiseline u vinu, mogu imati različite efekte na rast bakterija mlečnog vrenja (BMV). Galna kiselina može imati pozitivan uticaj na rast i aktivnost nekih sojeva BMV u medijumu kakav je vino, dok ostale fenolne kiseline inhibiraju dejstvo *O.oeni* i *Lb. hilgardii*. Nivo hidrosicimetnih kiselina može biti u porastu zbog hidrolize kaftarne i kutarne kiselina kao i cinamat glukozid antocijanina koji se nalaze u grožđu ili od hidrosicimetnih kiselina ekstrahovanih kada se MLF odigrava u hrastovom sudu. Porast fenolnih kiselina kao što su kafeinska, ferulinska i *p*-kumarinska kiselina može se dovesti u vezu sa metabolizmom bakterija mlečnog vrenja, aktiviranjem cinamat esterase i oslobađanjem ovih kiselina. Drugi način koji dovodi do porasta ovih fenolnih kiselina je i hidroliza njihovih estara sa vinskom kiselinom, koji su prisutni u grožđu, širi i vinu (Madsen et al., 2017; Hernández et al., 2006; Cabrita et al., 2008). Suprotno njima, Martínez-Pinilla et al. (2012), su u svom istraživanju došli do zaključka da nivo derivata hidrosicimetnih kiselina nije u porastu posle MLF, nego je čak ispod limita kvantifikacije.

2.15. Uticaj odležavanja vina u različitim sudovima na fenolni sastav

Tokom odležavanja crvenog vina dolazi do promena u fenolnom sastavu kao što je opadanje sadržaja antocijana i drugih fenolnih jedinjenja i porasta obojenih polimernih pigmenata (Dallas et al., 1995). Mikrooksigencija igra veliku ulogu kada je u pitanju odležavanje crvenih vina, pa se zbog toga fenolna jedinjenja različito ponašaju (McCord, 2003) u inernom (nerđajući čelik, staklo) i drvenom sudu (hrastove bačve i barik burad). Zapaženo je opadanje sadržaja epikatehina u uzorcima koji su bili izloženi oksigenaciji vina tokom odležavanja (McCord, 2003) kao i u pripremljenim model rastvorima (Vidal et al., 2002). Ovo dovodi do smanjenja proseka dužine lanca proantocijanidina i nagomilavanja njihovih oligomera, vezujući slobodne monomere kao što je epikatehin. Promena veličine polimera može uticati na oporost vina. Ovim se objašnjava često smanjenje percepcije grubosti u vinima koja su bila izložena mikrooksigenciji (McCord, 2003). Generalno flavan-3-oli se tokom odležavanja mogu ponašati dvojako, može doći do njihovog opadanja usled reakcija oksidacije, tanin-tanin i antocijanin-tanin reakcija polimerizacije, ali i njihovog porasta usled oslobađanja iz galatnih prekursora (Gutiérrez et al., 2005; Peri et al., 2015). Na sadržaj fenolnih jedinjenja može uticati i stepen nagorevanja hrasta kod barik buradi gde se stvaraju jedinjenja kao što su acetaldehid, glioksalna kiselina, furfural i hidroksimetilfurfural. Ova jedinjenja su proizvodi dehidratacije šećera i stupaju u reakcije sa flavanolima i hidratanim oblicima antocijana (Fulcrand et al., 2006). Prema Fang et al. (2007) koji su pratili ponašanje flavonola tokom odležavanja u nagorelim hrastovim buradima, ustanovili su da tokom odležavanja dolazi do opadanja njihovog sadržaja verovatno zbog stvaranja glikozida jer njihovi aglikoni reaguju sa šećerima, a nastajanjem sve viših količina glikozida može doći do njihove hidrolize pa je stoga njihovo ponašanje takoreći nepredvidivo.

3. CILJ I ZNAČAJ ISTRAŽIVANJA

Proučavanje dinamike fenolnih jedinjenja tokom proizvodnje crvenih vina je aktuelno kako sa tehnološkog tako i sa farmakološkog stanovišta. Cilj je bio da se na osnovu praćenja dinamike uz uključivanje i drugih parametara u tehnološki proces proizvodnje, dobiju vina sa što većim sadržajem biološki aktivnih komponenata značajnih za zdravlje ljudi.

U okviru toga je utvrđen optimalan stepen zrelosti grožđa u pogledu sadržaja biološki aktivnih fenolnih jedinjenja.

Pri primarnoj preradi grožđa ispitivan je uticaj nekih komercijalnih enzimskih preparata koji se primenjuju radi bolje ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz čvrstih delova grožđa. S istim ciljem korišćeni su sojevi kvasaca različite glikozidolitičke aktivnosti i praćen je njihov uticaj na dinamiku fenolnih jedinjenja tokom vinifikacije.

Primenjena je termička i karbonska maceracija s ciljem ispitivanja takvih vidova maceracije na promene fenolnog sastava vina.

Utvrđen je uticaj rastućeg pritiska ceđenja prevrele komine na povećanje količine pojedinačnih fenolnih jedinjenja kao i njihovog sadržaja koji je zaostao u komini i komini ceđenoj primenom različitih pritisaka.

Na novodobijenim vinima cilj je bio ispitati uticaj sredstava za bistrenje i stabilizaciju vina koja se uobičajeno koriste na količinu pojedinih fenolnih jedinjenja.

Ispitan je i uticaj malolaktičke fermentacije koja se uobičajeno koristi u proizvodnji crvenih vina kao i višemesečnog odležavanja vina u različitim sudovima na sadržaj fenolnih jedinjenja.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Grožđe kao osnovna sirovina za istraživanje

Grožđe korišćeno u ovom istraživanju potiče iz vinograda (Radmilovac) oglednog dobra Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni vinograd podignut je 2003. godine i redovi su orjentisani severoistok-jugozapad. U zasadu je formiran Gijov jednogubi uzgojni oblik. Broj rodni okaca po lastaru je osam. Razmak između redova je 3m, a između čokota u redu 1m. Grožđe potrebno za eksperimente prve godine istraživanja ubrano je u fazi pune zrelosti, a druge godine istraživanja u fazi šarka, fazi pune zrelosti i u fazi prezrelosti.

4.2. Sorta vinove loze Cabernet sauvignon

Cabernet sauvignon (poznat i kao Petit cabernet i Petit vidure) spada u sorte vinove loze za proizvodnju renomiranih visokokvalitetnih - vrhunskih crvenih vina. To je najšire rasprostranjena i najpoznatija vinska sorta u svetu (Slika 18). Vodi poreklo iz Francuske oblasti Bordo, a odatle je rasprostranjena po Evropi, zemljama Novog sveta i Južnoj Africi. Uprkos svom značaju u svetu vina, grožđe Cabernet sauvignon je relativno nova sorta, koja je nastala slučajnim ukštanjem dve francuske sorte Cabernet franc i Sauvignon blanc tokom 17. veka u jugozapadnoj Francuskoj (Radovanović et al., 2010). Osim u Francuskoj najviše se gaji u SAD, Južnoj Africi, Čileu, Novom Zelandu i Kini (Robinson et al., 2012). U Australiji, Cabernet sauvignon je druga po zastupljenosti zasađena crna sorta vinove loze, pored sorte Shiraz. Ova sorta je važna i za kupaže crvenog vina kao i vrhunska, regionalna i sortna vina (Robinson et al., 2012). Region Balkana ima moderne vinograde, od kojih je 80% zasađeno crnim vinski sortama, uključujući Cabernet sauvignon i Merlot kao i autohtone sorte Vranac, Kratošija i Prokupac (Radovanović et al., 2010). Kod nas se najviše gaji u Vojvodini i u centralnoj Srbiji. Formira veoma bujan čokot, međutim daje male prinose, retko veće od 8000 kg/ha.



Slika 18. Grožđe vinove loze sorte Cabernet sauvignon (Žunić et al., 2009)

Agrobiološke karakteristike sorte

- Epoha sazrevanja - grožđe sazreva u III epohi. Pozna sorta;
- Oplodnja - normalna i redovna;
- Koeficijent rodnosti - varira 1,1-1,4;
- Prinos grožđa - 6.000-8.000 kg/ha;
- Rezidba - zahteva dugu ili mešovitu rezidbu. Lukovi se režu na 10-12 okaca, a kondiri na 2 okca;
- Uzgojni oblici - pogodni su svi koji obezbeđuju mešovitu i dugu rezidbu;
- Tipovi zemljišta - najpogodnija su rastresita, propusna, šljunkovita, krečna, umereno plodna i topla zemljišta;
- Otpornost prema prouzrokovateljima važnijih bolesti - prema sivoj plesni je relativno dobro otporna. Prema plamenjači i pepelnici je srednje otporna;
- Otpornost prema niskim temperaturama - spada u grupu najotpornijih sorti prema niskim zimskim temperaturama. Okca izmrzavaju na -22 do -28°C;
- Afinitet prema loznim podlogama - dobar afinitet sa podlogama *Berlandieri x Riparia kober 5BB*, *Teleki 8B*, *Paulsen 1103* i dr. (Žunić et al., 2009).

Ova sorta ima mogućnost prilagođavanja različitim klimatskim uslovima, pri čemu srednja godišnja temperatura u najznačajnijim vinogorjima varira za 3,5°C, što je jedan od razloga rasprostranjenosti. Sorta poseduje normalan cvet (morfološki i funkcionalno hermafroditan), normalnu i redovnu oplodnju i grozd mase od 60 do 130 g. Grozd je mali ili srednje veličine, valjkastokonusan ili konusan često sa krilcem, zbijen ili srednje zbijen. Bobica grožđa vinove loze sorte Cabernet sauvignon je mala, okrugla ili malo izdužena, tamno plave boje, prekrivena često obilnim pepeljkom. Najbolji prinos daje kada se gaji na rastresitim, šljunkovitim, toplim i umereno vlažnim zemljištima (Milosavljević i Jović, 1999). Mehanički sastav grožđa vinove loze sorte Cabernet sauvignon prikazan je u Tabeli 6.

Tabela 6. Važnije uvološke karakteristike sorte Cabernet sauvignon (Žunić et al., 2009)

Sastav grozda (g)	Sastav bobice (g)
Masa grozda: 80,00-90,00	Masa pokožice: 7,00- 12,00
Broj bobica: 60-75	Masa semenki: 2,50-5,50
Masa bobica: 70,00-90,00	Masa mesa: 65,00-85,00
Masa šepurine: 3,50-5,50	
Struktura grozda (%)	
Šepurina: 3,00-4,50	Tvrđi ostatak
Pokožica: 8,00-11,00	(šepurina, pokožica i semenke): 13,00-16,00
Semenke: 2,00-4,50	Strukturni pokazatelj grozda
Meso: 75,00-80,00	(odnos mesa prema tvrdom ostatku): 4,00-6,00
Skelet: 11,00-15,00	

Tehnološke i senzorske karakteristike šire i vina

Groždani sok (šira) je bezbojan, prijatnog mirisa i ukusa sa primesom travnatih tonova. U groždanom soku može se akumulirati od 20 do 24% šećera, nekada i više u sušnim godinama. Titrabilni aciditet se kreće od 6,5 do 8,5 g/l izraženih kao vinska kiselina. Zbog visoke koncentracije šećera dobijaju se jaka vina sa većim % alkohola, harmonična, osvežavajuća, tamnoružičaste ili rubin boje i mirisom koji podseća na miris šumskih ljubičica (Milosavljević i Jović, 1999; Žunić et al., 2009). Vino sadrži od 12 do 14% alkohola i 6 do 8 g/l ukupnih kiselina izraženih kao vinska kiselina. Mlada vina su gruba i sirova i na tržište izlaze nakon odležavanja 2-3 godine u drvenim buradima i bačvama. U Francuskoj se proizvodi čuveno bordovsko vino u koje ulaze sorte Cabernet sauvignon, Cabernet franc i Merlot (Žunić et al., 2009).

4.3. Mikrovinifikacija

Primarna prerada i vinifikacija sprovedena je u prostorijama vinarije oglednog dobra Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, Radmilovac. Tehnološki proces prerade grožđa prve godine istraživanja (2016. godina), podrazumevao je dezintegraciju bobica uz odvajanje šepurine električnom muljačom (Griffo, Italija). Dobijeni kljuk je sulfitisano sa 5 g/100 kg slobodnog SO₂ (10 g K₂S₂O₅/100 kg) i tretiran komercijalnim pektinolitičkim enzimskim preparatima EXV (Lallemant, Kanada), Color plus (Enartis, Italija) i Caractère (Enartis, Italija) (pektinolitički enzim sa hemicelulaznom i β-glikozidaznom aktivnošću) u količini od 2 g/hl.

Nakon toga kljuk je zasejan čistom kulturom selekcionisanog vinskog kvasca BDX (Lallemant, Kanada) u količini 20 g/hl i podvrgnut alkoholnoj fermentaciji sa maceracijom na temperaturi 25±2°C uz dva potapanja dnevno (pigeage). Tečni deo je odvajan od komine odmah posle muljanja (kontrola), kao i posle 3, 5, 7, 14 i 21 dan od početka fermentacije. Godine 2018. prerada grožđa je bila identična, s tim što je mikrovinifikacija postavljena kao spontana i inokulisana sa vinskim selekcionisanim kvascima BDX, FX10, Qa23, a vreme maceracije je bilo isto. Iste godine druga varijanta ogleda obuhvatala je zasejavanje kvascem BDX uz dodatak enzimskih preparata EXV i CB, a maceracija je trajala isto 3, 5, 7, 14 i 21 dan.

Posle vinifikacije dobili smo uzorke vina kao i komplementarne uzorke komine koji su odvajani posle određenog perioda maceracije i zamrzavani do analiza. Kao kontrola dobijeno je vino koje je proizvedeno po tehnologiji proizvodnje belih vina (šira je odvojena odmah nakon muljanja), i odvojena komina koja je služila kao kontrola komine.

4.4. Korišćeni kvasci i enzimi za mikrovinifikaciju

4.4.1. Kvasac Uvaferm BDX (BDX)

Kvasac Uvaferm BDX: *Saccharomyces cerevisiae*, selekcionisali su ga u Bordou vodeći enološki instituti i Lallemant. Kvasac Uvaferm BDX selekcionisan je kako bi se postigli snažni, izražajni tipovi crvenog vina. Već u fazi samog započinjanja fermentacije kvasac Uvaferm BDX postiže mnogo bržu ekstrakciju boje u poređenju sa standardnim kvascima. Po pravilu se takav intenzitet ekstrakcije boje nastavlja do kraja fermentacije. Ćelijska struktura Uvaferm BDX-a odlikuje se neznatnom adsorpcijom boje crvenog vina i stoga se govori o "fermentaciji s BDX kvascem koja je vrlo obzirna prema boji". Optički doživljaj taloga kvasca takođe potvrđuje ove zaključke. Specifičan metabolizam Uvaferm BDX kvasca omogućuje povećanje kvaliteta crvenog vina i odlikuje se sledećim karakteristikama:

- pojačane ekstrakcije fenolnih jedinjenja;
- intenziviranje sortnog karaktera crvenih vina;
- posebnih enzimatskih aktivnosti ekstrakcije boje i tanina;
- daje strukturalna crvena vina;

- pospešuje biološku razgradnju jabučne kiseline;
- povećanje ukupnih kiselina u vrenju za oko +1g/l.

4.4.2. Kvasac Zimaflore FX10 (FX10)

Zimaflore FX10 je soj kvasca za crvena vina koji definiše njihovu eleganciju, kombinovanu strukturu, osećaj u ustima i intenzitet boje. Direktno oplemenjivanje poboljšalo je njegovu toleranciju na visoke temperature, osiguravajući tok fermentacije čak i u teškim uslovima. Posebno se preporučuje za proizvodnju vrhunskih vina kao što su Cabernet sauvignon i Merlot.

Karakteristike kvasca:

- Odlična sposobnost asimilacije fruktoze;
- Tolerancija na alkohol: do 16% vol.;
- Raspon temperatura: 20 - 35°C;
- Niske potrebe za azotnim jedinjenjima;
- Dobro oslobađanje polisaharida;
- Zadržava fenolni potencijal (strukturu i boju);
- Veoma pogodan za odležavanje na talogu;
- Naglašava „terroir“ (veoma slaba fermentaciona aroma).

4.4.3. Kvasac Lalvin Qa23 (Qa23)

Kvasac Lalvin Qa23 je selekcionisan u Portugalu, na Univerzitetu Tras os Montes e Alto Douro (UTAD) u saradnji sa vinogradarskom komisijom rejona Vinhos Verde.

Njegova aktivnost je dominantnija u odnosu na epifitnu mikrofloru koja bi mogla svojim nuz produktima spontane fermentacije bitno uticati na kvalitet vina u negativnom smislu. Kinetika fermentacije je jednolična, završava suvim vinom, u širokom temperaturnom rasponu. Optimalna temperatura fermentacije je 15-32°C, ali može se odvijati i na 10°C ako je katabolizam šećera kontrolisan od strane enologa. Ovaj kvasac može fermentisati i širu koja je vrlo siromašna azotom, odnosno šire bistrene centrifugiranjem, vakuum filtracijom ili jačim bistenjem. Ovo svojstvo daje kvascu Qa23 mogućnost da se koristi u fermentaciji mnogih belih vina.

Karakteristike kvasca:

- Ne peni, što omogućava maksimalno iskorišćenje kapaciteta;
- Kvasac odlično sedimentira, ostavljajući bistro vino;
- Alkoholna fermentacija do 13-14 vol.%;
- Stvara neznatnu količinu jedinjenja koji vežu SO₂, isparljive kiseline ispod 0,2 g/l, mala mogućnost stvaranja H₂S-a;
- Mala proizvodnja sekundarnih metabolita;
- Qa23 stvara prilikom rasta i razmnožavanja značajnu količinu enzima β-glukozidaze, koji oslobađa vezane terpene u muskatnim sortama dajući više voćnih aroma vinu.

4.4.4. Enzimski preparat EXV (EXV)

Lallzyme EXV je pektinolitički enzimski preparat sa vrlo aktivnom i koncentrisanom sekundarnom aktivnošću koja deluje na ćelijsku strukturu pokožice grožđa. Lallzyme EXV je razvijen sa svrhom poboljšanja ekstrakcije boje i tanina za vina koja će odležavati.

Lallzyme EXV je formulisan tako da brzo oslobađa groždani unutar ćelijski sadržaj radi sinergističkog efekta koncentrisane pektinaze i specifične aktivnosti liaze u cilju oslobađanja ostalih polisaharida iz ćelija grožđa.

Omogućava kompletno i brzo oslobađanje antocijana, veću efikasnost u oslobađanju tanina i njihovo kasnije vezivanje sa antocijanima, bolju stabilnost vina (boje i tela) i povećava oslobađanje sortnih aromatskih jedinjenja.

4.4.5. Enzimski preparat Cuvée blanc (CB)

Enzim Lallzyme Cuvée Blanc ima specifično delovanje na grožđe za vreme maceracije komine belog grožđa kao što je Sauvignon blanc, Semillon, Chardonnay i druge sorte u svrhu proizvodnje visokokvalitetnog belog vina bogatog na ukusu i intenzivnije punoće.

Lallzyme Cuvée blanc je specifična pektinaza komplementarne glukozidazne aktivnosti, ali male macerativne aktivnosti.

Pektinaze sa vrlo malom macerativnom aktivnošću omogućavaju bolje odvajanje vina od komine i bistrenje nakon presovanja, kao i limitiranje prevelike ekstrakcije intercelularnih komponenti. Radi svoje koncentrisane β -glukozidazne aktivnosti, enzim Cuvée blanc povećava aromatsku kompleksnost belih vina.

4.4.6. Enzimski preparat Color plus (CP)

EnartisZim Color plus (Enartis, Italija) je pektinolitički enzimski preparat bogat pektinazama i celulazom, hemicelulazne i proteazne sporedne aktivnosti koje deluju u sinergiji. Na taj način ubrzavaju i povećavaju ekstrakciju fenolnih jedinjenja (antocijanina i tanina, posebno) sadržanih u pokožici grožđa i promovišu njihovu stabilizaciju.

- Visoka koncentracija celulaznih i hemicelulaznih aktivnosti u EnartisZim Color plus brzo razgrađuju ćelijske zidove grožđa i povećavaju ekstrakciju fenola iz pokožice;
- Pektinolitičke aktivnosti poboljšavaju bistrenje i filtriranje;
- Kisela proteaza prisutna u EnartisZim Color plus je veoma efikasna u hidrolizi proteina grožđa, čime se ograničava njihova sposobnost taloženja tanina.

Vina tretirana EnartisZim Color plus su bogatija taninima od vina tretiranih tipičnom ekstrakcijom enzima, čime se poboljšava formiranje stabilnih bojenih kompleksa. EnartisZim Color plus prvenstveno ekstrahuje tanine vezane za polisaharide što daje izbalansirana vina sa dovoljno tanina koji garantuju dobru stabilizaciju boje. EnartisZim Color plus ne sadrži negativne sekundarne aktivnosti, kao što su oksidaze, antocijanaze i cinamilesteraze.

4.4.7. Enzimski preparat Caractère (Car)

Rezultat eksperimentisanja koje je sprovedla Enartis Research and Development, EnartisZim Caractère (Enartis, Italija) je enzimski preparat posebno razvijen za povećanje ekspresije aromatičnih prekursora belog ili crnog grožđa, sokova ili vina. Visoka koncentracija pektinolitičkih i hemicelulaznih aktivnosti u EnartisZim Caractère dopunjena enzimima koji su prirodno prisutni u grožđu utiču na brzu razgradnju ćelijskih zidova i smanjuju viskozitet soka. Prisutna β -glukozidazna bočna aktivnost u EnartisZim Caractère omogućava oslobađanje i ekspresiju glikozilovanih aromatičnih prekursora prirodno prisutnih u grožđu. EnartisZim Caractère ne sadrži negativne sekundarne aktivnosti, kao što su oksidaze i cinamilesteraze.

4.5. Ispitivanje uticaja različitog stepena zrelosti grožđa na fenolni sastav vina i komine

Grožđe vinove loze sorte Cabernet sauvignon, koje pripada OD Poljoprivrednog fakulteta „Radmilovac“ je ubrano u tri faze zrelosti (šarak, puna zrelost i prezrelost). U fazi šarka grožđe je ubrano poslednje nedelje avgusta. Oko 5 kg grožđa je izmuljano uz odvajanje šepurine, sulfitisano sa 10 g kalijum metabisulfit (K₂S₂O₅) na 100 kg i zasejano kulturom vinskog selekcionisanog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (BDX, Lallemand, Kanada). Pre toga izmerena je količina šećera

u širi pomoću Eksleovog (Oechle) širomera, kao i količina ukupnih titrabilnih kiselina metodom neutralizacije pomoću NaOH. Sadržaj šećera u širi je iznosio 19,4%, dok je sadržaj kiselina u širi u fazi šarka bio 7,10 g/l. Pre maceracije i vinifikacije izvršena je popravka sadržaja šećera u širi na 24,0% dodatkom saharoze. Maceracija je trajala 21 dan uz potapanje dva puta dnevno (postupkom pigeage) na temperaturi $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, nakon fermentacije odvojena komina, a mlado vino ostavljeno u sudu za fermentaciju do flaširanja.

Grožđe u fazi pune zrelosti je ubrano prve nedelje oktobra kada je količina šećera bila 23,5%, a sadržaj titrabilnih kiselina 6,50 g/l. Prerada grožđa obavljena je po istom principu kao za fazu šarka, ali bez popravke sadržaja šećera u širi.

Treća berba obavljena je 21 dan nakon berbe pune zrelosti. Tada je sadržaj šećera u širi iznosio 24,7%, a sadržaj titrabilnih kiselina je bio 4,20 g/l. Ubrano grožđe je prerađeno po istom postupku kao za prethodne dve berbe (šarak i puna zrelost), bez popravke sadržaja šećera i kiselina.

Dobijena vina, posle nege i odležavanja od 6 meseci, su pripremljena za snimanje na LC-MS/MS (Agilent LCTQ 6495C Triple Quadrupole). Pripremanje uzoraka, ekstrakcijom na čvrstoj fazi (više u poglavlju 4.17.), obavljeno je u laboratoriji za Organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

4.6. Ispitivanje uticaja zahvaćenosti grožđa sivom plesni *Botrytis cinerea* na fenolni sastav vina

Za potrebe ovog oglada upotrebljeno je zdravo i plesnivo grožđe koje je zahvaćeno sivom plesni *Botrytis cinerea* sorte Cabernet sauvignon koje vodi poreklo iz vinograda koji pripada vinariji Trišić u Vraniću nadomak Beograda (Beogradsko vinogorje). Zdravo i plesnivo grožđe je izmuljano, odvojena šepurina, kljuk sulfitisana sa 10 g/hl kalijum metabisulfita i zasejan kvascem BDX (Lallemend, Kanada) u količini 20 g/hl.

Fermentacija je obavljena po metodi mikroviniifikacije na $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, vina su odvojena od komine posle 14 dana i razlivena u balone. Mlada vina su odvojena od taloga pretakanjem u boce (0,75l) i ostavljena da odležavaju. Nakon mesec dana izvršeno je prvo pretakanje i korekcija SO_2 , a za dva meseca i drugo pretakanje.

4.7. Ispitivanje uticaja različitog pritiska ceđenja prevrele komine na fenolni sastav vina i komine

Za potrebe ovog oglada korišćeno je grožđe vinove loze sorte Cabernet sauvignon koje vodi poreklo iz vinograda u okolini Lazarevca koji pripada vinariji Carpe Diem. Maceracija je trajala 14 dana, a sadržaj šećera u širi je iznosio 23,5%.

Komina je presovana pri različitim pritiscima od 0,5 bara, 1 bar i 1,5 bar, kako bi se utvrdio uticaj različitog pritiska presovanja komine na fenolni sastav vina (17 fenolnih jedinjenja) i vršeno je poređenje sa uzorcima samotoka (kontrola), vina dobijenog bez pritiska tj. bez presovanja komine. Uporedo sa ispitivanjem uzoraka vina urađena je i ekstrakcija uzoraka prevrele komine zaostale nakon presovanja različitim pritiscima. Ceđenje je obavljeno na horizontalnoj pneumatskoj cednici kapaciteta 600 kg kljuka (Zambelli PN Zeta 6, Italija).

4.8. Uticaj različitih selekcionisanih vinskih kvasaca (BDX, FX10, Qa23), enzimskih preparata (EXV, CP, Car, CB) i spontane fermentacije na kinetiku ekstrakcije fenolnih jedinjenja i antioksidativni kapacitet vina

Kontrolni uzorci vina 2018. godine dobjeni su odvajanjem komine od šire prvog dana, tj. odmah nakon muljanja po principu tehnološkog procesa proizvodnje belih vina. Ogladi mikroviniifikacije za sve uzorke vina 2018 postavljeni su uz zasejavanje kulture selekcionisanih vinskih kvasaca BDX, FX10, Qa23 bez dodatka enzimskih preparata i ogled spontane fermentacije

bez dodatka kulture čistog kvasca kao i bez dodatka enzimskih preparata. Proizvodnja vina 2018. po ovim varijantama ogleđa odlikovala se i različitom dužinom trajanja maceracije (tri, pet, sedam, četrnaest i dvadesetjedan dan).

Analizirana je dinamika ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja, ukupnih fenolnih jedinjenja kao i određivanje antiradikalnog i antioksidativnog kapaciteta, tokom različitih perioda maceracije i primene spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10, Qa23).

Prilikom proizvodnje svih pomenutih eksperimentalnih vina zaostala je prevrela komina koja je zamrzavana do njenih daljih analiza.

Tokom maceracije dolazi do ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz čvrstih delova grožđa (komine) u tečni deo (širu). Sva ta fenolna jedinjenja ekstrahuju se određenom brzinom u određenom momentu maceracije. Vršena je analiza pojedinih fenolnih jedinjenja u vinu (galna kiselina, elaginska kiselina, kafeinska kiselina, katehin, epikatehin, kvercetin, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, *p*-kumarinska kiselina, protokatehuinska kiselina, siringinska kiselina, vanilinska kiselina) i određena je njihova brzina ekstrakcije tokom maceracije, dani njihove maksimalne ekstrakcije, kao i maksimalne ekstrahovane količine.

Jedinjenja analizirana u komini su bila derivati benzoeve kiseline, derivati hidroksicimetne kiseline, flavan-3-oli, flavonoli i flavanoni (kvercetin, kemferol i naringenin) i od stilbena *trans*-resveratrol.

4.9. Ispitivanje uticaja hraniva za kvasce na fenolni sastav vina

Za potrebe ovog ogleđa korišćeno je grožđe vinove loze sorte Cabernet sauvignon koje vodi poreklo sa OD „Radmilovac”. Ubrano je u stanju pune zrelosti, sadržaj šećera je bio 23,5%, a sadržaj titrabilnih kiselina 6,50 g/l izraženih kao vinska kiselina. Grožđe je izmuljano, odvojena šepurina i sulfitisano sa 10 g vinobrana (K₂S₂O₅) na 100 kg. Postavljena su dva ogleđa mikroviniifikacije od po 5 kg grožđa. Prvi ogled podrazumevao je zasejavanje kljuka selekcionisanim vinskim kvascem BDX (Lallemmand, Kanada) u količini 20 g/hl i dodatak amonijačnog hraniva posle tri dana u količini od 15 g/hl. U drugom ogleđu mikroviniifikacije izvršeno je zasejavanje istim kvascem i dodato je aminokiselinsko hranivo u količini 15g/hl posle tri dana. Mikroviniifikacija je sprovedena po sistemu pigeage, gde je vršeno potapanje dva puta dnevno. Posle 14 dana maceracije, otočeno je mlado vino i prebačeno u staklene balone od 5l da bi se dovršilo vrenje. Posle završene fermentacije vino je flaširano u boce zapremine 0,75l do analiza. Dobijeno vino je poređeno sa vinom dobijenim uz selekcionisani kvasac BDX bez dodatka hraniva. Sva vina su analizirana LC-MS/MS tehnikom i izvršena kvantifikacija pojedinih fenolnih jedinjenja. Izvršeno je poređenje sadržaja 13 fenolnih jedinjenja (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska, elaginska, kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, katehin, epikatehin, kvercetin i *trans*-resveratrol) u kontroli i vinima kojima su dodati nutritijenti tokom fermentacije.

4.10. Primena termičke maceracije

Ogledi vezani za termičku maceraciju su postavljeni na OD Radmilovac, odakle i grožđe vodi poreklo. Grožđe vinove loze sorte Cabernet sauvignon je ubrano u stanju pune zrelosti, sadržaj šećera je bio 23,5%, a sadržaj titrabilnih kiselina 6,50 g/l izraženih kao vinska kiselina. Grožđe za klasičnu maceraciju uz potapanje (pigeage) je izmuljano, odvojena šepurina i sulfitisano sa 10 g vinobrana (K₂S₂O₅) na 100 kg. Kljuk je zasejan selekcionisanim vinskim kvascem BDX (Lallemmand, Kanada) u količini 20 g/hl. Odvojeno je oko 6 kg grožđa za termičku maceraciju koje je podeljeno na dva dela i izmuljano. Prvi deo je izložen temperaturi od 60°C 60 minuta, dok je drugi deo izložen temperaturi od 80°C 30 minuta. Posle toga kljuk je ohlađen na temperaturu oko 25±2°C i zasejan selekcionisanim vinskim kvascem BDX (Lallemmand, Kanada) u količini 20 g/hl.

Maceracija i fermentacija u kontrolnom uzorku i u uzorcima termičke maceracije je trajala 14 dana uz dva potapanja dnevno. Nakon toga komina je odvojena i šira razlivena u staklene balone. Posle 15 dana mlado vino je odvojeno od taloga i pretočeno u flaše (0,75l) i ostavljeno da odležava do analiza.

4.11. Primena karbonske maceracije

Za potrebe ovog eksperimenta bilo je potrebno oko 5 kg grožđa vinove loze sorte Cabernet sauvignon. Cele bobice su odvojene od šepurine u mikrovinifikator i dodat je suvi led kako bi otpočela karbonska maceracija. Preko je postavljen poklopac da bi atmosfera oko bobica bila zasićena ugljen-dioksidom. Posle 3 dana izvršeno je zasejavanje selekcionisanim vinskim kvascem (BDX, Lallemand, Kanada) u količini 20 g/hl, a posle 7 dana izvršeno je odvajanje vina od celih bobica, padom pod dejstvom gravitacione sile. Kao kontrola iskorišćeno je vino koje je dobijeno klasičnom maceracijom koja je trajala takođe 7 dana, a zasejavanje je izvršeno istim vinskim selekcionisanim kvascem. Posle šest meseci odležavanja vina u boci, izvršena je kvantifikacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja.

4.12. Ispitivanje uticaja različitih sredstava za bistrenje na fenolni sastav vina

Od sredstava za bistrenje, a u cilju ispitivanja njihovog uticaja na fenolni sastav vina, korišćeni su želatin u količinama 5 g/hl i 10 g/hl, riblji mehur u količinama 10 g/hl i 20 g/hl, kalijum kazeinat (10 g/hl i 15 g/hl) i albumin (5 g/hl i 10 g/hl). Ogledi su postavljeni na vinima od grožđa sorte vinove loze Cabernet sauvignon, čija je maceracija i fermentacija trajala 14 dana uz dodatak EXV (Lallemand, Kanada) enzimskog preparata i BDX (Lallemand, Kanada) selekcionisanog vinskog kvasca i posle njihovog odležavanja u flašama (0,75l) godinu dana. Tretiranje bistrilima izvršeno je u laboratorijskim uslovima (Laboratorija za konzervisanje i vrenje Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu), na zapremini od 200 ml vina. Posle procedure za pripremu uzorka (Poglavlje 4.17.), izvršena je kvantifikacija pojedinih fenolnih jedinjenja LC-MS/MS tehnikom (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska, elaginska, kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, katehin, epikatehin, kvercetin, naringenin i *trans*-resveratrol).

4.13. Ispitivanje uticaja stabilizacije vina na fenolni sastav (askorbinska kiselina, SO₂, malolaktička fermentacija, pasterizacija)

Ovi eksperimenti su obuhvatili kvantifikaciju 14 fenolnih jedinjenja, i to derivata benzoeve kiseline (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska i elaginska kiselina), derivata hidroksicimete kiseline (kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina), katehin, epikatehin, kvercetin, naringenin i *trans*-resveratrol.

4.13.1. Ispitivanje uticaja askorbinske kiseline na fenolni sastav vina

Eksperimenti su postavljeni u laboratorijskim uslovima za koje je bilo neophodno 200 ml vina, koje je proizvedeno na Ogladnom dobru "Radmilovac", uz maceraciju i fermentaciju od 21 dan i uz dodatak BDX vinskog selekcionisanog kvasca i EXV enzimskog preparata. Tokom dezintegracije bobica, kljuk je sulfitisan sa 10 g vinobrana na 100 kg. Prilikom flaširanja nivo slobodnog SO₂ je podešen na oko 30 mg/l. Vino je odležavalo šest meseci i posle toga se pristupilo analizama. Takvo vino je poslužilo kao kontrolni uzorak koji je poređen sa istim vinom kome je dodato 200 mg/l askorbinske kiseline, sa ciljem ispitivanja uticaja askorbinske kiseline na koncentracije pojedinih fenolnih jedinjenja prisutnih u vinu. Pošto je tokom odležavanja vina došlo do pada nivoa slobodnog SO₂, pre dodavanja askorbinske kiseline nivo slobodnog SO₂ je podešen na 30 mg/l. Analizirano je 14 fenolnih jedinjenja među kojima su derivati benzoeve kiseline (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska i elaginska kiselina), derivati

hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska, kafeinska i ferulinska kiselina), katehin, epikatehin, kvercetin, naringenin i *trans*-resveratrol.

4.13.2. Ispitivanje uticaja SO₂ na fenolni sastav vina

Eksperimenti su postavljeni u laboratorijskim uslovima na 200 ml vina, koje je proizvedeno na OD "Radmilovac", uz maceraciju i fermentaciju od 21 dan uz dodatak BDX vinskog selekcionisanog kvasca i EXV enzimskog preparata. Tokom dezintegracije bobica, izmuljano grožđe je sulfitisano sa 10 g vinobrana na 100 kg. Tokom nege i odležavanja vina nivo slobodnog SO₂ je bio oko 30 mg/l. Takvo vino je poslužilo kao kontrolni uzorak koji je poređen sa istim uzorcima vina kome su dodate rastuće koncentracije vinobrana od 3 g/hl, 5 g/hl i 7 g/hl, a sve sa ciljem ispitivanja uticaja slobodnog SO₂ na koncentracije pojedinih fenolnih jedinjenja prisutnih u vinu. Analizirano je 14 fenolnih jedinjenja među kojima su derivati benzoee kiseline (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska i elaginska kiselina), derivati hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska, kafeinska i ferulinska kiselina), katehin, epikatehin, kvercetin, naringenin i *trans*-resveratrol.

4.13.3. Ispitivanje uticaja malolaktičke fermentacije na fenolni sastav vina

Eksperimenti vezani za ovo ispitivanje su postavljeni u Laboratoriji za konzervisanje i vrenje Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu. U cilju ispitivanja uticaja bakterija mlečnog vrenja na fenolni sastav vina izvršeno je zasejavanje kulturama *Lactobacillus plantarum* (ML Prime; 0,1 g/l) i *Oenococcus oeni* (VP41; 0,01 g/l) uzoraka Cabernet sauvignon vina koje je proizvedeno metodom mikroviniifikacije na Ogladnom dobru Poljoprivrednog fakulteta, "Radmilovac". Prilikom maceracije korišćen je enzimski preparat EXV (Lallemand, Kanada), a zasejavanje izvršeno vinskim selekcionisanim kvascem BDX (Lallemand, Kanada). Probe su vršene na 200 ml vina, zatim termostahirane na 28°C oko 3 meseca. Kasnije je izvršeno poređenje sa kontrolnim uzorkom vina koje je bilo u istim uslovima skladištenja ali u kome nije izazvano malolaktičko vrenje. Pre analiza, vino je odnegovano i odležalo oko 6 meseci u boci (0,75l).

4.13.4. Ispitivanje uticaja pasterizacije na fenolni sastav vina

Eksperimenti su postavljeni u Laboratoriji za konzervisanje i vrenje Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu. Za potrebe ovog eksperimenta odmereno je dva puta po 200 ml vina, koje je proizvedeno na OD "Radmilovac", uz maceraciju i fermentaciju od 21 dan i uz dodatak BDX vinskog selekcionisanog kvasca i EXV enzimskog preparata. Vino je odležavalo šest meseci i posle toga se pristupilo analizama. Prvih 200 ml tog vina poslužilo je kao kontrola, dok je drugih 200 ml vina bilo izloženo pasterizaciji 20 minuta na 60°C u vodenom kupatilu. Posle toga vino je pripremljeno za LC-MS/MS tehniku snimanja (Poglavlje 4.17.).

4.14. Poređenje sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja u vinima različitih berbi 2016. i 2018. godine

Istraživanja 2016. i 2018. godine podrazumevala su identične eksperimente radi poređenja vina u pogledu sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja. Posle muljanja grožđa i sulfitisanja (10 g/hl vinobrana) izvršeno je zasejavanje kljuka kulturom selekcionisanog vinskog kvasca BDX (20 g/hl), a pre toga u kljuk je dodat enzimski preparat EXV (2 g/hl). Za obe godine istraživanja postavljeni su ogledi mikroviniifikacije gde je maceracija trajala 3, 5, 7, 14 i 21 dan, nakon čega je odvojeno vino koje je flaširano u boce od 0,75l. Nakon 6 meseci odležavanja izvršena je kvantifikacija fenolnih jedinjenja.

Izvršeno je poređenje sadržaja 12 fenolnih jedinjenja (galne kiseline, protokatehuinske kiseline, *p*-hidroksibenzoee kiseline, katehina, vanilinske kiseline, kafeinske kiseline, siringinske

kiseline, epikatehina, *p*-kumarinske kiseline, elaginske kiseline, ferulinske kiseline i kvercetina u vinima iz 2016. i vinima 2018. godine uz kombinaciju istog selekcionisanog vinskog kvasca BDx i enzimskog preparata EXV.

4.15. Ispitivanje uticaja starosti zasada vinograda na fenolni sastav vina

Za potrebe ovog oglada vršeno je poređenje vina od grožđa koje potiče iz tri vinograda. Grožđe koje je važno kao uzorak iz mladog vinograda potiče iz vinograda vinarije "Carpe Diem" iz okoline Lazarevca, grožđe iz srednje starog vinograda dobijeno je iz vinarije Trišić iz Vranića, i grožđe starog vinograda ubrano je na OD Poljoprivrednog fakulteta "Radmilovac". Za sve uzorke grožđa obavljena je identična mikroviniifikacija uz zasejavanje BDx selekcionisanim vinskim kvascem (20 g/hl) i standardno sulfitanje (10 g vinobrana na 100 kg kljuka). Maceracija je trajala 14 dana nakon čega je odvojeno mlado vino u staklene balone od 5l. Nakon završene fermentacije vino je flaširano u staklene buteljke zapremine 0,75 l i ostavljeno da odležava do analiza.

Izvršeno je poređenje sadržaja 13 fenolnih jedinjenja (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska, elaginska, kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, katehin, epikatehin, kvercetin i *trans*-resveratrol).

4.16. Ispitivanje uticaja odležavanja vina u različitim sudovima na fenolni sastav

Za potrebe ovog oglada analizirana je promena fenolnog sastava vina od grožđa sorte vinove loze Cabernet sauvignon tokom dvogodišnjeg odležavanja u tankovima od nerđajućeg čelika (500 l), drvenim bačvama (500 l), bariku (225 l) i staklenim buteljicama (0,75 l). Analizirano je 13 fenolnih jedinjenja (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska, elaginska, kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, katehin, epikatehin, kvercetin i *trans*-resveratrol).

4.17. Priprema uzoraka vina i komine sorte vinove loze Cabernet sauvignon za analizu LC-MS/MS tehnikom

Da bi fenolna jedinjenja mogla da se detektuju i kvantifikuju u izabranim uzorcima vina Cabernet sauvignon neophodno ih je odvojiti od pratećih komponenti, koncentrovati i prečistiti. Eksperimentalno je utvrđeno da je za to najpogodnija ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. Solid Phase Extraction, SPE) po postupku koji se sastoji od sledećih pet koraka:

1. Kondicioniranje: Propušta se 5 ml metanola kroz čvrsti sorbens (Oasis HLB bcc/200 μm), čime se omogućava njegovo aktiviranje;
2. Ekvilibracija: Kroz aktivirani čvrsti sorbens se propušta 5 ml dejonizovane vode;
3. Nanošenje uzorka: Propušta se uzorak (5 ml) u kome se nalaze analiti i za sorbent se vezuju komponente uzorka;
4. Ispiranje: Kroz sorbent za koji su vezane komponente uzorka propušta se dejonizovana voda (2 ml), čime se odstranjuju komponente matriksa, dok analiti od interesa ostaju vezani za sorbent;
5. Eluiranje analita: Kroz sorbent za koji su vezani analiti propušta se metanol (2 ml) koji ima jaku eluacionu moć, odnosno sposobnost da raskine veze između analita i sorbenta, čime se željeni analiti prevode u rastvor.

Priprema uzoraka komine je vršena na sledeći način:

1. Odmeravanje uzoraka prevrele komine;
2. Liofilizacija uzoraka prevrele komine;
3. Ekstrakcija liofilizovanih uzoraka u smeši metanol/voda (1:1) 30 minuta na vodenom kupatilu (Bandelin Electronic Sonorex), a zatim reekstrakcija 15 minuta i ceđenje dobijenog filtrata pomoću filter papira;

4. Uparavanje dobijenih filtrata na rotirajućem vakuum uparivaču (IKA RV 10 basic) do suvog ostatka;
5. Merenje dobijenog suvog ekstrakta i rastvaranje u 12% etanolu i dobijanje uzorka nalik imitaciji vina.

Dobijeni uzorci komine su pripremljeni za analizu LC-MS/MS tehnikom pomoću već opisane ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE).

4.17.1. Liofilizacija

Liofilizacija uzoraka prevrele komine i pokožice svežeg grožđa urađena je na laboratorijskom liofilizatoru Christ Alpha 2-4 LD plus (Osterode am Harz, Germany). Temperatura liofilizacije bila je podešena na -80°C . Za ceo proces sušenja bilo je potrebno 2-3 puta po 24h u zavisnosti od samog uzorka. Liofilizovani uzorci su čuvani na -20°C do ekstrakcije.

4.18. Priprema uzoraka pokožice i semenke za ekstrakciju i određivanje fenolnog sastava LC-MS/MS tehnikom

Priprema uzoraka je obavljena u laboratoriji Odeljenja za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta u Beogradu.

4.18.1. Ekstrakcija iz pokožice

Uzorci grožđa vinove loze sorte Cabernet sauvignon su ubrani u fazi šarka, pune zrelosti i prezrelosti i zamrznuti do daljih analiza. Sa zamrznutih bobica odvojena je pokožica za sve tri faze zrelosti, koja je potom liofilizovana. Liofilizovana pokožica je homogenizovana i usitnjena pomoću električnog mlina da bi se dobio praškast uzorak. Odmeren je 1 g homogenizovanog uzorka pokožice na tehničkoj vagi i rastvoren u 10 ml smeše metanol/voda (1:1). Pomoću vodenog kupatila (Bandelin Electronic Sonorex) pokožica je ekstrahovana 1h u datoj smeši. Dobijeni ekstrakt je profiltriran preko kvalitativnog filter papira, a zatim kroz filter veličine pora $0,45\ \mu\text{m}$. Tako profiltriran uzorak je pomoću šprica prebačen u vijale zapremine 2 ml koje su čuvane u frižideru do analiza.

4.18.2. Ekstrakcija iz semenki

Odmereno je po 1g celih semenki uzoraka grožđa za sve tri faze zrelosti (šarak, puna zrelost, prezrelost) na tehničkoj vagi u staklenim vijalama od 12 ml. Semenke su ekstrahovane pomoću smeše metanol/voda u odnosu 1:1, odnosno prelivene sa po 5 ml metanola i 5 ml dejonizovane vode. Ekstrakcija je vršena 1h na vodenom kupatilu (Bandelin Electronic Sonorex), a ostatak postupka je identičan kao za pripremu ekstrakta pokožice.

Za pripremu uzoraka korišćen je metanol HPLC čistoće i dejonizovana voda.

4.19. LC-MS/MS

Analiza je urađena na tačnom hromatografu Agilent 1290 Infinity II LC System sa binarnom pumpom u kombinaciji sa trostrukim kvadripolom (Agilent LCTQ 6495C Triple Quadrupole) Komponente su razdvajane na koloni Zorbax Rapid Resolution C18, $50 \times 4,6\ \text{mm}$, $1,8\ \mu\text{m}$ (Agilent Technologies, US) u sistemu 0,1% (v/v) mravlja kiselina u metanolu (A) i 0,1% (v/v) mravlja kiselina u vodi (B) u gradijentnom režimu rada: 0 min - 95%B, 2 min - 95%B, 10 min- 50%B, 12 min - 30%B; 20 min - 10%B; protok mobilne faze $0,40\ \text{ml/min}$; temperatura kolone 40°C ; injekciona zapremina standardnih rastvora i uzoraka $2\ \mu\text{l}$.

Parametri za kvantifikaciju komponenata masenim spektrometrom, uključujući jonizacioni mod, napone na konusu, kolizione energije i karakteristične prelaze jona (MRM, multiple reaction monitoring mode), prikazani u Tabeli 7, dobijeni pomoću *MassHunter Optimizire* softvera (Agilent Technology 2020). Uslovi jonskog izvora pri kojima je vršeno snimanje: temperatura

desolvacionog gasa: 200°C, protok gasa: 14 l/min, pritisak na raspršivaču (Nebulizer): 20 psi; protok pomoćnog gasa/temperatura (Sheath Gas Temp./Flow): 300 °C/ 11 l/min; napon na kapilari, 3000 V (negativni mod jonizacije). Napon mlaznice (Nozzle voltage): 1500V.

Tabela 7. Uslovi MS/MS snimanja i MRM prelazi

Jedinjenje	Molekulska formula	Masa (g/mol)	Jonizacioni režim, ESI	Prelaz MRM	Ener. Frag. (V)	Koliziona energija (V)	t _r - retenciono vreme (min)
Galna kiselina	C ₇ H ₆ O ₅	170	-	169→125	166	10	3,90
Protokatehuinska kiselina	C ₇ H ₆ O ₄	154	-	153→109	166	9	7,50
Katehin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	-	289→245	166	10	9,90
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	C ₇ H ₆ O ₃	138	-	137→93	166	10	9,70
Vanilinska kiselina	C ₈ H ₈ O ₄	168	-	167→108	166	15	10,90
Kafeinska kiselina	C ₉ H ₈ O ₄	180	-	179→135	166	10	11,10
Epikatehin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	-	289→245	166	10	11,52
Hlorogenska kiselina	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354	-	355→163	166	12	2,60
Siringinska kiselina	C ₉ H ₁₀ O ₅	198	-	197→182	166	7	11,60
<i>p</i> -kumarinska kiselina	C ₉ H ₈ O ₃	164	-	163→119	166	9	12,70
Vanilin	C ₈ H ₈ O ₃	152	-	151,1→92	166	21	11,80
Ferulinska kiselina	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194	-	193→134	166	11	13,20
<i>trans</i> -resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228	-	227→185	166	20	14,30
Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610	-	609→300	166	42	14,07
Elaginska kiselina	C ₁₄ H ₆ O ₈	302	-	301→145	166	35	14,50
Kvercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302	-	301→151	166	15	15,60
Kemferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286	-	285→285	166	0	16,40
Miricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318	-	317→151	166	24	4,60
Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272	-	271→151	166	16	15,70

U cilju identifikacije i određivanja sadržaja izabranih fenolnih jedinjenja (galna kiselina, protokatehuinska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, katehin, hlorogenska kiselina, vanilinska kiselina, kafeinska kiselina, siringinska kiselina, epikatehin, vanilin, *p*-kumarinska kiselina, elaginska kiselina, ferulinska kiselina, rutin, miricetin, *trans*-resveratrol, kvercetin, naringenin i kemferol) u ispitivanim uzorcima vina, komine, pokožice i semenke snimani su metanolni rastvori

navedenih jedinjenja koncentracija 0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,67; 1,00; 1,50; 2,00 $\mu\text{g/ml}$ za pokožicu i semenke i 0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00 $\mu\text{g/ml}$ za uzorke vina i komine, u istim uslovima pod kojima su snimani uzorci.

Identifikacija jedinjenja na hromatogramu uzorka je rađena poređenjem MRM prelaza uzorka sa MRM prelazom standarda, kao i poređenjem vremena zadržavanja (t_r) odgovarajućeg pika u odnosu na retenciono vreme standarda. Ukoliko je t_r odgovarajućeg pika u opsegu $\pm 0,1$ min u odnosu na t_r standarda, onda se može smatrati da je identifikacija pozitivna.

Na osnovu kalibracionih pravih, koje su konstruisane kao zavisnost površine signala date supstance za odgovarajući prelaz od koncentracije supstance u standardnom rastvoru, izračunat je sadržaj ispitivanih fenolnih jedinjenja u analiziranim uzorcima vina i komine grožđa, kao i uzoraka pokožice i semenke.

Linearna regresiona analiza, LOD i LOQ za kvantifikovana jedinjenja

Linearnost je dobijena na osnovu šest kalibracionih standardnih rastvora fenolnih jedinjenja pravljenih u duplikatu. Za ocenu linearnosti korišćen je koeficijent korelacije (R^2 , zahtev $R^2 > 0,99$) za kvadratnu zavisnost odgovora detektora od koncentracije. Granica detekcije (LOD) je određena kao odnos signala i šuma ($S/N=10$) korišćenjem MassHunter softvera (Agilent Technologies), a za granicu detekcije (LOQ) je uzeta najniža tačka kalibracije, što je prikazano u tabelama (Tabela 8-11).

Tabela 8. Koeficijenti korelacije i granice detekcije za standarde pojedinih fenolnih jedinjenja prilikom njihove kvantifikacije u uzorcima vina

Jedinjenja u vinu	R²	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
Galna kiselina	0,9936	0,020	0,05
Protokatehuinska kiselina	0,9946	0,007	0,02
Katehin	0,9977	0,014	0,02
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,9940	0,011	0,02
Vanilinska kiselina	0,9966	0,050	0,10
Kafeinska kiselina	0,9964	0,022	0,05
Epikatehin	0,9966	0,010	0,05
Siringinska kiselina	0,9966	0,010	0,02
Hlorogenska kiselina	0,9905	0,004	0,02
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,9944	0,004	0,02
Vanilin	0,9970	0,026	0,05
Ferulinska kiselina	0,9946	0,004	0,02
<i>trans</i> -resveratrol	0,9928	0,010	0,02
Rutin	0,9935	0,003	0,02
Elaginska kiselina	0,9973	0,020	0,05
Kvercetin	0,9927	0,005	0,02
Kemferol	0,9942	0,002	0,02
Miricetin	0,9920	0,002	0,02
Naringenin	0,9922	0,010	0,02

Tabela 9. Koeficijenti korelacije i granice detekcije za standarde pojedinih fenolnih jedinjenja prilikom njihove kvantifikacije u uzorcima ekstrakta kumine

Jedinjenja u komini	R ²	LOD		LOQ	
		µg/g liof.	µg /kg sveže	µg /g liof.	µg /kg sveže
Galna kiselina	0,9936	0,1	26,70	0,25	66,70
Protokatehuinska kiselina	0,9946	0,035	9,33	0,10	26,66
Katehin	0,9977	0,07	18,70	0,10	26,70
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,9940	0,055	14,70	0,10	26,70
Vanilinska kiselina	0,9966	0,25	66,70	0,50	133,33
Kafeinska kiselina	0,9964	0,11	29,33	0,25	66,70
Epikatehin	0,9966	0,05	13,33	0,25	66,70
Siringinska kiselina	0,9966	0,05	13,33	0,10	26,70
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,9944	0,02	5,33	0,10	26,70
Vanilin	0,9970	0,13	34,70	0,25	66,70
Ferulinska kiselina	0,9946	0,02	5,33	0,10	26,70
<i>trans</i> -resveratrol	0,9928	0,05	13,33	0,10	26,7
Rutin	0,9935	0,015	4,00	0,10	26,70
Elaginska kiselina	0,9973	0,1	26,70	0,25	66,70
Kvercetin	0,9927	0,025	6,70	0,10	26,7
Kemferol	0,9942	0,01	2,70	0,10	26,70
Naringenin	0,9922	0,05	13,33	0,10	26,70

Tabela 10. Koeficijenti korelacije i granice detekcije za standarde pojedinih fenolnih jedinjenja prilikom njihove kvantifikacije u uzorcima ekstrakta pokožice

Jedinjenja u pokožici	R ²	LOD		LOQ	
		µg /g liof.	µg /kg sveže	µg /g liof.	µg /kg sveže
Galna kiselina	0,9994	0,2	63,70	0,5	159,24
Katehin	0,9992	0,14	44,6	0,2	63,70
Epikatehin	0,9994	0,1	31,90	0,5	159,24
Siringinska kiselina	0,9988	0,1	31,90	0,2	63,70
<i>trans</i> -resveratrol	0,9996	0,1	31,90	0,2	63,70
Kvercetin	0,9988	0,05	15,92	0,2	63,70
Naringenin	0,9986	0,1	31,90	0,2	63,70

Tabela 11. Koeficijenti korelacije i granice detekcije i kvantifikacije za standarde pojedinih fenolnih jedinjenja prilikom njihove kvantifikacije u uzorcima ekstrakta semenke

Jedinjenja u semenkama	R ²	LOD		LOQ	
		µg /g	µg /kg	µg /g	µg /kg
Galna kiselina	0,9994	0,2	200,0	0,5	500,0
Katehin	0,9992	0,14	140,0	0,2	200,0
Epikatehin	0,9994	0,1	100,0	0,5	500,0

4.20. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorcima vina i ekstrakta komine metodom po Folin-Ciocalteu

Ovo je spektrofotometrijska metoda za koju je neophodan Folin-Ciocalteu reagens, koji predstavlja smešu fosfovolframove (H₃PW₁₂O₄₀) i fosfomolibdenske (H₃PMo₁₂O₄₀) kiseline. Za ovu metodu potrebno je konstruisanje standardne krive snimanjem absorbancije matriks rastvora sa rastućim koncentracijama galne kiseline (6,5 g/l vinske kiseline u 12 %v/v etanolu). Absorbancija je očitana na talasnoj dužini 720 nm na spektrofotometru HALO DB-20S (Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija).

Postupak za vino:

U normalni sud od 100 ml se doda 75 ml destilovane vode, zatim 1 ml vina (za crveno razblaženje 1:5), potom 5 ml rastvora Folin-Ciocalteu, 10 ml zasićenog rastvora Na₂CO₃ (35 g Na₂CO₃ u 150 g H₂O) i dopuni destilovanom vodom do marke. Rastvor Folin-Ciocalteu se dobija razblaženjem sa destilovanom vodom u odnosu 1:2. Nakon isteka 60 minuta, vrši se očitavanje absorbancije na spektrofotometru u standardnoj kiveti 1 cm pri talasnoj dužini 720 nm, a na osnovu očitane absorbancije, pomoću standardne krive se očitava sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Rezultat se izražava u mg/l ekvivalentno galnoj kiselini (mg GAE/l) (Tanner i Brunner, 1979; Daničić, 1988).

Postupak za uzorke komine:

Postupak za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktu komine je isti kao i za vino osim što se koristi veće razblaženje uzorka sa destilovanom vodom (1:10). Na kraju je izvršeno preračunavanje dobijenih rezultata koji su izraženi u mg/kg prevrele komine.

4.21. Određivanje antiradikalske i antioksidativne aktivnosti uzoraka vina i ekstrakta komine

4.21.1. Anti-DPPH radikalska aktivnost

Antiradikalska aktivnost praćena je korišćenjem stabilnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH). Ova metoda primenjena je da bi pokazala sposobnost hvatanja slobodnih radikala od strane analiziranih uzoraka vina. Rezultati su prikazani kao inhibiciona koncentracija koja predstavlja količinu antioksidansa koja je potrebna da snizi koncentraciju DPPH radikala za 50%. Svaki uzorak pripremljen je u 5 razblaženja u triplikatu. Vrednosti za inhibicionu koncentraciju su dobijene na osnovu procenta inhibicije u odnosu na koncentraciju, $I(\%) = f(c)$. Procenat inhibicije DPPH radikala je izračunat prema jednačini:

$$I(\%) = 100 \times (A_{\text{slupe probe}} - A_{\text{uzorka}}) / A_{\text{slupe probe}}$$

gde je $A_{\text{sepe probe}}$ očitana absorbancija DPPH sa etanolom, A_{uzorka} očitana absorbancija DPPH sa uzorcima vina. Rezultati su izraženi kao recipročna vrednost $I(\%)$ i pomnoženi sa 100 (Čakar et al., 2016). Pre analiza uzorci vina su razblaženi destilovanom vodom u intervalu od 1:2 do 1:20 u zavisnosti od antioksidativne moći datog vina.

4.21.2. Antioksidativna aktivnost - metoda FRAP

Određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka vina i ekstrakta komine sprovedeno je metodom FRAP (Ferric Reducing Activity of Plasma) (Benzie i Strain, 1996). Rezultati su izraženi u $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{l}$.

FRAP metoda se zasniva na redukciji žutog feri-tripiridiltriazin kompleksa (Fe(III)-TPTZ) pri niskoj pH (3,6) i pod uticajem elektron-donirajućih antioksidanasa u intenzivno plavo obojeni fero kompleks (Fe(II)-TPTZ), sa apsorpcionim maksimumom na 593 nm. Vrednost absorbancije je linearno proporcionalna koncentraciji antioksidanasa u rastvoru, a za konstrukciju standardne krive korišćen je $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u rastućim koncentracijama od 100-1000 $\mu\text{mol/l}$.

4.21.3. Antioksidativna aktivnost - test TEAC

Test TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) je zasnovan na principu inhibicije stabilnog ABTS^{*+} radikala od strane antioksidativnih komponenti prisutnih u nekom medijumu. Koncentracija antioksidanasa u nekom uzorku je obrnuto proporcionalna vrednosti absorbancije na $\lambda = 734 \text{ nm}$. Antioksidativna aktivnost se izračunava na osnovu vrednosti pada absorbancije i izražava se kao $\text{mmol Trolox ekvivalenta po litri vina (mmol TE/l)}$.

Rastvor ABTS (14 mM) ((2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfonska kiselina) diamoniumova so) i 4,9 mM rastvor $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ su pripremljeni u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 7,40$) i pomešani u jednakim zapreminama kako bi se dobio stabilan ABTS^{*+} osnovni rastvor. Dobijeni plavo-zeleni rastvor je ostavljen da se temperira na tamnom mestu 16h. Radni ABTS^{*+} rastvor je pripremljen razblaženjem osnovnog ABTS^{*+} rastvora u fosfatnom puferu u odnosu približno 1:80, sve do postizanja vrednosti absorbancije od $0,70 \pm 0,02$ apsorpcione jedinice na talasnoj dužini $\lambda = 734 \text{ nm}$. U 30 μl razblaženog vina je dodato 3 ml ABTS^{*+} radnog rastvora i nakon inkubacije u trajanju od 6 minuta na 30°C obavljeno je merenje absorbancija na talasnoj dužini $\lambda = 734 \text{ nm}$. U toku celog procesa merenja korišćena je slepa proba. Frakciona inhibicija (FI) ABTS^{*+} radikala je izračunata tako što su koeficijenti pravca krive (koncentracija u funkciji od frakcione inhibicije) za Trolox reagens koji je korišćen kao standard i za svaki uzorak, stavljeni u odnos (Re et al., 1999). TEAC vrednost je izračunata na osnovu sledeće jednakosti:

$\text{TEAC (mmol/l)} = \text{koeficijent pravca krive uzorka/koeficijent pravca krive standarda}$.

4.22. Količina slobodnog sumpordioksida

Količina slobodnog SO_2 određena je u vinu direktnom titracijom sa jodom, pri čemu se I_2 redukuje, a SO_2 oksiduje (Tanner i Brunner, 1979). U 50 ml vina se dodaje 10 ml H_2SO_4 (1:4) i 3 ml 1% rastvora skroba. Tako dobijena smeša se titriše rastvorom joda koncentracije 0,01 M do pojave tamno plave boje koja mora da bude postojana 30 sekundi. Utrošak rastvora joda za titraciju je u ml i označava se sa n. Izračunavanje se vrši prema jednačini:

$$\text{Količina slobodnog SO}_2 (\text{mg/l}) = n \times 12,8.$$

4.23. Standardi i hemijski reagensi

Standardi fenolnih jedinjenja (galna kiselina, protokatehuinska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, siringinska kiselina, kafeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, elaginska kiselina, hlorogenska kiselina, vanilinska kiselina, katehin, epikatehin, *trans*-resveratrol, kvercetin, rutin, naringenin, kemferol, miricetin i vanilin) nabavljeni su od Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) i Fluka (Buch, Switzerland). Reagensi Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina), ABTS ((2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfonska kiselina) diamoniumova so) i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), su nabavljeni od Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Reagens TPTZ (2,4,6-tripiridil-*s*-triazin) je nabavljen od Fluka Analytical (Switzerland).

4.24. Statistička obrada rezultata

Statistička analiza je urađena u programu SPSS Statistic V20.0 (IMB, Chicago, IL, USA; 2014) kojim je urađen statistički test uparenih uzoraka, kao i analiza glavnih komponenti PCA (engl. Principal Component Analysis). Linearna regresiona analiza je urađena u program Origin Pro 8 (OriginLab, Northampton, MA, USA; 2008).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Uticaj stepena zrelosti grožđa na fenolni sastav vina i komine

U ekstraktima svežih semenki detektovana su tri jedinjenja, galna kiselina, katehin i epikatehin (Tabela 12), među kojima je najdominantniji bio katehin (Peña-Neira et al., 2004; de Simón et al., 1992b). Najviša koncentracija ovih jedinjenja detektovana je u semenkama faze šarka, a sa povećanjem stepena zrelosti njihov sadržaj u semenkama je opadao. Međutim nije nađena statistički značajna razlika među analiziranim uzorcima semenki ($p > 0,05$). Prema Ivanova et al. (2011b), u beloj sorti Chardonnay semenke su sadržale najvišu koncentraciju flavan-3-ola upravo u fazi šarka što je u skladu sa našim rezultatima, dok je kod sorte Smederevka njihov sadržaj bio u porastu do fiziološke zrelosti nakon čega je došlo do njihovog pada u fazi prezrelosti. Što se tiče crnih sorti Vranac i Merlot, sadržaj ukupnih flavan-3-ola u semenkama je bio najviši u fazi šarka, što je nađeno i u našem istraživanju za sadržaj katehina i epikatehina. U skladu sa našim rezultatima vezanim za sadržaj katehina i epikatehina u semenkama, je istraživanje Kurt-Celebi et al. (2020) sa sortom Isabel, gde je od početka faze šarka nastupilo opadanje njihove koncentracije kao i istraživanje Kennedy et al. (2000) gde je nađeno da tokom sazrevanja dolazi do opadanja koncentracije flavan-3-ola u semenkama grožđa.

Sadržaj katehina u našim uzorcima pokožice najniži je bio u fazi šarka, a zatim je bio u porastu sve do faze prezrelosti, ali generalno sadržaj flavan-3-ola je bio dosta niži u odnosu na njihov sadržaj u semenkama (Anđelković et al., 2013). Kod sadržaja epikatehina zabeležen je pad posle faze šarka međutim promena koncentracija i katehina i epikatehina u pokožici različitih faza zrelosti nije bila značajna ($p > 0,05$). Sadržaj katehina u pokožici je bio viši u odnosu na epikatehin (Tabela 13) što je u skladu sa Peña-Neira et al. (2004). Sa porastom stepena zrelosti prema literaturi (Ivanova et al. 2011b) dolazi do porasta flavan-3-ola u pokožici sa maksimumom u fiziološkoj fazi zrelosti ali bez statističke značajnosti, što se slaže sa našim rezultatima za sadržaj katehina u pokožici. Prema Obreque-Slier et al. (2013) u pokožici bobice grožđa vinove loze sorte Cabernet sauvignon je nađena najviša koncentracija katehina pri poslednjem datumu uzorkovanja ($6,1 \text{ mg/kg} \pm 0,6$) što znači kada je grožđe bilo najzrelije što je u skladu sa našim rezultatima gde je maksimalna koncentracija katehina u pokožici bila $4,35 \pm 0,04 \text{ mg/kg}$ sveže pokožice.

Tabela 12. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja identifikovanih u semenkama grožđa

Jedinjenje (ug/g semenke)	Šarak	Puna zrelost	Prezrelost
Galna kiselina	21,30	12,50	7,47
Katehin	712,22	384,20	230,86
Epikatehin	299,92	173,40	102,47

Što se tiče sadržaja katehina i epikatehina u uzorcima komine različitih faza zrelosti, najniže vrednosti za oba jedinjenja nađena su u komini od prezrelog grožđa, a najviši sadržaj je izmeren u ekstraktima komine pune zrelosti (Tabela 14). Ipak, nije nađena statistički značajna razlika u sadržaju katehina i epikatehina u komini grožđa različitih faza zrelosti ($p > 0,05$).

U uzorcima vina Cabernet sauvignon nije ustanovljena statistički značajna razlika u sadržaju katehina i epikatehina u sve tri faze zrelosti grožđa ($p \geq 0,05$). Najviši sadržaj ovih jedinjenja je izmeren u fazi pune zrelosti i to za katehin $40,13 \pm 3,25$ mg/l, a za epikatehin $22,29 \pm 1,50$ mg/l, dok je najniži bio u fazi šarka (Tabela 15). Analizirana vina od grožđa ubranog u fazi šarka su imala niži sadržaj katehina i epikatehina u odnosu na druge dve berbe (puna zrelost i prezrelost) što je za katehin suprotno rezultatima od Pérez-Magariño i González-San José (2005) gde je nađena najviša koncentracija katehina u vinu od najmanje zrelog grožđa za sortu Cabernet sauvignon. Sorta Tinto fino u istoj studiji imala je rezultate u skladu sa našim. Međutim koncentracija epikatehina u vinima od sve zrelijeg grožđa, čija je maceracija trajala od 12-14 dana, je bila u blagom porastu što je u saglasnosti sa našim rezultatima (Pérez-Magariño i González-San José, 2005). Na osnovu podataka iz literature vezano za sadržaj flavan-3-ola u bobici grožđa u fazi šarka dolazimo do zaključka da se neće ekstrahovati njihov celokupan sadržaj iz grožđa u vino. To zavisi od više faktora kao što su uslovi u vinogradu, vreme maceracije, stepen zrelosti, čak i stepen dezintegracije bobica tokom muljanja (Kennedy et al., 2007). Tokom produžene maceracije dolazi do stvaranja veće količine alkohola što olakšava ekstrakciju tanina iz semenke (Canals et al., 2005). Iz nedovoljno zrelog grožđa tokom fermentacije ekstrahovana je niska koncentracija katehina i epikatehina u vino pa se pretpostavlja da su ostali vezani kao proantocijanidini semenke za koje važi lakše oslobađanje nego za pokožične proantocijanidine kada je u pitanju nedovoljno zrelo grožđe. Ipak, ekstrakcijom iz svežih semenki, kao što je već rečeno, u fazi šarka nađena je najviša količina katehina i epikatehina koja je kasnije sa sazrevanjem opadala, dok je u pokožici sadržaj katehina tokom sazrevanja bio u blagom porastu. Prema Kontoudakis et al. (2011) veća gustina grožđa uzrokuje veću koncentraciju proantocijanidina u vinu, a manje katehina, što se može porediti sa našim rezultatima za fazu šarka obzirom da smo dodavali šećer pre fermentacije. Što je grožđe zrelije dolazi do smanjenja ekstraktibilnosti tanina koji se nalaze u semenkama grožđa (Kennedy et al., 2007; Gil et al., 2012) što objašnjava niži sadržaj katehina i epikatehina u analiziranim vinima od prezrelog grožđa u odnosu na fazu pune zrelosti. Posmatrajući fazu prezrelosti, u svežim semenkama je nađeno najmanje katehina i epikatehina upravo u toj fazi. Sadržaj flavan-3-ola u bobici je takav da je maksimum oko faze šarka (Kurt-Celebi et al., 2020) što ne znači da će se u vinu od takvog grožđa ekstrahovati najviše katehina i epikatehina. Prema Giovanelli i Brenna (2007) koji su ispitali sadržaj ukupnih katehina (katehin i epikatehin) na italijanskim sortama Erbaluce, Barbera i Nebbiolo od početka jula do druge polovine septembra. Prema iznetom, iako je u semenkama tokom sazrevanja dolazilo do opadanja sadržaja ovih jedinjenja, u pokožici je ustanovljeno odstupanje od ovakvog trenda.

Od derivata benzoeve kiseline u svežoj pokožici su detektovane siringinska i galna kiselina (Tabela 13). Najniže vrednosti nađene su u šarku ali nije bilo statistički značajne razlike ($p > 0,05$). Zabeležen je trend porasta siringinske kiseline u pokožici sa maksimumom u fazi pune zrelosti što

je u skladu sa de Simón et al. (1992a) gde je maksimum siringinske nađen u fazi optimalne zrelosti, dok je u fazi šarka porast koncentracije bio blaži. Sadržaj galne kiseline je bio prilično ustaljen ili u blagom porastu u pokožici grožđa tokom sazrevanja, dok je u uzorcima semenki došlo do opadanja galne kiseline tokom sazrevanja (Peña-Neira et al., 2004; Kurt-Celebi et al., 2020).

Tabela 13. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja identifikovanih u pokožici grožđa

Jedinjenje (mg/kg sveže pokožice)	Šarka	Puna zrelost	Prezrelost
Galna kiselina	1,50±0,05	1,71±0,05	1,75±0,02
Katehin	3,55±0,22	4,50±0,25	4,35±0,04
Epikatehin	1,35±0,05	0,67±0,05	0,98±0,09
Siringinska kiselina	4,73±0,15	5,82±0,55	4,60±0,20
<i>trans</i> -resveratrol	0,12±0,02	0,12±0,02	n.d.
Kvercetin	1,40±0,05	1,16±0,09	1,51±0,05
Naringenin	0,10±0,01	0,10±0,01	0,12±0,01

Nije dokazana statistički značajna razlika u sadržaju derivata benzoeve kiseline između uzoraka komine zaostale nakon proizvodnje vina različitih faza zrelosti ($p > 0,05$). U uzorcima prevrele komine najdominantnija je bila siringinska kiselina sa najvišim sadržajem u komini faze prezrelosti i to $10,29 \pm 0,25$ mg/kg prevrele komine (Tabela 14). Sledeća po zastupljenosti bila je vanilinska kiselina, čiji je sadržaj u svim uzorcima faza zrelosti bio prilično ujednačen.

Nije ustanovljena statistički značajna razlika među koncentracijama derivata benzoeve kiseline ($p \geq 0,05$) u vinima od grožđa u svim fenofazama zrelosti. Najdominantnije su bile siringinska i galna kiselina, dok je najmanju koncentraciju zabeležila *p*-hidroksibenzoeva kiselina (Tabela 15) slično kao u prethodnim istraživanjima (de Simón et al., 1992a; de Simón et al., 1992b). Ekstrakcije pokožice sorte Cencibel koju su radili de Simón et al. (1992b) pokazali su trend rasta koncentracije vanilinske kiseline oko 25 dana posle šarka, a zatim blago opadanje koncentracije, slično kao i dinamika siringinske kiseline u istom eksperimentu. Sadržaj vanilinske u našim vinima je u skladu sa tim trendom ponašanja vanilinske kiseline u pokožici grožđa (de Simón et al., 1992b) kao i sa sadržajem vanilinske kiseline u vinu Cabernet sauvignon poreklom iz Španije (Pérez-Magariño i González-San José, 2005). Studija na sorti Kardinal gde je praćena koncentracija fenolnih kiselina tokom sazrevanja (period od 09. do 30. jula), ukazuje na to da generalno sadržaj fenolnih kiselina raste do 23. jula, a posle opada što nije od statističke značajnosti (Topalović i Mikulić-Petkovsek, 2010). Ista studija je pokazala da je koncentracija siringinske kiseline u pokožici i u mesu bila u porastu što je grožđe bilo zrelije i bila je najdominantnija što je slučaj u našim vinima od takvog grožđa (Topalović i Mikulić-Petkovsek, 2010). U našem ogledu vina od prezrelog grožđa imala su najviši sadržaj siringinske kiseline i to $8,26 \pm 0,60$ mg/l (Tabela 15), što je u skladu sa radovima de Simón et al. (1992b) i Özcan et al. (2017). Prema de Simón et al. (1992a) u periodu oko faze šarka sadržaj siringinske kiseline je bio niži (oko $50 \mu\text{g}/100$ bobica) u odnosu na kasniji period sazrevanja gde se koncentracija kretala do $200 \mu\text{g}/100$ bobica u grožđu sorte Cencibel. Ispitivanja na grožđu vinove loze sorte Cabernet sauvignon uzgajanom u Čileu pokazala su da je koncentracija siringinske kiselina počela da raste odmah nakon faze šarka i održavala taj nivo u toku daljeg sazrevanja (Peña-Neira et al., 2004). To je u skladu sa rezultatima sadržaja siringinske kiseline u vinima i pokožici naših eksperimenata.

Ista studija je pokazala da galna kiselina opada i u ekstraktu pokožice i semenke grožđa vinove loze sorte Cabernet sauvignon tokom sazrevanja (Peña-Neira et al., 2004). Njena koncentracija u našim uzorcima semenki kao i vina nastavlja takav trend sa povećanjem stepena zrelosti. Prema Topalović i Mikulić-Petkovsek (2010), zapažen je pad sadržaja galne kiseline i u mesu tokom analiziranog perioda sazrevanja. Slične tvrdnje vezano za galnu kiselinu iz semenke grožđa izneli su de Simón et al. (1992b) gde je najveća koncentracija galne kiseline bila u fazi oko šarka. Kasnije su zabeležene niže vrednosti, dok je obrnut slučaj bio za koncentraciju galne kiseline u pokožici što je slično kao i u našem istraživanju. Posle siringinske kiseline u našim vinima najdominantnija je bila galna kiselina što je u skladu sa sadržajem galne kiseline u ekstraktu pokožice sorti Carménère i Cabernet sauvignon (Obreque-Slier et al., 2010). Prema Pérez-Magariño i González-San José (2005) vina od najzrelijeg grožđa vinove loze sorte Tinto fino su imala najniži sadržaj galne kiseline što je u skladu sa našim rezultatima.

Derivati hidroksicimetne kiseline nisu detektovani u ekstraktima pokožice, pa se pretpostavlja da se nalaze u vidu svojih estara, vezani u kompleks sa drugim jedinjenjima ili učestvuju u sintezi acetiliranih antocijanina što je karakteristično za crno grožđe (Ivanova et al., 2011b).

Od derivata hidroksicimetne kiseline u zaostaloj komini različitih faza zrelosti nađena je kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina (Tabela 14) u niskim koncentracijama među kojima nije nađena značajna razlika ($p > 0,05$).

U vinu od grožđa različitih faza zrelosti detektovane su kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina (Tabela 15). Najniži sadržaj je uglavnom bio u vinima od prezrelog grožđa ($p \geq 0,05$) što potvrđuje studija Keller (2004) koja govori da sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline opada sa sazrevanjem grožđa. Odmah nakon cvetanja dolazi do njihove akumulacije u vidu estara sa vinskom kiselinom u mesu bobice grožđa ali njihov sadržaj opada tokom sazrevanja. Najviši sadržaj kafeinske kiseline izmeren je u vinu od grožđa u punoj zrelosti i to $4,09 \pm 0,35$ mg/l, a *p*-kumarinske kiseline u vinima od grožđa u fazi šarka i to $4,19 \pm 0,35$ mg/l (Tabela 15). Najviši sadržaj kafeinske kiseline u vinima druge berbe je u skladu sa studijom Pérez-Magariño i González-San José (2005). Pad koncentracije derivata hidroksicimetne kiseline može se tumačiti promenama koncentracije estara hidroksicimetnih kiselina u pokožici grožđa koji mogu biti oksidisani, graditi komplekse sa drugim jedinjenjima ili učestvovati u sintezi acetilovanih antocijana (Ivanova et al., 2011b). Sadržaj ferulinske kiseline u vinu faze šarka nije detektovan dok je u vinima ostalih fenofaza bio jako nizak. Suprotno ovim tvrdnjama, de Simón et al. (1992b) su ustanovili da sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline u pokožici dostiže svoj maksimum oko 30 dana posle faze šarka.

U pokožici grožđa detektovani su kvercetin, naringenin i *trans*-resveratrol (Tabela 13). Koncentracije naringenina i *trans*-resveratrola su bile vrlo niske, dok je najdominantniji bio kvercetin. Nije nađena značajna razlika u njihovom sadržaju u ovim fazama zrelosti. Prema Ivanova et al. (2011b), kvercetin je formiran u pokožici u fazi šarka, a zatim neznatno opada. U našim uzorcima pokožica faze šarka je bila neznatno bogatija kvercetinom od faze pune zrelosti, što bi se moglo uporediti sa istraživanjem Anđelković et al. (2013) gde je zabeležen porast kvercetina 20 dana posle faze šarka nakon čega počinje da neznatno opada, a slično kao u radu de Simón et al. (1992a) za crnu sortu Cencibel gde je porast kvercetina bio eksponencijalan.

U uzorcima komine kvercetin je bio najdominantnije jedinjenje gde je u fazi pune zrelosti u komini zaostalo $10,96 \pm 0,14$ mg/kg (Tabela 14). Najniža koncentracija zaostala je u komini faze prezrelosti. Kao ni za ostale grupe jedinjenja, ni za pokožične fenole detektovane u komini nije nađena statistički značajna razlika među uzorcima različitih faza zrelosti ($p > 0,05$).

Mnogi istraživači su zaključili da koncentracija flavonola zavisi od sorte kao i od količine svetlosti kojoj je grožđe izloženo (Topalović i Mikulić-Petkovsek, 2010). Kvercetin koji spada u

ovu grupu zabeležio je maksimalnu vrednost već u fazi šarka (Ivanova et al., 2011b). U našim vinima od prezrelog grožđa kvercetin nije detektovan što znači da nije ekstrahovan u buduće vino, iako je iz sveže pokožice faze zrelosti ekstrahovan u količini od $1,51 \pm 0,05$ mg/kg (Tabela 13). Prema našim rezultatima sadržaj kvercetina bio je najviši u vinima od grožđa u punoj zrelosti ($0,78 \pm 0,02$ mg/l) (Tabela 15). U italijanskim sortama Nebbiolo, Barbera i Erbaluce od početka jula do početka avgusta sadržaj flavonola je bio u porastu nakon čega je došlo do neznatnog pada koncentracije i ponovnog porasta do kraja analiziranog perioda, druge polovine septembra (Giovanelli i Brenna, 2007). Prema Obreque-Slier et al. (2010) u pokožici sorte Cabernet sauvignon zapažen je drastičan pad flavonoida tokom sazrevanja, a neflavonoidi su ostali većinom nepromenjeni.

Najveća koncentracija *trans*-resveratrola je izmerena u vinu faze šarka (Tabela 15), međutim nije ustanovljena statistički značajna razlika između ostalih uzoraka vina ($p \geq 0,05$). Autori Geana et al. (2015), su analizirali pet sorti (Pinot noir, Mamaia, Cabernet sauvignon, Fetească neagră, Merlot) u različitim fenofazama sazrevanja i pokazali da različite sorte u različito vreme sazrevanja daju maksimum nakupljenog *trans*-resveratrola. Kod sorte Pinot noir sa povećanjem zrelosti grožđa dolazi do opadanja sadržaja *trans*-resveratrola, što je u skladu sa našim rezultatima u uzorcima vina mada promena nije bila značajna (Geana et al., 2015). U pokožici našeg ispitivanog grožđa faze zrelosti *trans*-resveratrol nije detektovan, pa ni vino od takvog grožđa nije dalo veću koncentraciju ovog jedinjenja. Suprotno našim rezultatima, bobica grožđa vinove loze sorte Cabernet sauvignon je dala maksimum *trans*-resveratrola na kraju perioda sazrevanja (Geana et al., 2015). Sličnu tvrdnju dali su autori Giovanelli i Brenna (2007) za neke italijanske sorte gde je resveratrol bio u porastu tokom sazrevanja. Moguće objašnjenje za pad sadržaja *trans*-resveratrola može biti zbog padavina neposredno pre berbe grožđa (Geana et al., 2015). Cvejić et al. (2010) u srpskim komercijalnim vinima sorte Cabernet sauvignon su pronašli od 0,18 do 1,69 mg/l *trans*-resveratrola što je u saglasnosti sa našim rezultatima gde je nađeno $0,19 \pm 0,02$ mg/l u vinu faza pune zrelosti i prezrelosti i $0,58 \pm 0,04$ mg/l u vinu faze šarka (Tabela 15). Kada je u pitanju sorta Mencía, u pojedinim godinama berbe (2001) došlo je do opadanja sadržaja *trans*-resveratrola u pokožici kako je grožđe bilo zrelije ($21,07 \pm 0,30$ do $9,23 \pm 0,04$ mg/l), dok u ostalim godinama berbe ista sorta nije održavala isti trend opadanja *trans*-resveratrola (Moreno et al., 2008). *Trans*-resveratrol nije detektovan u našim uzorcima semenki što je u saglasnosti sa Iacopini et al. (2008). Prema Moreno et al. (2008) u semenkama je zabeležena generalno niža koncentracija *trans*-resveratrola, sa najvišom koncentracijom prilikom prve berbe. Ipak, fenolni sadržaj vina zavisi ne samo od prisustva pojedinih fenolnih jedinjenja u bobici grožđa već i od uslova njihove ekstrakcije i hemijskih interakcija (Peña-Neira et al., 2004), a konkretno *trans*-resveratrol se javlja kao posledica gljivične infekcije grožđa i kao odgovor na fiziološki stres, pa ukoliko grožđe nije tome izloženo i njegov sadržaj u grožđu i vinu će biti nizak (Revilla i Ryan, 2000).

Tabela 14. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u komini od grožđa različitih faza zrelosti

Jedinjenja u komini (mg/kg)	Šarak	Puna zrelost	Prezrelost
Galna kiselina	0,86±0,04	0,82±0,04	0,67±0,02
Protokatehuinska kiselina	0,18±0,02	0,23±0,02	0,19±0,01
Katehin	4,92±0,15	6,73±0,11	3,30±0,09
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,12±0,01	0,23±0,01	0,13±0,02
Vanilinska kiselina	3,57±0,05	4,46±0,04	4,48±0,04
Kafeinska kiselina	n.d.	0,11±0,02	0,09±0,01
Epikatehin	2,70±0,05	3,37±0,10	1,76±0,04
Siringinska kiselina	5,68±0,10	8,53±0,15	10,29±0,25
Vanilin	0,15±0,02	0,19±0,02	0,22±0,02
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,04±0,004	0,05±0,002	0,04±0,002
Ferulinska kiselina	0,06±0,002	0,24±0,02	0,16±0,02
Rutin	0,13±0,02	0,20±0,02	0,25±0,03
<i>trans</i> -resveratrol	0,01	0,06	0,02
Elaginska kiselina	0,70±0,02	3,07±0,09	1,31±0,06
Kvercetin	7,44±0,10	10,96±0,14	5,61±0,15
Naringenin	0,27±0,04	0,35±0,02	0,23±0,02
Kemferol	1,23±0,03	1,45±0,03	0,61±0,02

Tabela 15. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u vinima proizvedenim od grožđa različitih faza zrelosti

Jedinjenja u vinu (mg/l)	Šarak	Puna zrelost	Prezrelost
Galna kiselina	5,18±0,20	4,22±0,40	1,59±0,15
Protokatehuinska kiselina	1,07±0,15	1,94±0,10	1,47±0,10
Katehin	1,55±0,10	40,13±3,25	19,23±1,40
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,24±0,05	0,66±0,04	0,56±0,05
Vanilinska kiselina	2,77±0,20	3,91±0,20	3,55±0,40
Kafeinska kiselina	2,00±0,20	4,09±0,35	3,43±0,25
Epikatehin	0,73±0,05	22,29±1,50	12,35±0,50
Siringinska kiselina	5,57±0,40	7,55±0,50	8,26±0,60
<i>p</i> -kumarinska kiselina	4,19±0,35	3,88±0,20	2,33±0,20
Ferulinska kiselina	0,00	0,11±0,02	0,03±0,01
<i>trans</i> -resveratrol	0,58±0,04	0,19±0,02	0,19±0,02
Elaginska kiselina	0,00	3,33±0,20	1,55±0,10
Kvercetin	0,09±0,01	0,78±0,02	0,00

5.2. Uticaj zahvaćenosti grožđa sivom plesni *Botrytis cinerea* na fenolni sastav vina

U našim istraživanjima je zabeležen pad koncentracije epikatehina i katehina u vinima od botritiziranog grožđa u odnosu na vina od zdravog grožđa za 28,51% kod katehina i 10,90% kod epikatehina. Prema Ky et al. (2012), nije ustanovljena statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih tanina između zdravih i botritiziranih bobica, a sadržaj samo katehina je bio u padu do 52%. Razaranje epikatehina i katehina ima za posledicu organoleptičke promene u vinu i narušavanje njegovog kvaliteta (Steel et al., 2013). Kada su u pitanju ispitivani pokožični fenoli, u vinu od plesnivog grožđa rutin i kemferol nisu detektovani, dok je sadržaj kvercetina dosta smanjen, što je u skladu sa Ky et al. (2012) koji navodi da su ovi fenoli mnogo više oštećeni ovom plesni zbog njihovog direktnog kontakta sa sivom plesni. Galna kiselina, kvercetin i kafeinska kiselina su se pokazali kao dobri supstrati za enzimsku aktivnost lakaze, jer sadrže barem dve hidroksilne grupe u *orto* i *meta* položaju u fenolnom prstenu (Quijada-Morin et al., 2018). Time se može objasniti nizak sadržaj ovih jedinjenja u analiziranom vinu od botritiziranog grožđa, gde je zabeležen niži sadržaj kvercetina, galne kiseline, protokatehuinske kiseline i kafeinske kiseline u odnosu njihove koncentracije u vinu od zdravog grožđa. To mogu potvrditi i podaci za relativnu aktivnost lakaze sa ovim jedinjenjima koja iznosi 69% za kafeinsku kiselinu, 82% za kvercetin i čak 89% za galnu kiselinu, mereno po potrošnji kiseonika (Claus, 2017), što se i ogleda i u našim rezultatima (Tabela 16). Prema Zinnai et al. (2013), enzimaska oksidacija galne kiseline izazvana enzimom lakaza je bila tri puta veća nego oksidacija galne kiseline izazvana hemijskim putem. Oszmianski et al. (1985) su proučavali kako *Botrytis cinerea* tj. ekstracelularni enzimi, utiču na ekstrakt semenki grožđa koji je sadržao galnu kiselinu, katehin, epikatehin i dimere proantocijanidina te je došao do zaključka da dolazi do oksidacije ovih fenolnih jedinjenja i njihovog smanjenja. Kao najlošiji supstrat za enzimsku aktivnost lakaze pokazala se *p*-kumarinska kiselina (Quijada-Morin et al., 2018) što je u skladu sa dobijenim rezultatima, gde je lakaza iz

Botrytis vrlo malo uticala na smanjenje njene koncentracije. Suprotno tome, Steel et al. (2013) u svom radu je pokazao da je dobar supstrat za dejstvo lakaze *p*-kumarinska kiselina, ali i kafeinska kiselina, njihovi estri sa vinskom kiselinom kao i ferulinska kiselina u manjoj meri, što se ipak poklapa sa našim rezultatima.

Tabela 16. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u vinu od zdravog grožđa i vinu od plesnivog grožđa

Jedinjenje (mg/l)	Vino od zdravog grožđa	Vino od plesnivog grožđa
Galna kiselina	2,80±0,10	2,00±0,05
Protokatehuinska kiselina	0,49±0,03	1,39±0,03
Katehin	23,71±0,50	16,95±0,33
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,89±0,03	1,49±0,03
Vanilinska kiselina	2,88±0,10	4,53±0,15
Kafeinska kiselina	4,34±0,15	1,19±0,03
Epikatehin	10,46±0,20	9,32±0,20
Siringinska kiselina	3,73±0,15	8,43±0,40
Vanilin	0,14±0,01	0,00
<i>p</i> -kumarinska kiselina	2,32±0,10	2,19±0,08
Ferulinska kiselina	0,27±0,01	0,18±0,01
Rutin	0,15±0,01	0,00
<i>trans</i> -resveratrol	1,32±0,03	0,18±0,01
Elaginska kiselina	1,96±0,06	1,61±0,03
Kvercetin	24,75±0,50	0,47±0,02
Naringenin	0,24±0,01	0,00
Kemferol	5,12±0,20	0,00

Fenolna jedinjenja sa dve hidroksilne ili metoksi grupe na susednim atomima ugljenika fenolnog prstena pospešuju enzimsku interakciju (Quijada-Morin et al., 2018) što može objasniti veću degradaciju analiziranih fenolnih jedinjenja koja imaju takvu strukturu. Sadržaj resveratrola u vinima od botritiziranog grožđa je dosta smanjen u odnosu na vino od zdravog grožđa što se može pripisati dejstvu lakaze. Prirodna otpornost bobice grožđa povezana je sa prisustvom fenolnih jedinjenja sa antifungicidnim delovanjem, pre svih *trans*-resveratrolom (Ky et al., 2012). *Botrytis cinerea*, kao odgovor na to proizvodi stilben oksidaze koji stupaju u „borbu“ sa tim fenolnim jedinjenjima (Steel et al., 2013), što je jedino moguće ukoliko je grožđe zahvaćeno *Botrytisom* u manjoj meri (Petrović, 2011). Pošto je ispitivano vino proizvedeno od grožđa zahvaćenog *Botrytisom* u većoj meri (više od 50%), došlo je do degradacije *trans*-resveratrola. Kvalitet vina od botritiziranog grožđa je u velikoj meri umanjen zbog enzimskog dejstva ove plesni koje se ogleda i u razaranju antocijanidina i proantocijanidina, što rezultira nestabilnom bojom vina (Steel et al., 2013). U ispitivanim vinima sa 20% botritiziranim grožđem, utvrđeno je da se lakaza zadržava u

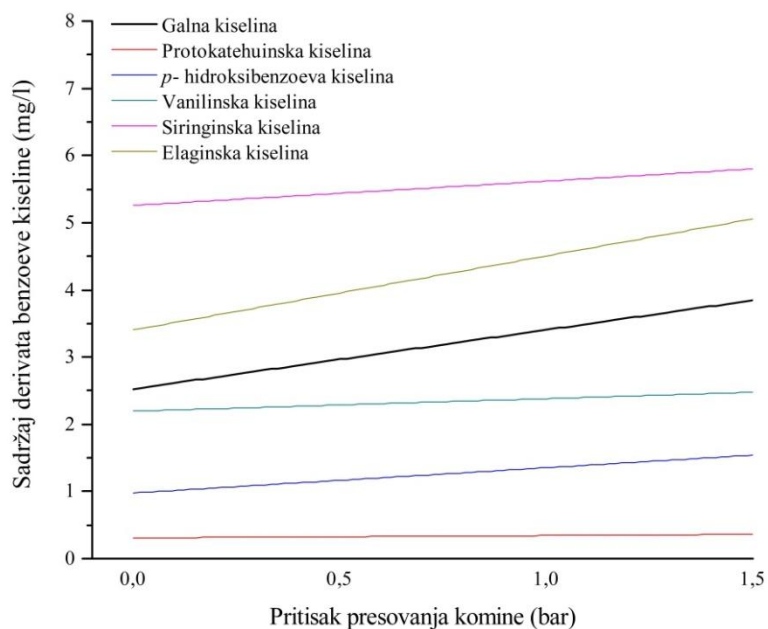
vinu ali sa smanjenom aktivnošću (Ky et al., 2012). Prema Claus (2017), nađeno je da relativna aktivnost lakaze iz plesni *Botrytis cinerea* sa resveratrolom iznosi 61%, izmerena kao potrošnja kiseonika. Utvrđeno je da lakaza u širi od grožđa zahvaćenog ovom plesni može izazvati značajno smanjenje sadržaja fenolnih jedinjenja (Claus, 2017). Ipak, poredeći koncentracije analiziranih jedinjenja (u zdravom i plesnivom grožđu) u našim uzorcima nije ustanovljena statistički značajna razlika u njihovom sadržaju na nivou značajnosti 0,05.

5.3. Uticaj primene različitog pritiska ceđenja prevrele komine na fenolni sastav vina i zaostale komine

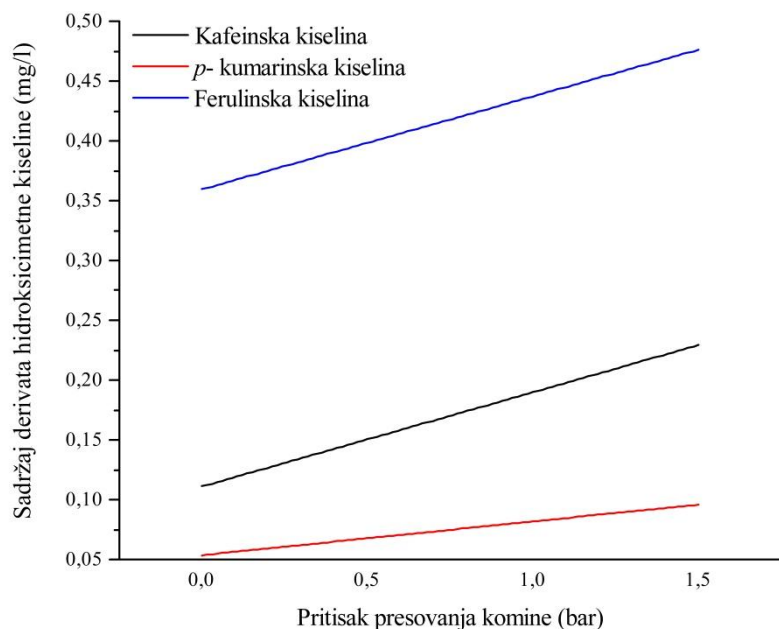
5.3.1. Fenolni sastav vina dobijenog ceđenjem komine pri različitim pritiscima

Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u fenolnom sastavu među uzorcima samotoka i uzorcima dobijenim presovanjem komine pri različitim pritiscima, na nivou značajnosti 0,05. Vršeno je poređenje uticaja različitih pritisaka međusobno i takođe je utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju pojedinih fenolnih jedinjenja ($p \leq 0,05$). Koncentracija svih 17 fenolnih jedinjenja (Tabela 17) se povećala za 6,45% uz presovanje komine pritiskom 0,5 bara u odnosu na koncentracije fenolnih jedinjenja dobijene analiziranjem samotoka. Pritisak od 1 bar je povećao koncentraciju ovih jedinjenja za 15,53% u odnosu na samotok, dok je 1,5 bar doprineo još većoj ekstrakciji analiziranih fenolnih jedinjenja i to za 28,82% u odnosu na samotok. Najdominantnije jedinjenje dobijeno u vinu od samotoka kao i ostalim frakcijama presovanja predstavlja kvercetin čija je koncentracija u vinu od samotoka iznosila $14,73 \pm 0,55$ mg/l (Tabela 17). Pritisak ceđenja komine od 1,5 bar doveo je do povećanja ekstrakcije kvercetina za 23,08%. Suprotno tome, zabeležena je veća koncentracija kvercetina u vinima dobijenim od frakcije samotoka kod italijanske sorte Sangiovese (Rinaldi et al., 2020). Od derivata benzojeve kiseline (siringinska, galna, *p*-hidroksibenzoeva, protokatehuinska, vanilinska i elaginska kiselina) u našim Cabetnet sauvignon vinima, najdominantnija je bila siringinska kiselina što je nađeno i u vinima sorte Sangiovese sa različitih lokaliteta u Italiji (Rinaldi et al., 2020). Uticaj presovanja prevrele komine pritiskom 1,5 bar je imao statistički značajan uticaj na ekstrakciju derivata benzojeve kiseline (siringinske, galne, *p*-hidroksibenzojeve, protokatehuinske, vanilinske i elaginske kiseline) u odnosu na ekstrakciju samotokom ($p \leq 0,5$). Primenjeni niži pritisak od 0,5 i 1 bar nije imao statistički značajan uticaj na ova jedinjenja (Slika 19). Do istog zaključka su došli Rinaldi et al. (2020), gde primenjeni pritisak od 1,5 bara nije doveo do značajne ekstrakcije derivata benzojeve kiseline (galne, protokatehuinske i siringinske kiseline) kao što je slučaj u našem istraživanju sa derivatima hidroksicimetne kiseline (ferulinska, kafeinska i *p*-kumarinska kiselina) (Slika 20). Značajan uticaj na povećanje njihovog sadržaja imao je samo pritisak od 0,5 bara ($p \leq 0,05$). Uopšteno gledajući, veći pritisak doveo je i do bolje ekstrakcije fenolnih kiselina (Ferreira-Lima et al., 2016), kao i ostalih analiziranih fenolnih jedinjenja. Za koncentracije katehina i epikatehina je takođe ustanovljena pozitivna korelacija sa povećanjem pritiska ceđenja komine. Sadržaj katehina je bio dominantniji u odnosu na epikatehin u vinu od samotoka, i zabeleženo je duplo veće povećanje katehina pri istom pritisku od 1,5 bar u odnosu na epikatehin. Koncentracija *trans*-resveratrola u vinu od samotoka je iznosila $0,20 \pm 0,02$ mg/l dok je u vinima dobijenim sa povećanjem pritiska ceđenja došlo do povećanja njegove koncentracije i do 40% (Tabela 17). Slično tome Gambuti et al. (2004), su poredili vina od samotoka i vina od samotoka uz dodatak frakcije dobijene presovanjem pod pritiskom 8 bara. Kod tog vina sorte Aglianico sa udelom presovane frakcije šire zabeležen je statistički značajan porast *trans*-resveratrola (od 10-40%). Za vina od sorti Piediroso i Nerello mascalese za vino od iste frakcije šire, zabeležen je statistički značajan porast epikatehina, dok je katehin bio u značajnom porastu samo kod sorte Piediroso (Gambuti et al., 2004). Ispitivajući uticaj presovanja kljuka na sadržaj epikatehina i katehina kod belih sorti iz Brazila, Ferreira-Lima et al. (2016) dobili su viši sadržaj u vinima od presovanog kljuka pritiskom do 2 bara. Prema Petrović (2011), sadržaj *trans*-resveratrola biva veći u vinima dobijenim pri rastućim vrednostima pritiska ceđenja kljuka i do 50 bara za neke bele sorte, što je u skladu sa našim rezultatima gde je povećanje pritiska ceđenja

prevrele komine u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem *trans*-resveratrola kao i ostalih analiziranih jedinjenja.



Slika 19. Dinamika ekstrakcije derivata benzoeve kiseline pri rastućim pritiscima presovanja komine



Slika 20. Dinamika ekstrakcije derivata hidroksicimetne kiseline pri rastućim pritiscima presovanja komine

Tabela 17. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja pri različitim pritiscima presovanja komine i procentualno povećanje njihove koncentracije u odnosu na samotok

Jedinjenje u vinu (mg/l)	Samotok (S)	0,5 bar	S:0,5 (%)	1 bar	S:1 (%)	1,5 bar	S:1,5 (%)
Galna kiselina	2,50±0,04	2,94±0,05	17,60	3,52±0,04	40,80	3,63±0,07	45,20
Protokatehuinska kiselina	0,31±0,02	0,32±0,02	3,22	0,35±0,03	12,90	0,36±0,06	16,13
Katehin	4,08±0,10	4,26±0,11	4,41	4,86±0,03	19,12	5,85±0,21	43,38
<i>p</i> -hidriksibenzoeva kiselina	1,06±0,03	1,06±0,04	0,00	1,13±0,04	6,60	1,83±0,05	72,64
Vanilinska kiselina	2,23±0,05	2,23±0,09	0,00	2,31±0,05	3,59	2,53±0,05	13,45
Kafeinska kiselina	0,11±0,01	0,16±0,05	45,45	0,20±0,02	81,82	0,20±0,04	81,82
Epikatehin	2,28±0,04	2,29±0,04	0,44	2,31±0,05	1,32	2,88±0,07	26,32
Siringinska kiselina	5,21±0,14	5,50±0,11	5,57	5,59±0,10	7,29	5,82±0,27	11,71
Vanilin	0,17±0,05	0,21±0,04	23,53	0,21±0,04	23,52	0,28±0,02	64,71
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,05±0,01	0,08±0,03	60,00	0,09±0,01	80,00	0,09±0,01	80,00
Ferulinska kiselina	0,35±0,04	0,40±0,03	14,29	0,45±0,03	28,50	0,46±0,04	31,43
Rutin	0,15±0,02	0,16±0,03	6,67	0,18±0,02	20,00	0,20±0,02	33,33
<i>trans</i> -resveratrol	0,20±0,02	0,23±0,02	15,00	0,27±0,03	35,00	0,28±0,09	40,00
Elaginska kiselina	3,51±0,10	3,71±0,11	5,70	4,68±0,14	33,33	5,09±0,20	45,01
Kvercetin	14,73±0,55	15,79±0,40	7,20	16,29±0,35	10,59	18,13±0,40	23,08
Naringenin	0,26±0,04	0,28±0,03	7,69	0,30±0,05	15,38	0,31±0,07	19,23
Kemferol	2,01±0,05	2,12±0,04	5,47	2,56±0,07	27,36	2,57±0,06	27,86
SUMA	39,21mg/l	41,74mg/l	6,45%	45,30mg/l	15,53%	50,51mg/l	28,82%

5.3.2. Fenolni sastav komine zaostale nakon presovanja pri različitim pritiscima

Analizirajući zaostala fenolna jedinjenja u komini (Tabela 18) koja je presovana pri različitim pritiscima prilikom odvajanja tečnog dela tj. mladog vina, ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika ($p \leq 0,05$) između samotoka i preševina (0,5 bara, 1 bar i 1,5 bara) kada su u pitanju derivati benzoeve kiseline (galna, *p*-hidroksibenzoeva, protokatehuinska, vanilinska, siringinska i elaginska kiselina). U slučaju derivata hidroksicimetne kiseline nije ustanovljena značajna razlika između koncentracije koja je ekstrahovana iz samotoka i koncentracije ovih jedinjenja (kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina) iz preševina. Uticaj različitih pritisaka presovanja komine nije imao značajan uticaj na koncentracije ostalih ispitivanih flavan-3-ola kao ni flavonola ni stilbena ($p > 0,05$). Ipak u uzorcima komine presovane pod višim pritiskom zabeleženo je povećanje koncentracija katehina i epikatehina, kako u vinu tako i u komini.

Posle maceracije i presovanja oslobođeni deo flavonola je prešao u vino, dok su u komini nađeni u niskim koncentracijama pa se pretpostavlja da je većina tih jedinjenja ostala vezana za

polisaharide i rastvorljive pektine koji imaju sposobnost reagovanja sa istim. Flavonoli su u većini koncentrisani u pokožici grožđa pa presovanje komine ne omogućava njihovu bolju ekstrakciju (Rinaldi et al., 2020).

Tabela 18. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja zaostalih u komini posle ceđenja različitim pritiscima

Jedinjenja u prevreloj komini (mg/kg)	Samotok	Pritisak ceđenja (bar)		
		0,5	1,0	1,5
Galna kiselina	4,90±0,21	6,24±0,30	7,96±0,40	8,35±0,45
Protokatehuinska kiselina	2,16±0,12	2,53±0,15	3,17±0,20	3,23±0,20
Katehin	25,46±1,3	29,93±1,50	35,41±1,55	37,43±1,25
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1,13±0,09	1,28±0,05	1,60±0,14	1,59±0,12
Vanilinska kiselina	2,94±0,11	3,64±0,20	4,62±0,30	4,10±0,50
Kafeinska kiselina	4,86±0,22	4,91±0,20	5,68±0,30	5,70±0,45
Epikatehin	15,38±0,95	18,51±1,2	22,12±1,0	23,33±1,05
Siringinska kiselina	7,27±0,40	8,72±0,45	11,27±0,90	10,54±0,90
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,33±0,14	3,16±0,20	3,75±0,18	3,17±0,14
Ferulinska kiselina	0,82±0,05	0,87±0,04	1,12±0,05	1,00±0,04
Rutin	0,06±0,002	0,06±0,003	0,07±0,005	0,07±0,005
<i>trans</i> -resveratrol	1,51±0,10	1,44±0,10	1,51±0,12	1,36±0,14
Elaginska kiselina	1,72±0,11	1,63±0,14	2,36±0,15	2,23±0,15
Kvercetin	0,51±0,04	0,41±0,04	0,31±0,02	0,31±0,02
Naringenin	0,20±0,01	0,21±0,012	0,28±0,01	0,24±0,02

5.4. Uticaj dodatka hraniva za kvasce na fenolni sastav vina

Testom uparenih uzoraka izvršeno je poređenje sadržaja derivata benzoeve kiseline i nađena je statistički značajna razlika između sadržaja istih pri upotrebi amonijačnog hraniva i kontrolnog uzorka ($p < 0,05$). Za ostala analizirana fenolna jedinjenja nije ustanovljena statistički značajna razlika između ispitivanih varijanti ogleda ($p > 0,05$), a njihov sadržaj u vinima prikazan je u Tabeli 19.

Tabela 19. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u kontrolnom vinu i vinu fermentisanom uz dodatak hraniva za kvasac

Jedinjenje (mg/l)	Kontrola	Amonijačno hranivo	Aminokiselinsko hranivo
Galna kiselina	2,42±0,12	3,61±0,12	3,66±0,14
Protokatehuinska kiselina	2,31±0,12	3,86±0,15	1,40±0,10
Katehin	19,35±1,20	12,59±0,90	10,05±0,95
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,62±0,04	0,98±0,05	0,71±0,06
Vanilinska kiselina	3,39±0,15	5,28±0,21	3,31±0,15
Kafeinska kiselina	5,08±0,45	6,47±0,40	9,22±0,85
Epikatehin	7,60±0,25	3,77±0,15	3,23±0,12
Siringinska kiselina	7,74±0,55	10,61±0,90	6,19±0,40
<i>p</i> -kumarinska kiselina	5,54±0,30	5,51±0,30	5,76±0,40
Ferulinska kiselina	0,07±0,008	0,13±0,02	0,24±0,03
<i>trans</i> -resveratol	0,13±0,02	0,07±0,002	0,07±0,003
Elaginska kiselina	1,85±0,20	2,80±0,10	2,42±0,11
Kvercetin	0,57±0,06	0,63±0,05	0,40±0,04

U zavisnosti od karakteristika grožđa i uslova gajenja, šira može sadržati različite koncentracije azotnih nutritijenata. Prisustvo neorganskog oblika azota - amonijum kvasci snažno preferiraju i aminacijom ga direktno ugrađuju u ugljenični skelet. Amonijum otežava usvajanje aminokiselina od strane kvasca, blokirajući aminokiselinsku permeazu ali ne i specifične permeaze. U početku alkoholne fermentacije kvasci najčešće usvajaju amonijum jon, a kada se njegova količina utroši aktivira se aminokiselinska permeaza koja usvaja aminokiseline koje dotad nisu bile asimilovane. Većinu aminokiselina iz šire kvasac usvoji tokom fermentacije prvih 30 g/l šećera. Sa odmicanjem alkoholne fermentacije povećava se koncentracija etanola što negativno utiče na usvajanje aminokiselina od strane kvasca zato je neophodno hraniva dodati pre početka alkoholne fermentacije. Pošto povećana količina alkohola pogoduje ekstrakciji fenolnih jedinjenja tokom maceracije i fermentacije, nije nađeno da aminokiselinsko hranivo ima značajnog uticaja na fenolni sastav vina. Generalno posmatrajući, smanjenje pojedinih fenolnih jedinjenja u vinima sa dodatkom hraniva moglo bi se pripisati adsorpciji istih na povećanu aktivnu površinu kvašćevih ćelija usled povećanja biomase kvasca (Blesić, 2016).

5.5. Kinetika ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu i komini tokom alkoholne fermentacije i maceracije kljuka

5.5.1. Uticaj vremena maceracije, spontane fermentacije i zasejavanja kljuka različitim selekcionisanim vinskim kvascima na dinamiku ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja tokom maceracije uz spontanu fermentaciju je bio u stalnom porastu do 21. dana maceracije. Zasejavanjem kljuka kulturom selekcionisanog vinskog kvasca Qa23, tokom maceracije primećen je eksponencijalni porast sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja tokom 19 dana maceracije, nakon čega je došlo do opadanja njihovog sadržaja usled reakcija kondenzacije, polimerizacije ili degradacije (Slika 21). Maksimalna ekstrakcija ukupnih fenolnih jedinjenja tokom maceracije uz zasejavanje BDX i FX10 selekcionisanim vinskim kvascima, bio je 16. dan maceracije, nakon čega je primećen eksponencijalni pad njihove količine (Slika 21). Najniže vrednosti ukupnih fenolnih jedinjenja dobijene su u kontrolnim uzorcima vina (nulti dan) za sve varijante ogleđa. Ogledi na sorti Teran gde je analizirana dinamika ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja (3, 7, 12, 17 i 21 dan), dobijena je najviša vrednost 17. dan maceracije, a značajna razlika u njihovom sadržaju nađena je jedino između vina koja su macerirala 3 i 7 dana, posle čega je ekstrakcija upoređena do 21. dana (Damijanić et al., 2012).

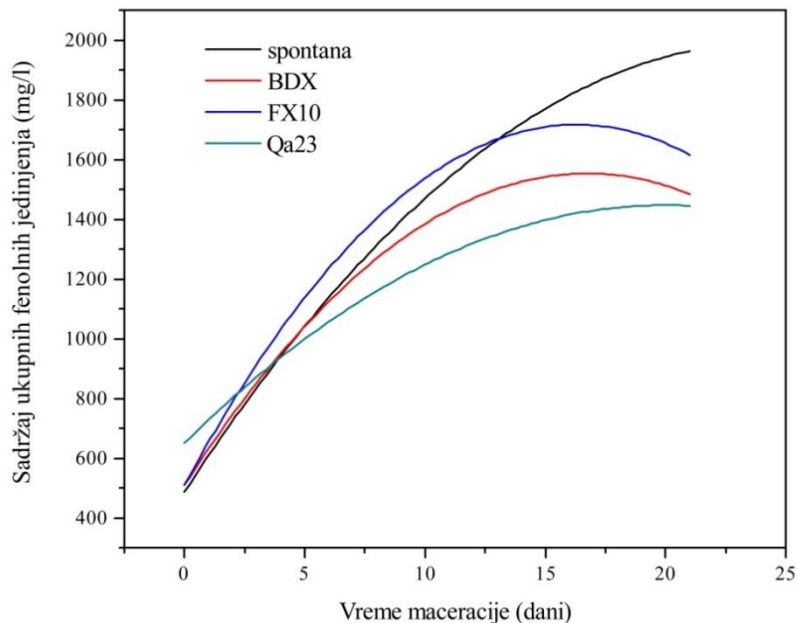
Testom uparenih uzoraka možemo da zaključimo da je značajna razlika u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u kontrolama svih primenjenih varijanti ogleđa (spontana, BDX, FX10 i Qa23) i vinima istih varijanti ogleđa ali sa različitim periodima maceracije ($p \leq 0,05$). Efekat trajanja maceracije na ukupna fenolna jedinjenja u vinu Karaoglan je bio značajan ($p < 0,05$) i njihova koncentracija je bila u porastu od 5. do 15. dana maceracije što je u saglasnosti sa našim rezultatima (Kocabey et al., 2016). U skladu sa tim je i istraživanje na sorti Plavac mali, gde je nađeno značajno povećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja produženjem perioda maceracije (Budić-Leto et al., 2008).

Suprotno tome analizom ukupnih fenolnih jedinjenja tokom maceraciono-fermentacionog procesa od 15 dana, nije zapažena značajna razlika u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u širi (nulti dan) i u vinu dobijenom posle 15 dana maceracije. Njihov sadržaj je imao tendenciju rasta tokom celog maceraciono-fermentacionog procesa (Muñoz-Bernal et al., 2020).

Najveća brzina ekstrakcije bila je tokom inokulisane fermentacije kvascem FX10 i maksimum ekstrakcije ostvaren je 16. dan maceracije (Tabela 20).

Tabela 20. Maksimalni ekstrahovani ukupni fenolni jedinjenja, vreme i brzina ekstrakcije u ogleđima spontane i inokulisane fermentacije

Vrsta fermentacije (2018)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)	Vreme maksimuma ekstrakcije (dan)	Brzina ekstrakcije (mg/dan)
spontana	1963,40	21.	5,00
BDX	1552,90	16.	7,40
FX10	1716,60	16.	9,20
Qa23	1446,80	19.	3,80



Slika 21. Dinamika ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja tokom 21 dan maceracije bez zasejavanja i sa zasejavanjem vinskim selekcionisanim kvascem

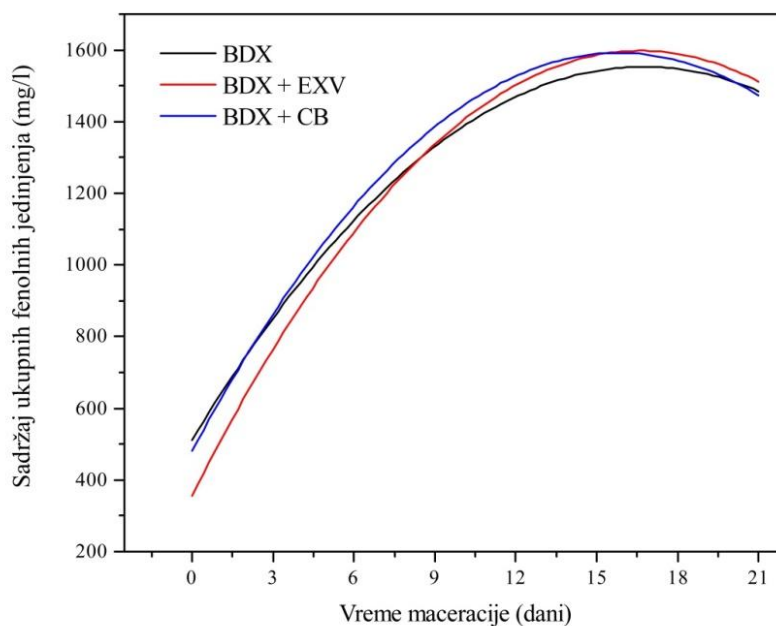
Vršeno je poređenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja vina, varijante ogleđa spontane fermentacije (bez dodate kulture selekcionisanog kvasca), sa sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja vina dobijenih dodatkom BDX, FX10 i Qa23. Ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika u pogledu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja među ovim uzorcima, na nivou značajnosti 0,05. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem na sorti Vranac, gde je praćena dinamika ekstrakcije treći, šesti i deseti dan uz primenu dva različita kvasca, Vinalco (Makedonija) i Levuline (Francuska) (Ivanova et al., 2012). U tom istraživanju, kao ni u našem, nije ustanovljena značajna razlika u uticaju korišćenih kvasaca na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Smatra se da je to zbog primene kvasaca iste *Saccharomyces cerevisiae* vrste. Međutim, u daljem istraživanju Ivanova-Petropulos et al. (2015), gde su korišćeni kvasac Vinalco i Lallemand komercijalni kvasci među kojima je i BDX koji smo koristili u našem istraživanju, bolje se pokazao kvasac Vinalco u pogledu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na Lallemand kvasce, zbog moguće adsorpcije fenolnih jedinjenja na ćelije kvasca. To bi se moglo poistovetiti sa našim rezultatima gde je nađeno više ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu koje je spontano fermentisalo. Dobro je poznato da se metabolički putevi kvasca mogu razlikovati među sojevima koji utiču na sadržaj fenola (npr. tirozol, pirogroždana kiselina, vinilfenol) i drugih jedinjenja (npr. acetaldehid) tokom maceracije. Neka od ovih jedinjenja mogu reagovati sa antocijanima modifikujući njihova adsorpciona svojstva (Ivanova-Petropulos et al., 2015).

5.5.1.1. Poređenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja vina inokulisane fermentacije uz dodatak enzimskih preparata

Postavljeni su ogledi mikroviniifikacije korišćenjem kvasca BDX bez dodatka enzimskih preparata, kao i varijante ogleđa korišćenjem BDX kvasca uz dodatak enzimskih preparata EXV i Cuvée blanc (CB) (Slika 22). Statističkom obradom dobijenih rezultata (T-tesom), došli smo do zaključka da ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja između varijanti ogleđa pri korišćenju samog kvasca i u kombinaciji sa enzimskim preparatima (EXV i CB) na nivou značajnosti 0,05. Slabo dejstvo enzimskih preparata tokom maceracije može se objasniti stvaranjem kompleksa enzim- fenol hidrofobnim interakcijama, jer proteini sadrže ograničen broj

pozicija koje bi mogle stupiti u interakciju sa fenolnim jedinjenjima (Wojdyło et al., 2021). Za razliku od naših rezultata Ortega-Heras et al. (2012) su našli viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinima koja su macerirala uz dodatak enzima nego u kontroli. Prema Mihnea et al. (2016) na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja bolje se pokazala primena enzimskog preparata u odnosu na tradicionalnu maceraciju koja je trajala 12 dana, što su pokazali i drugi autori (Parley, 1997; Bautista-Ortín et al., 2005; Bautista-Ortín et al., 2007; Romero-Cascales et al., 2012).

Primenom pektinolitičkog enzima tokom maceracije grožđa vinove loze sorte Syrah došlo je do porasta koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja do 15. dana maceracije zadržavajući je konstantnom tokom daljeg perioda maceracije (Alencar et al., 2017).



Slika 22. Dinamika ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja za varijante ogleda sa kvascem BDX i varijantama ogleda sa dodatim enzimskim preparatima

Tabela 21. Maksimumi ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja, vreme i brzina ekstrakcije u ogledima inokulisane fermentacije sa i bez enzimskih preparata

Vrsta fermentacije (2018)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)	Vreme maksimuma ekstrakcije (dan)	Brzina ekstrakcije (mg/dan)
BDX	1552,90	16.	7,40
BDX + EXV	1597,75	16.	9,00
BDX + CB	1591,88	15.	6,51

Najvećoj brzini ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja je pogodovala kombinacija BDX + EXV, a maksimum ekstrakcije je primećen 16. dan maceracije (Tabela 21), što je primećeno i u varijanti ogleda iz 2016. godine s tim što je u tom slučaju maksimum ekstrakcije bio 19. dan maceracije (Tabela 22).

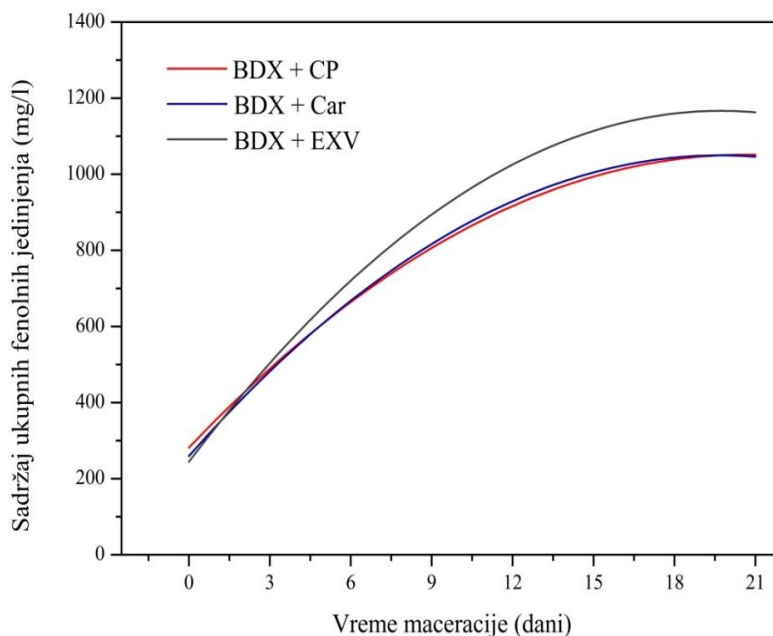
5.5.1.2. Uticaj vremena maceracije i primene enzimskih preparata (EXV, CP i Car) na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja vina berbe 2016.

Dobijeni rezultati sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja vina proizvedenih u 2016. godini istraživanja, su pokazali slične rezultate kao i vina iz 2018. godine. To znači da je produženje vremena maceracije dovelo do veće ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja (Slika 23) što je u saglasnosti sa Kocabey et al. (2016), koji su primenili maceraciju u trajanju od 15 dana. Tokom fermentacije i maceracije uz ove enzime, došlo je do porasta sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja do 21. dana maceracije.

Najveća vrednost sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja dobijena je primenom enzimskog preparata EXV, koji poseduje pektinolitičku aktivnost, i ostvareni maksimum je bio 1166,70 mg GAE/l (Tabela 22). Prema Sacchi et al. (2005), koji su ranije ispitivali uticaj pektinaza na boju crvenih vina kao i ukupne fenole, pokazali su pozitivne efekte na kraju fermentacije i to za sorte Grenache, Carignane, Zinfandel i Petite sirah. Naši rezultati govore da je dinamika ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja bila eksponencijalna.

Maksimumi ekstrakcije uz EXV i Car enzimske preparate ostvareni su 19. dana maceracije, dok je primenom CP enzimskog preparata maksimum bio 20. dan maceracije (Tabela 22). To je u skladu sa Vrhovsek et al. (2002) gde je nađeno konstantno povećanje proantocijanidina od 15. do 19. dana maceracije, u vinima sorte Blaufränkisch, dok duži kontakt dovodi do gubitaka. Druga studija na sorti Teran, pokazala je da je najveći sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida bio 17. dan maceracije (Damijanić et al., 2012). Slično našim rezultatima, porast ukupnih fenolnih jedinjenja primećen je do kraja vremena maceracije uz enzimske preparate za sorte Cabernet sauvignon i Isabel, kako navodi Sacchi et al. (2005) u svom radu, dok takvo ponašanje nije nađeno za sortu Syrah. Villaño et al. (2006) su u svom radu zapazili povećanje ukupnih fenolnih jedinjenja tokom 11 dana maceracije za sortu Cabernet sauvignon, od 734 mg GAE/l do 2 813 mg GAE/l, kao i Jordão et al. (2011) tokom 9 dana maceracije za lokalne portugalske sorte, što je nešto raniji maksimum u odnosu na naše rezultate.

Poredeći ukupni fenolni sadržaj u vinu označenom kao kontrola (nulti dan) i vinima dobijenim tretiranjem različitim enzimskim preparatima ustanovljena je značajna razlika ($p \leq 0,05$), što znači da je vreme maceracije presudno za veći sadržaj ukupnih fenola. Ovo potvrđuje i studija Kovač et al. (1992), gde je došlo do porasta ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida tokom dužeg kontakta šire sa čvrstim delovima grožđa.



Slika 23. Dinamika ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja za varijante ogleda sa kvascem BDX i dodatim enzimskim preparatima

Tabela 22. Maksimumi ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja, vreme i brzina ekstrakcije tokom varijanti ogleda inokulisane fermentacije sa enzimskim preparatima

Vrsta fermentacije (2016)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)	Vreme maksimuma ekstrakcije (dan)	Brzina ekstrakcije (mg/dan)
BDX + EXV	1166,70	19.	4,07
BDX + CP	1051,50	20.	2,43
BDX + Car	1049,73	19.	3,97

5.5.2. Uticaj vremena maceracije, spontane fermentacije i zasejavanja kljuka različitim selekcionisanim vinskim kvascima na dinamiku ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja u komini

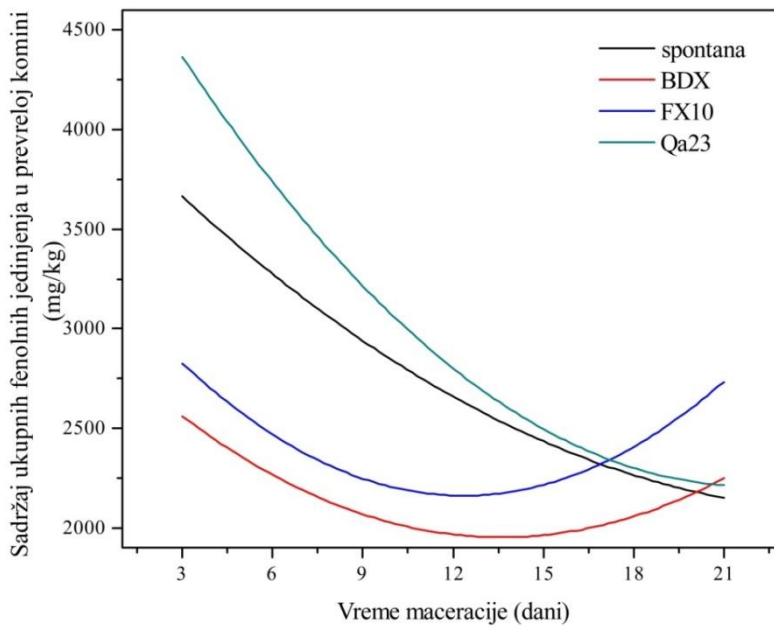
5.5.2.1. Uticaj zasejavanja selekcionisanih vinskih kvasaca (BDX, FX10 i Qa23) na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja zaostalih u komini u odnosu na spontanu fermentaciju

Poredeći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u komini zaostaljoj posle spontane i u komini zaostaljoj nakon inokulisane fermentacije, jedino je uz kvasac BDX nađena statistički značajna razlika u odnosu na spontanu fermentaciju ($p < 0,05$).

U varijanti ogleda spontane fermentacije najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja zaostalih u prevreloj komini nađen je posle tri dana maceracije u količini od $3719,75 \pm 96,0$ mg/kg prevrele komine (Tabela 23). Prateći dalji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u komini tokom 21 dan izluživanja, zapažen je eksponencijalni pad od trećeg do dvadesetprvog dana maceracije (Slika 24), gde je ostvaren najniži sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja spontane fermentacije i to $2114,93 \pm 101,5$ mg/kg (Tabela 23). Dinamika ekstrakcije iz čvrstih delova grožđa bi se mogla uporediti sa eksponencijalnim opadanjem koncentracije antocijanina tokom 25h, koja je dobijena

bilansom mase monomernih antocijanina za komplementarnu tečnu fazu (Setford et al., 2019a). Prema Iora et al. (2015), koji su radili ekstrakciju ukupnih fenolnih jedinjenja iz komine koja je sušena na 50°C, nađena je veća količina ukupnih fenolnih jedinjenja izraženih na 100 gr sušene komine u odnosu na našu kominu koja je prethodno liofilizovana, s tim što u tom istraživanju nije primenjena maceracija. U drugom istraživanju gde je maceracija trajala 6 dana, a potom komina liofilizovana i usitnjena uz tečni azot, nađena je količina od 74,75±2,22 mg/g suve liofilizovane komine za sortu Cabernet sauvignon (Rockenbach et al., 2011), dok je u našim uzorcima ta količina bila 4-5 puta manja za istu sortu. Pretpostavlja se da je uzrok tome različita priprema uzorka, koja je obuhvatala različite rastvarače, usitnjavanje liofilizovane komine jer se pokazalo da veličina čestica bitno utiče na ekstrakciju (Sparrow et al., 2016), upotreba vinskih selekcionisanih kvasaca itd. Količina zaostalih ukupnih fenolnih jedinjenja posle 6 dana maceracije u našim uzorcima komine bila je približnija izmerenoj količini u komini od grožđa vinove loze sorti Isabel i Merlot (Rockenbach et al., 2011). U radu Moldovan et al. (2020), sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja različitih sorti u vodenim ekstraktima kretao se ispod 9,5 mg/g suve komine, dok je u etanolnim rastvorima sa zagrevanjem primećen nešto viši prinos. To je u skladu sa našim rezultatima obzirom da ekstrakcija nije rađena na isti način (rastvarači, vreme ekstrakcije, korišćenje ultrazvučnog kupatila). Različit prinos zaostalih fenolnih jedinjenja u komini grožđa je i očekivan usled različitog načina vinifikacije, primenjenih agrotehničkih i ampelotehničkih mera u vinogradu, vremenskih uslova, perioda berbe, stepena zrelosti itd. (Rockenbach et al., 2011; Moldovan et al., 2020). U našim uzorcima je nađeno u proseku 1 g/100g liofilizovane komine, dok je u radu Wang et al. (2017), prema njihovoj proceduri ekstrakcije komine grožđa vinove loze sorte Tempranillo nađeno je 4,84 g/100g suvog ekstrakta komine.

Kao što je i prikazano na graficima (Slika 24 i Slika 25), u varijantama ogleđa spontane fermentacije, BDX + CB, BDX + EXV₂₀₁₆, kao i inokulacije sa Qa23 vinskim selekcionisanim kvascem, zabeležen je eksponencijalni pad sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja sa minimumom 21. dana maceracije. U slučaju varijanti ogleđa inokulacije sa FX10 selekcionisanim vinskim kvascem minimalna količina ukupnih fenolnih jedinjenja je nađena posle 12 dana maceracije (Slika 24), a u slučaju BDX kvasca, nakon 13 dana maceracije. Nakon toga, došlo je do povećanja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u komini sve do 21. dana maceracije što bi se moglo objasniti reakcijama adsorpcije fenolnih jedinjenja na ćelije kvasca kojima je kljuk inokulisan (Setford et al., 2017; Bautista-Ortín et al., 2016). To bi mogla potvrditi i činjenica da tokom spontane fermentacije, gde nije bilo dodavanja selekcionisanog vinskog kvasca, ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz komine u vino je tekla neometano do 21. dana maceracije gde je utvrđen njihov minimum. To se poklopilo i sa maksimumom fenolnih jedinjenja posle 21 dan maceracije u komplementarnom vinu. Prema Bautista-Ortín et al. (2016), tokom ekstrakcije se adsorpciono-desorpcionim procesima uspostavlja ravnoteža koncentracije antocijana između grožđa i vina, i kada se dostigne to stanje nije moguća dalja ekstrakcija antocijana iz pokožice bobice, što bi se moglo poistovetiti sa ekstrakcijom ukupnih fenolnih jedinjenja. Pošto se uz sam BDX kvasac ekstrakcija iz komine intezivno dešavala do 13. dana maceracije, njegova kombinacija sa različitim enzimskim preparatima (BDX + EXV₂₀₁₈, BDX + Car, BDX + CP) dovela je do produženja perioda ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz prevrele komine do 14, 16 i 18 dana. To bi se moglo pripisati enzimskom delovanju oslobađanja fenolnih jedinjenja jer veliku ulogu prilikom njihove ekstrakcije igra i struktura biljnog materijala (Setford et al., 2017; Ducasse et al., 2010; Sacchi et al., 2005). Konkretno u našem eksperimentu, ćelijske zidove bobica grožđa, enzimi su doveli u stanje dužeg izluživanja.



Slika 24. Dinamika sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja zaostalih u komini tokom maceracije u varijantama ogleda sa i bez zasejavanja kljuka

Tabela 23. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u prevreloj komini za ogledne spontane i inokulisane fermentacije

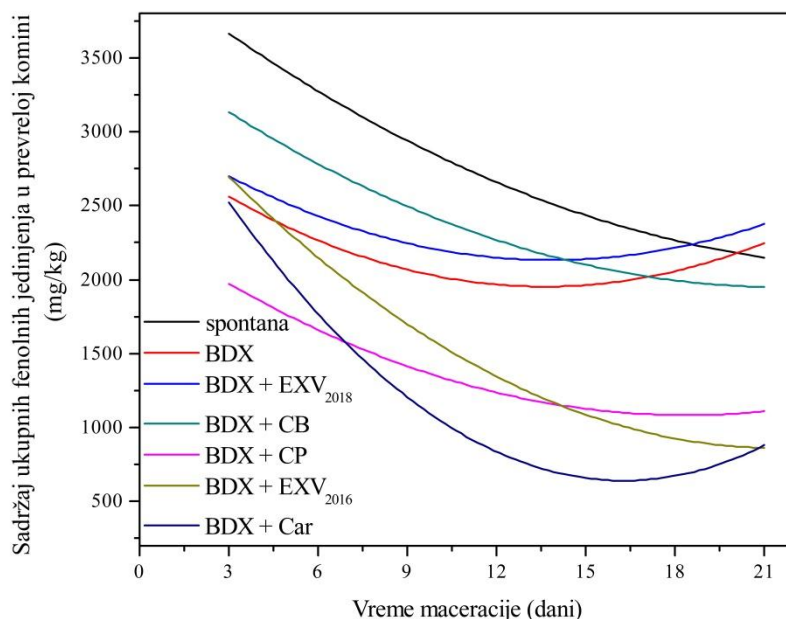
Vrsta fermentacije	3. dan (mg/kg)	5. dan (mg/kg)	7. dan (mg/kg)	14. dan (mg/kg)	21. dan (mg/kg)
Spontana	3719,75±96,0	3454,74±90,0	2958,35±55,0	2622,64±89,5	2114,93±101,5
BDX	2400,66±65,0	2670,95±70,0	2044,44±75,0	1926,31±99,0	2260,56±86,0
FX10	2822,19±98,0	2359,37±80,0	2700,62±85,0	2036,36±60,0	2774,5±65,0
Qa23	4083,6±108,0	4404,54±110,0	3422,68±90,0	2481,66±70,0	2253,02±98,0

5.5.2.2. Poređenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u prevreloj komini dobijenoj primenom kvasca i enzimskih preparata

Nije ustanovljena statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja zaostalih u komini koja je fermentisala uz kvasac BDX i u kombinaciji BDX + CB i BDX + EXV enzimskih preparata ($p > 0,05$) uključujući uzorke primenjenih svih perioda maceracije.

Analizirajući kominu zaostalu posle fermentacije sa BDX selekcionisanim vinskim kvascem i EXV enzimskim preparatom za dve godine istraživanja (2016. i 2018.), nije nađena statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja (Slika 25) ($p > 0,05$).

Prevrela komina posle 3 dana maceracije kod ogleda BDX + CB, dala je najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i to 3278,5±85,0 mg/kg (Tabela 24), dok je najmanji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja zaostao u komini ogleda BDX + Car u količini od 557,14±30,0 mg/kg (Tabela 24).



Slika 25. Dinamika ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja zaostalih u komini tokom maceracije u oglelima spontane fermentacije, inokulisane sa BDX i oglelima BDX sa dodatim enzimskim preparatima

Tabela 24. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u prevreloj komini ogleda sa kvascem i enzimskim preparatima

Vrsta fermentacije	3. dan (mg/kg)	5. dan (mg/kg)	7. dan (mg/kg)	14. dan (mg/kg)	21. dan (mg/kg)
BDX + EXV₂₀₁₈	2506,04±90,0	3268,19±95,0	1634,27±40,0	2343,54±80,0	2323,82±86,0
BDX + CB	3278,5±85,0	2797,01±77,0	2521,88±60,0	2303,23±50,5	1900,35±85,0
BDX + CP	1846,7±60,0	1857,14±40,0	1678,06±40,0	1035,8±70,0	1147,2±78,0
BDX + EXV₂₀₁₆	2491,6±55,0	2363,04±40,0	2335,31±98,0	891,4±55,0	944,67±44,0
BDX + Car	2470,07±80,0	1905,5±80,0	1802,7±45,0	557,14±30,0	921,74±38,0

5.5.2.3. Uticaj maceracije na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja zaostalih u prevreloj komini dobijenom primenom različitih kvasaca i enzimskih preparata

Trajanje maceracije je značajno uticalo na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja koja su zaostala u komini koja je macerirala uz kvasac BDX i enzimске preparate EXV₂₀₁₆, CP i Car. Nađena je statistički značajna razlika između komine koja je macerirala 3 i 5 dana u poređenju sa 14 i 21 dan, kao i između komine koja je macerirala 7 i 14 dana ($p < 0,05$). Tokom inokulisane i spontane fermentacije, značajna razlika u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja dobijena je između 3 dana i sa druge strane 7 i 14 dana maceracije ($p < 0,05$). Statistički značajna razlika je nađena između ukupnih fenolnih jedinjenja zaostalih u komini koja je macerirala 3 i 7 dana, kao i između 5 i 21 dan uz kvasac BDX i enzimске preparate EXV₂₀₁₈ i CB.

Prema Andrich et al. (2005), u početku maceracije izdvaja se samo 26% ekstraktibilnih fenolnih jedinjenja iz čvrste u tečnu fazu (širu), što znači da većina zaostaje u komini što je i u

skladu sa našim istraživanjem. Između 14. i 20. dana maceracije nije zapažena značajna razlika kad je u pitanju ekstrakcija jedinjenja u tečnu fazu (Andrich et al., 2005), što se preslikava i na kominu u našem istraživanju. U našim uzorcima nije bilo značajnih razlika u sadržaju zaostalih fenolnih jedinjenja komine 14. i 21. dana ($p > 0,05$).

Komina zaostala nakon kraćeg perioda maceracije, u većini slučajeva dala je viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja koja su preostala zbog nedovoljnog kontakta čvrste (delova grožđa) i tečne faze (šire ili vina), slično kao u radu de la Cerda-Carrasco et al. (2015), dok se u slučaju duže maceracije dvojako ponašala. Posmatrajući kinetiku ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz komine tokom 21 dan maceracije, komina ih je u prvom slučaju otpuštala tokom celog perioda kontakta čvrste i tečne faze. U drugom slučaju u nekom momentu dolazilo je do adsorpcije ekstrahovanih fenolnih jedinjenja na ćelije kvasca ili na čvrste delove grožđa. Uporedo sa ekstrakcijom dešavale su se reakcije oksidacije, kopigmentacije kao i nastajanja novih pigmenata (Setford et al., 2017). Ograničena ili smanjena ekstrakcija tanina, koji čine 30 % ukupnih fenolnih jedinjenja (Solari-Godiño et al., 2017), iz bobice grožđa mogla bi se objasniti i kao rezultat uspostavljanja vodoničnih veza i hidrofobnih interakcija između tanina i ćelijskih zidova bobice grožđa (Hanlin et al., 2010). Neki autori navode da kvasci najviše adsorbuju antocijanine formirajući slabe i reverzibilne veze, ali i pojedinačna fenolna jedinjenja u model rastvorima (Razmkhab et al., 2002; Salmon et al., 2002; Cerpa-Calderón i Kennedy, 2008).

Procesi ekstrakcije mogli bi se opisati reakcijama difuzije (Cerpa-Calderón i Kennedy, 2008), gde su se fenolna jedinjenja kretala iz faze visoke koncentracije (komina) do faze niže koncentracije (šira) tokom maceracije. Konkretno u ovom slučaju proces difuzije uslovljen je nastalom količinom etanola, raspoloživom površinom kontakta čvrstih delova grožđa, dužinom maceracije kao i molekularnom strukturom fenolnih jedinjenja. Prema Setford et al. (2017), etanol ima značajan uticaj na brzinu kao i na produženje ekstrakcije fenola iz komine grožđa. Prema tome, u komini zaostaloj posle kraćeg perioda kontakta čvrste i tečne faze, a i zbog manje koncentracije etanola, nađeni su maksimumi ukupnih fenolnih jedinjenja u komini posle tri i pet dana maceracije. To je u skladu i sa istraživanjem Bautista-Ortín et al. (2007), koji navode da se fenolna jedinjenja semenke ekstrahuju tek na kraju fermentacije. Period od tri ili pet dana maceracije nije dovoljan za njihovu ekstrakciju pa zaostaju u komini u većoj meri.

5.6. Kinetika ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja u vinu tokom alkoholne fermentacije i maceracije kljuka uz primenu različitih kvasaca i enzimskih preparata

Tokom maceracije dolazi do ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz čvrstih delova grožđa (komine) u tečni deo (širu). Sva ta fenolna jedinjenja ekstrahuju se određenom brzinom u određenom momentu maceracije koja je u našem ispitivanju trajala 21 dan.

5.6.1. Galna kiselina

Galna kiselina je maksimum ekstrakcije dostigla 21. dana maceracije za varijante ogleđa spontane fermentacije, kao i za varijantu ogleđa uz BDX (Tabela 26), dok su maksimumi za FX10 i Qa23 varijante ogleđa bili nešto ranije, 17. i 18. dana maceracije za berbu 2018. godine (Tabela 27). Uz primenu kvasca Qa23 ostvarena je najveća brzina ekstrakcije galne kiseline od 0,0225 mg/danu (Tabela 27). Prateći istraživanje Francesca et al. (2014), količina galne kiseline je bila u porastu čak do 90. dana post-fermentativne maceracije, što je u saglasnosti sa našim istraživanjem praćenim do 21. dana maceracije. Rađena je i kraća maceracija od 9 dana na sortama Cabernet sauvignon, Vranac i Stanušina gde je nađeno da je količina galne kiseline u porastu dok traje maceracija, do 9. dana, dok je za Vranac konstatovan maksimum već 6. dan maceracije (Ivanova-Petropulos et al., 2016). Poredeći sadržaj galne kiseline 8. i 16. dan maceracije na sorti Fetească neagră, zaključeno je da duža maceracija dovodi do veće ekstrakcije ovog jedinjenja (Artem et al., 2021) kao i u našim istraživanjima koja su vezana za dinamiku galne kiseline u svim varijantama ogleđa sa i bez

kvasaca. Međutim, taj trend dinamike ekstrakcije se nastavio i dodavanjem enzimskih preparata (EXV i CB) tokom maceracije uz fermentaciju primenom BDX selekcionisanog vinskog kvasca. Prema Alencar et al. (2017) i Kocabey et al. (2016) porastu galne kiseline je pogodovala produžena maceracija, što može biti rezultat hidrolize galo-fenola na pH vina (Borazan i Bozan, 2013).

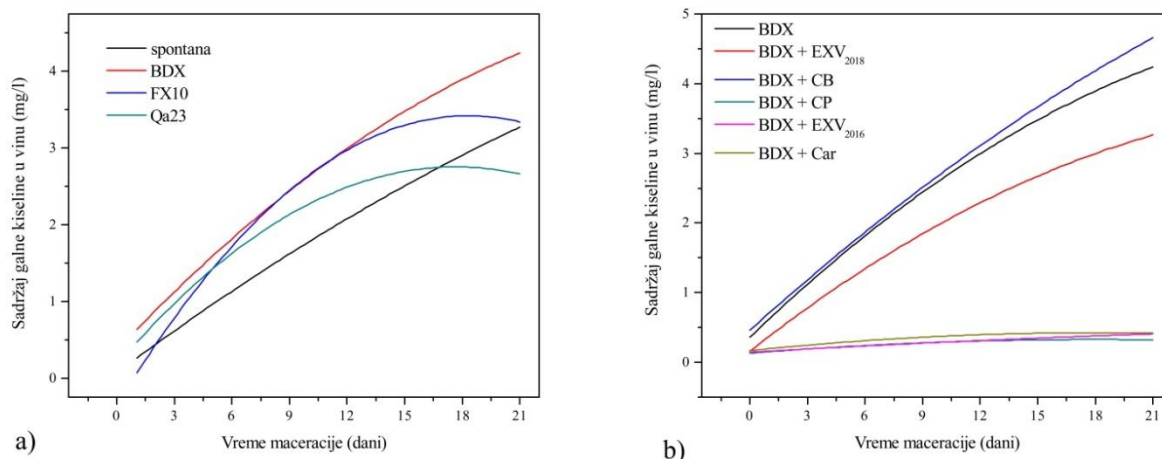
Kao i za BDX, tako i uz dodatak enzimskih preparata EXV i CB, maksimum ekstrakcije galne kiseline bio je 21. dana maceracije (Tabela 25) kao i za 2016. godinu koristeći isti enzim i kvasac (Tabela 28). Od svih varijanti ogleđa kvasaca i enzima, za obe godine istraživanja, najviši sadržaj galne kiseline dobijen je primenom kvasca BDX u kombinaciji sa enzimskim preparatom CB uz maceraciju od 21 dan (4,6600 mg/l) (Tabela 25). Maceracijom uz enzime CP i Car u 2016. godini istraživanja, nađeno je da je došlo do eksponencijalnog porasta sadržaja galne kiseline do 18. dana maceracije (Slika 26). To je u skladu sa rezultatima Generalić Mekinić et al. (2019) koji su koristili Vinozym Vintage, enzimski preparat koji je kao i naš CB u osnovi takođe pektinaza sa dodatnim bočnim aktivnostima. Dodatak enzimskih preparata pri maceraciji grožđa vinove loze sorte Mencía, takođe je doveo do povećanja sadržaja galne kiseline posle 12 dana maceracije, u odnosu na kontrolu koja nije macerirala uz enzim (Soto-Vázquez et al., 2010). Najniža ekstrahovana količina ostvarena je kod ogleđa BDX + CP i iznosila je 0,3274 mg/l (Tabela 28).

Poređenjem sadržaja galne kiseline u vinu dobijenom spontanom fermentacijom i vinu dobijenom dodatkom BDX selekcionisanog vinskog kvasca, ustanovljena je statistički značajna razlika. Zasejavanje FX10 i Qa23 kvascima nije imalo značajnog uticaja na sadržaj galne kiseline. Primena enzima CP i Car u 2016. godini, dali su značajnu razliku u pogledu sadržaja galne kiseline.

Sadržaj galne kiseline u vinima različitog vremena maceracije, spontane i inokulisane fermentacije se značajno razlikovao od sadržaja galne kiseline u kontrolnom vinu ($p \leq 0,05$). Pored toga, ustanovljena je statistički značajna razlika u sadržaju galne kiseline u kontroli poredeći je sa vinima uz dodatak CP i Car enzimskih preparata ($p \leq 0,05$), dok ostali primenjeni enzimski preparati nisu imali značajan uticaj.

Sadržaj galne kiseline u vinu označenom kao kontrola značajno se razlikovao od sadržaja galne u vinima koja su macerirala 5, 7, 14 i 21 dan ($p < 0,05$). To znači da je vreme maceracije je bitno uticalo na ekstrakciju galne kiseline pri ogleđima sa i bez kvasaca. Sa produžetkom vremena maceracije došlo je do eksponencijalnog porasta sadržaja galne kiseline (Slika 26). Analizirajući vreme maceracije uz dodatak EXV i CB, sadržaj galne kiseline u kontroli se nije značajno razlikovao od vina različitih dana maceracije ($p \geq 0,05$). U varijantama ogleđa u 2016. godini maceracija od 5, 14 i 21 dan je bila značajna za sadržaj galne kiseline poredeći ga sa sadržajem u kontroli (nulti dan).

Testom uparenih uzoraka, nije ustanovljena značajna razlika između varijanti ogleđa pri korišćenju samog kvasca BDX i u kombinaciji sa enzimskim preparatima (EXV i CB) na nivou značajnosti 0,05. Ovakav efekat enzima na ekstrakciju galne kiseline može se porediti sa istraživanjem Romero-Cascales et al. (2008) gde se sa produženjem perioda maceracije efekat primenjenih enzima smanjuje. Pomenuti autori su ustanovili da je 7. dana maceracije ekstrahovano 13% više bojenih materija u odnosu na kontrolu, a zatim do kraja maceracije (15 dana) taj procenat se smanjio i nije nađena značajna razlika u sadržaju ekstrahovanih jedinjenja. Prema Bautista-Ortín et al. (2005), nije ustanovljena značajna razlika u sadržaju galne kiseline između enzimom tretiranih i netretiranih uzoraka.



Slika 26. Dinamika ekstrakcije galne kiseline tokom spontane i inokulisane fermentacije (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti selekcionisani kvasac, BDX (b)

5.6.2. Protokatehuinska kiselina

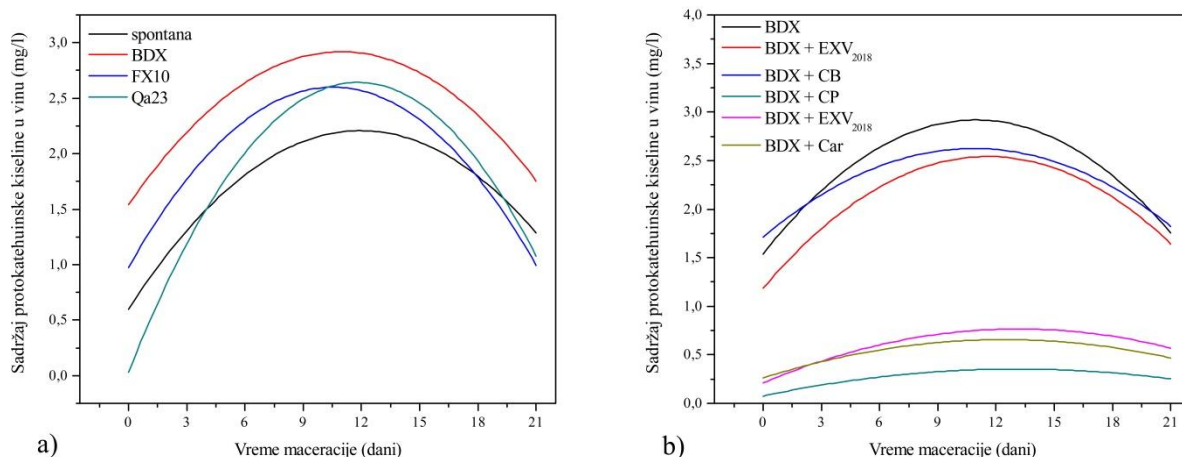
Protokatehuinska kiselina dostigla je maksimum već 10. dan maceracije (2,5984 mg/l) kod FX10 varijante ogleđa (Tabela 27), dok je kod ostalih ogleđa spontane i inokulisane fermentacije maksimum bio 11. dan maceracije (Tabela 26 i Tabela 27). Prateći kinetiku ekstrakcije protokatehuinske kiseline uz dodatak enzimskog preparata EXV maksimum ekstrakcije je bio 11. dan maceracije, dok je uz CB maksimum ekstrakcije dostignut dan ranije u količini 2,6247 mg/l, za 2018. godinu (Tabela 25). Najviša ekstrahovana količina uz pomenuti EXV enzimski preparat je iznosila 2,5419 mg/l (Tabela 25). Maksimum ekstrakcije je bio 12. i 13. dana maceracije u varijantama ogleđa sa enzimskim preparatima CP, EXV i Car (Tabela 28). U pomenutoj godini istraživanja, kod ogleđa BDX + CP ostvarena je najviša ekstrahovana količina protokatehuinske kiseline i to 0,9300 mg/l (Tabela 28). Nakon ostvarenih maksimuma došlo je do opadanja sadržaja protokatehuinske kiseline do kraja ispitivanog perioda maceracije (Slika 27). Suprotno od naših rezultata, najveća količina protokatehuinske kiseline ekstrahovana je već posle 3 dana maceracije (Ivanova-Pertopulos et al., 2016). Od svih varijanti ogleđa primenjenih kvasaca i enzima, najveća brzina ekstrakcije protokatehuinske kiseline bila je 0,0373 mg/danu, uz kvasac Qa23 (Tabela 27).

Ispitivajući uticaj zasejavanja kvascima BDX, FX10 i Qa23, u odnosu na spontanu fermentaciju (Slika 27a), nađeno je da je samo BDX značajno uticao na promenu koncentracije protokatehuinske kiseline ($p \leq 0,05$). Prema Ivanova-Pertopulos et al. (2015), upotreba različitih kvasaca tokom fermentacije dala je slične koncentracije protokatehuinske kiseline. Testom uparenih uzoraka nađena je značajna razlika između kontrolnih vina i vina različitog vremena maceracije za sve varijante ogleđa sa i bez kvasca kao i uz dodatak enzimskih preparata EXV i CB, kao i u 2016. godini koristeći enzime CP i Car.

Analizirajući kako vreme maceracije utiče na sadržaj protokatehuinske kiseline u varijantama ogleđa sa dodatim enzimima, dobijeno je da postoji značajna razlika između kontrole (nulti dan) i vina čija je maceracija trajala 7 dana. U ogleđima sa CP, EXV i Car na njen sadržaj uticali i ostali periodi maceracije. U varijantama ogleđa spontane i inokulisane fermentacije kontrola se značajno razlikovala od vina čija je maceracija trajala 3, 5, 7, 14 i 21 dan ($p \leq 0,05$).

Dodatak enzimskih preparata EXV i CB, uz zasejavanje selekcionisanim kvascem BDX (Slika 27b), nije značajno menjao sadržaj protokatehuinske kiseline u odnosu na vina koja su fermentisala samo uz kvasac BDX ($p \geq 0,05$). Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Soto-Vásquez et al. (2010) gde dodatak enzima i tanina nije značajno promenio sadržaj protokatehuinske

kiseline. Poredeći različite enzime u 2016. godini, nađena je značajna razlika u sadržaju protokatehuinske kiseline maceracijom uz CP i Car ($p \leq 0,05$).



Slika 27. Dinamika ekstrakcije protokatehuinske kiseline tokom spontane i inokulisane fermentacije (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti selekcionisani kvasac, BDX (b)

5.6.3. *p*-hidroksibenzoeva kiselina

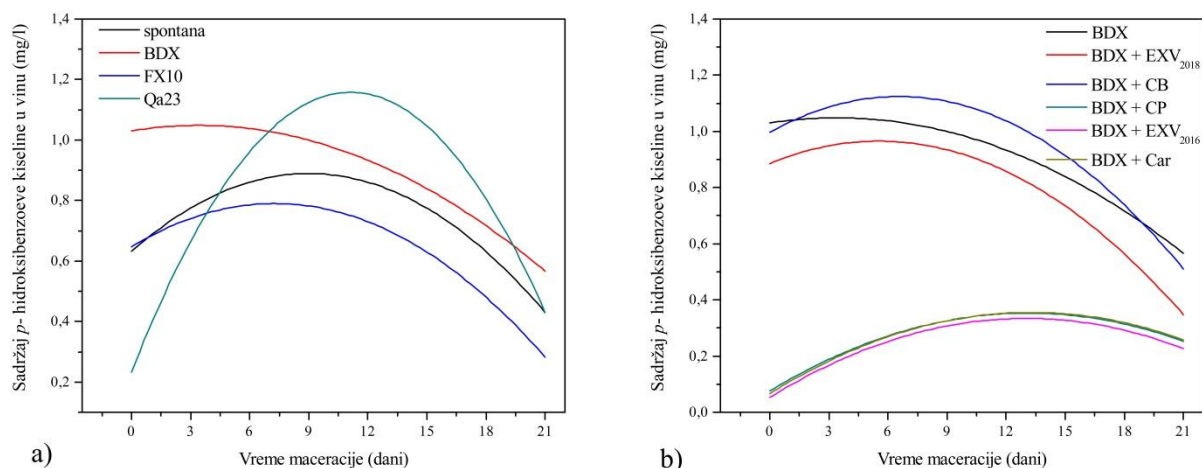
Od svih analiziranih jedinjenja, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, je najranije dostigla svoj maksimum već 3. dana maceracije u količini 1,0485 mg/l uz selekcionisani vinski kvasac BDX (Tabela 26). Maksimum ekstrakcije u 2016. godini je bio čak 13. dan, uz enzimске preparate EXV, CP i Car (Tabela 28). Za razliku od toga, primena enzimskih preparata EXV i CB u 2018. godini, dala je maksimume ekstrakcije ovog jedinjenja 5. odnosno 6. dan maceracije (Slika 28b). Slično tome, rezultati jednog istraživanja govore o povećanju količine ovog jedinjenja usled povećanja vremena maceracije (Artem et al., 2021). Analiza dinamike ekstrakcije *p*-hidroksibenzoeve kiseline uz različite kvasce i enzime (Slika 28), pokazala je da se maksimalna ekstrahovana količina ostvarila uz primenu kvasca Qa23 i iznosila je 1,1578 mg/l (Tabela 27).

Kada je u pitanju sadržaj *p*-hidroksibenzoeve kiseline, utvrđena je statistički značajna razlika među vinima koja su fermentisala sa dodatkom kvasca BDX i sa druge strane vinima koja su fermentisala uz BDX sa dodatkom EXV enzimskog preparata, na nivou značajnosti 0,05. Suprotno tome, neka istraživanja govore da dodatak enzima i tanina tokom maceracije grožđa vinove loze sorte Mencía, nije značajno uticao na promenu sadržaja *p*-hidroksibenzoeve kiseline u odnosu na kontrolu (Soto-Vásquez et al., 2010).

Od svih primenjenih kvasaca samo je BDX imao značajan uticaj na sadržaj *p*-hidroksibenzoeve kiseline u odnosu na spontanu fermentaciju. U poređenju sa kontrolnim vinima značajna razlika je nađena za vina spontane i fermentacije sa Qa23 kvascem. Dodati kvasci BDX i FX10 nisu imali uticaj. Nije bilo razlike u sadržaju ovog jedinjenja u kontroli i vinima ogleđa BDX + EXV i BDX + CB ($p > 0,05$). Nađena je značajna razlika u kontroli i vinima različitih perioda maceracije uz CP, EXV i Car. Isto tako u 2016. godini, različiti enzimski preparati su dali različite sadržaje *p*-hidroksibenzoeve kiseline ($p \leq 0,05$).

Sadržaj *p*-hidroksibenzoeve kiseline u kontroli se značajno razlikovao od njene količine u vinima čija je maceracija trajala 3, 5 i 7 dana sa i bez kvasaca, na nivou značajnosti 0,05. Vreme maceracije od 5 i 14 dana imalo je značajan uticaj na promenu sadržaja *p*-hidroksibenzoeve kiseline u varijanti ogleđa sa dodatkom enzima EXV i CB, dok periodi od 3, 5, 14 i 21. dan su bili značajni tokom maceracije u 2016. godini. Tokom maceracije grožđa vinove loze sorte Karaoglan bez

dodavanja enzimskog preparata, postignuta je značajna razlika u sadržaju *p*-hidroksibenzojeve kiseline u vinima koja su macerirala 5, 10 i 15 dana (Kocabey et al., 2016).



Slika 28. Dinamika ekstrakcije *p*-hidroksibenzojeve kiseline tokom spontane i inokulisane fermentacije (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti selekcionisani kvasac, BDX (b)

5.6.4. Siringinska kiselina

Maksimumi ekstrakcije siringinske kiseline zapaženi su 12. dana maceracije za oglede sa i bez kvasaca, izuzev BDX varijante ogleada gde je maksimum dostignut dan kasnije (Slika 29a). Uz primenu enzimskog preparata EXV maksimalna ekstrahovana količina je ostvarena u vinu čija je maceracija trajala 13 dana (Slika 29b), dok uz primenu CB maksimum je ostvaren dan ranije (Tabela 25). U 2016. godini, maksimumi su bili posle 10 i 11 dana maceracije uz primenu enzimskih preparata EXV, Car i CP (Tabela 28). Nađeni su promenljivi podaci za kinetiku ekstrakcije siringinske kiseline za različite sorte (Stanušina, Vranac i Cabernet sauvignon) gde je u slučaju vina Cabernet sauvignon, njen sadržaj detektovan posle 9 dana maceracije (Ivanova-Petropulos et al., 2016). Suprotno tome, u našem istraživanju sa istom sortom koncentracija siringinske bila je u porastu već od trećeg dana maceracije. Prema Kocabey et al. (2016), sadržaj siringinske kiseline je bio u porastu od 5. do 15. dana maceracije, što se donekle poklapa sa našim rezultatima. Sadržaj siringinske kiseline u vinima sa inokulisanom fermentacijom nije bio značajno promenjen u odnosu na sadržaj tog jedinjenja u vinu dobijenom spontanom fermentacijom. Ekstrakcija siringinske kiseline nije uslovljena metabolizmom kvasca već nastajanjem alkohola koji pomaže ekstrakciju iz čvrstih delova grožđa (Cabrita et al., 2008). Ipak, Ivanova-Petropulos et al. (2015) u svom radu navodi da je sadržaj siringinske kiseline bio veći primenom Lallemant kvasaca, dok primenom Vinalco kvasaca tokom fermentacije, siringinska kiselina nije detektovana u tom vinu.

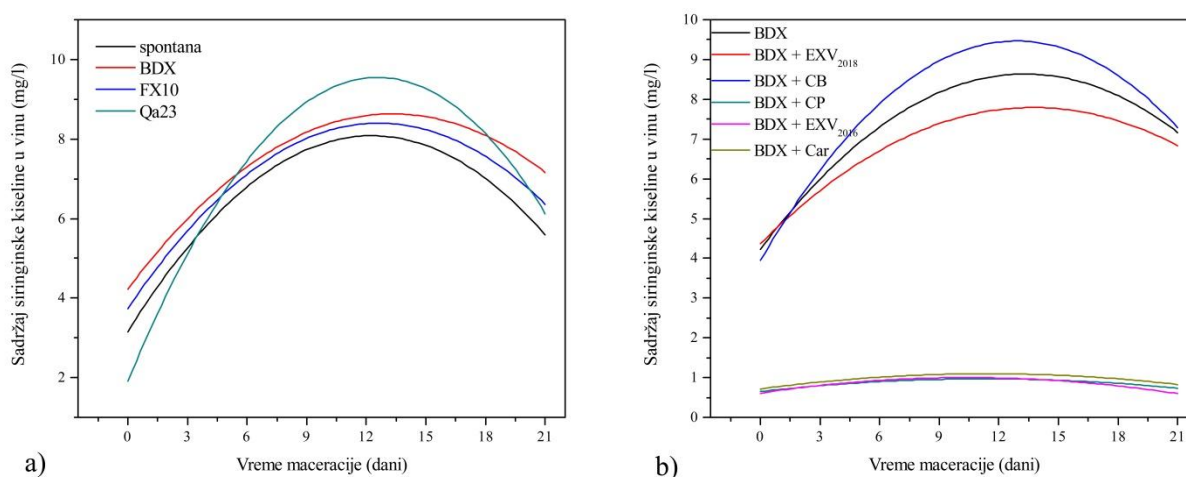
Dodatak enzimskih preparata nije imao uticaj na sadržaj izdvojene siringinske kiseline u odnosu na vino koje je fermentisalo uz BDX bez dodatka enzimskih preparata, što je u skladu sa Cabrita et al. (2008). Prethodno pomenuti autori navode da se sadržaj siringinske kiseline nije povećao u vinima dobijenim uz dodatak enzimskih preparata. Prema Bautista-Ortín et al. (2005) ni za sortu Monastrell nije uočena značajna razlika u sadržaju siringinske kiseline između enzimski tretiranih i netretiranih vina. Poredeći nekoliko tehnika vinifikacije, Soto-Vázquez et al. (2010) su primetili viši sadržaj siringinske kiseline u vinima kojima su dodati enzimi i tanini tokom maceracije.

Upotreba enzima EXV, CP i Car nije dovela do značajne razlike u pogledu sadržaja siringinske kiseline u 2016. godini istraživanja ($p > 0,05$).

Uz enzimski preparat CB je ostvarena najviša ekstrahovana količina siringinske kiseline i to 9,4652 mg/l, 12. dan maceracije pri maksimalnoj brzini od 0,0665 mg/dan (Tabela 25). Prema literaturi enzimski preparati najbolju aktivnost pokazuju u prvim danima maceracije. Ekstrakciju siringinske kiseline u ovom slučaju poboljšala je β -glukozidazna aktivnost enzimskog preparata CB jer se ovo jedinjenje izdvaja iz B- prstena malvidin-3-glukozida (Bautista-Ortín et al., 2005; Cabrita et al., 2008).

Koncentracija siringinske kiseline u kontrolama (nulti dani) se značajno razlikovala od sadržaja tog jedinjenja u vinima dužeg vremena maceracije sa ili bez zasejavanja selekcionisanim vinskim kvascima ili dodatim enzimskim preparatima u 2018. godini istraživanja, kao i u 2016. godini osim uz enzim EXV.

Vreme maceracije od 3, 5, 7, 14 i 21 dan (spontana, BDX, FX10 i Qa23) je značajno uticalo na sadržaj siringinske kiseline u poređenju sa kontrolnim vinom ($p \leq 0,05$). Pri upotrebi različitih enzimskih preparata (EXV i CB) značajno je bilo vreme maceracije u trajanju od 3, 5 i 21 dan, a za 2016. godinu samo 5 i 21 dan.



Slika 29. Dinamika ekstrakcije siringinske kiseline tokom spontane i inokulisane fermentacije (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti kvasac, BDX (b)

5.6.5. Vanilinska i kafeinska kiselina

Prateći kinetiku ekstrakcije kafeinska i vanilinska kiselina svoje maksimume ekstrakcije su dostigle 12. dan maceracije i to za varijante ogleđa spontane fermentacije i uz Qa23 selekcionisani vinski kvasac (Slika 30a i Slika 31a).

Za BDX varijantu ogleđa vanilinska je dostigla maksimalnu ekstrahovanu količinu, 4,3769 mg/l, 13. dana maceracije (Tabela 26). Uz dodatak enzimskih preparata, maksimumi vanilinske kiseline su bili 14. dan za EXV i 13. dan za CB enzimski preparat (Tabela 25), i slično vreme maksimuma zabeleženo je i u 2016. godini (Tabela 28).

Najveća brzina ekstrakcije kafeinske i vanilinske kiseline postignuta je tokom spontane fermentacije, a to je 0,0687 mg/danu za kafeinsku i 0,0350 mg/danu za vanilinsku kiselinu (Tabela 26).

Primenom BDX selekcionisanog vinskog kvasca, dobijena je količina vanilinske kiseline koja se značajno razlikovala od njenog sadržaja dobijenog spontanom fermentacijom ($p < 0,05$). Kvasci FX10 i Qa23 nisu dali rezultate koji se značajno razlikuju od spontane fermentacije. Testom uparenih uzoraka vršeno je poređenje tri enzimski preparata u 2016. godini i nije ustanovljena značajna razlika u sadržaju vanilinske kiseline ($p \geq 0,05$).

Utvrđena je značajna razlika u sadržaju vanilinske kiseline između kontrolnih vina i vina svih ostalih varijanti ogleđa. Dodatak enzima EXV i CB, nije značajno uticao na sadržaj vanilinske kiseline u odnosu na vino koje je fermentisalo samo uz kvasac BDX ($p \geq 0,05$).

Vreme maceracije od 3, 5, 7, 14 i 21 dan (spontana, BDX, FX10 i Qa23) je značajno uticalo na sadržaj vanilinske kiseline pri poređenju sa kontrolnim vinom ($p \leq 0,05$). Pri upotrebi različitih enzimskih preparata (EXV i CB) značajno je bilo vreme maceracije u trajanju od 5, 7, 14 i 21 dan. Za sadržaj vanilinske kiseline u vinima iz 2016. godine, bila je značajna maceracija od 3, 5, 14 i 21 dan u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Slično tome, pronađena je razlika u sadržaju vanilinske kiseline u Karaoglan vinima koja su dobijena maceracijom od 5 i 10 dana sa vinima koja su macerirala 15 dana (Kocabey et al., 2016).

U ogleđima sa kvascima, najraniji maksimum imala je kafeinska kiselina kod varijante ogleđa FX10, koji je bio 11. dan maceracije u količini 6,3608 mg/l. Vanilinska kiselina je dostigla maksimum dan kasnije za istu varijantu ogleđa (3,8308 mg/l) (Tabela 27). Slično tome, za vino sorte Aglianico di taurasi posle 20 dana maceracije nađeno je $6,25 \pm 0,25$ mg/l kafeinske kiseline, dok je količina vanilinske u istom vinu bila $10,68 \pm 0,30$ mg/l (Francesca et al., 2014), što je dosta više u odnosu na naš maksimum. Suprotno tome, u istraživanju Ivanova-Petropulos et al. (2016), najviši sadržaj kafeinske kiseline nađen je na početku maceracije, već 3. dana, da bi kasnije došlo do opadanja.

Dinamika ekstrakcije kafeinske kiseline tokom maceracije u 2016. godini, pokazala je kasniji maksimum ekstrakcije za enzim EXV (18. dan), dok su varijante ogleđa sa Car i CP enzimskim preparatima dale maksimume 13. i 12. dan maceracije (Tabela 28), slično kao pri maceraciji u 2018. godini kada su korišćeni samo kvasci prilikom vinifikacije.

U našim eksperimentima sa enzimima u 2018. godini, maksimalna ekstrahovana količina, od 6,2872 mg/l, ostvarena je posle 8. dana maceracije uz primenu enzima CB (Tabela 25). Primena EXV enzimskog preparata dala je maksimalnu ekstrahovanu količinu kafeinske kiseline posle 9 dana maceracije i to 5,9041 mg/l (Tabela 25). Uz primenu kvasca BDX bez enzimskih preparata u istoj godini istraživanja, maksimum je dostignut 12. dan maceracije (Tabela 26). Ovi rezultati su u skladu sa Alencar et al. (2017) koji su dodavali i pektinolitički enzimski preparat, gde je nađen najviši sadržaj kafeinske kiseline posle 5 dana maceracije, nakon čega je došlo do opadanja. Enzimsko dejstvo najizraženije na početku maceracije, dok se kasnije njihovo dejstvo smanjuje (Romero-Cascales et al., 2008).

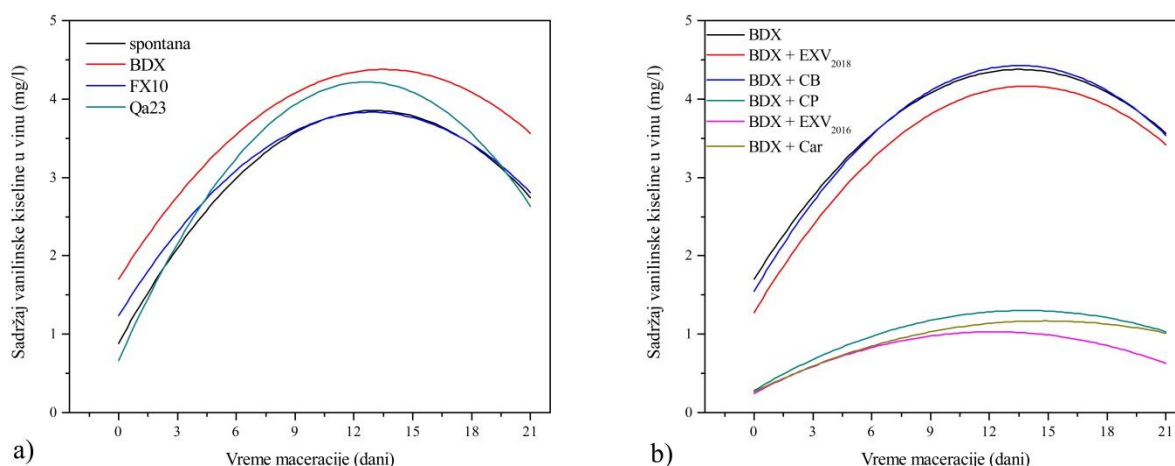
Posmatrajući samo kako vreme maceracije utiče na sadržaj kafeinske kiseline u varijantama ogleđa sa dodatim enzimima u 2018. godini, dobijeno je da nema razlike u kontroli (nulti dan) sa vinima ostalih dana maceracije (3, 5, 7, 14 i 21 dan). Postojala je značajna razlika u sadržaju kafeinske kiseline između kontrole i vina koja su macerirala 3, 5, 14 i 21 dan uz enzimске preparate CP, EXV i Car ($p \leq 0,05$).

U slučaju spontane i fermentacije sa kvascima sadržaj kafeinske kiseline u kontroli se značajno razlikovao od njene količine u vinima čija je maceracija trajala 5, 14 i 21 dan. Za Karaoglan vina koja su macerirala 5, 10 i 15 dana, nije ustanovljen značajan uticaj vremena maceracije na sadržaj kafeinske kiseline (Kocabey et al., 2016).

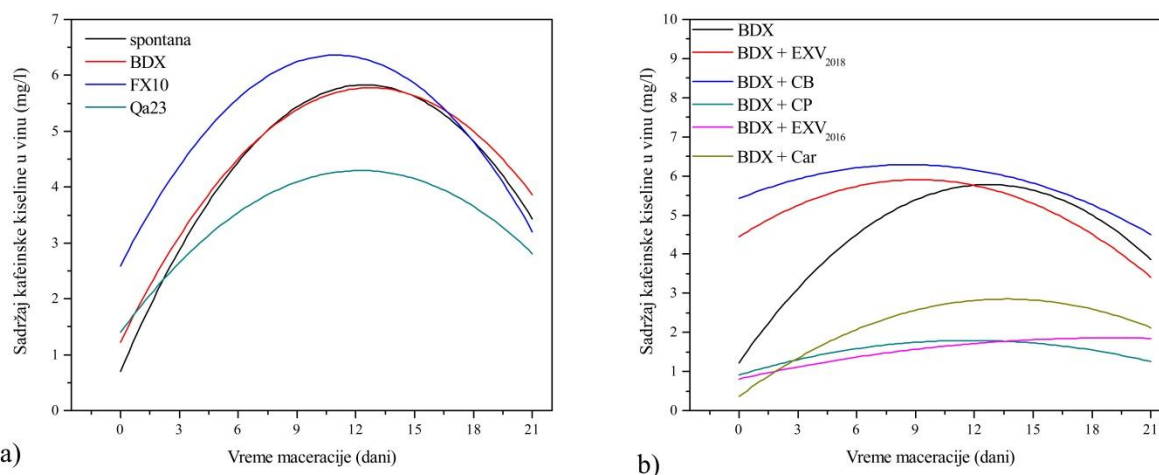
Ipak, uticaj dodatka enzimskih preparata (EXV i CB) uz kvasac BDX, nije bitno promenio izdvojenu količinu kafeinske kiseline u odnosu na vino koje je fermentisalo samo uz BDX, na nivou značajnosti 0,05. Nije uočena statistički značajna razlika u pogledu kafeinske kiseline između kontrole bez enzima i enzimski tretiranog vina uz maceraciju od 15 dana, ni kod sorte Monastrell (Bautista-Ortín et al., 2005).

Takođe nije nađena statistički značajna razlika u pogledu sadržaja kafeinske kiseline korišćenjem tri različita enzimska preparata (EXV, CP i Car).

Sadržaj kafeinske kiseline nije se značajno menjao u vinima spontane i inokulisane fermentacije ($p \geq 0,05$). Primenom kvasca FX10 i spontane fermentacije nađena je razlika u sadržaju kafeinske kiseline u kontrolnim vinima i vinima duže maceracije, dok druge varijante ogleđa nisu dale značajnu razliku među pomenutim uzorcima. Ipak, u 2016. godini, postojala je razlika između sadržaja kafeinske kiseline u kontroli i sadržaja koji je dobijen fermentacijom uz BDX i različite enzime (EXV, CP, Car) u vinima različitog perioda maceracije ($p \leq 0,05$).



Slika 30. Dinamika ekstrakcije vanilinske kiseline tokom spontane i inokulisane fermentacije (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti selekcionisani kvasac, BDX (b)



Slika 31. Dinamika ekstrakcije kafeinske kiseline tokom spontane i inokulisane fermentacije (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti selekcionisani kvasac, BDX (b)

5.6.6. Elaginska kiselina

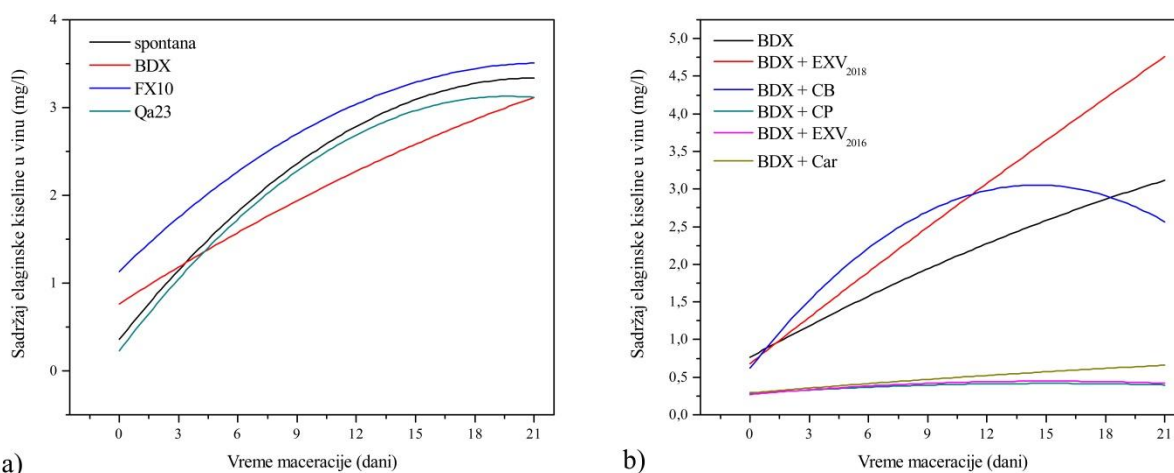
Kada je u pitanju elaginska kiselina, maksimum ekstrakcije je dostignut 21. dana maceracije za varijante ogleđa spontane fermentacije i fermentacije uz kvasce BDX (Tabela 26) i FX10. Primenom kvasca Qa23 (Tabela 27) svoj maksimum dostigla je 19. dan maceracije (Slika 32a). Uz dodati enzimski preparat EXV maksimum ekstrakcije je bio takođe 21. dana maceracije, a uz CB 14. dan maceracije (Slika 32b). Slične maksimume ekstrakcije, uz različite enzimske preparate, dala je i 2016. godina (Tabela 28). Zasejavanje kljuka različitim kvascima, kao ni kombinacija kvasca i enzima, nije dovelo do značajne razlike u sadržaju elaginske kiseline u odnosu na spontanu

fermentaciju ($p \geq 0,05$). Primena različitih enzimskih preparata u 2016. godini nije dovela do značajne razlike u pogledu sadržaja elaginske kiseline.

Tokom spontane i inokulisane fermentacije uz različite periode maceracije, kao i u kombinaciji BDX + CB u 2018. i BDX u kombinacijama sa CP i Car u 2016. godini, došlo je do značajne razlike u ekstrakciji elaginske kiseline u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$). Primena enzima EXV uz kvasac BDX nije dovela do značajne razlike u sadržaju elaginske kiseline u odnosu na kontrolu u obe godine istraživanja.

Analizirajući primenu spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10 i Qa23) u pogledu ekstrakcije elaginske kiseline tokom različitog vremena maceracije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između kontrole i vina čija je maceracija trajala 5, 7, 14 i 21 dan. Nije nađena statistički značajna razlika između kontrole i vina čija je maceracija trajala tri dana, na nivou značajnosti 0,05. Primena enzimskih preparata, na sadržaj elaginske kiseline bitno je uticala maceracija od 7 dana u poređenju sa kontrolom u 2018. godini i maceracija od 14 dana u 2016. godini ($p \leq 0,05$). Prema Kocabey et al. (2016), tokom maceracije u trajanju od 15 dana primećen je neznatan porast sadržaja elaginske kiseline, mada ta razlika nije bila statistički značajna. Elaginska kiselina uglavnom nastaje kao proizvod hidrolize hidrolizabilnih tanina koji se nalaze u hrastovom drvetu, pa veću količinu ove fenolne kiseline poseduju vina koja su odležavala u drvenim sudovima (Kocabey et al., 2016).

Prateći dinamiku ekstrakcije u različitim varijantama ogleđa uz primenu različitih kvasaca i enzima za 2018. godinu, zaključeno je da je najviša koncentracija elaginske kiseline ekstrahovana u vino čija je maceracija trajala 21 dan uz zasejavanje kvascem BDX i dodatkom EXV enzimskog preparata.



Slika 32. Dinamika ekstrakcije elaginske kiseline tokom spontane i inokulisane fermentacije (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti selekcionisani kvasac, BDX (b)

5.6.7. *p*-kumarinska kiselina

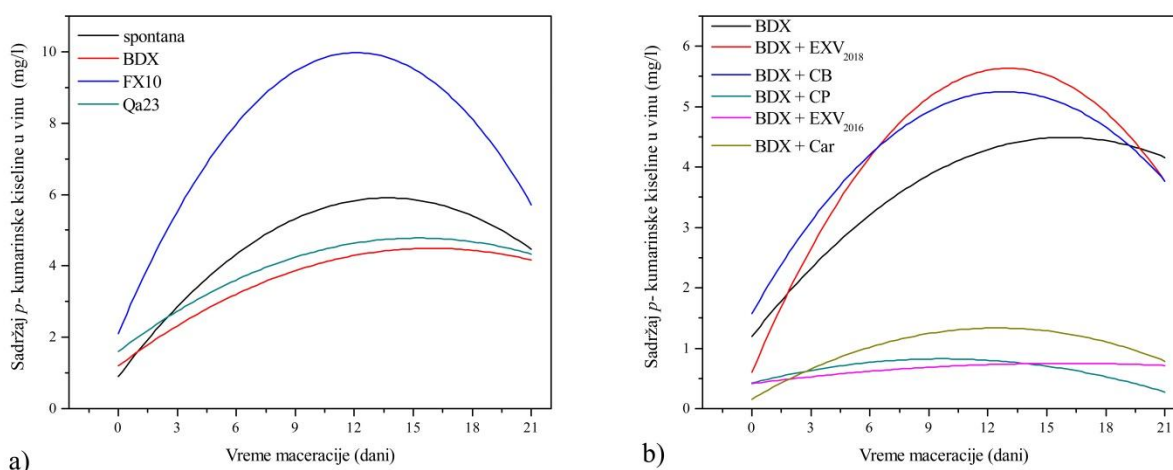
Maksimumi *p*-kumarinske kiseline za BDX i Qa23 varijante ogleđa bili su 15. dana maceracije, dok je uz spontanu fermentaciju i upotrebu selekcionisanog vinskog kvasca FX10 dostignut ranije (Slika 33a), 13. i 12. dana maceracije (Tabela 26 i Tabela 27). Prateći dinamiku ekstrakcije uz primenu enzimskih preparata, maksimumi ekstrakcije su ostvareni 12. dan maceracije u 2018. godini, dok je u 2016. maksimum postignut 16. dan maceracije za EXV (Slika 33b). Slično tome u jednom istraživanju, prilikom maceracije od 3, 6 i 9 dana, grožđa vinove loze sorte Cabernet sauvignon, sadržaj *p*-kumarinske kiseline je do kraja maceracije bio u porastu sa najvećim sadržajem 9. dana (Ivanova-Petropulos et al., 2016). Na sadržaj *p*-kumarinske kiseline značajan

uticaj imao je dodatak selekcionisanog vinskog kvasca FX10 u poređenju sa spontanom fermentacijom. U pogledu sadržaja *p*-kumarinske kiseline utvrđena je značajna razlika između spontane i fermentacije sa FX10 u poređenju sa kontrolnim vinima, dok se BDX i Qa23 varijante ogleda nisu značajno razlikovale od kontrola. Značajna razlika se javila i između sadržaja ovog jedinjenja u kontroli i vinima koja su macerirala uz dodatak enzimskih preparata EXV i CB, kao i enzimskih preparata Car i CP u 2016. godini. Određene fenolne kiseline, uglavnom hidroksicimetne kiseline, među kojima je *p*-kumarinska kiselina, mogu biti esterifikovane sa galaktoznom i arabinoznom grupom u bočnim lancima pektina ramnogalakturonana I (Arnous i Meyer, 2010; Wojdyło et al., 2021). Pretpostavlja se da je primena enzimskih preparata koji su uglavnom pektinolitički povećala sadržaj ovog jedinjenja u vinu. Pored ovoga oslobađanje *p*-kumarinske kiseline može nastati i degradacijom acilovanih antocijanina (Arnous i Meyer, 2010).

Nije nađena značajna razlika u vinima koja su fermentisala uz kvasac BDX sa dodatkom enzimskih preparata EXV i CB i vina koja su fermentisala samo uz primenu kvasca BDX ($p \geq 0,05$), što je suprotno rezultatima Soto-Vásquez et al. (2010). Pomenuti autori su pronašli statistički značajnu razliku između kontrole i vina koje je maceriralo uz dodatak enzima i tanina. Ispitujući dva različita enzima Bautista-Ortín et al. (2005) su zaključili, slično našim rezultatima, da nema statistički značajne razlike među kontrolom i enzimima tretiranih vina. Poređenjem enzima međusobno (EXV, CP i Car) nije ustanovljena značajna razlika u sadržaju *p*-kumarinske kiseline.

Sa aspekta uticaja dužine maceracije na sadržaj *p*-kumarinske kiseline prilikom spontane i inokulisane fermentacije, kontrola se značajno razlikovala od vina čija je maceracija trajala 5 i 21 dan, na nivou značajnosti 0,05. U varijanti ogleda sa dodatkom EXV i CB enzimskih preparata, sadržaj *p*-kumarinske kiseline u kontroli se značajno razlikovao od sadržaja u vinima koja su macerirala 14 i 21 dan ($p \leq 0,05$), dok su u 2016. godini to bila vina koja su macerirala samo 3 i 5 dana.

Za izdvajanje najviše količine *p*-kumarinske kiseline, najbolje se pokazala primena kvasca FX10. U tom ogledu maksimalna ekstrahovana količina je iznosila 9,9765 mg/l i ostvarena je 12. dan maceracije (Tabela 27). Dobijeni rezultat je značajno viši u odnosu na količinu *p*-kumarinske kiseline koja je ekstrahovana tokom 30 dana maceracije sorte Syrah i iznosila oko 0,20 mg/l (Alencar et al., 2017). Autori drugog rada, koji su primenjivali tri perioda maceracije (5, 10 i 15 dana) sorte Karaoglan, našli su najvišu količinu *p*-kumarinske kiseline u vinu koje je maceriralo 15 dana i iznosila je $7,15 \pm 2,13$ mg/l, što je takođe manje nego u našim vinima (Kocabey et al., 2016).



Slika 33. Dinamika ekstrakcije *p*-kumarinske kiseline tokom maceracije pri spontanoj i inokulisanoj fermentaciji (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti selekcionisani kvasac, BDX (b)

5.6.8. Katehin i epikatehin

Maksimum ekstrakcije katehina i epikatehina, za sve varijante ogleda sa kvascima i sa enzimima za 2018. godinu, ostvaren je 21. dana maceracije sa najvišim izdvojenim količinama za fermentaciju uz dodatak BDX vinskog selekcionisanog kvasca (Slika 34 i Slika 35). Maksimalna izdvojena količina za epikatehin u 21. danu maceracije iznosila je 18,7350 mg/l (Tabela 26), dok je za katehin ta količina bila 36,3108 mg/l (Tabela 26), uz kvasac BDX (Slika 34a i Slika 35a). U 2016. godini, kada je ispitivan uticaj tri različita enzimska preparata (EXV, CP i Car) primećena je eksponencijalna ekstrakcija katehina, sa maksimumom ekstrakcije posle 18. dana maceracije (Tabela 28). Ovi rezultati su u saglasnosti sa Francesca et al. (2014) gde su maksimalne količine katehina i epikatehina nađene na kraju maceracije, u toku koje je dominantan kvasac bio *Saccharomyces cerevisiae*, što bi se moglo tumačiti sporijom kinetikom ekstrakcije, jer prolaze nekoliko supstitucija i imaju veću molekulsku masu. Drugi autori navode da je maksimalna vrednost za katehin i epikatehin kod sorti Aglianico, Piediroso i Nerello mascalese bila posle 15. i 12. dana (Gambutti et al., 2004) i njihov sadržaj je uveliko uslovljen sortom. Izdvajanje flavan-3-ola koji se nalaze u semenkama grožđa, dešava se tokom celog perioda maceracije zbog postepenog nastajanja alkohola koji je neophodan ekstragens kada su ova jedinjenja u pitanju jer se oslobađaju iz kutikularnog voštanog sloja kojim su obložene semenke (Sun et al., 2011). Sadržaj katehina i epikatehina je bio u pozitivnoj korelaciji sa produženjem perioda maceracije i za sorte Monastrell i Karaoglan (Gómez-Plaza et al., 2001; Kocabey et al., 2016), što se poklapa sa našim tvrdnjama. Katehin je bio najdominantnije kvantifikovano jedinjenje u svim varijantama ogleda što je u saglasnosti sa drugim autorima (Generalić Mekinić et al., 2019; Bautista-Ortín et al., 2007; Soto-Vázquez et al., 2010). U 2016. godini ekstrahovane su dosta niže koncentracije katehina nego u vinu berbe 2018.

Najveća brzina ekstrakcije katehina i epikatehina za 2018. godinu ostvarena je uz fermentaciju selekcionisanim vinskim kvascem BDX za 2018. godinu, i iznosila je 1,994 mg/danu za katehin, odnosno 1,0600 mg/danu za epikatehin (Tabela 26).

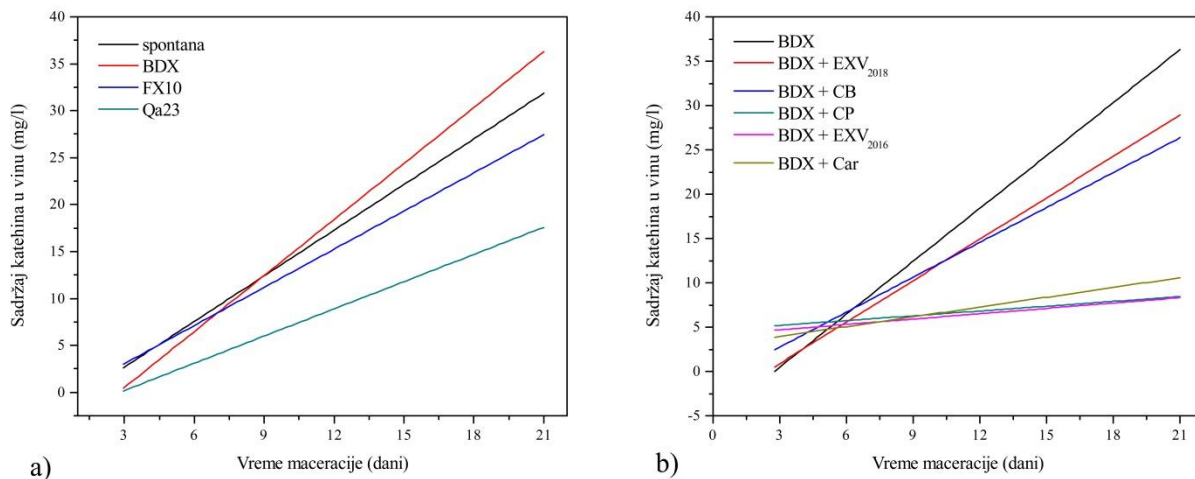
Sadržaj katehina i epikatehina nije se značajno razlikovao u vinu koje je fermentisalo spontano i vinu koje je fermentisalo uz zasejavanje selekcionisanim vinskim kvascima, kao ni u kombinaciji kvasca sa enzimskim preparatima ($p > 0,05$). Nasuprot ovome, maceracija u trajanju od 12 dana sorte Mencía, uz primenu kombinacije enzima i tanina, dovela je do značajnog povećanja sadržaja katehina u odnosu na tradicionalnu maceraciju (Soto-Vázquez et al., 2010). Prema Bautista-Ortín et al. (2005), maceracija uz dodatak enzimskih preparata povećala je značajno sadržaj katehina, dok je sadržaj epikatehina ostao približno nepromenjen. Prateći sadržaj katehina i epikatehina tokom maceracije od 30 dana uz dodatak pektinolitičkog enzimskog preparata, Alencar et al. (2017) su zaključili da je došlo do značajnog porasta količine katehina tokom celog perioda maceracije što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Prema Revilla i Gonzáles-SanJosé (2003), pektinolitički preparati su se pokazali dobro u smislu veće ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja osim epikatehina, što je u skladu sa našim rezultatima.

U ogledima iz 2016. godine ostvarena je značajna razlika u sadržaju katehina u kontrolnom vinu (nulti dan) i vinima dobijenim uz dodatak EXV, CP i Car enzimskih preparata dužih perioda maceracije.

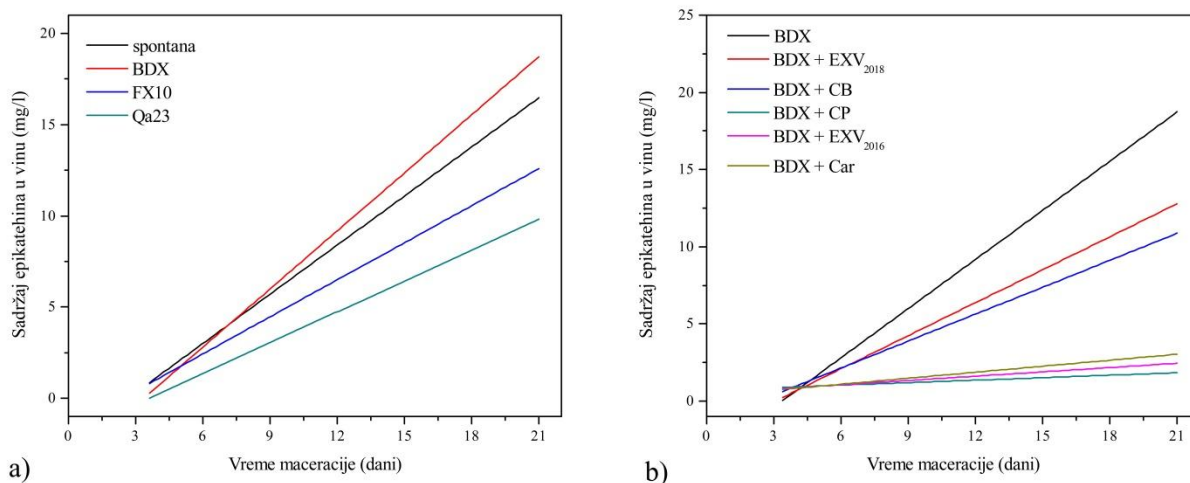
U pogledu uticaja vremena maceracije na sadržaj katehina, kontrola se statistički značajno razlikovala od vina koja su macerirala 7, 14 i 21 dan uz različite kvasce ($p < 0,05$). Značajan uticaj na sadržaj epikatehina ispoljilo je vreme maceracije od 7 i 21 dan, u poređenju sa kontrolom. Vino maceracije 3, 7 i 14 dana uz BDX i dodatak enzimskih preparata EXV i CB se značajno razlikovalo po sadržaju epikatehina od kontrolnog vina. Sadržaj katehina u vinu koje je maceriralo 14 i 21 dan značajno se razlikovao ($p < 0,05$), od njegovog sadržaja u kontroli za varijantu ogleda sa enzimima (EXV i CB) u 2018. godini. U našem istraživanju u 2016. godini, sadržaj katehina u vinu koje je

maceriralo 5, 14 i 21 dan se značajno razlikovao od njegove količine u kontroli iz iste godine. Primena različitih enzimskih preparata (EXV, CP i Car) nije bila značajna u pogledu sadržaja katehina u dobijenim vinima iz 2016. godine ($p > 0,05$).

Slično tome, u radu Alencar et al. (2017), sadržaj ovih jedinjenja u širi se značajno razlikovao od njihove količine nakon 10, 15, 20, 25 i 30 dana maceracije. Analizom svih varijanti oglada dinamike ekstrakcije za 2018. godinu, u pogledu količine katehina i epikatehina u vinu, najbolje se pokazala primena kvasca BDX i maceracija od 21 dan.



Slika 34. Dinamika ekstrakcije katehina tokom maceracije primenom spontane i inokulisane fermentacije (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti selekcionisani kvasac, BDX (b)



Slika 35. Dinamika ekstrakcije epikatehina tokom maceracije primenom spontane i inokulisane fermentacije (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti selekcionisani kvasac, BDX (b)

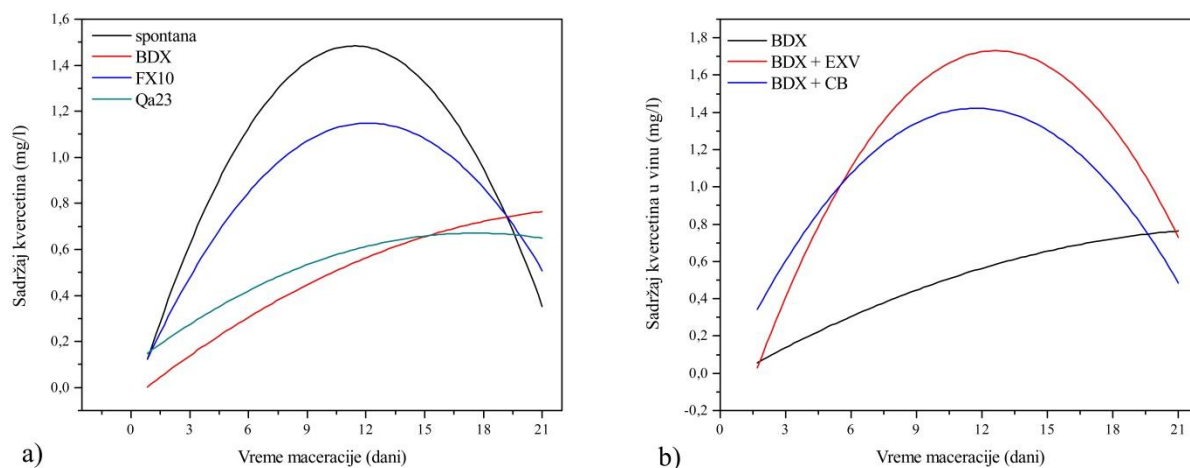
5.6.9. Kvercetin

Kvercetin je ekstrahovan do 21. dana maceracije uz selekcionisani vinski kvasac BDX, da bi taj dan dostigao maksimalnu izdvojenu količinu od 0,7637 mg/l. Primenom spontane fermentacije maksimum je dostignut već 11. dana maceracije u količini od 1,4840 mg/l, što je najranije od svih varijanti oglada sa i bez kvasaca (Slika 36). Primenom enzimskog preparata EXV uz kvasac BDX, maksimum ekstrakcije kvercetina bio je 12. dan maceracije u količini 1,7301 mg/l, dok primenom enzimskog preparata CB taj maksimum je bio dan ranije u količini 1,4221 mg/l (Tabela 25). Primenom spontane fermentacije, kvasaca FX10 i Qa23 najbolje se pokazala maceracija u trajanju

od 7 dana, dok primenom kvasca BDX maceracija koja je trajala čak 21 dan dala je najvišu količinu kvercetina (Tabela 26 i Tabela 27). Uz enzime CB i EXV, maksimalne ekstrahovane količine su ostvarene 11. odnosno 12. dana maceracije (Tabela 25). Tokom maceracije sadržaj kvercetina je bio u porastu, što je u saglasnosti sa Gambuti et al. (2004) koji su konstatovali pozitivnu korelaciju izdvojenog kvercetina i dužine maceracije. Za vino Piediroso je nađeno da je maksimum ekstrakcije kvercetina bio 12. dan maceracije, dok za Nerello mascalese maksimum dostignut 17. dan maceracije (Gambuti et al., 2004). Primenom inokulisane fermentacije (BDX, FX10 i Qa23), sadržaj kvercetina se nije značajno promenio ($p \geq 0,05$) u odnosu na spontanu fermentaciju. Dodatak enzimskih preparata EXV i CB nije značajno uticao na sadržaj kvercetina u tom vinu. Za razliku od naših rezultata, za vino Monastrell koje je tretirano enzimskim preparatima, nađeno je da sadrži viši nivo kvercetina u odnosu na klasičnu maceraciju bez enzima (Bautista-Ortín et al., 2005).

U odnosu na kontrolu (nulti dan), utvrđena je značajna razlika u sadržaju kvercetina za vina različitog vremena maceracije varijante ogleđa BDX i FX10 ($p \leq 0,05$), dok spontana i fermentacija uz kvasac Qa23 nisu dovele do bitnih promena. Dodatkom enzimskog preparata EXV, ekstrahovana količina kvercetina nije se bitno razlikovala od kontrole. Suprotno tome značajna razlika konstatovana je u vinima koja su macerirala različito vreme uz enzimski preparat CB u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$).

Uticaj vremena maceracije na sadržaj kvercetina za sve varijante spontane i inokulisane fermentacije, ogleđa se u značajnoj razlici između vina označenog kao kontrola i vina čija je maceracija bila 5, 7 i 21 dan ($p \leq 0,05$). Suprotno našim rezultatima, tokom maceracije sorte Karaoglan 5, 10 i 15 dana, utvrđeno je da vreme maceracije nije imalo bitnog uticaja na sadržaj kvercetina u vinu (Kocabey et al., 2016). Primenom enzimskih preparata EXV i CB, maceracija od 7 dana je značajno uticala na sadržaj kvercetina u odnosu na sadržaj ovog jedinjenja u kontroli. Slično tome, korišćenje enzimskog preparata tokom maceracije od 5 dana, dovelo je do veće ekstrakcije kvercetina u odnosu na klasičnu maceraciju bez korišćenja enzima (Generalčić Mekinić et al., 2019). U istraživanju Soto-Vásquez et al. (2010) primena kombinacije tanina i enzima nije značajno promenila sadržaj kvercetina u odnosu na kontrolu.



Slika 36. Sadržaj kvercetina tokom maceracije pri spontanoj i inokulisanoj fermentaciji (a), kao i uticaj dodatka različitih enzimskih preparata uz isti selekcionisani kvasac, BDX (b)

Tabela 25. Brzina ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja, maksimalne ekstrahovane količine i dani maceracije u kojima su dostignute za BDX + EXV i BDX + CB varijante ogleda

Jedinjenje	Brzina ekstrakcije (mg/dan)	Maksimum ekstrakcije (dan)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)	Brzina ekstrakcije (mg/dan)	Maksimum ekstrakcije (dan)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)
Vrsta fermentacije	BDX + EXV			BDX + CB		
Elaginska kiselina	0,0012	21.	4,7599	0,0232	14.	3,0536
Epikatehin	0,7163	21.	12,7883	0,5817	21.	10,8685
Galna kiselina	0,0058	21.	3,2623	0,0047	21.	4,6600
Kafeinska kiselina	0,0353	9.	5,9041	0,0233	8.	6,2872
Katehin	1,5580	21.	28,9557	0,5794	21.	26,3809
Kvercetin	0,0285	12.	1,7301	0,0216	11.	1,4221
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,0051	5.	0,9654	0,0058	6.	1,1242
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,0592	12.	5,6356	0,4443	12.	5,2498
Protokatehuinska kiselina	0,0202	11.	2,5419	0,0155	10.	2,6247
Siringinska kiselina	0,0363	13.	7,7923	0,0665	12.	9,4652
Vanilinska kiselina	0,0298	14.	4,1648	0,0316	13.	4,4260

Tabela 26. Brzina ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja, maksimalne ekstrahovane količine i dani maceracije u kojima su dostignute za spontanu fermentaciju i BDX varijantu ogleda

Jedinjenje	Brzina ekstrakcije (mg/dan)	Maksimum ekstrakcije (dan)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)	Brzina ekstrakcije (mg/dan)	Maksimum ekstrakcije (dan)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)
Vrsta fermentacije	Spontana fermentacija			BDX		
Elaginska kiselina	0,0135	21.	3,3372	0,0031	21.	3,1162
Epikatehin	0,8970	21.	16,4767	1,0600	21.	18,7350
Galna kiselina	0,0035	21.	3,2765	0,0078	21.	4,2400
Kafeinska kiselina	0,0687	12.	5,831	0,0561	12.	5,7769
Katehin	1,6250	21.	31,8615	1,9940	21.	36,3108
Kvercetin	0,0245	11.	1,4840	0,0028	21.	0,7637
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,0064	8.	0,8891	0,0031	3.	1,0485
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,0536	13.	5,9057	0,0260	15.	4,4929
Protokatehuinska kiselina	0,0225	11.	2,2077	0,0230	11.	2,9186
Siringinska kiselina	0,0655	12.	8,0818	0,0496	13.	8,6342
Vanilinska kiselina	0,0350	12.	3,8524	0,0291	13.	4,3769

Tabela 27. Brzina ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja, maksimalne ekstrahovane količine i dani maceracije u kojima su dostignute za FX10 i Qa23 varijante ogleda

Jedinjenje	Brzina ekstrakcije (mg/dan)	Maksimum ekstrakcije (dan)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)	Brzina ekstrakcije (mg/dan)	Maksimum ekstrakcije (dan)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)
Vrsta fermentacije	FX10			Qa23		
Elaginska kiselina	0,0102	21.	3,5073	0,0150	19.	3,1286
Epikatehin	0,6810	21.	12,5929	0,5685	21.	9,8227
Galna kiselina	0,0166	17.	2,7547	0,0225	18.	3,4224
Kafeinska kiselina	0,0627	11.	6,3608	0,0387	12.	4,2958
Katehin	1,3560	21.	27,4477	0,9692	21.	17,5867
Kvercetin	0,0162	12.	1,1490	0,0038	17.	0,6707
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,0054	7.	0,7903	0,0149	11.	1,1578
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,1075	12.	9,9765	0,0273	15.	4,7794
Protokatehuinska kiselina	0,0292	10.	2,5984	0,0373	11.	2,6418
Siringinska kiselina	0,0584	12.	8,4012	0,1533	12.	9,5484
Vanilinska kiselina	0,0312	12.	3,8308	0,0449	12.	4,2172

Tabela 28. Brzina ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja, maksimalne ekstrahovane količine i dani maceracije u kojima su dostignute za BDX + EXV, BDX + Car i BDX + CP varijante ogleda postavljenih 2016. godine

Jedinjenje	Maksimum ekstrakcije (dan)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)	Brzina ekstrakcije (mg/dan)	Maksimum ekstrakcije (dan)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)	Brzina ekstrakcije (mg/dan)	Maksimum ekstrakcije (dan)	Maksimalna ekstrahovana količina (mg/l)	Brzina ekstrakcije (mg/dan)
Vrsta fermentacije	BDX + EXV			BDX + Car			BDX + CP		
Elaginska kiselina	15.	0,4467	0,00156	21.	0,6584	0,00039	15.	0,4166	0,00119
Ferulinska kiselina	12.	0,1983	0,00133	12.	0,1951	0,00063	10.	0,1857	0,00149
Galna kiselina	21.	0,4083	0,00031	18.	0,4264	0,03350	18.	0,3274	0,00121
Kafeinska kiselina	18.	1,8570	0,00590	13.	2,8510	0,02660	12.	1,7930	0,01280
Katehin	18.	8,0070	0,04240	21.	10,476	0,01070	20.	8,2850	0,03120
Miricetin	15.	0,5100	0,00454	10.	0,2860	0,00239	18.	0,6460	0,00443
Naringenin	10.	0,0327	0,00022	10.	0,0300	0,00022	10.	0,0420	0,00050
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	13.	0,3340	0,00330	13.	0,3556	0,04540	13.	0,3530	0,00322
<i>p</i> -kumarinska kiselina	16.	0,7483	0,00260	12.	1,3350	0,01510	10.	0,9155	0,00851
Protokatehuinska kiselina	13.	0,7663	0,00630	12.	0,6560	0,00515	13.	0,9300	0,00990
<i>trans</i> -resveratrol	16.	0,6021	0,00400	17.	0,6660	0,00490	15.	0,5950	0,00481
Siringinska kiselina	10.	0,9986	0,00710	11.	1,0960	0,00590	11.	1,0740	0,00726
Vanilinska kiselina	12.	1,0311	0,01040	14.	1,1703	0,00825	13.	1,1310	0,01062

5.7. Poređenje maksimalnih ekstrahovanih količina fenolnih jedinjenja spontano i inokulisano fermentisanih uzoraka

Ne postoji statistički značajna razlika između maksimalnih ekstrahovanih količina za uzorke spontane fermentacije i uzorke koji su fermentisali uz dodatak vinskih selekcionisanih kvasaca BDX, Qa23 i FX10, na nivou značajnosti 0,05.

5.8. Poređenje brzina ekstrakcije fenolnih jedinjenja spontano i inokulisano fermentisanih uzoraka

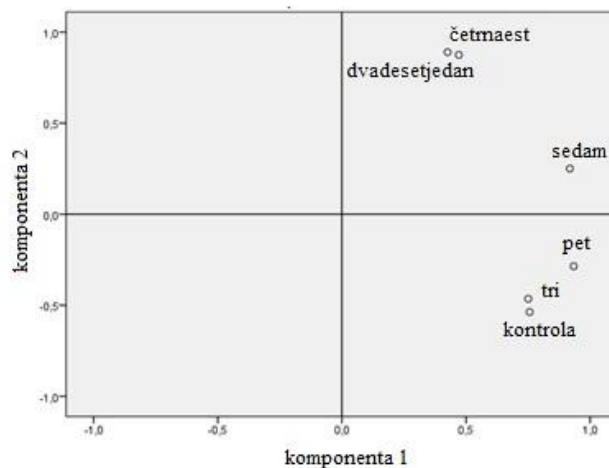
Dodatak nekog od selekcionisanih vinskih kvasaca (BDX, FX10 ili Qa23), nije imao statistički značajan uticaj na brzinu ekstrakcije 11 različitih fenolnih jedinjenja u poređenju sa brzinom ekstrakcije istih jedinjenja u uzorcima koja su spontano fermentisala ($p \geq 0,05$).

5.9. Analiza glavnih komponentata

Varijante ogleda različitih perioda maceracije u pogledu sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja u vinima spontane i inokulisane fermentacije sa selekcionisanim vinskim kvascima BDX, FX10 i Qa23, su analizirane metodom redukcije faktora (Principal Component Analysis - PCA). Ovom statističkom procedurom se, korišćenjem linearnih transformacija, početni skup promenljivih transformiše u novi skup nekorelisanih promenljivih. Dalji tok je identifikacija one promenljive koja je najvažnija za opisivanje podataka i one koje nisu od veće važnosti. Cilj je da se prvenstveno izdvoji komponenta koja opisuje najveći deo disperzije podataka. Dalje sledi komponenta koja ima normalan pravac prostiranja podataka na glavnu komponentu, a ta druga komponenta obuhvata sledeću najveću disperziju podataka itd.

Grupisanje vina je sprovedeno na osnovu sadržaja 12 fenolnih jedinjenja kvantifikovanih u vinima ispitivanih perioda maceracije uz primenu spontane fermentacije. Opravdanost analize je obuhvatala Kajzer Majer Olkinov kriterijum (Kaiser Mayer Olkin) koji je bio 0,501, a vrednosti ovog parametra se kreću od 0 do 1. Ukoliko je KMO preko 0,9 podaci se smatraju kao savršeni, između 0,8 i 0,9 kao odlični, od 0,7 do 0,8 kao dobri, dok su između 0,5 i 0,7 srednje adekvatnosti. Bartletov test sferičnosti (Bartlett's test of sphericity) je pokazao statističku značajnost ($p < 0,05$).

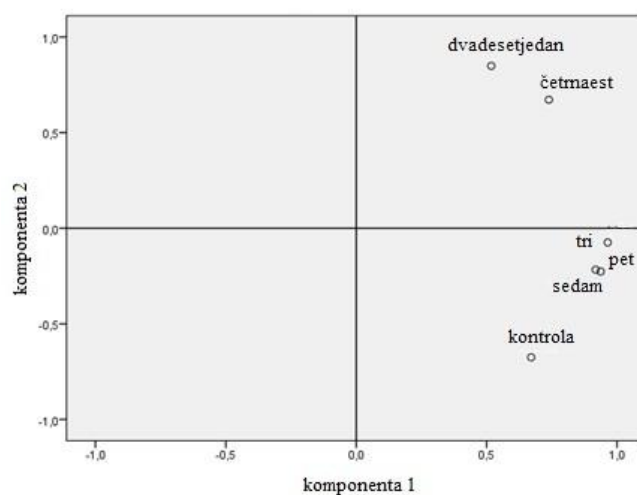
U ovom slučaju primenjena je analiza bez rotacije, zato što je obezbedila maksimalno opisivanje varijansi pomoću novih komponenti. Poredeći najznačajnija faktorska opterećenja, vina spontane fermentacije, čija je maceracija trajala 5 i 7 dana su jasno bila drugačija u odnosu na kontrolu i vina od 3, 14 i 21 dan maceracije (Slika 37). Izdvojile su se dve komponente i prva ima objašnjenje varijanse 54,22%, druga komponenta objašnjava 36,78% varijanse, dok obe komponente objašnjavaju 91,01% varijabiliteta.



Slika 37. Grupisanje vina spontane fermentacije različitih perioda maceracije u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja

Grupisanje vina je vršeno i za vina koja su fermentisala zasejavanjem kvascem FX10 na osnovu sadržaja 12 fenolnih jedinjenja, a prema različitim periodima maceracije (Slika 38). Parametri opravdanosti su bili Kajzer Majer Olkinov kriterijum koji iznosi 0,617, dok je Bartletov test sferičnosti pokazao statističku značajnost ($p < 0,05$).

Posmatrajući u odnosu na najznačajnija faktorska opterećenja, jasno su se razdvojila vina koja su macerirala 3, 5 i 7 dana u odnosu na kontrolu i vina dužeg perioda maceracije. U ovom slučaju primenjena je analiza bez rotacije, zato što je obezbedila maksimalno opisivanje varijansi pomoću novih komponenti. Izdvojene su dve komponente, gde prva objašnjava 62,25% varijabiliteta, a druga 28,85%. Obe obuhvataju 94,10% varijanse.

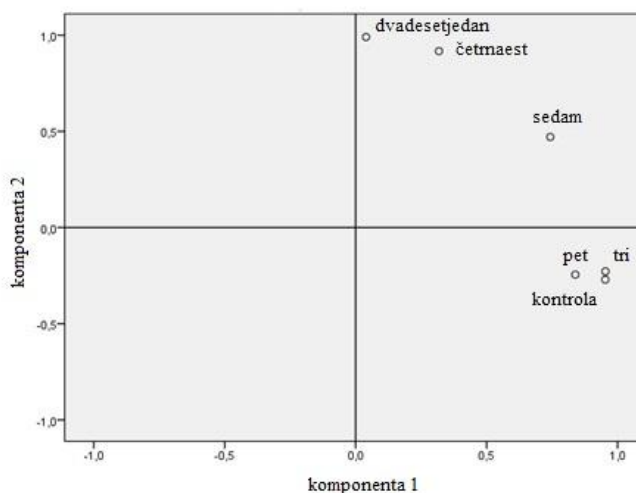


Slika 38. Grupisanje vina fermentacije kvascem FX10 različitih perioda maceracije u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja

Ova metoda primenjena je i na vinima dobijenim zasejavanjem kvascem BDX prema različitim periodima maceracije, a na osnovu sadržaja 12 fenolnih jedinjenja (Slika 39). Parametri

opravdanosti primene analize su bili Kajzer Majer Olkinov kriterijum koji iznosi 0,591, dok je Bartletov test sferičnosti pokazao statističku značajnost ($p < 0,05$).

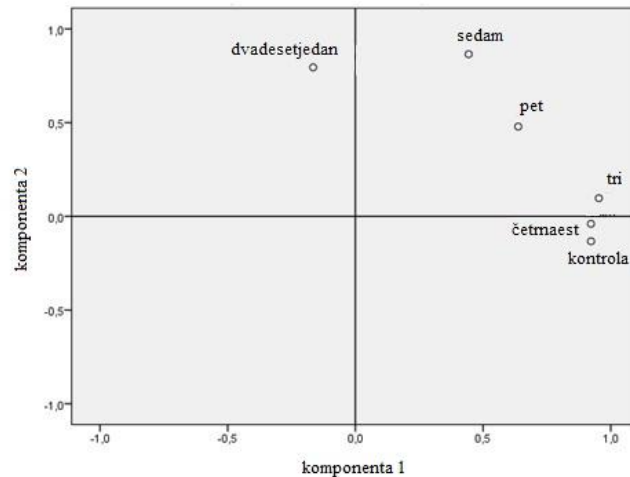
Izdvojene su dve komponente, gde se prvom objašnjava 52,91%, a drugom komponentom 37,16% varijabiliteta. Obe izdvojene komponente objašnjavaju 90,07% varijabiliteta. Posmatrajući u odnosu na najznačajnija faktorska opterećenja, u prvoj komponenti su se izdvojila vina koja su macerirala 3 dana i vino kontrole od ostalih uzoraka, dok su od manjeg uticaja bili periodi maceracije 14 i 21 dan koji su se izdvojili u drugoj komponenti. U ovom slučaju primenjena je analiza bez rotacije, zato što je obezbedila maksimalno opisivanje varijansi pomoću novih komponenti.



Slika 39. Grupisanje vina fermentacije kvascem BDX različitih perioda maceracije, u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja

Ova metoda primenjena je i na vinima dobijenim zasejavanjem sa kvascem Qa23 prema različitim periodima maceracije, a na osnovu sadržaja 12 fenolnih jedinjenja (Slika 40). Parametri opravdanosti su bili Kajzer Majer Olkinov kriterijum koji iznosi 0,577, dok je Bartletov test sferičnosti pokazao statističku značajnost ($p < 0,05$).

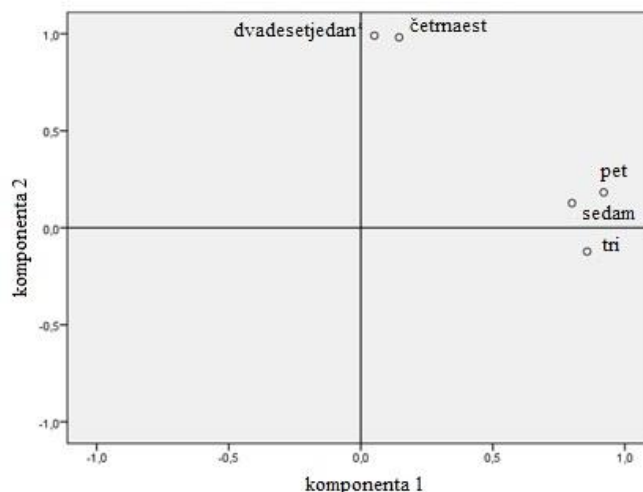
Izdvojene su dve komponente, prva komponenta objašnjava 54,05%, a druga 27,31% varijanse. Obe komponente objašnjavaju 81,37% varijanse. Posmatrajući u odnosu na najznačajnija faktorska opterećenja, u prvoj komponenti su se izdvojila vina koja su macerirala 3 dana i 14 dana i vino kontrole od ostalih uzoraka. Primenjena je ortogonalna quartimax rotacija kojoj je data prednost u odnosu na varimax i equamax, zato što je obezbedila maksimalno opisivanje varijansi pomoću novih komponenti.



Slika 40. Grupisanje vina fermentacije kvascem Qa23 različitih perioda maceracije u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja

Grupisanje vina čija je vinifikacija sprovedena uz zasejavanje kvascem BDX uz enzimske preparate EXV i CB, različitih perioda maceracije od 3, 5, 7, 14 i 21 dan, prema sadržaju 12 fenolnih jedinjenja (Slika 41). Opravdanost analize je obuhvatala Kajzer Majer Olkinov kriterijum (Kaiser Mayer Olkin) koji iznosi 0,530, i Bartletov test sferičnosti koji je pokazao statističku značajnost ($p < 0,05$).

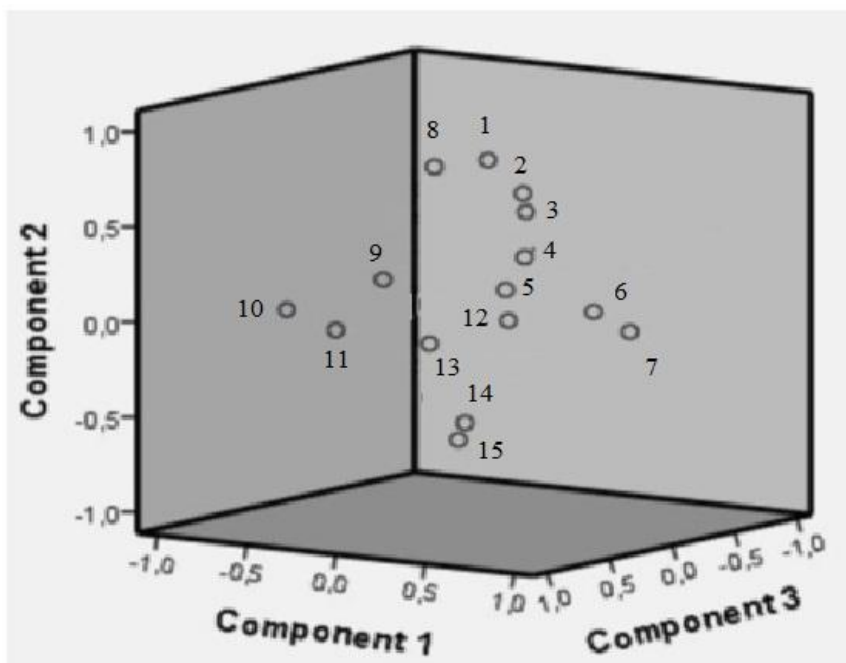
Primenjena je quartimax ortogonalna rotacija kojoj je data prednost u odnosu na varimax i equamax, zato što je obezbedila maksimalno opisivanje varijansi pomoću novih komponenti. Izdvojene su dve komponente, gde prva objašnjava 44,88, a druga 40,20% varijabiliteta. Obe komponente objašnjavaju 85,08% varijabiliteta. Vino čija je maceracija trajala 5 dana jasno se izdvojilo od ostalih uzoraka i imalo je najveći uticaj, dok su se u drugoj komponenti izdvojila vina čija je maceracija trajala 14 i 21 dan.



Slika 41. Grupisanje vina različitih perioda maceracije ogleda BDX + EXV i BDX + CB u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja

Rezultati dobijeni za pojedinačna ispitivana jedinjenja u vinima dobijenim primenom kvasca BDX i enzimskih preparata EXV, Car i CP su takođe analizirana metodom redukcije faktora (PCA). Opravdanost analize je obuhvatala Kajzer Majer Olkinov kriterijum (Kaiser Mayer Olkin) koji je bio 0,695, i Bartletov test sferičnosti koji je pokazao statističku značajnost ($p < 0,05$), dok su

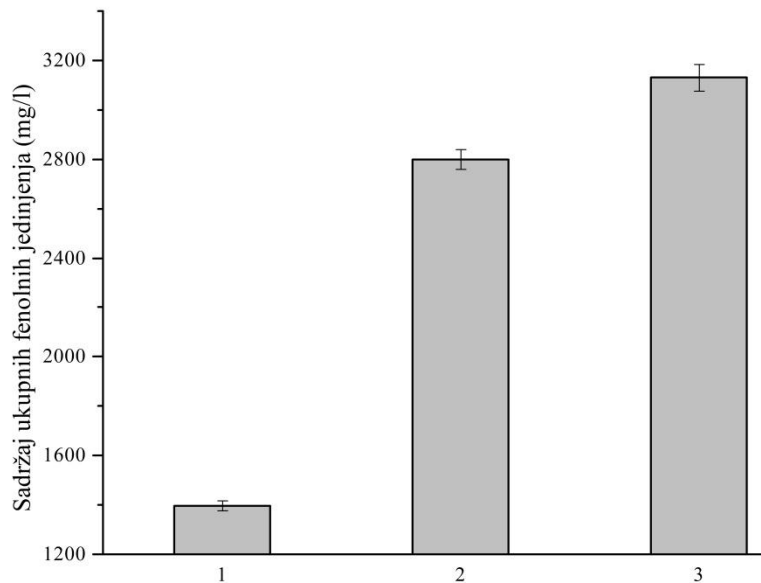
faktorska opterećenja ispod 0,3 isključena. Equamax rotacija je pokazala izrazito bolje razdvajanje komponenti nego quartimax i varimax. Odabrana rotacija je najjasnije razdvojila varijable, fenole, u funkciji faktorskog opterećenja. Odabrane su četiri komponente (84,091 varijabilnost, kumulativno) i primenom Katelovog kriterijuma. Ukratko, dve grupe su se jasno razlikovale. Prva je sadržala derivate hidroksicimetne kiseline (kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina) i odgovala je komponenti 2 (Slika 42). Druga komponenta je obuhvatala različite grupe fenolnih jedinjenja kao što su stilbeni (*trans*-resveratrol), flavan-3-oli (katehin), derivati benzojeve kiseline (*p*-hidroksibenzoeva kiselina, protokatehuinska kiselina, siringinska kiselina, vanilinska kiselina, galna kiselina i elaginska kiselina), zatim vanilin, miricetin, naringenin i hlorogensku kiselinu.



Slika 42. Grupisanje fenolnih jedinjenja u vinima varijanti ogleda BDX sa enzimskim preparatima EXV, Car i CP (1- galna kiselina; 2- katehin; 3- *trans*-resveratrol; 4- vanilinska kiselina; 5- protokatehuinska kiselina; 6- vanilin; 7- miricetin; 8- elaginska kiselina; 9- kafeinska kiselina; 10- ferulinska kiselina; 11- *p*-kumarinska kiselina; 12- *p*-hidroksibenzoeva kiselina; 13- siringinska kiselina; 14- hlorogenska kiselina; 15- naringenin).

5.10. Uticaj primene termičke maceracije na fenolni sastav vina

U vinima dobijenim termičkom maceracijom došlo je do znatnog porasta sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i to više u slučaju više temperature. Najveći sadržaj je zabeležen kod uzorka T80 i kretao se do $3130 \pm 55,00$ mg GAE/l (Slika 43), dok je sadržaj u uzorku T60 bio $2800 \pm 40,00$ mg GAE/l (Slika 43). Najniži sadržaj je ekstrahovan u vinima označenim kao kontrola, koja su dobijena klasičnom maceracijom koja je trajala 14 dana. Ovo potvrđuje činjenicu da primena visoke temperature tokom prerade predstavlja efikasnu metodu za ekstrakciju fenolnih jedinjenja, jer povišena temperatura utiče na propustljivost ćelijskih membrana bobice grožđa i vrši njihovu degradaciju (Koyama et al., 2007). Prema Borazan i Bozan (2013), najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (2220 - 2720 mg GAE/l) je zabeležen u vinima dobijenim sa prefermentativnim zagrevanjem kljuka u odnosu na kontrolu dobijenu klasičnom maceracijom i maceracijom uz dodatak enzimskih preparata, što je u skladu sa našim rezultatima. Termička maceracija je tretman koji u zavisnosti od visine temperature i vremenskog trajanja obezbeđuje povećanu ekstrakciju ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na neke druge tehnike vinifikacije. Ipak, istraživanja na sorti Dornfelder govore da ne postoji značajna razlika između vina dobijenih termičkom maceracijom i klasičnom maceracijom posle šestomesečnog odležavanja vina (Wojdyło et al., 2021).



Slika 43. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u kontrolnom i termički maceriranim vinima na 60 i 80°C (1- kontrola - klasična maceracija; 2- T60; 3- T80)

Neke vinarije, kako bi povećale sadržaj antocijana u vinima vršile su termički tretman pokožice bobice na 60-70°C kraći vremenski interval. To je upravo doprinelo višem sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja posebno na sorti Pinot noir koja važi za vrlo problematičnu kada je u pitanju ekstrakcija bojenih materija (Sacchi et al., 2005). Suprotno našim rezultatima, Atanacković et al. (2012) su dobili viši sadržaj fenolnih jedinjenja pomoću termičke maceracije na 60°C u toku od 60 minuta za sorte Cabernet sauvignon, Prokupac i Merlot. Za sortu Pinot noir važno je da viša temperatura dovodi do veće ekstrakcije fenolnih jedinjenja. Dužina maceracije ima veliki uticaj na ekstrakciju mada koliko će se jedinjenja ekstrahovati takođe zavisi od same sirovine, sorte kao i stepena zrelosti grožđa.

Poredivši koncentracije svih analiziranih fenolnih jedinjenja (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, elaginska, siringinska, kafeinska, *p*-kumarinska, ferulinska kiselina, katehin, epikatehin, kvercetin, *trans*-resveratrol, kemferol) u kontrolnom uzorku sa koncentracijama u uzorcima termičke maceracije na 60°C i na 80°C (Tabela 29), može se zaključiti da ne postoji statistički značajna razlika ($p \geq 0,05$).

Nije ustanovljena značajna razlika u sadržaju epikatehina, katehina, *trans*-resveratrola, kvercetina i kemferola u kontroli i vinima dobijenim termičkom maceracijom ($p \geq 0,05$).

Sve analizirane fenolne kiseline imaju viši sadržaj u vinu dobijenom klasičnom maceracijom (kontrolni), osim kafeinske kiseline čiji je sadržaj bio najviši u vinu dobijenom termičkom maceracijom na 60°C ($7,58 \pm 0,20$ mg/l) (Tabela 29). Može se pretpostaviti da je ovo optimalna temperatura za ekstrakciju kafeinske kiseline, jer u vinima dobijenim maceracijom na višim temperaturama (80°C), njen sadržaj je bio znatno niži ($0,97 \pm 0,09$ mg/l) (Tabela 29). Na višim temperaturama može doći do degradacije kafeinske kiseline ili visoke temperature inhibiraju enzim polifenoloksidazu koja razlaže kaftarnu na kafeinsku kiselinu u širi pre fermentacije (Gómez-Plaza et al., 2001; Wojdyło et al., 2021). Enzimsko aktivnost je u porastu do 60°C, a na višim temperaturama uzrokuje degradaciju pa se kljuk mora zagrevati veoma brzo (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). U vinima dobijenim termičkom maceracijom, galna, siringinska i vanilinska kiselina su bile

najprisutnije, dok je najviši sadržaj bio u kontroli dobijenoj klasičnom maceracijom (Tabela 29). Koncentracija siringinske kiseline je u vinu dobijenom termičkom maceracijom na 80°C smanjena do 57%, dok u vinu dobijenom termičkom maceracijom na 60°C smanjena 52% u odnosu na kontrolu. Sadržaj galne kiseline se nije značajno menjao ni posle termičke maceracije na 70°C u trajanju od 30 minuta, izmeren posle 14 dana fermentacije (El Darra et al., 2016), a u našim uzorcima tu tendenciju galna kiselina nastavlja i nakon odležavanja. Prema Wojdyło et al. (2021), koji su poredili klasičnu i termičku maceraciju, ustanovili su da termička maceracija poboljšava ekstrakciju fenolnih kiselina, što je suprotno od naših rezultata. Oslobođanje fenolnih kiselina tokom termičke maceracije je moglo biti izazvano oslobađanjem iz acilovanih antocijanina, posebno *p*-kumarinske kiseline. Ferulinska kiselina u našim vinima je nađena u najnižim koncentracijama (u vinu T80 nije detektovana) (Tabela 29), što je u saglasnosti sa rezultatima datim od strane Borazan i Bozan (2013). Sadržaj protokatehuinske kiseline je bio dosta niži u termički maceriranim vinima (T60 i T80) nego u kontroli (Tabela 29), što je slično podacima iz literature gde je nađeno da njena količina opada u vinima čiji je kljuk zagrevan (Borazan i Bozan, 2013). Za derivate benzoeve i hidroksicimete kiseline nije nađena statistički značajna razlika između kontrole i vina dobijenog maceracijom na 60°C na nivou značajnosti 0,05. Suprotno ovome, primenjena kraća termička maceracija na 80°C, značajno je promenila sadržaj fenolnih kiselina u poređenju sa kontrolom ($p \leq 0,05$).

U vinima proizvedenim od sorte Cabernet Sauvignon u okviru naših vinifikacija, sadržaj katehina u kontroli je iznosio $19,35 \pm 1,50$ mg/l, dok je u uzorku T80 taj sadržaj bio čak $47,68 \pm 2,00$ mg/l (Tabela 29). Sadržaj epikatehina je takođe bio najviši u uzorku T80 i iznosio je $24,52 \pm 1,20$ mg/l, što je više za 33,91% u odnosu na koncentraciju epikatehina ekstrahovanog na temperaturi od 60°C (Tabela 29). Različite vrste vinifikacije grožđa vinove loze sorte Boğazkere (Turska) pokazale su da se kratkotrajnom termičkom maceracijom na 80°C uz UV svetlosne lampe, ekstrahuje značajno viši sadržaj katehina (136%) i epikatehina (190%) u odnosu na klasičnu maceraciju (Tahmaz i Söylemezoğlu, 2017), što je u skladu sa našim rezultatima. Prema Netzel et al. (2003), koji je poredio koncentracije grupa fenolnih jedinjenja za tri sorte (Pinot noir, Cabernet franc i Lemberger), najveći porast je bio za tehniku termičke maceracije na 65°C uz nastavak maceracije do 14 dana kao što je slučaj bio i u našem eksperimentu. Ustanovljen je porast flavan-3-ola kod sve tri sorte, baš kao i u našem slučaju kod katehina i epikatehina.

U istoj studiji, analiziran je i sadržaj kvercetina gde nije došlo do značajne promene u koncentraciji u uzorku posle termičke maceracije i klasične vinifikacije (Tahmaz i Söylemezoğlu, 2017) čija je koncentracija u oba slučaja bila oko 0,50 mg/l. Slično tome, naš kontrolni uzorak je sadržao $0,53 \pm 0,03$ mg/l, dok je najviši sadržaj izmeren u uzorku T60 od $16,71 \pm 0,70$ mg/l. Viša temperatura (uzorak T80) je dovela do pada sadržaja kvercetina na duplo manji sadržaj (Tabela 29). Izlaganje kljuka temperaturi (65°C) i odvajanje komine tek posle 14 dana, prouzrokovalo je povećanje ukupnih flavonola kod sorti Pinot noir, Lemberger i Cabernet franc (Netzel et al., 2003). Podaci iz literature govore da termička maceracija (70°C, 30 minuta) povećava ekstrakciju ukupnih flavonola u poređenju sa kontrolom, intenzivira degradaciju ćelija pokožice bobice i ubrzava njihovu ekstrakciju (El Darra et al., 2016).

Kratkotrajna termička maceracija kljuka sorte Boğazkere na 80°C, dovela je do porasta *trans*-resveratrola za 21% u odnosu na kontrolu, a u našim uzorcima *trans*-resveratrol u kontroli nije detektovan. Primenom termičke maceracije, ekstrahovao se u količinama od $0,12 \pm 0,02$ mg/l za T60 i $0,82 \pm 0,05$ mg/l za T80. To je u skladu sa Atanacković et al. (2012), gde je za sorte Merlot, Cabernet sauvignon i Prokupac nađeno da više temperature maceracije (80°C) povećavaju sadržaj *trans*-resveratrola u vinima. Suprotno tome, u studiji Romero-Pérez et al. (2001), najviša količina resveratrola ekstrahovana je na 60°C 30 minuta i veći porast temperature nije povezan sa ekstrakcijom ukupnog resveratrola. Prema Netzel et al. (2003), za sorte Pinot noir, Cabernet franc i

Lemberger, nađeno je da imaju najviši sadržaj *trans*-resveratrola upravo ona koja su proizvedena termičkom maceracijom i maceracijom od 14 dana, što se slaže sa našim istraživanjima.

Tabela 29. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u kontrolnim i termomaceriranim uzorcima

Jedinjenje (mg/l)	Kontrola	T60	T80
Galna kiselina	2,42±0,15	2,06±0,17	2,19±0,20
Protokatehuinska kiselina	2,31±0,25	0,59±0,08	0,78±0,10
Katehin	19,35±1,50	35,71±2,20	47,68±2,00
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,62±0,08	0,13±0,02	0,09±0,03
Vanilinska kiselina	3,39±0,05	2,16±0,05	2,10±0,30
Kafeinska kiselina	5,08±0,20	7,58±0,20	0,97±0,09
Epikatehin	7,60±0,50	18,31±0,90	24,52±1,20
Siringinska kiselina	7,74±0,50	3,72±0,20	3,34±0,60
<i>p</i> -kumarinska kiselina	5,54±0,70	3,90±0,25	0,64±0,05
Ferulinska kiselina	0,07±0,01	0,04±0,01	0,00
<i>trans</i> -resveratrol	0,00	0,12±0,02	0,82±0,05
Elaginska kiselina	2,19±0,03	1,94±0,05	1,73±0,20
Kvercetin	0,53±0,03	16,71±0,70	8,74±0,50
Kemferol	0,00	1,41±0,30	1,05±0,20

5.11. Uticaj primene karbonske maceracije na fenolni sastav vina

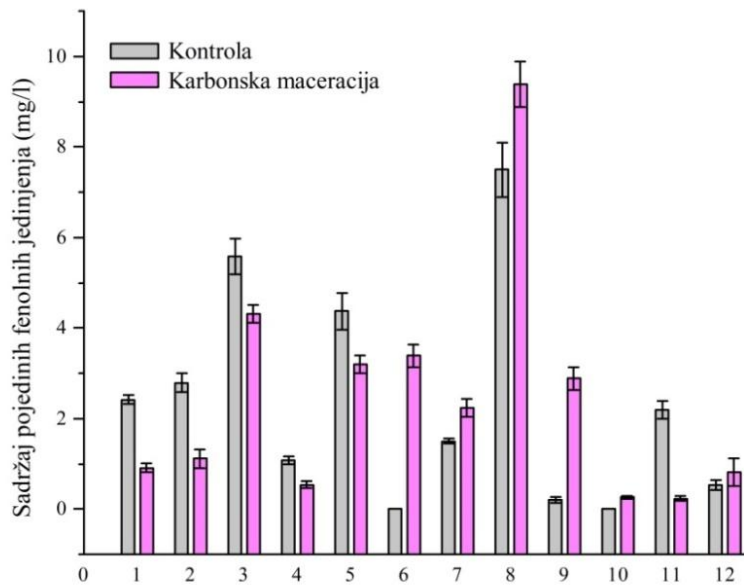
U poređenju sa kontrolom sadržaj fenolnih kiselina nije statistički značajno promenjen primenom karbonske maceracije ($p \geq 0,05$). Derivati hidroksicimetne kiseline u uzorcima karbonske maceracije su ekstrahovani u višim količinama nego u uzorcima dobijenim klasičnom maceracijom (Slika 44) koja je trajala 7 dana, gde ferulinska i kafeinska kiselina nisu detektovane (Tabela 30). Koncentracija *p*-kumarinske kiseline je bila viša u uzorku dobijenom karbonskom maceracijom ($2,88 \pm 0,25$ mg/l) pretpostavljajući kao posledicu njenog oslobađanja tokom unutarćelijske fermentacije koja se odlikuje degradacijom estara *p*-kumarinske kiseline sa vinskom kiselinom (Ramos et al., 1993). Viši sadržaj kafeinske kiseline u vinu dobijenom karbonskom maceracijom bi se mogao objasniti na sličan način. Derivati benzojeve kiseline su ekstrahovani u višim koncentracijama klasičnom maceracijom nego što je to slučaj sa uzorcima karbonske maceracije (Slika 44). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa Pellegrini et al. (2000) koji su istakli da je sadržaj galne kiseline u vinu Pinot noir bio dvostruko veći klasičnom maceracijom. U našim vinima najdominantnija je bila vanilinska kiselina koja je dostigla količinu od $4,37 \pm 0,40$ mg/l u vinima dobijenim klasičnom i $3,20 \pm 0,20$ mg/l u vinima dobijenim karbonskom maceracijom (Tabela 30). Sadržaj ukupnih flavanola izraženih preko katehina za osam italijanskih sorti, nije se razlikovao značajno poredeći karbonsku i tradicionalnu maceraciju (Pellegrini et al., 2000), što se slaže sa našim rezultatima kada je u pitanju sadržaj katehina i epikatehina ($p \geq 0,05$). Sadržaj kvercetina u našim vinima je bio dosta niži u odnosu na mlada italijanska vina Pinot noir (Pellegrini

et al., 2000), gde je nađen viši sadržaj kvercetina u vinima dobijenim tradicionalnom maceracijom. Nasuprot tome, naša vina dobijena karbonskom maceracijom imala su viši sadržaj kvercetina u odnosu na ona dobijena klasičnom maceracijom.

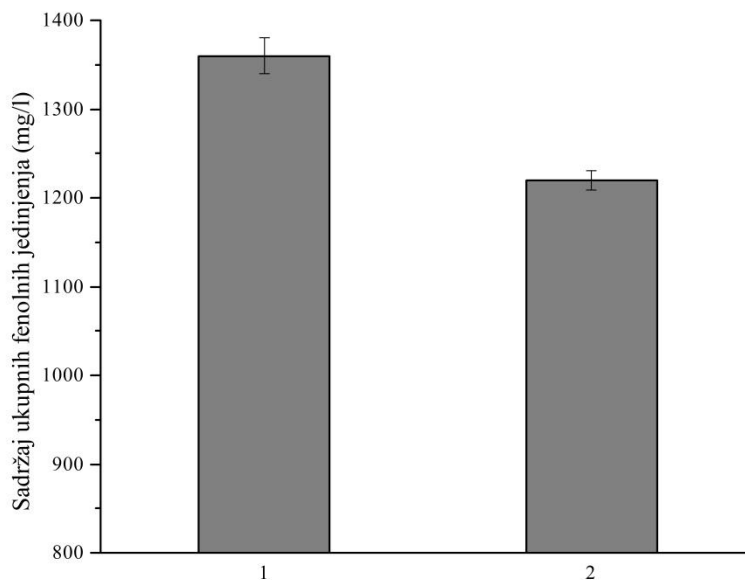
Prema Gómez-Míguez i Heredia (2004), sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je bio niži u vinima dobijenim karbonskom maceracijom (978,30 prema 2219,50 mg/l dobijeno klasičnom maceracijom), što je u saglasnosti sa našim rezultatima gde je dobijeno $1220 \pm 11,00$ mg/l ukupnih fenola izraženih kao galna kiselina karbonskom maceracijom i $1360 \pm 20,00$ mg/l ukupnih fenolnih jedinjenja ekstrahovanih klasičnom maceracijom (Slika 45). Suprotno tome, analizirajući komercijalna vina sorte Tempranillo dobijena karbonskom i klasičnom maceracijom utvrđen je znatno viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorcima karbonske maceracije (González-Arenzana et al., 2020). Dugogodišnja istraživanja na mađarskim sortama ističu da karbonska maceracija povećava sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u poređenju sa klasičnom fermentacijom. Suprotno ovome, studije na muskatnim sortama potvrđuju da nema efekta ili dolazi do opadanja ukupnih fenolnih jedinjenja karbonskom maceracijom (Sacchi et al., 2005). Ponašanje i ekstrakcija fenolnih jedinjenja tokom različitih tehnika maceracije je umnogome uslovljena sortom. Poredeći koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja mladih vina dobijenih karbonskom i tradicionalnom maceracijom, zaključeno je da ne postoji statistički značajna razlika u dobijenom sadržaju (Pellegrini et al., 2000).

Tabela 30. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u kontrolnim vinima i vinima dobijenim karbonskom maceracijom

Jedinjenje (mg/l)	Kontrola	Karbonska maceracija
Galna kiselina	2,42±0,10	0,91±0,10
Protokatehuinska kiselina	2,79±0,20	1,11±0,20
Katehin	5,58±0,40	4,31±0,20
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1,08±0,08	0,54±0,08
Vanilinska kiselina	4,37±0,40	3,20±0,20
Kafeinska kiselina	0,00	3,39±0,25
Epikatehin	1,50±0,05	2,24±0,20
Siringinska kiselina	7,50±0,60	9,38±0,50
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,20±0,07	2,88±0,25
Ferulinska kiselina	0,00	0,26±0,04
Elaginska kiselina	2,19±0,20	0,23±0,05
Kvercetin	0,53±0,10	0,81±0,30



Slika 44. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u kontroli i vinu dobijenom karbonskom maceracijom (1- Galna kiselina; 2-Protokatehuinska kiselina; 3- Katehin; 4- *p*-hidroksibenzoeva kiselina; 5- Vanilinska kiselina; 6- Kafeinska kiselina; 7- Epikatehin; 8- Siringinska kiselina; 9- *p*-kumarinska kiselina; 10- Ferulinska kiselina; 11- Elaginska kiselina; 12- Kvercetin)



Slika 45. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu klasične (1) i karbonske maceracije (2)

5.12. Uticaj primene različitih sredstava za bistrenje na fenolni sastav vina

Poredeći koncentracije svih analiziranih fenolnih jedinjenja (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, elaginska, vanilinska, siringinska, kafeinska, *p*-kumarinska, ferulinska kiselina, epikatehin, katehin, naringenin, kvercetin i *trans*-resveratrol) u kontrolnom uzorku vina bez dodatka sredstava za bistrenje sa uzorcima koji su tretirani sredstvima za bistrenje (Tabela 31), zaključeno je da postoji statistički značajna razlika za sve varijante bistrenja u poređenju sa kontrolom, na nivou značajnosti 0,05. Analizirajući međusobno uticaj istih sredstava na fenolni sastav, u različitim dozama, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u fenolnom sastavu vina, kada su u pitanju različite količine dodatih sredstava za bistrenje na nivou značajnosti 0,05 (Threlfall et al., 1999).

Koncentracija derivata benzoeve kiseline (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, siringinska, vanilinska i elaginska kiselina) bila je značajno smanjena tretiranjem želatinom u višoj koncentraciji (10 g/hl), ribljim mehurom (10 i 20 g/hl), kalijum kazeinatom (10 g/hl i 15 g/hl) i albuminom (5 g/hl i 10 g/hl) na nivou značajnosti 0,05. Koncentracija galne kiseline je smanjena najviše dodatkom ribljeg mehura (20 g/hl) i to 34,80% (Tabela 32). Na *p*-hidroksibenzoevu kiselinu najveći uticaj imao je dodatak kalijum kazeinata u koncentraciji 15 g/hl gde je smanjio njen sadržaj do 48,03%, dok je sadržaj protokatehuinske pod uticajem istog sredstva smanjen za 34,97% (Tabela 32). Sadržaj vanilinske i siringinske kiseline je takođe najviše smanjen dodatkom kalijum kazeinata (15 g/hl) i to 32,14% i 37,03% (Tabela 32). Najmanji uticaj na derivate benzoeve kiseline imao je dodatak želatina (5 g/hl) i to do 20%, osim *p*-hidroksibenzoeve kiseline koja je smanjena za 41,45% (Tabela 32). Bistrenje želatinom i sa višim koncentracijama nego u našem istraživanju nije dovelo do značajnog smanjenja sadržaja galne kiseline (Donovan et al., 1998; Ghanem et al., 2017).

Koncentracija derivata hidroksicimetne kiseline (kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina) je smanjena u tretiranim uzorcima vina ali nije ustanovljeno značajno opadanje ($p \geq 0,05$). Najveće smanjenje kafeinske kiseline izazvao je dodatak kalijum kazeinata (10 g/hl) i do 40,82%, dok je *p*-kumarinska kiselina dostigla najveći pad (39,36%) dodatkom istog sredstva u većoj dozi od 15 g/hl (Tabela 32). Kod sadržaja ferulinske kiseline primećen je dosta manji pad koncentracije primenom svih navedenih sredstava, a najveći uticaj imao je dodatak ribljeg mehura (20 g/hl) koji je smanjio koncentraciju 26,92% (Tabela 32). Donovan et al. (1998) i Ghanem et al. (2017) u svojim istraživanjima su naveli da dodatak želatina i albumina u vina od grožđa vinove loze sorti Merlot i Cabernet sauvignon nije imao značajan efekat na smanjenje sadržaja kafeinske kiseline što se poklapa i sa našim rezultatima. Sadržaj ferulinske kiseline nije značajno promenjen tretiranjem albuminom i želatinom u vinu sorte Cabernet sauvignon (Ghanem et al., 2017) što je u skladu sa našim rezultatima.

Za neflavonoidna jedinjenja - derivati benzoeve i hidroksicimetne kiseline, samo je dodatak ribljeg mehura i kalijum kazeinata imao značajan uticaj (Cosme et al., 2008). Cosme et al. (2012) takođe potvrđuje da kalijum kazeinat značajno utiče na smanjenje flavonoidnih, neflavonoidnih i ukupnih fenolnih jedinjenja u belim vinima. Dodatak albumina (10 g/hl) nije značajno promenio sadržaj ukupnih fenolnih kiselina (Gordillo et al., 2021), što je u našem istraživanju slučaj sa derivatima hidroksicimetne kiseline.

Koncentracija katehina i epikatehina je takođe bila u padu primenom sredstava za bistrenje u odnosu na kontrolu, ali to smanjenje nije statistički značajno ($p \geq 0,05$). Najmanji uticaj na sadržaj katehina i epikatehina imao je dodatak ribljeg mehura u koncentraciji 10 g/hl, dok je najveće smanjenje izazvao kalijum kazeinat u koncentraciji 15 g/hl. Prema Braga et al. (2007), monomerni flavanoli su sniženi oko 30% dodatkom kalijum kazeinata (20 g/hl) u belim vinima, dok je kod naših Cabernet sauvignon vina smanjenje kalijum kazeinatom (15 g/hl) bilo do 28,91% za katehin i 39,11% za epikatehin (Tabela 32).

Autori Cosme et al. (2008), koji su ispitivali dejstvo različitih sredstava za bistrenje na flavanole u belim vinima, ustanovili su da albumin, kalijum kazeinat, riblji mehur i želatin nemaju značajan uticaj na njihov sadržaj u odnosu na netretirano vino. Samo je upotreba kazeina značajno smanjila sadržaj flavanola. Analizirajući sadržaj katehina i epikatehina, pokazano je da različita sredstva imaju različitu efikasnost uklanjanja ovih jedinjenja. Prema Cosme et al. (2008) sadržaj katehina je značajno smanjen pomoću svih proteinskih sredstava (najviše želatinom i kazeinom), dok je epikatehin značajno smanjen samo dodatkom ribljeg mehura. U našem slučaju, smanjenje katehina i epikatehina najviše se primetilo upotrebom kalijum kazeinata (15 g/hl) i želatina (10 g/hl) što je u skladu sa Braga et al. (2007). Prema Donovan et al. (1998), dodatak želatina nije imao uticaja na sadržaj katehina i epikatehina u vinu od grožđa sorte vinove loze Merlot, dok je albumin doveo do smanjenja sadržaja epikatehina, mada to nije bilo statistički značajno ($p \geq 0,05$). Sličnu tvrdnju je izneo i Ghanem et al. (2017) gde je objavljeno da želatin i albumin nemaju uticaja na koncentraciju katehina i epikatehina. Monomerni flavan-3-oli su smanjeni tretiranjem albuminom za oko 17% (Gordillo et al., 2021), što je otprilike procenat smanjenja katehina u našim vinima, dok je procenat smanjenja epikatehina bio veći (Tabela 32).

Nije zabeleženo značajno smanjenje ni *trans*-resveratrola, naringenina i kvercetina ($p \geq 0,05$). Najveće smanjenje koncentracije naringenina izazvali su želatin i albumin u obe dodate koncentracije (33,33%), dok je koncentracija kvercetina najviše smanjena dodatkom veće količine želatina (10 g/hl) i ribljeg mehura (20 g/hl) i to za 39,52% (Tabela 32). Prema Donovan et al. (1998) tretiranje vina i sa višim količinama želatina i albumina nije imalo efekta na koncentraciju kvercetina u odnosu na kontrolu (netretirano vino). U istom istraživanju slični rezultati primećeni su i za *trans*-resveratrol, na koji je za nijansu veći uticaj imao albumin u odnosu na želatin (Donovan et al., 1998; Ghanem et al., 2017). Prema Karamanidou et al. (2011) tretiranje vina želatinom izazvalo je smanjenje resveratrola i do 60% dok je u našim uzorcima *trans*-resveratrol bio smanjen za 17,78% dodatkom želatina u koncentraciji 10 g/hl (Tabela 32). Kod nekih sorti kao što su Cynthiana, Noble i Cabernet sauvignon primećeno je da niže količine želatina (u kombinaciji sa silicijum-dioksidom, 4 ml/l) i albumina (1,28 ml/l) ne dovode do značajnog smanjenja količine *trans*-resveratrola (Threlfall et al., 1999).

Sve ove promene u koncentracijama fenolnih jedinjenja dešavaju se usled različitih interakcija proteina sa monomernim fenolima, dimerima i taninima različite molekulske mase (Karamanidou et al., 2011; Cosme et al., 2008).

Tabela 31. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u vinu pod uticajem različitih bistrila

Jedinjenje (mg/l)	Kontrola	Želatin (5 g/hl)	Želatin (10 g/hl)	Riblji mehur (10 g/hl)	Riblji mehur (20 g/hl)	Kalijum- kazeinat (10 g/hl)	Kalijum- kazeinat (15 g/hl)	Albumin (5 g/hl)	Albumin (10 g/hl)
Galna kiselina	3,42±0,07	3,16±0,10	3,01±0,10	2,50±0,11	2,23±0,16	2,93±0,10	2,69±0,12	2,48±0,16	2,43±0,12
Protokatehuinska kiselina	2,86±0,03	2,69±0,04	1,90±0,05	2,49±0,08	2,13±0,10	2,37±0,14	1,86±0,04	2,24±0,10	2,19±0,10
Katehin	12,07±0,15	10,33±0,50	8,66±0,35	11,27±0,50	8,95±0,25	8,70±0,24	8,58±0,24	10,43±0,22	10,28±0,29
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1,52±0,05	0,89±0,08	0,87±0,06	0,89±0,10	0,82±0,09	0,81±0,03	0,79±0,06	0,89±0,05	0,85±0,05
Vanilinska kiselina	2,52±0,06	2,35±0,07	2,22±0,05	2,24±0,10	2,07±0,11	2,13±0,12	1,71±0,10	2,04±0,25	1,87±0,10
Kafeinska kiselina	3,92±0,12	2,88±0,05	2,74±0,05	3,86±0,20	2,54±0,08	2,32±0,12	2,58±0,10	2,51±0,10	2,47±0,13
Epikatehin	4,04±0,10	2,75±0,06	2,52±0,07	3,60±0,12	2,81±0,08	2,76±0,10	2,46±0,12	3,07±0,20	3,04±0,25
Siringinska kiselina	7,67±0,15	6,50±0,13	6,33±0,10	6,79±0,15	5,55±0,21	6,01±0,21	4,83±0,23	5,73±0,14	5,64±0,10
<i>p</i> -kumarinska kiselina	2,82±0,06	1,88±0,05	1,82±0,05	2,40±0,10	1,80±0,10	1,81±0,10	1,71±0,10	1,95±0,11	1,88±0,10
Ferulinska kiselina	0,26±0,04	0,22±0,04	0,21±0,02	0,25±0,01	0,19±0,01	0,20±0,01	0,20±0,02	0,22±0,05	0,21±0,04
<i>trans</i> -resveratrol	0,45±0,04	0,39±0,01	0,37±0,06	0,41±0,05	0,31±0,01	0,37±0,04	0,36±0,04	0,40±0,04	0,39±0,03
Elaginska kiselina	2,52±0,02	2,45±0,02	1,45±0,05	1,99±0,10	1,42±0,05	1,77±0,05	1,62±0,07	1,65±0,05	1,56±0,10
Kvercetin	1,24±0,04	0,82±0,02	0,75±0,02	1,23±0,05	0,75±0,11	1,07±0,04	0,84±0,01	0,91±0,02	0,86±0,01

Tabela 32. Procenat smanjenja pojedinih fenolnih jedinjenja pod uticajem različitih sredstava za bisternje vina

Jedinjenje (% smanjenja)	Želatin (5 g/hl)	Želatin (10 g/hl)	Riblji mehur (10 g/hl)	Riblji mehur (20 g/hl)	Kalijum-kazeinat (10 g/hl)	Kalijum-kazeinat (15 g/hl)	Albumin (5 g/hl)	Albumin (10 g/hl)
Galna kiselina	7,60	11,99	26,90	34,80	14,33	21,35	27,49	28,95
Protokatehuinska kiselina	5,94	33,57	12,94	25,52	17,13	34,97	21,68	23,43
Katehin	14,42	28,25	6,63	25,85	27,84	28,91	13,59	14,83
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	41,45	42,76	41,48	46,05	46,71	48,03	41,45	44,08
Vanilinska kiselina	6,75	11,90	11,11	17,86	15,48	32,14	19,05	25,79
Kafeinska kiselina	26,53	30,10	1,53	35,20	40,82	34,18	35,97	36,99
Epikatehin	31,93	37,62	10,90	30,45	31,68	39,11	24,01	24,75
Siringinska kiselina	15,25	17,47	11,47	27,64	21,64	37,03	25,29	26,47
<i>p</i> -kumarinska kiselina	33,33	35,46	14,89	35,82	35,82	39,36	30,85	33,33
Ferulinska kiselina	15,38	19,23	3,85	26,92	23,08	23,08	15,38	19,23
<i>trans</i> -resveratrol	13,33	17,78	8,89	31,11	17,78	20,00	11,11	13,33
Elaginska kiselina	2,78	42,46	21,03	43,65	29,76	35,71	34,52	38,10
Kvercetin	33,87	39,52	0,81	39,52	13,71	32,26	26,61	30,65
Naringenin	33,33	33,33	11,11	22,22	11,11	22,22	33,333	33,33

5.13. Uticaj stabilizacije vina na fenolni sastav (askorbinska kiselina, SO₂, malolaktička fermentacija, pasterizacija)

5.13.1. Uticaj dodatka askorbinske kiseline na fenolni sastav vina

Dodatak askorbinske kiseline nije statistički značajno uticao na promenu koncentracije derivata benzoeve, derivata hidroksicimetne kiseline, *trans*-resveratrola, kvercetina i naringenina, na nivou značajnosti 0,05. Pretpostavlja se da se sadržaj jedinjenja u uzorcima vina sa dodatkom askorbinskom kiselinom (200 mg/l) nije značajno menjao zbog prisutnog slobodnog SO₂ koji je na početku eksperimenta u vinu podešen na oko 30 mg/l dodatkom K₂S₂O₅.

Askorbinska kiselina može imati i pro-oksidativnu ulogu, jer njenom degradacijom nastaje vodonik peroksid koji dalje stupa u reakcije sa fenolima i dolazi do njihove oksidacije (Barril et al., 2016). U našem eksperimentu nepromenjenost koncentracije fenolnih jedinjenja mogla bi se pripisati SO₂ koji u svim svojim oblicima ima sposobnost da veže vodonik peroksid i na taj način spreči oksidaciju fenolnih jedinjenja (Waterhouse et al., 2016).

Askorbinska kiselina se češće upotrebljava prilikom muljanja i flaširanja belih vina i najviše podataka iz literature nađeno je upravo za bela vina i model rastvora (Nikolantonaki i Waterhouse, 2012; Peng et al., 1998). Pojedini autori navode da su se vina sa dodatkom askorbinskom kiselinom činila svežija, lepršavija na ukusu i sa manje oksidativnih tonova (Barril et al., 2016), dok njihova boja nije bila održiva tokom dužeg perioda odležavanja (Peng et al., 1998; Clark et al., 2010). Fenolna jedinjenja u vinu, najpodložnija oksidativnim promenama su ona sa katehol funkcionalnom grupom (*orto*- difenol) uključujući kafeinsku kiselinu, katehin, epikatehin, flavonole kao što je kvercetin i jedinjenja sa trifenol grupom kao što je galna kiselina (Makhotkina i Kilmartin, 2009) koja predstavljaju oko 30% ukupnih fenolnih jedinjenja (Jeremić et al., 2020).

Prema Makhotkina i Kilmartin (2009), voltametrijskim ispitivanjem antioksidanasa vina zaključeno je da je askorbinska kiselina zanemarljiva vezano za redukciju *o*-hinona u poređenju sa SO₂ i glutationom. Hinoni kafeinske kiseline su reagovali sa SO₂ najbrže u poređenju sa drugim nastalim hinonima (Makhotkina i Kilmartin, 2009). Time se donekle može objasniti nepromenjenost ili čak blagi porast koncentracije kafeinske kiseline i ostalih derivata hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska kiselina i ferulinska kiselina) u našim uzorcima vina gde je dodata askorbinska kiselina i SO₂ u odnosu na kontrolu (Tabela 33). Sumpordioksid ima odličnu sposobnost da stabilizuje derivate hidroksicimetne kiseline (Makhotkina i Kilmartin, 2009), što se poklapa sa našim rezultatima (Tabela 33). Nasuprot ovome, ista studija je pokazala da oksidacioni produkti kvercetina (hinoni) stupaju u dalji niz hemijskih reakcija otežavajući ili onemogućavajući reakcije sa SO₂. Da je sadržaj kvercetina smanjen u odnosu na kontrolu pokazuju rezultati gde je nađeno 0,26±0,01 mg/l, dok je u kontroli sadržaj kvercetina iznosio 0,63±0,03 mg/l (Tabela 33). Interakcija katehin hinona sa SO₂ je bila nepotpunija u odnosu na kafeinsku (Makhotkina i Kilmartin, 2009). U našim uzorcima koncentracija katehina i epikatehina nije značajno promenjena u odnosu na kontrolu, dodatkom ovih antioksidanasa ($p \geq 0,05$). Tipični fenoli belih vina kao što su derivati hidroksicimetne kiseline mnogo brže stupaju u reakciju sa SO₂ u poređenju sa flavonoidima kao što su katehin i kvercetin koji su karakteristični za crvena vina (Makhotkina i Kilmartin, 2009).

Tabela 33. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u kontrolnim vinima i vinima sa dodatkom askorbinske kiseline

Jedinjenje (mg/l)	Kontrola	Askorbinska kiselina
Galna kiselina	4,04±0,12	4,36±0,15
Protokatehuinska kiselina	1,30±0,05	1,49±0,05
Katehin	11,80±0,35	11,05±0,30
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1,07±0,03	0,65±0,02
Vanilinska kiselina	1,50±0,05	1,98±0,05
Kafeinska kiselina	2,30±0,05	2,99±0,10
Epikatehin	5,20±0,17	4,57±0,15
Siringinska kiselina	5,68±0,20	6,46±0,25
<i>p</i> -kumarinska kiselina	2,18±0,10	2,48±0,10
Ferulinska kiselina	0,23±0,02	0,24±0,02
<i>trans</i> -resveratrol	0,28±0,02	0,25±0,01
Elaginska kiselina	1,50±0,05	1,43±0,05
Kvercetin	0,63±0,03	0,26±0,01
Naringenin	0,04±0,01	0,01±0,001

5.13.2. Uticaj dodatka rastućih koncentracija SO₂ na fenolni sastav vina

Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji svih analiziranih jedinjenja u kontrolnom uzorku i uzorcima kojima su dodate veće koncentracije vinobrana (5 g/hl i 7 g/hl) odnosno vinima sa 43 i 55 mg/l slobodnog SO₂. Poredeći posebno derivate benzojeve kiseline (Slika 46) zapažena je značajna razlika među pomenutim uzorcima, dok za derivate hidroksicimetne kiseline (Slika 47) i flavan-3-ole (katehin i epikatehin) (Slika 48) nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p \geq 0,05$). Ponašanje ovih jedinjenja usled dodatka povećanih koncentracija vinobrana je uglavnom u porastu sa ili bez statističke značajnosti.

Neki od podataka nađenih u literaturi govore o tome da povećane koncentracije SO₂ u vinu sorte vinove loze Merlot (50, 100 i 200 mg/l), bez prisustva kiseonika, ne dovode do značajnih promena kada je u pitanju sadržaj katehina i epikatehina (Tao et al., 2007), što je u saglasnosti sa našim rezultatima gde je zabeležen rast ali ne statistički značajan (Slika 48). Autori Ma et al. (2018) ustanovili su slične tvrdnje. Kako navode Barril et al. (2012), SO₂ ima sposobnost da redukuje katehin *o*-hinon nazad u katehin i na taj način se čuva sadržaj katehina. Bradshaw et al. (2004) su ustanovili da je u model vinima, kojima je dodat standard katehina (100 mg/l) i SO₂ (50 mg/l), izbegnuta oksidacija katehina i stvaranje hinona tj. potamnivanje vina. Prema Pateraki et al. (2014), koji su analizirali uticaj dodatka SO₂ tokom spontane fermentacije, ustanovili su da je sadržaj katehina i epikatehina na kraju fermentacije (posle 14 dana) bio viši u uzorcima sa dodatkom SO₂.

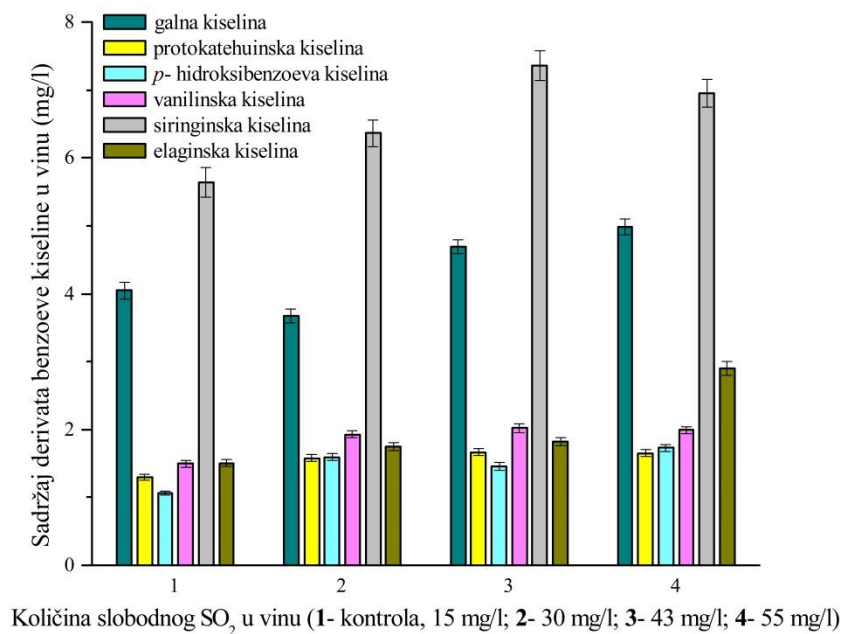
Približno ista koncentracija kvercetina nađena je u kontrolnom vinu i vinu koje je imalo 43 mg/l slobodnog SO₂. Slično tome, poredeći konvencionalna vina sa organskim vinima bez dodatka

SO₂, nađen je viši sadržaj kvercetina u većem broju vina bez dodatka SO₂ (organskim vinima) mada ta razlika nije bila značajna (Garaguso i Nardini, 2015). Rezultati koje su dali Tao et al. (2007), govore da sa povećanjem koncentracije SO₂ dolazi do smanjenja sadržaja kvercetina. Razlog za ovakvo ponašanje kvercetina može se pripisati reakciji kvercetina ili njegovog oksidovanog oblika sa SO₂, koji se razlikuju od reakcija sa drugim fenolima (Tao et al., 2007).

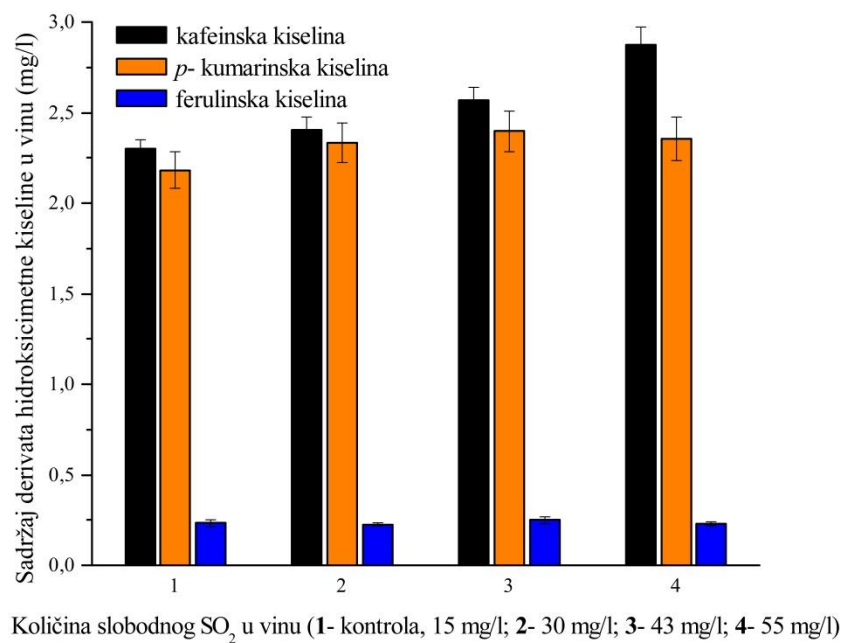
U našim vinima sadržaj kafeinske kiseline je bio u porastu sa povećanjem koncentracije SO₂ mada nije ustanovljena značajna razlika. Pretpostavlja se da je to rezultat reakcija hidrolize kafeinske kiseline iz svojih estara (Gabriele et al., 2018). Koncentracija kafeinske kiseline u uzorcima vina Merlot nije se značajno promenila prilikom dodatka 50, 100 i 200 mg/l SO₂, ali je najveći sadržaj ipak bio u uzorcima bez dodatka SO₂ (Tao et al., 2007; Garaguso i Nardini, 2015). Kada je u pitanju sadržaj *p*-kumarinske kiseline došlo je do blagog porasta u sadržaju počevši od vina sa 15 mg/l SO₂ ka vinu sa 43 mg/l SO₂ (Slika 47). U literaturi je nađeno da je koncentracija *p*-kumarinske i ferulinske kiseline neznatno viša u vinima sa sadržajem oko 50 mg/l nego u vinima kojima nije dodat SO₂ (Garaguso i Nardini, 2015). U medijumu kao što je vino dolazi do vezivanja bisulfita za fenolna jedinjenja, posebno za kafeinsku i *p*-kumarinsku kiselinu i ovi procesi su reverzibilni u zavisnosti od pH i temperature (Pateraki et al., 2014), čime se može objasniti variranje njihovog sadržaja u našim istraživanjima (Slika 47).

Koncentracija siringinske kiseline kao i ostalih derivata benzojeve kiseline (Slika 46) je povećana sa porastom koncentracija SO₂ ($p \leq 0,05$). U publikacijama nađena je veća koncentracija siringinske kiseline u vinima sa 50 mg/l nego u vinima koja ne sadrže SO₂ (Garaguso i Nardini, 2015). Takođe je, za koncentraciju galne kiseline je nađeno da je bila viša u uzorcima sa dodatkom SO₂ nego u uzorcima bez dodatka SO₂ (Pateraki et al., 2014).

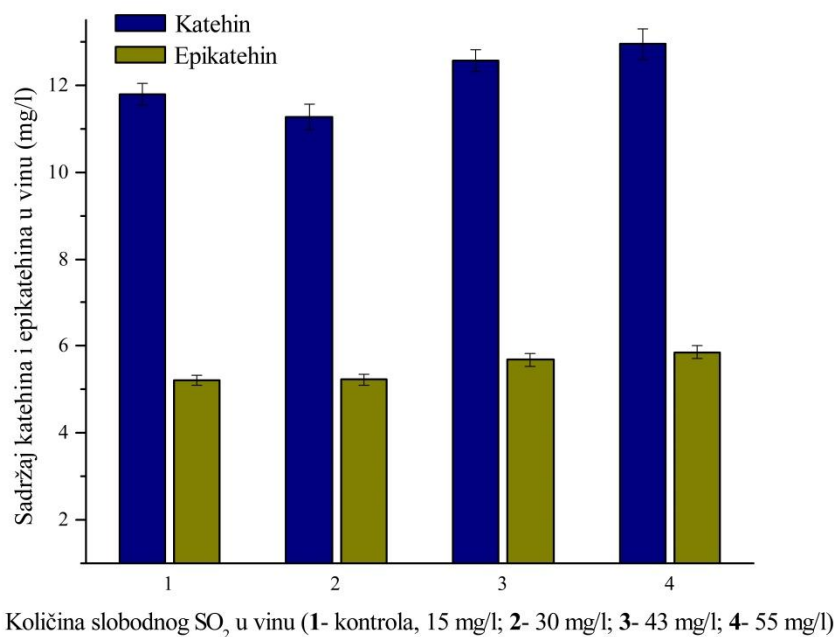
Nije zapažena značajna promena *trans*-resveratrola u našim vinima kako u kontroli tako i u ostalim uzorcima sa rastućim koncentracijama slobodnog SO₂ (Slika 49). Podaci nađeni u literaturi su pokazali da sa povećanjem sadržaja SO₂ od 50 do 100 mg/l i od 100 do 150 mg/l dolazi do značajnog porasta sadržaja *trans*-resveratrola (Gabriele et al., 2018). Ipak, drugi navode da je pri sadržaju SO₂ od oko 50 mg/l u konvencionalnim vinima nađena niža koncentracija *trans*-resveratrola nego u vinima bez dodatka SO₂ (Garaguso i Nardini, 2015).



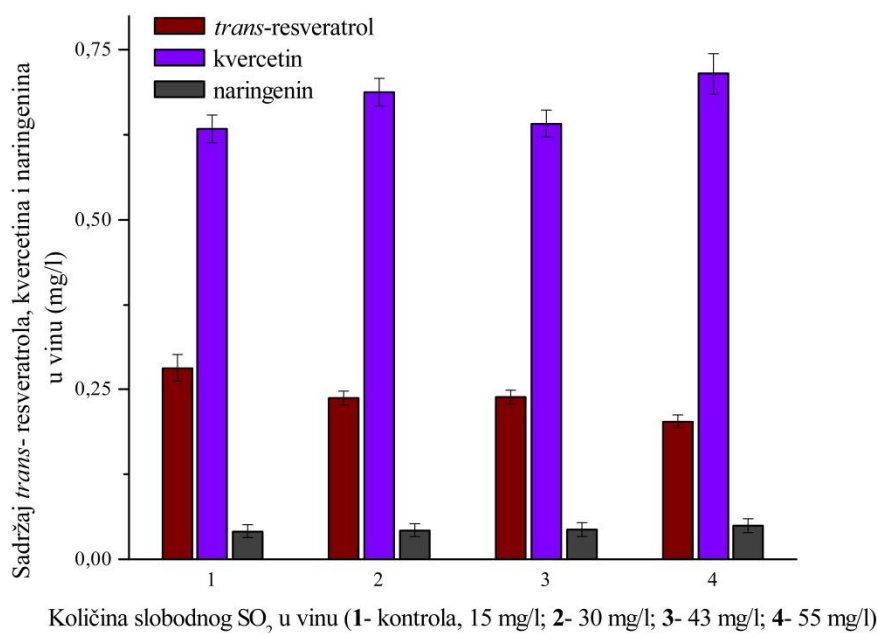
Slika 46. Sadržaj derivata benzoeve kiseline u vinu u zavisnosti od sadržaja slobodnog SO₂



Slika 47. Sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline u vinu u zavisnosti od sadržaja slobodnog SO₂



Slika 48. Sadržaj katehina i epikatehina u vinu u zavisnosti od sadržaja slobodnog SO₂



Slika 49. Sadržaj *trans*-resveratrola, kvercetina i naringenin u vinu u zavisnosti od sadržaja slobodnog SO₂

5.13.3. Uticaj primene malolaktičke fermentacije (MLF) na fenolni sastav vina

U našem istraživanju, najdominantnija jedinjenja izmerena u kontrolnom uzorku su bila katehin, epikatehin i siringinska kiselina, što se donekle poklapa sa istraživanjima vršenim na vinima Tempranillo gde su najdominantnija jedinjenja u kontrolnim vinima bila galna kiselina, epikatehin, katehin kao i kvercetin (Hernández et al., 2006).

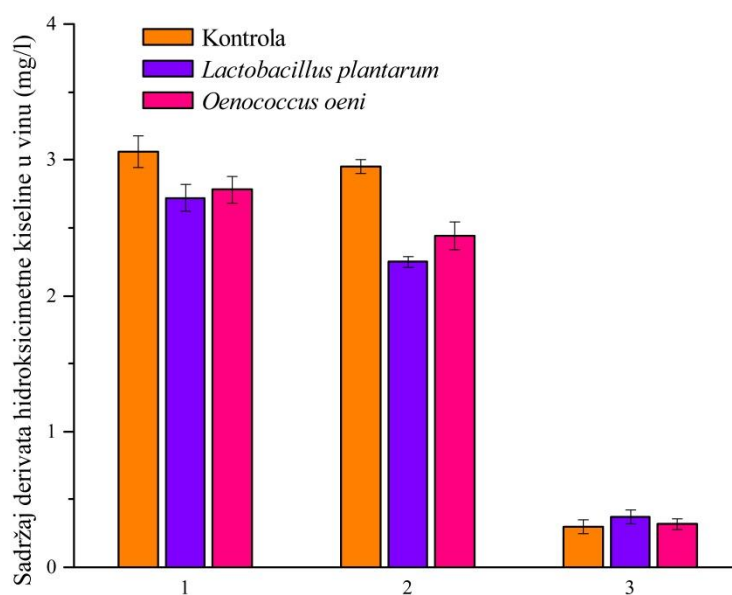
Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u kontrolnim uzorcima vina je približan sadržaju posle MLF (Slika 50), tj. nema statistički značajne razlike ($p \geq 0,05$), što se može tumačiti kao uticaj dodatka pektinolitičkih enzima tokom alkoholne fermentacije (EXV). Tokom ovog procesa je došlo do dejstva cinamat esteraze i enzimske razgradnje estara ovih jedinjenja sa vinskom kiselinom, a u toku MLF enzimska aktivnost bakterija mlečnog vrenja je dovela do njihovog oslobađanja (Hernández et al., 2006). Takođe Hernández et al. (2007) su proučavali oslobađanje derivata hidroksicimetnih kiselina i došli do zaključka da tokom spontane fermentacije i inokulacije sa *Lb. plantarum* dolazi do hidrolize estara ovih kiselina, dok inokulacija drugim sojevima *Lb. plantarum* i *O. oeni* ima malo ili nimalo efekta na ove estre. Kod ovih sojeva oslobađanje kafeinske i *p*-kumarinske kiseline pripisalo se delovanju cinamat esteraze. Time se objašnjava približno ista količina navedenih derivata hidroksicimetnih kiselina u našim uzorcima zasejanim i jednom i drugom kulturom bakterija mlečnog vrenja.

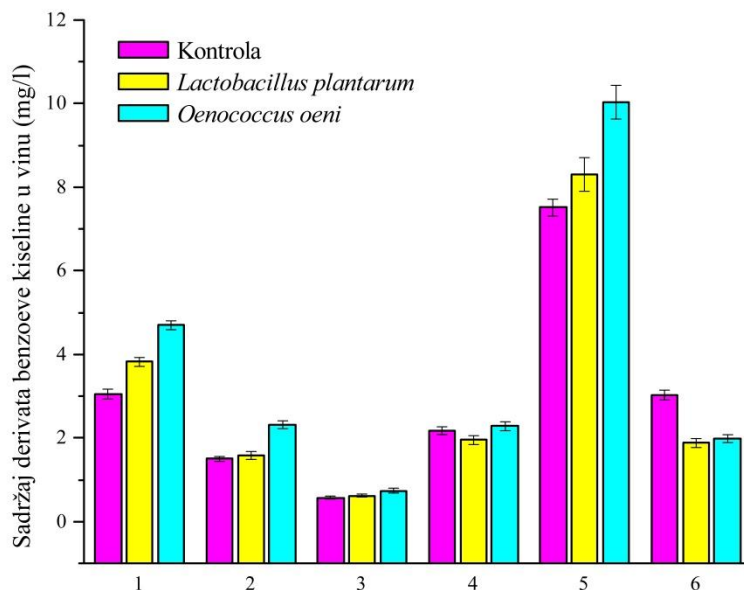
Sadržaj vanilinske, protokatehuinske i siringinske kiseline posle MLF je ostao uglavnom nepromenjen ili u malom padu u slučaju obe zasejane kulture bakterija mlečne kiseline (BMK) (*Lactobacillus plantarum* i *Oenococcus oeni*) kod vina Tempranillo kao i vina Trincadeira (zasejanog komercijalnim preparatima mlečnih bakterija Biolact Acclimatée i Biolact Acclimatée 4R). Takođe je ustanovljeno i u našim uzorcima vina sorte vinove loze Cabernet sauvignon (Slika 51) gde nije pokazana statistički značajna razlika poređenjem sa kontrolom ($p \geq 0,05$). Madsen et al. (2017) i Chescheir et al. (2015) su ispitivali različite sojeve BMK *O.oeni* i ustanovili da oslobađanje hidroksicimetnih kiselina iz estara zavisi od bakterijske kulture i njenog enzimskog dejstva. Sadržaj vanilinske i siringinske kiseline je približan u svim uzorcima, jer njihovo prisustvo u vinu nije uslovljeno metabolizmom kvasca, nego zavisi od sadržaja alkohola koji je u ovim vinima bio isti (Hernández et al., 2007; Cabrita et al., 2008). Prema Cabrita et al. (2008), koji su ispitivali dejstvo MLF na koncentraciju fenolnih jedinjenja, nije ustanovljena značajna promena ovih jedinjenja u odnosu na klasičnu fermentaciju uz dodatak enzimskih preparata. Izuzetak je bila kafeinska kiselina čiji je sadržaj bio veći pre MLF, što je pripisano dejstvu enzima.

Prema Hernández et al. (2007), sadržaj *trans*-resveratrola i kvercetina se udvostručio posle MLF, dok je najniža koncentracija dobijena u uzorku zasejanom sa *Lb. plantarum* što je slučaj i kod naših uzoraka (Slika 52). Takođe ista studija navodi da je sadržaj katehina i epikatehina bio viši posle MLF nego u kontrolnom uzorku vina, dok je kod sorti Regent i Rondo, u zavisnosti od primenjenog bakterijskog soja, primećeno opadanje flavan-3-ola posle MLF i do 68% što se poklapa sa trendom opadanja u našem ispitivanom vinu Cabernet sauvignon. Ipak nije nađena statistički značajna razlika u sadržaju katehina i epikatehina pre i posle zasejavanja BMK ($p \geq 0,05$). Ispitivana bakterija *Lb. hilgardii* je uticala takođe na smanjenje sadržaja katehina u vinu na 20°C (Alberto et al., 2004). MLF je prouzrokovala degradaciju flavanola u vinima Rondo i Regent, sortama vinove loze koje rastu u hladnom regionu. Korišćene BMK za inokulaciju nisu dovele do statistički značajne razlike ($p > 0.05$) u sadržaju fenolnih jedinjenja vina sorte Rondo što je u skladu sa našim rezultatima (Wojdyło et al., 2020). U našim uzorcima nađeno je da ne postoji statistički značajna razlika poredeći uzorke vina inokulisane sa bakterijama *O.oeni* i *Lb. plantarum*, na nivou značajnosti 0,05, što znači da dodatak BMK ne utiče značajno na fenolni sastav vina sorte Cabernet sauvignon (Tabela 34).

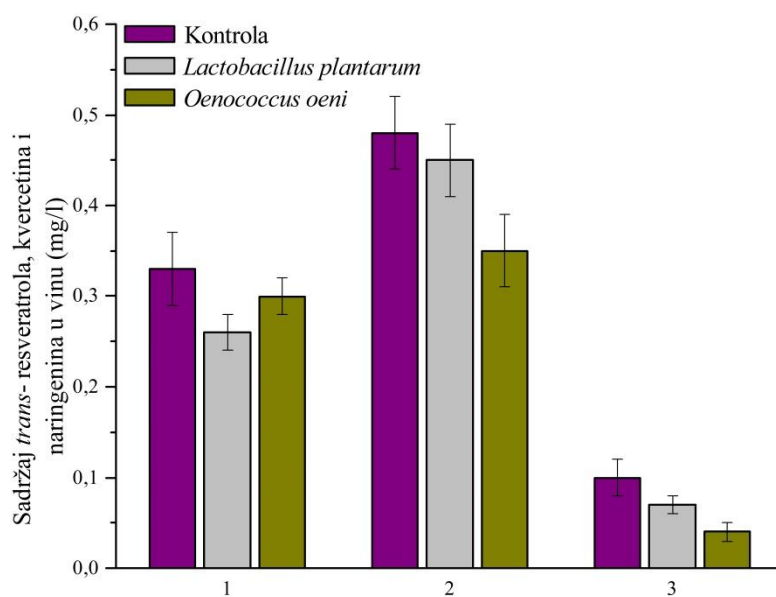
Tabela 34. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u kontrolnom i uzorcima zasejanim BMK

Jedinjenje (mg/l)	Kontrola (bez zasejavanja BMK)	Vino zasejano sa <i>Lb.plantarum</i>	Vino zasejano sa <i>O.oeni</i>
Galna kiselina	3,04±0,12	3,82±0,10	4,70±0,10
Protokatehuinska kiselina	1,50±0,05	1,58±0,10	1,98±0,10
Katehin	22,26±0,40	13,88±0,25	16,07±0,25
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,57±0,04	0,62±0,04	0,74±0,05
Vanilinska kiselina	2,17±0,10	1,95±0,10	2,28±0,10
Kafeinska kiselina	3,06±0,12	2,72±0,10	2,78±0,10
Epikatehin	9,45±0,40	6,08±0,50	6,50±0,50
Siringinska kiselina	7,52±0,20	8,30±0,40	10,03±0,40
<i>p</i> -kumarinska kiselina	2,95±0,05	2,25±0,04	2,44±0,10
Ferulinska kiselina	0,30±0,05	0,37±0,05	0,32±0,04
<i>trans</i> -resveratrol	0,33±0,04	0,26±0,02	0,30±0,02
Elaginska kiselina	3,02±0,12	1,88±0,10	2,31±0,10
Kvercetin	0,48±0,04	0,45±0,04	0,35±0,04
Naringenin	0,10±0,02	0,07±0,01	0,04±0,01

**Slika 50.** Sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline pre i posle MLF (1- kafeinska kiselina; 2- *p*-kumarinska kiselina; 3- ferulinska kiselina)



Slika 51. Sadržaj derivata benzoeve kiseline pre i posle MLF (1- galna kiselina; 2- protokatehuinska kiselina; 3- *p*-hidroksibenzoeva kiselina; 4- vanilinska kiselina; 5- siringinska kiselina; 6- elaginska kiselina)



Slika 52. Sadržaj *trans*-resveratrola, kvercetina i naringenina pre i posle MLF (1- *trans*-resveratrol; 2- kvercetin; 3- naringenin)

5.13.4. Uticaj primene pasterizacije na fenolni sastav vina

Poredeći sadržaj fenolnih jedinjenja u pasterizovanom i nepasterizovanom vinu (Tabela 35) nije ustanovljena statistički značajna razlika između ovih uzoraka ($p > 0,05$) što znači da pasterizacija nije imala značajan uticaj na ispitivana jedinjenja u vinu.

Uglavnom je došlo do smanjenja sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja što se može pripisati termičkoj degradaciji. Međutim, među identifikovanim derivatima benzoeve kiseline izdvojila se elaginska kiselina čiji se sadržaj povećao nakon pasterizacije. Postoji mogućnost da se elaginska kiselina oslobodila iz elagitanina koji podležu reakcijama hidrolize tokom toplog punjenja soka od kupine koji je bogat izvor ovih jedinjenja (Gancel et al., 2011). U istom radu autori su ustanovili smanjenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja usled termičkog tretmana soka od kupine što bi se moglo dovesti u vezu sa našim rezultatima. Povećanjem temperature odležavanja crvenog vina do 40°C nađeno je smanjenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, dok smanjenje sadržaja ukupnih tanina nije bilo značajno (Hopfel et al., 2013).

Tabela 35. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u kontrolnom i pasterizovanom vinu

Jedinjenje (mg/l)	Kontrola	Pasterizacija
Galna kiselina	3,42±0,15	2,84±0,11
Protokatehuinska kiselina	2,86±0,10	1,23±0,10
Katehin	10,07±0,05	18,88±1,20
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1,52±0,08	0,40±0,02
Vanilinska kiselina	2,52±0,10	1,69±0,11
Kafeinska kiselina	2,62±0,15	2,28±0,21
Epikatehin	6,44±0,04	6,87±0,20
Siringinska kiselina	7,67±0,40	7,32±0,30
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,82±0,10	0,97±0,05
Ferulinska kiselina	0,26±0,02	0,26±0,02
<i>trans</i> -resveratrol	0,15±0,01	0,25±0,04
Elaginska kiselina	0,52±0,04	2,72±0,12
Kvercetin	0,13±0,02	0,33±0,04
Naringenin	0,02±0,001	0,09±0,004

5.14. Poređenje sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja različitih berbi 2016. i 2018.

Nakon statističke obrade podataka testom uparenih uzoraka za 12 fenolnih jedinjenja kvantifikovanih 2016. i 2018. godine u vinu proizvedenom po istoj tehnologiji proizvodnje, zaključeno je da postoji statistički značajna razlika u sadržaju galne, elaginske, *p*-kumarinske, *p*-hidroksibenzoeve, protokatehuinske, siringinske i vanilinske kiseline na nivou značajnosti 0,05. Razlike u sadržaju pojedinih fenolnih jedinjenja javljaju se zbog varijabilnih vremenskih uslova u godinama berbi, kao što su prosečne dnevne temperature i količina padavina. Osim uticaja na

sadržaj stilbena u vinu, uticaj vremenskih uslova na ostala fenolna jedinjenja nije u potpunosti razjašnjen (Raičević et al., 2017).

5.15. Uticaj dvogodišnjeg odležavanja vina u različitim sudovima na fenolni sastav

Poredeći fenolni sastav uzoraka vina koja su odležavala u različitim sudovima 2 godine (Tabela 36), nađena je statistički značajna razlika u sadržaju katehina i epikatehina kada je u pitanju vino iz inoksa i vino iz staklene boce (buteljke) ($p < 0,05$). Ne postoji statistički značajna razlika između dvogodišnjeg odležavanja vina u inoksu, hrastovim bačvama, barik buradima i staklenim buteljka u pogledu sadržaja derivata benzojeve kiseline, derivata hidroksicimetne kiseline, *trans*-resveratrola i kvercetina na nivou značajnosti 0,05.

Tabela 36. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u vinu koje je odležavalo u različitim sudovima tokom dve godine

Jedinjenje (mg/l)	Inoks	Hrast	Barik	Staklo
Galna kiselina	3,34±0,12	3,09±0,15	4,36±0,21	2,42±0,10
Protokatehuinska kiselina	0,38±0,04	1,05±0,05	1,11±0,05	2,31±0,10
Katehin	31,66±1,20	39,43±1,40	31,57±1,1	19,35±0,95
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	0,13±0,02	0,37±0,05	0,30±0,03	0,62±0,06
Vanilinska kiselina	1,12±0,10	2,75±0,15	1,90±0,10	3,39±0,15
Kafeinska kiselina	3,07±0,10	3,87±0,10	2,87±0,12	5,08±0,20
Epikatehin	19,52±1,0	21,71±1,10	15,70±1,4	7,60±0,35
Siringinska kiselina	3,32±0,14	3,66±0,15	3,34±0,20	7,74±0,15
<i>p</i> -kumarinska kiselina	3,77±0,17	3,76±0,15	3,02±0,10	5,54±0,20
Ferulinska kiselina	0,07±0,004	0,04±0,001	0,07±0,004	0,07±0,004
<i>trans</i> -resveratrol	0,58±0,03	0,92±0,04	0,41±0,02	0,13±0,02
Elaginska kiselina	2,47±0,10	4,45±0,12	6,43±0,15	1,85±0,10
Kvercetin	7,62±0,22	3,18±0,11	1,34±0,10	0,57±0,02

5.16. Uticaj starosti zasada vinograda na fenolni sastav vina

U vinima dobijenim od grožđa koje potiče iz tri vinograda različite starosti zasada kvantifikovano je 13 fenolnih jedinjenja (Tabela 37), među kojima su derivati hidroksicimetne kiseline (kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina), derivati benzojeve kiseline (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska i elaginska kiselina), flavan-3-oli (katehin i epikatehin), od flavonola kvercetin i stilbena *trans*-resveratrol. Na osnovu poređenja dobijenih rezultata nađena je statistički značajna razlika između fenolnog sastava vina dobijenog iz vinograda u punom rodu (mlad vinograd) i vinograda višedecenijske eksploatacije ($p \leq 0,05$), a to je vinograd Radmilovac.

Tabela 37. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja u vinima iz vinograda različite starosti zasada

Jedinjenje (mg/l)	Vino Carpe Diem (mlad vinograd)	Vino Trišić (srednje star vinograd)	Vino Radmilovac (star vinograd)
Galna kiselina	1,13±0,10	2,80±0,06	2,42±0,05
Protokatehuinska kiselina	1,96±0,11	0,49±0,03	2,31±0,05
Katehin	11,04±0,20	23,71±0,50	19,35±0,33
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	1,23±0,10	0,89±0,05	0,62±0,04
Vanilinska kiselina	3,53±0,09	2,88±0,08	3,39±0,06
Kafeinska kiselina	3,87±0,11	1,34±0,10	5,08±0,18
Epikatehin	4,37±0,35	10,46±0,99	7,60±0,25
Siringinska kiselina	7,82±0,45	3,73±0,15	7,74±0,20
<i>p</i> -kumarinska kiselina	2,38±0,06	0,32±0,02	5,54±0,30
Ferulinska kiselina	0,05±0,002	0,27±0,02	0,07±0,005
<i>trans</i> -resveratrol	0,12±0,01	1,32±0,10	0,13±0,01
Elaginska kiselina	0,49±0,03	1,96±0,11	1,85±0,10
Kvercetin	0,02±0,001	24,75±1,10	0,57±0,02

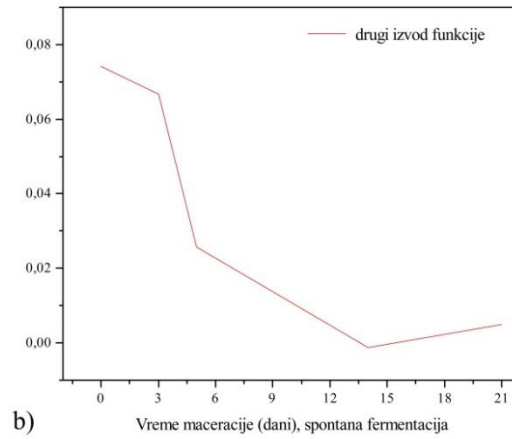
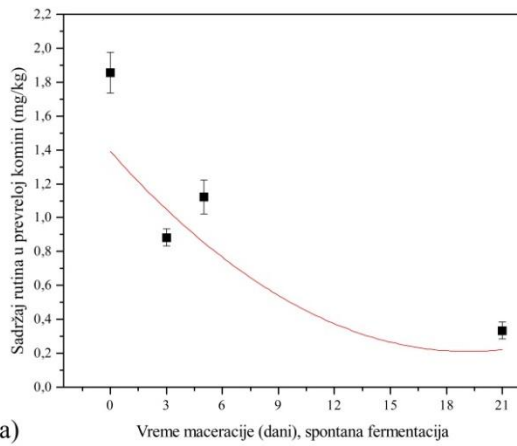
5.17. Uticaj različitih vinskih selekcionisanih kvasaca i enzimskih preparata na kinetiku ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja prevrele komine tokom maceracije

5.17.1. Sadržaj rutina u uzorcima prevrele komine

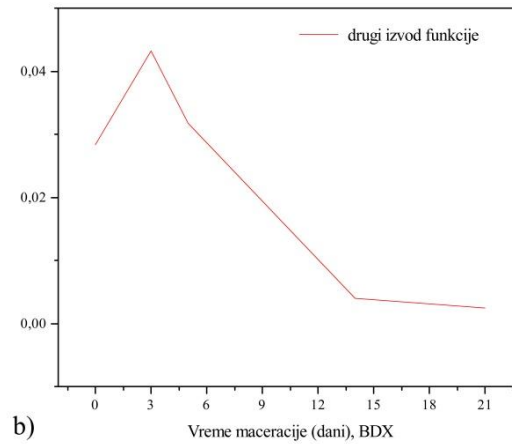
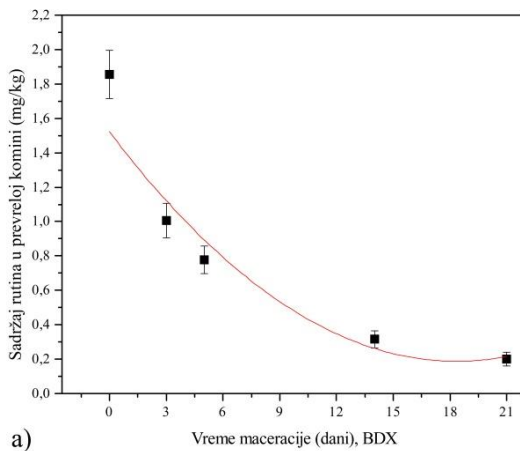
Za sadržaj rutina u uzorcima komine koja je macerirala 3, 5, 7 14 i 21 dana uz potapanje dva puta dnevno, zapažen je trend eksponencijalnog opadanja od perioda najkraće maceracije tj. trećeg dana do 21. dana maceracije za sve varijante ogleda (Slika 53a-57a). Najviši sadržaj rutina je izmeren u komini koja je najkraće macerirala što znači da je manje rutina ekstrahovano u odnosu na kominu koja je duži period bila u kontaktu sa tečnom fazom.

Poređenjem sadržaja rutina u komini dobijenoj spontanom i inokulisanom fermentacijom (BDX, FX10 i Qa23) nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Isti slučaj zabeležen je za kominu koja je macerirala uz dodatak enzimskih preparata (BDX + CB i BDX + EXV₂₀₁₈) u poređenju sa kominom koja je macerirala bez enzimskih preparata (BDX). Upotreba enzimskog preparata CP tokom maceracije i fermentacije sa selekcionisanim kvascem BDX dovela je do statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u sadržaju rutina u toj komini i komini varijanti ogleda BDX + EXV₂₀₁₆ i BDX + Car.

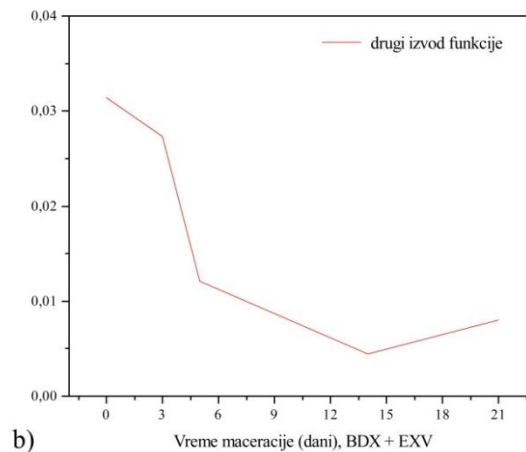
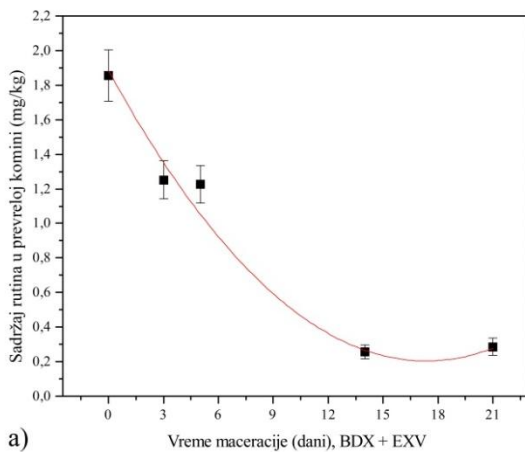
Vreme maceracije je imalo značajan uticaj na sadržaj rutina u uzorcima komine koja je macerirala tri dana i komine koja je macerirala 7, 14 i 21 dan ($p < 0,05$). Takođe značajna je bila razlika komine koja je maceirala 5 dana sa kominom koja je bila u kontaktu sa tečnom fazom 14 i 21 dan ($p \leq 0,05$).



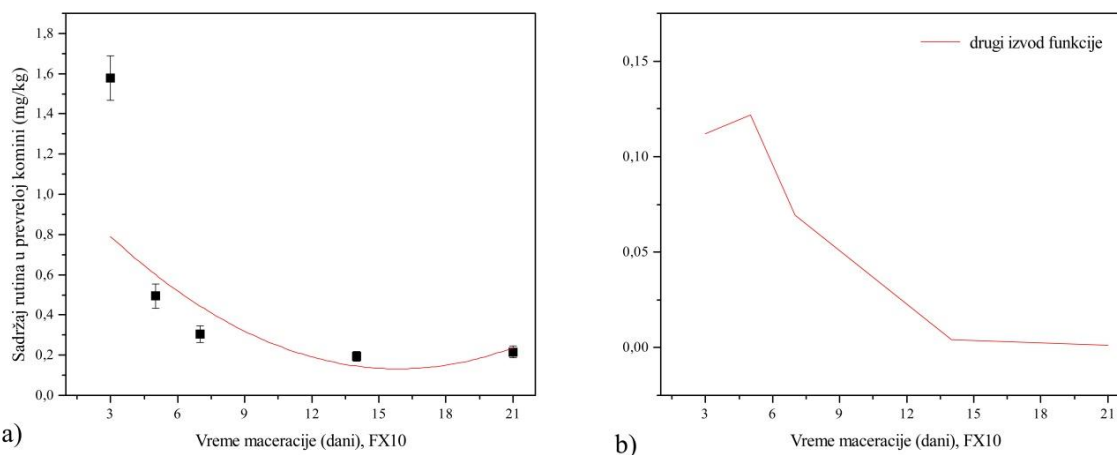
Slika 53. Dinamika sadržaja rutina u prevreloj komini tokom maceracije i spontane fermentacije (a) i konveksnost/konkavnost (b)



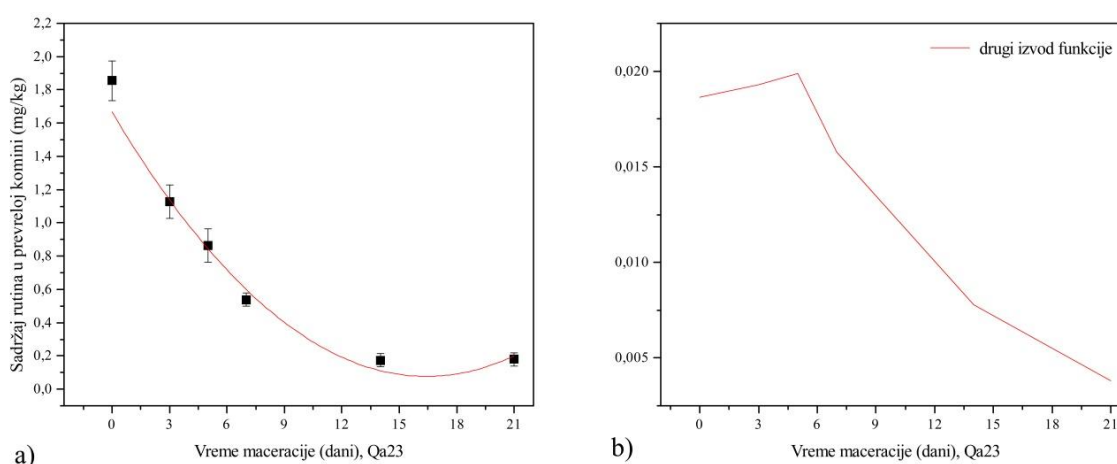
Slika 54. Dinamika sadržaja rutina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 55. Dinamika sadržaja rutina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX uz enzimski preparat EXV (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 56. Dinamika sadržaja rutina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem FX10 (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 57. Dinamika sadržaja rutina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem Qa23 (a) i konveksnost/konkavnost (b)

Drugi izvod (konveksnost ili konkavnost) nam govori da u postavljenim varijantama ogleda dolazi do desorpcije sadržaja rutina iz komine u vino u periodu od 3. do 14. dana. Nakon toga u većini slučajeva dolazi do uspostavljanja ravnoteže u sadržaju ovog jedinjenja između tečne i čvrste faze (Slika 53b-56b), izuzev kod varijante ogleda Qa23 gde je primećen nastavak desorpcije i nakon 14. dana (Slika 57b).

5.17.2. Sadržaj *trans*-resveratrola u uzorcima prevrele komine

Najviši sadržaj *trans*-resveratrola nađen je u komini koja je macerirala kraći vremenski period, tako da nije bilo dovoljno vremena da se viša količina ovog jedinjenja ekstrahuje (Slika 58a-62a).

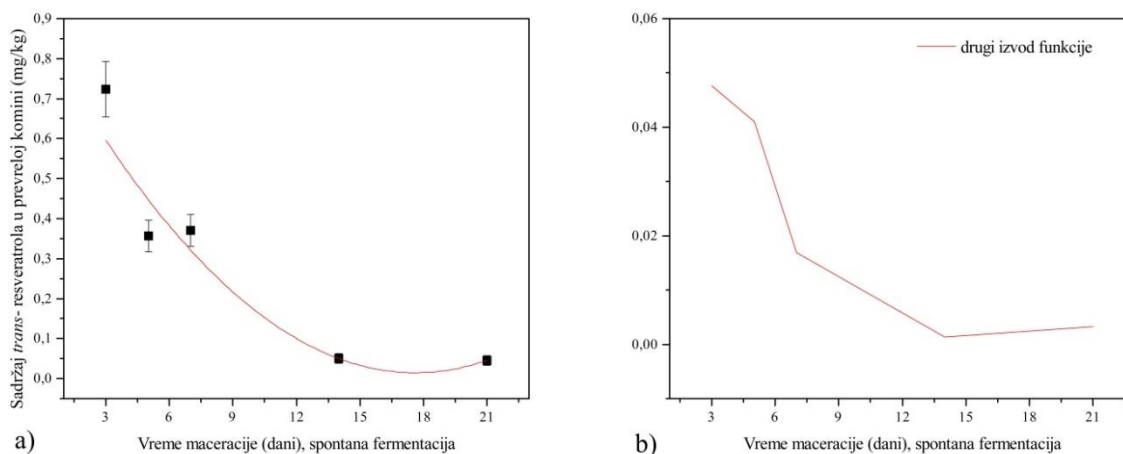
Nije ustanovljena statistički značajna razlika u sadržaju *trans*-resveratrola u komini koja je macerirala 3, 5, 7, 14 i 21 dan uz potapanje dva puta dnevno za različite varijante ogleda spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10 i Qa23). Dodatak enzimskih preparata (varijante ogleda BDX + CB i BDX + EXV₂₀₁₈) pri maceraciji kljuka nije imao statistički značajan uticaj na sadržaj *trans*-resveratrola zaostalog u komini posle maceracije. U istraživanju Meini et al. (2019), resveratrol nije detektovan u ekstraktima komine grožđa od sorte vinove loze Syrah, kako u kontroli tako ni u enzimski tretiranim uzorcima.

Komina koja je macerirala u periodima od 14 i 21 dan sadržala je statistički višu količinu *trans*-resveratrola u odnosu na kominu koja je odvojena nakon 3, 5 i 7 dana maceracije ($p < 0,05$).

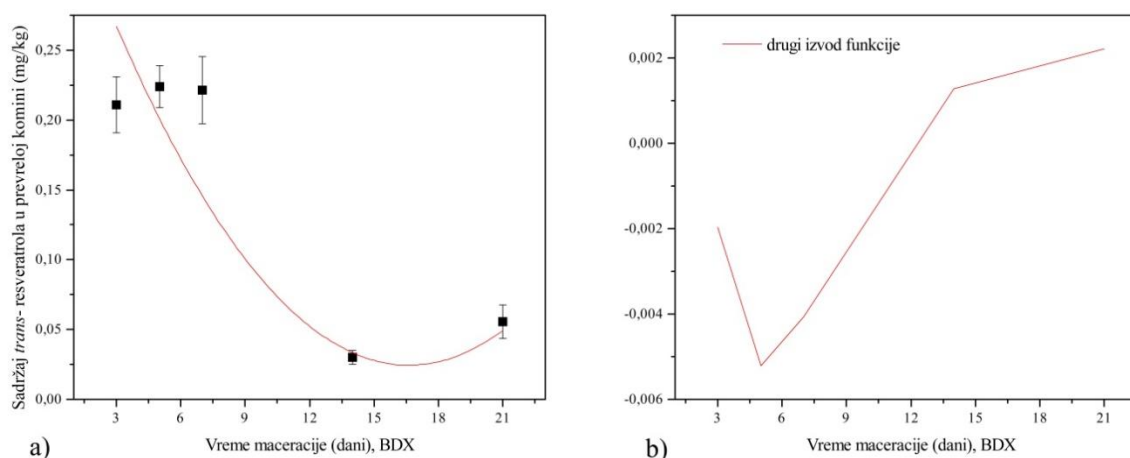
To znači da je vreme maceracije bitno uticalo na sadržaj ovog jedinjenja koje je zaostalo u prevreloj komini.

U radu Antonioli et al. (2015), izmereno je 36,0 μg *trans*-resveratrola po g liofilizovanog ekstrakta komine, dok je u našim uzorcima klasične vinifikacije uz potapanje komine (uz različite enzime i kvasce) taj sadržaj bio dosta niži (svega oko 1 $\mu\text{g/g}$). Rezultat je izražen na liofilizovanu kominu, a ne na ekstrakt komine kao što je slučaj u literaturi.

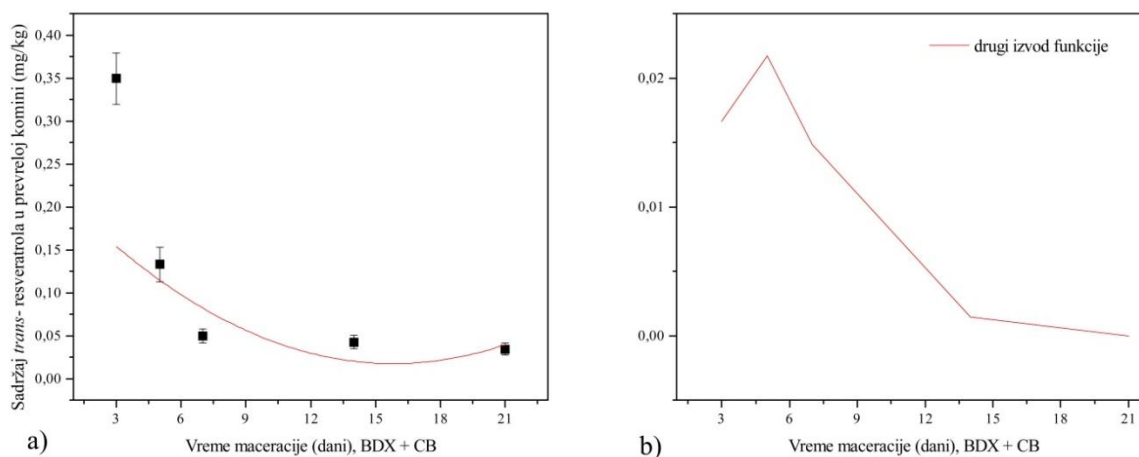
Primena različitih pritisaka presovanja komine prilikom odvajanja tečnog dela (samotok, 0,5, 1,0 i 1,5 bara) nije dala statistički značajne razlike u sadržaju *trans*-resveratrola zaostalog u prevreloj komini.



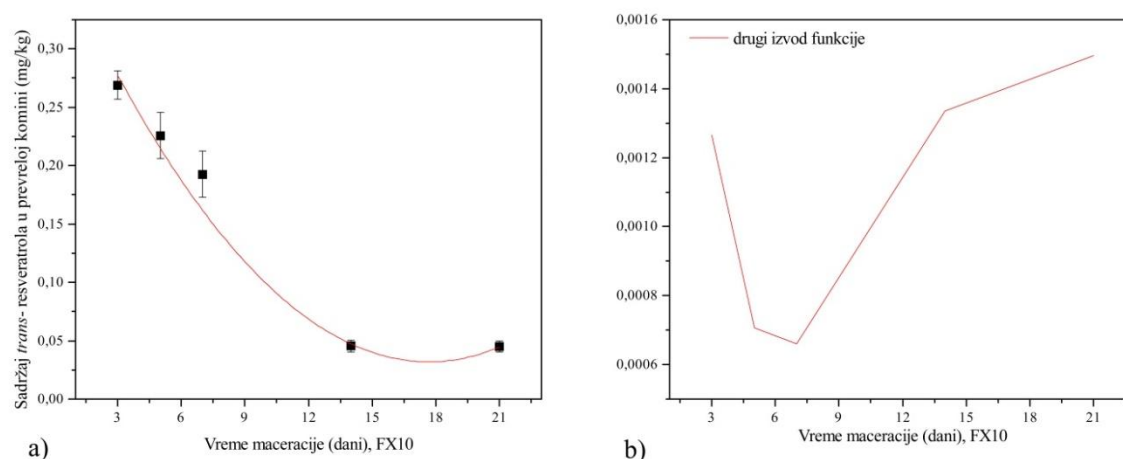
Slika 58. Dinamika sadržaja *trans*-resveratrola u prevreloj komini tokom maceracije i spontane fermentacije (a) i konveksnost/konkavnost (b)



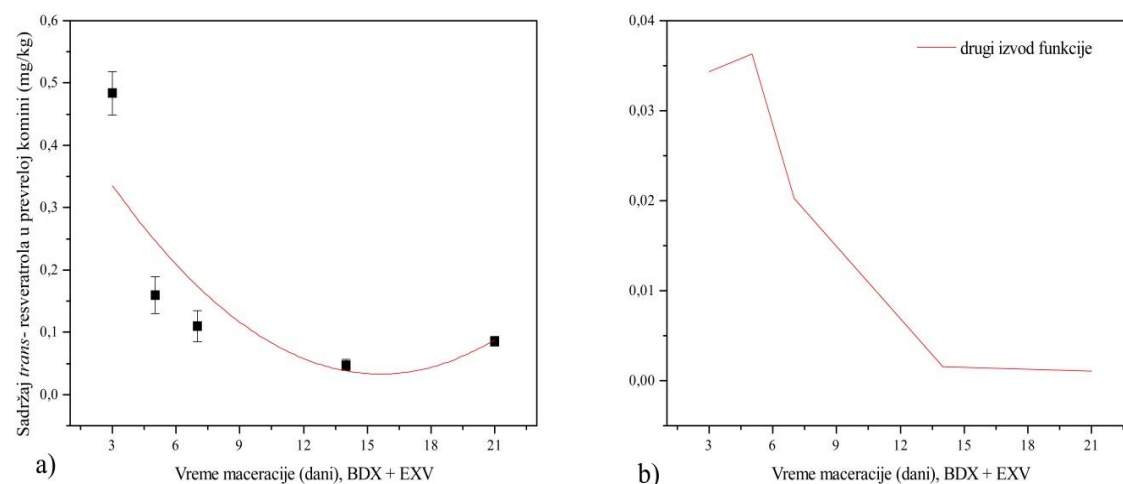
Slika 59. Dinamika sadržaja *trans*-resveratrola u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 60. Dinamika sadržaja *trans*-resveratrola u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX uz enzimski preparat CB (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 61. Dinamika sadržaja *trans*-resveratrola u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem FX10 (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 62. Dinamika sadržaja *trans*-resveratrola u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX uz enzimski preparat EXV (a) i konveksnost/konkavnost (b)

Slično dinamici rutina, primećena je desorpcija sadržaja *trans*-resveratrola od 3. dana maceracije pa do 14. dana za varijante oglada spontane fermentacije, BDX + CB, BDX + EXV. U slučaju FX10 i BDX varijanti oglada desorpcija *trans*-resveratrola trajala je nešto kraće. Postoji pretpostavka da je došlo do blage adsorpcije ovog jedinjenja na ćelije kvasca ili komine do 14. dana

maceracije. Nakon 14. dana za sve varijante ogleda važila je ravnoteža u sadržaju *trans*-resveratrola između tečne i čvrste faze (Slika 58b-62b).

5.17.3. Sadržaj katehina i epikatehina u uzorcima prevrele komine

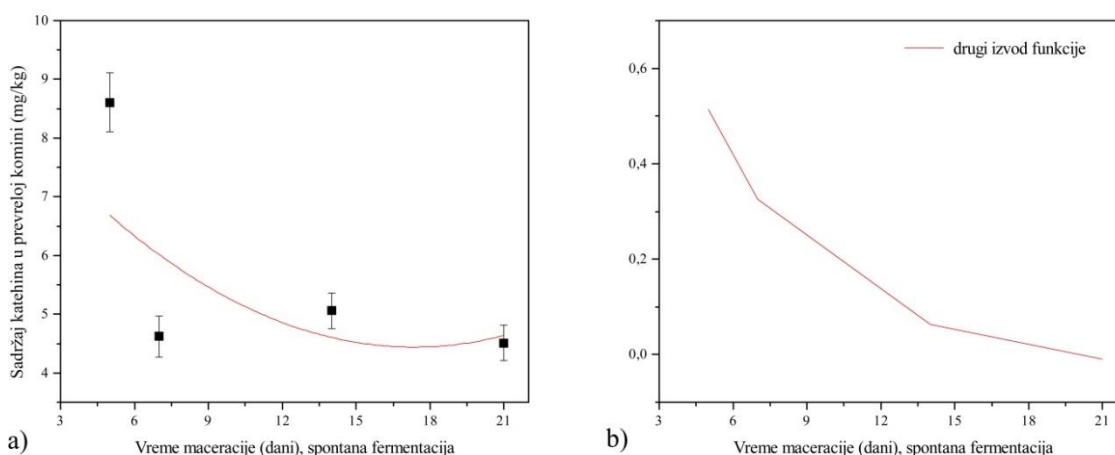
Poređenjem sadržaja katehina i epikatehina u komini dobijenoj spontanom i inokulisanom fermentacijom (BDX, FX10 i Qa23) nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Isti slučaj zabeležen je za kominu koja je macerirala uz dodatak enzimskih preparata (BDX + CB i BDX + EXV₂₀₁₈) u poređenju sa kominom koja je macerirala bez enzimskih preparata (BDX).

Upotreba enzimskih preparata CP, Car i EXV₂₀₁₆ nije imala značajnog uticaja na sadržaj katehina kao ni epikatehina zaostalog u prevreloj komini.

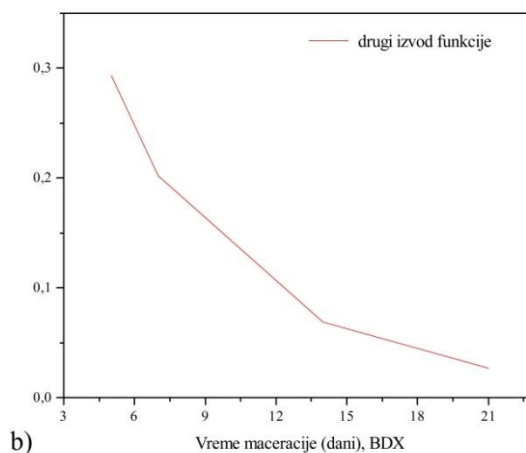
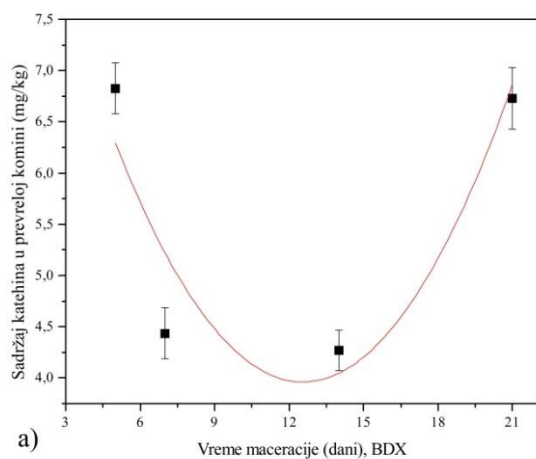
Kao i sa prva dva pomenuta jedinjenja, najviša količina katehina i epikatehina nađena je u komini koja je macerirala kraći vremenski period (Slika 63a-73a). Obzirom da je vrlo mala količina katehina ekstrahovana u vino zbog prirode ekstrakcije jedinjenja koja se nalaze u semenkama grožđa. Za njihovu ekstrakciju, kao što je već rečeno, potrebna je određena količina nastalog etanola što nije bio slučaj posle 3 ili 5 dana maceracije, tako da je viši sadržaj nađen u komini.

Uzimajući u obzir sve varijante ogleda klasične maceracije različitih perioda (3, 5, 7, 14 i 21 dan), utvrđeno je da samo između perioda od 5 dana i perioda maceracije od 7 dana postoji statistički značajna razlika kada je u pitanju sadržaj katehina kao i epikatehina u prevreloj komini. Pretpostavlja se da je upravo u tom periodu maceracije prelomni momenat veće ekstrakcije ovih jedinjenja, usled nastalog etanola u kljuku, što se odražava i na sadržaj ovog jedinjenja u komini.

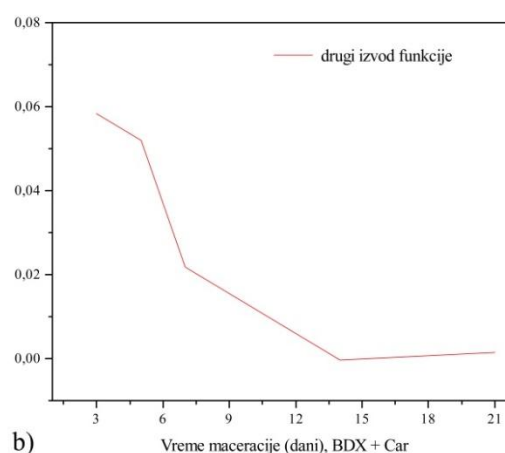
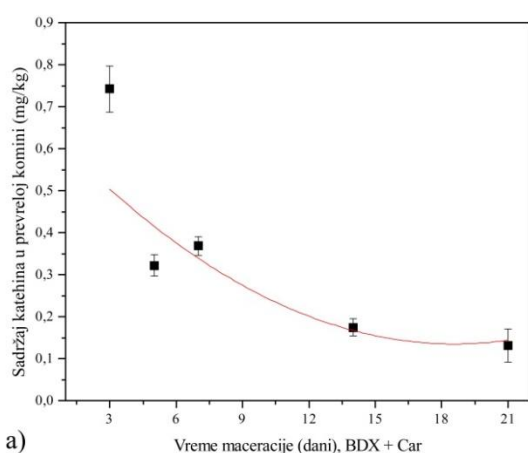
Katehin i epikatehin su nađeni kao najdominantnija jedinjenja u komini grožđa Cabernet sauvignon što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (de la Cerda-Carrasco et al., 2015; Melo et al., 2015). Sadržaj katehina u svim uzorcima je bio viši u odnosu na sadržaj epikatehina što je saglasno sa de la Cerda-Carrasco et al. (2015) i Antonioli et al. (2015). Autori Cheng et al. (2012) navode da je sadržaj katehina u ekstraktu komine od grožđa vinove loze sorte Pinot noir koja je macerirala 7 dana, bio dvostruko viši od sadržaja epikatehina. Dosta niži sadržaj ova dva jedinjenja je izmeren kod komine od grožđa vinove loze sorte Pinot meunier iako nije bila izložena maceraciji, nego je odvojena odmah posle muljanja (Cheng et al., 2012).



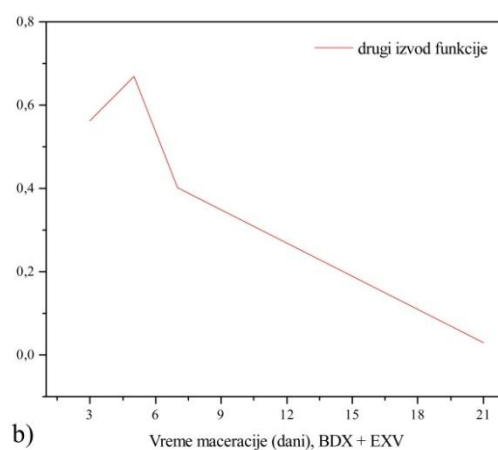
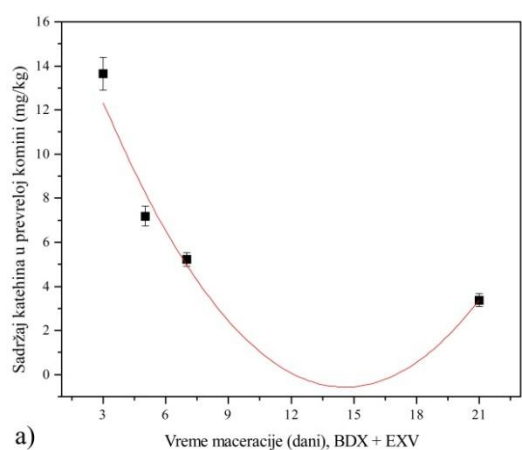
Slika 63. Dinamika sadržaja katehina u prevreloj komini tokom maceracije i spontane fermentacije (a) i konveksnost/konkavnost (b)



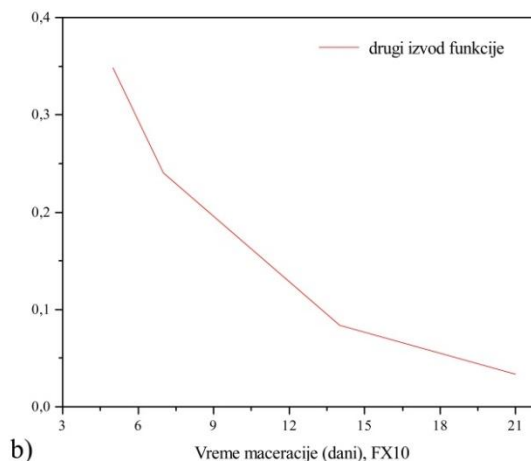
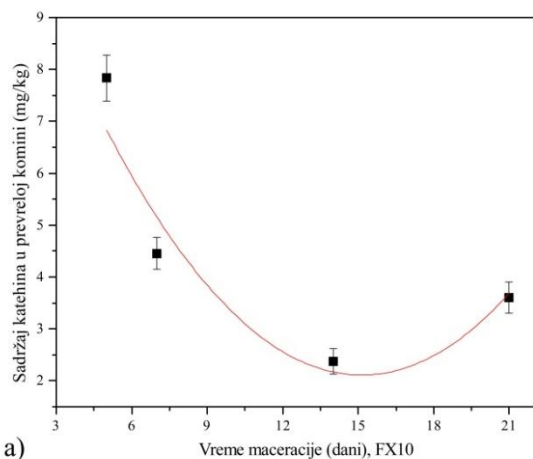
Slika 64. Dinamika sadržaja katehina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX (a) i konveksnost/konkavnost (b)



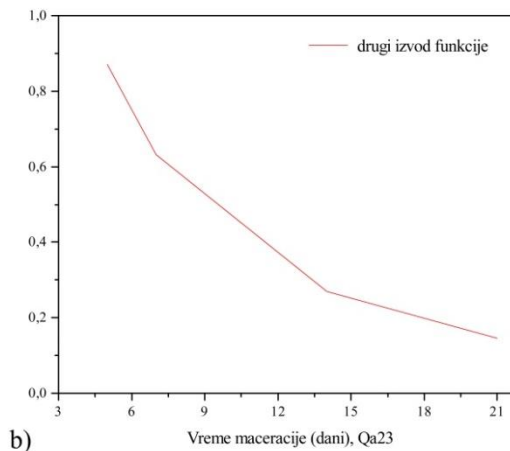
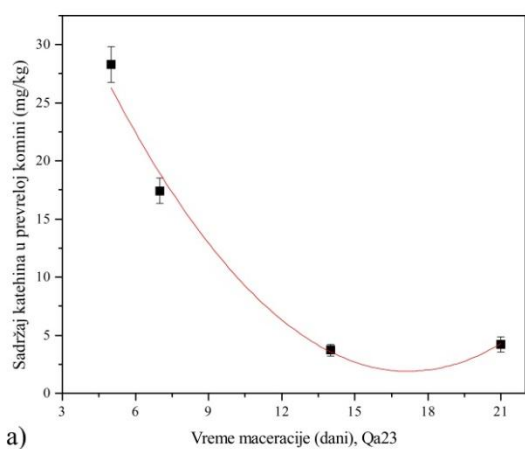
Slika 65. Dinamika sadržaja katehina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX uz enzimski preparat Car (a) i konveksnost/konkavnost (b)



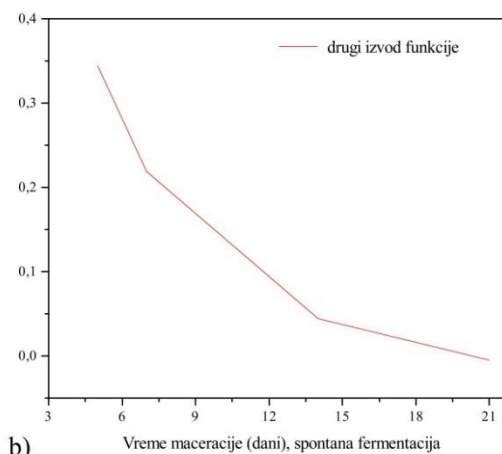
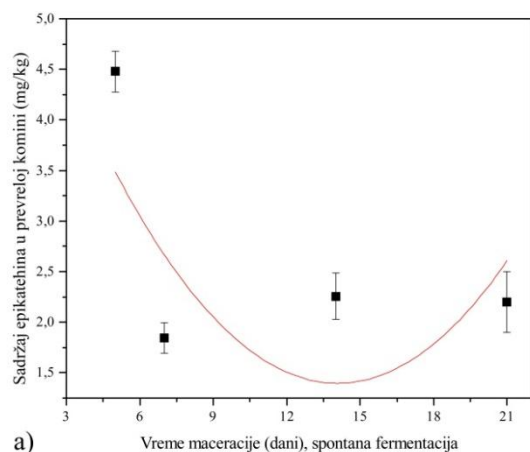
Slika 66. Dinamika sadržaja katehina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX uz enzimski preparat EXV (a) i konveksnost/konkavnost (b)



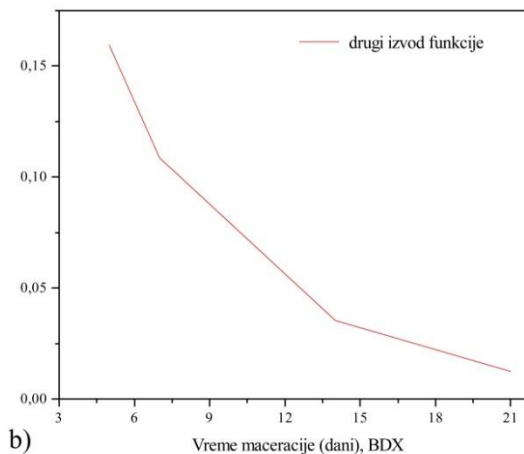
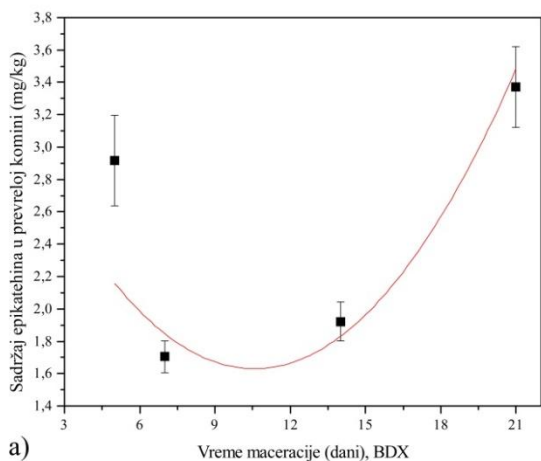
Slika 67. Dinamika sadržaja katehina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem FX10 (a) i konveksnost/konkavnost (b)



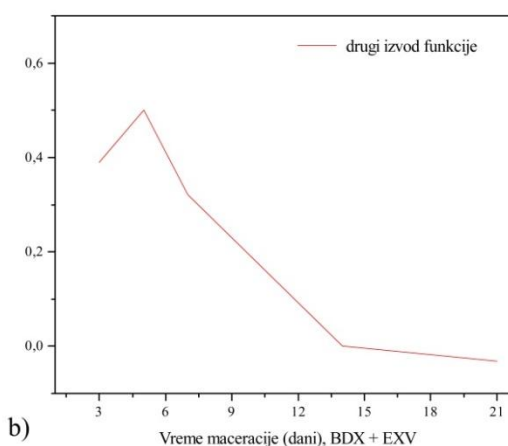
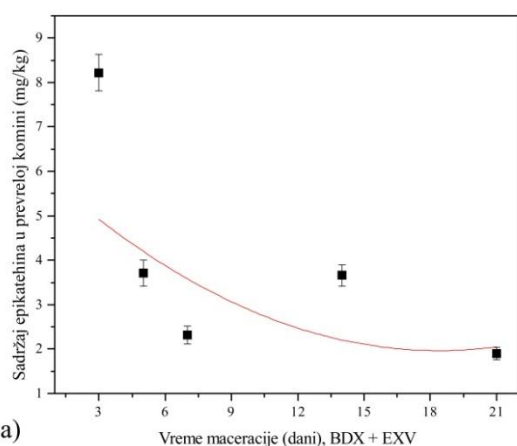
Slika 68. Dinamika sadržaja katehina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem Qa23 (a) i konveksnost/konkavnost (b)



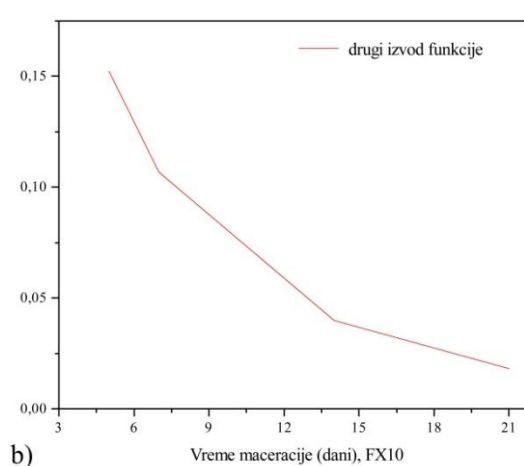
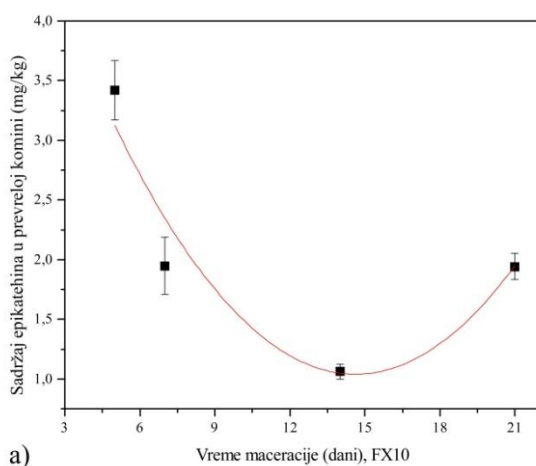
Slika 69. Dinamika sadržaja epikatehina u prevreloj komini tokom maceracije i spontane fermentacije (a) i konveksnost/konkavnost (b)



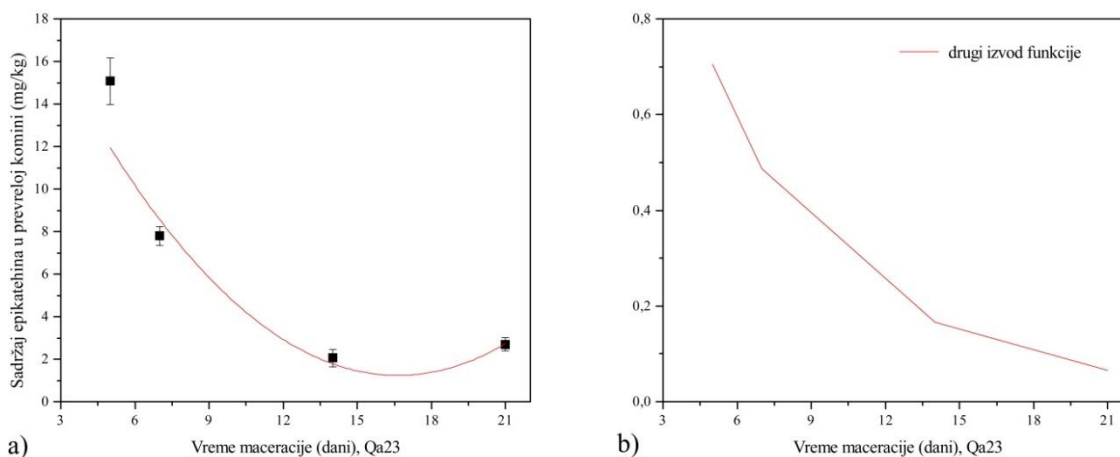
Slika 70. Dinamika sadržaja epikatehina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 71. Dinamika sadržaja epikatehina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX uz enzimski preparat EXV (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 72. Dinamika sadržaja epikatehina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem FX10 (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 73. Dinamika sadržaja epikatehina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem Qa23 (a) i konveksnost/konkavnost (b)

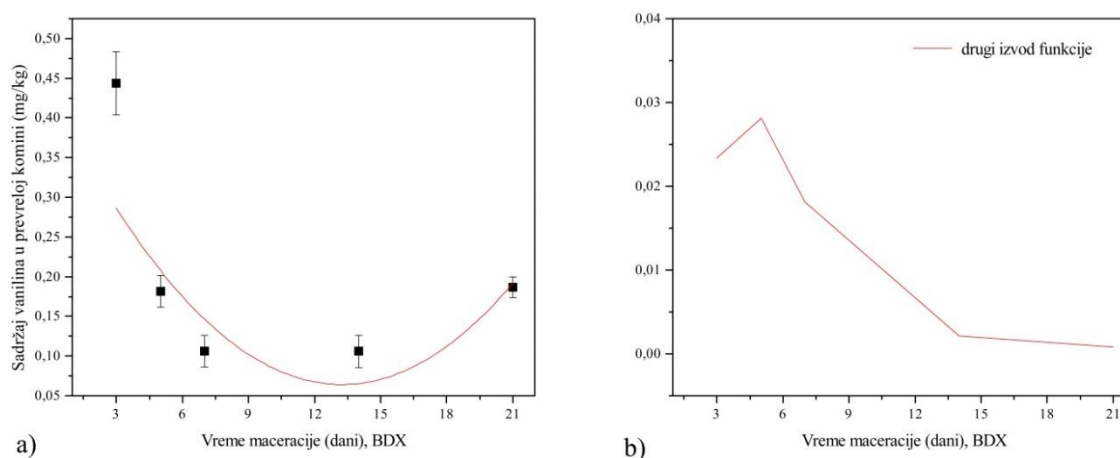
Kao što je prikazano na grafičarima (Slika 63b-73b) kod svih varijanti ogleda sadržaj katehina i epikatehina je desorbovan od početka maceracije pa do 14. dana nakon čega je došlo do uspostavljanja ravnoteže ili je nastavljena blaga desorpcija. Samim tim tokom celog perioda maceracije dešavala se ekstrakcija ovih jedinjenja iz komine u vino, u čemu je veliku ulogu, pretpostavlja se, imao nastali etanol tokom fermentacije.

5.17.4. Sadržaj vanilina u uzorcima prevrele komine

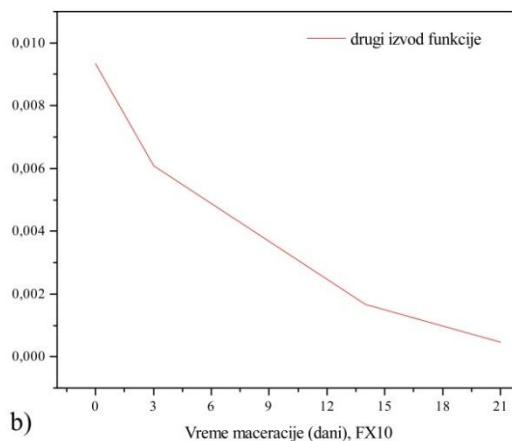
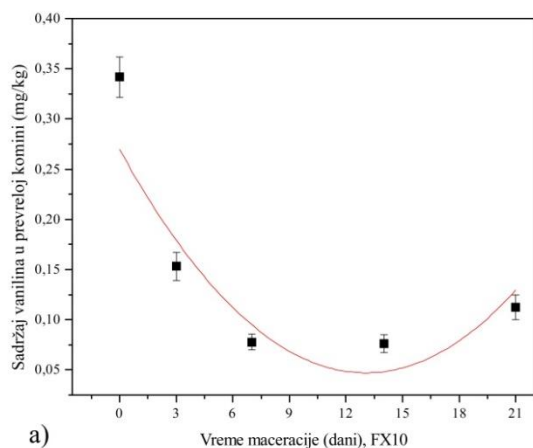
Analizirajući količinu vanilina zaostalog u prevreloj komini nakon klasične vinifikacije uz spontanu i inokulisanu fermentaciju, kao i kombinacijom kvasca BDX sa enzimskim preparatima CB i EXV₂₀₁₈ uz različito vreme maceracije, utvrđeno je da je samo primena selekcionisanog kvasca Qa23 imala značajan uticaj na sadržaj ovog jedinjenja u prevreloj komini u odnosu na spontanu fermentaciju ($p < 0,05$).

Sadržaj vanilina kao i ostalih jedinjenja čija je dinamika ponašanja u komini praćena tokom 21 dan maceracije, eksponencijalno je opadala od 3. do 21. dana maceracije. To bi znaćilo da kako je vreme odmicalo sve je manja koncentracija vanilina zaostajala u prevreloj komini (Slika 74a-78a).

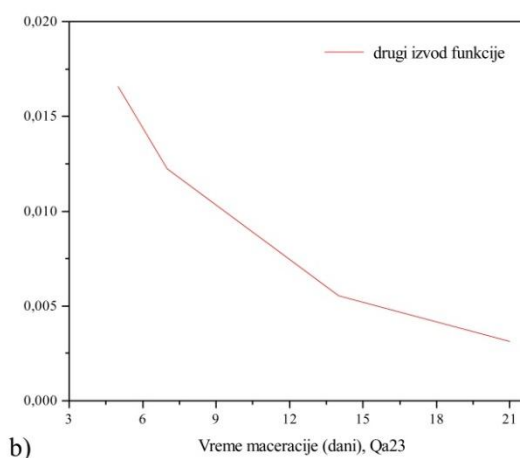
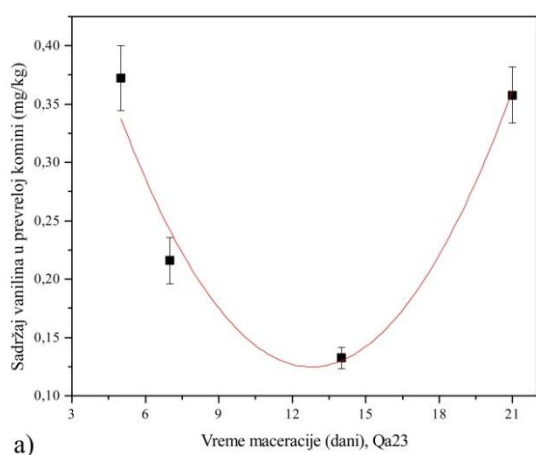
Koncentracija vanilina se menjala tokom 21 dan maceracije ali statistiĉki znaćajna razlika je naćena izmeću uzoraka komine koji su odvojeni nakon perioda maceracije od 3 dana i perioda maceracije od 21 dan ($p \leq 0,05$).



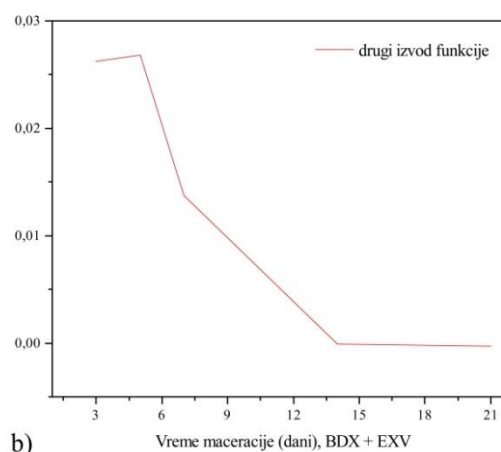
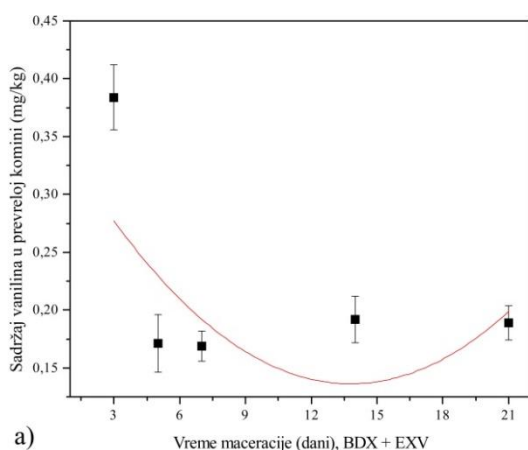
Slika 74. Dinamika sadržaja vanilina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX (a) i konveksnost/konkavnost (b)



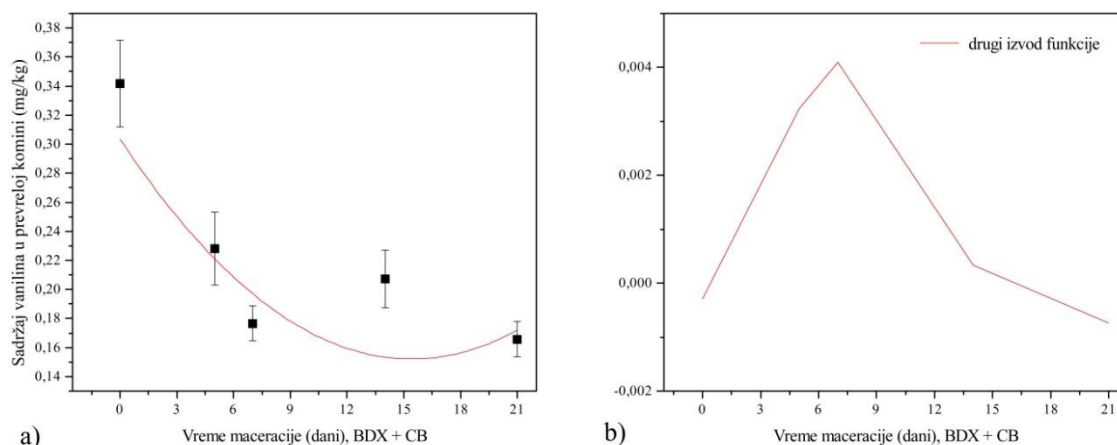
Slika 75. Dinamika sadržaja vanilina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem FX10 (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 76. Dinamika sadržaja vanilina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem Qa23 (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 77. Dinamika sadržaja vanilina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX uz enzimski preparat EXV (a) i konveksnost/konkavnost (b)

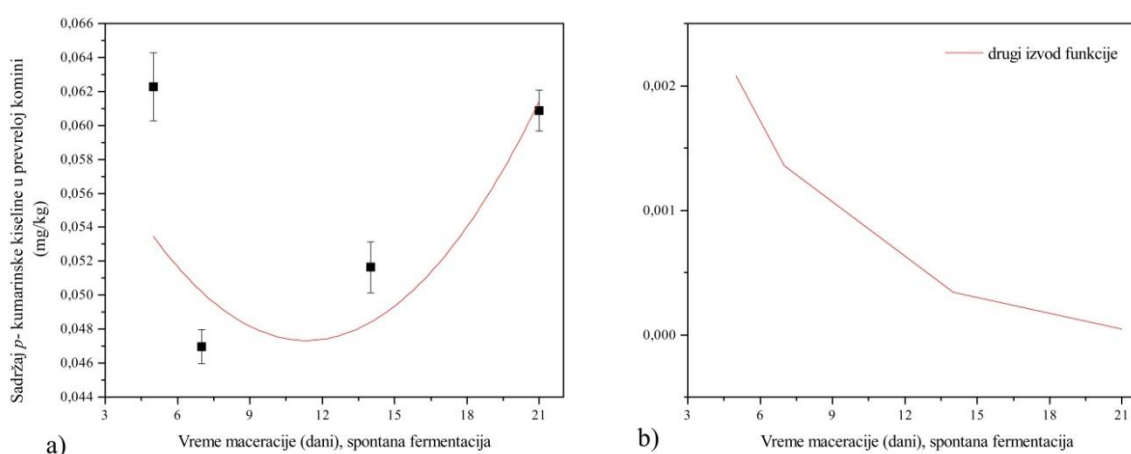


Slika 78. Dinamika sadržaja vanilina u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX uz enzimski preparat CB (a) i konveksnost/konkavnost (b)

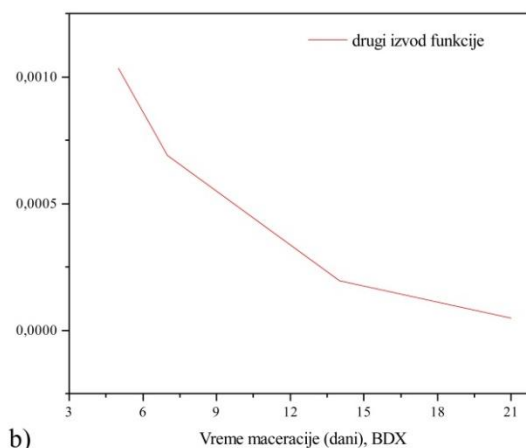
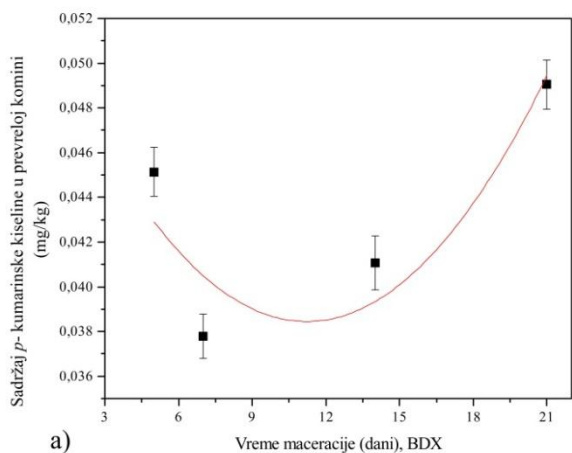
Sadržaj vanilina se kod varijanti oglada BDX i BDX + EXV kretao prilično identično što nam pokazuje drugi izvod funkcije dinamike ekstrakcije ovog jedinjenja tokom perioda maceracije (Slika 74b i Slika 77b). Posle desorpcije do 14. dana maceracije sledila je pravilna ravnoteža između koncentracije ovog jedinjenja u komini i u vinu tj. došlo je do zasićenja. Kod varijante oglada BDX + CB desorpcija je nastupila od 7. dana pa sve do 14. dana nakon čega je usporena sve do kraja maceracije (Slika 78b). Uz primenu FX10 i Qa23 selekcionisanih kvasaca, tokom celog perioda maceracije ustanovljena je desorpcija ovog jedinjenja iz komine u vino (Slika 75 i Slika 76).

5.17.5. Sadržaj *p*-kumarinske kiseline u uzorcima prevrele komine

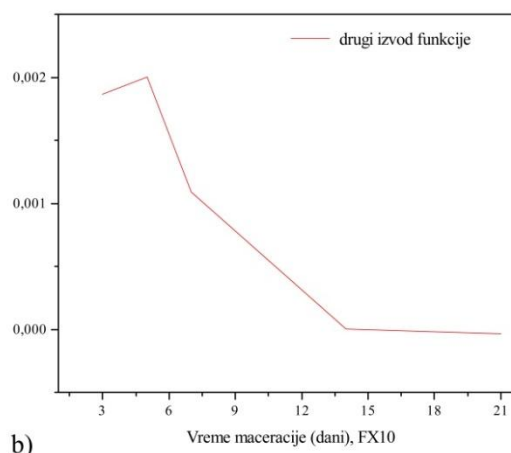
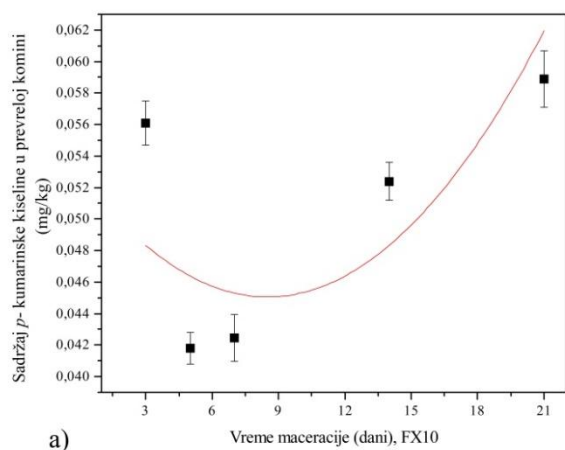
Poređenjem sadržaja *p*-kumarinske kiseline u komini dobijenoj spontanom i inokulisanom fermentacijom (BDX, FX10 i Qa23) nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Isto je utvrđeno za kominu koja je macerirala uz dodatak enzimskih preparata (BDX + CB i BDX + EXV₂₀₁₈) u poređenju sa kominom koja je macerirala bez enzimskih preparata (BDX). Dinamika sadržaja *p*-kumarinske kiseline je bila približno ujednačena za sve prikazane varijante oglada (Slika 79a-83a). Za sve varijante oglada, uočena je statistički značajna razlika između komine koja je odvojena posle 7 dana maceracije u poređenju sa uzorcima prevrele komine od 3, 5 i 21 dan ($p < 0,05$).



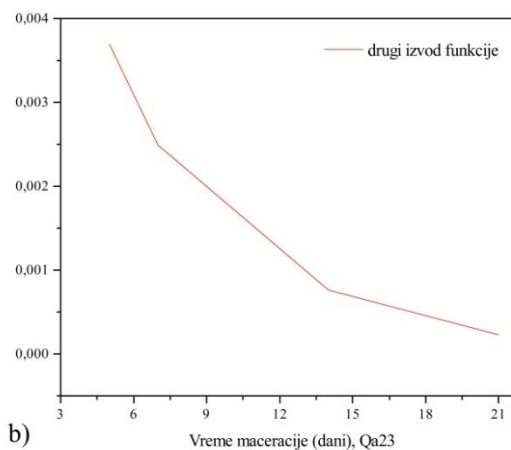
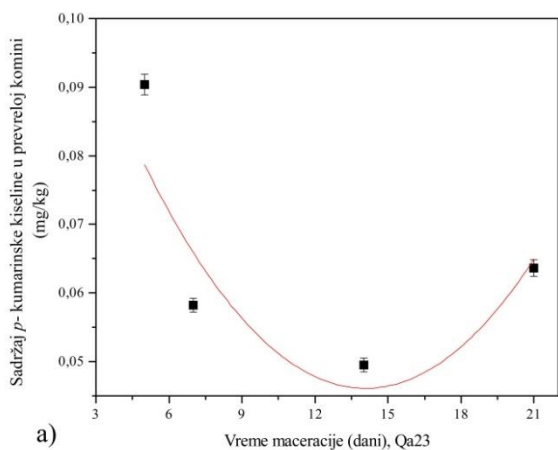
Slika 79. Dinamika sadržaja *p*-kumarinske kiseline u prevreloj komini tokom maceracije i spontane fermentacije (a) i konveksnost/konkavnost (b)



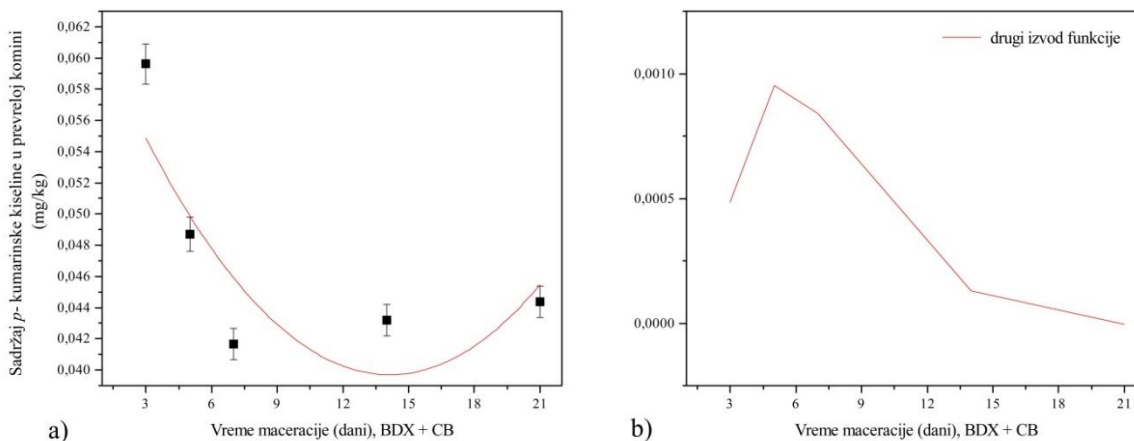
Slika 80. Dinamika sadržaja *p*- kumarinske kiseline u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 81. Dinamika sadržaja *p*-kumarinske kiseline u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem FX10 (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 82. Dinamika sadržaja *p*- kumarinske kiseline u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem Qa23 (a) i konveksnost/konkavnost (b)



Slika 83. Dinamika sadržaja *p*-kumarinske kiseline u prevreloj komini tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX uz enzimski preparat CB (a) i konveksnost/konkavnost (b)

Za dinamiku *p*-kumarinske kiseline može se reći da su dominantne bile reakcije desorpcije kao i kod prethodnih jedinjenja. Za sve primenjene varijante ogleda intezivna desorpcija *p*-kumarinske kiseline iz komine u vino dešavala se do 14. dana maceracije. Posle toga je ili nastavljena slabijim intezitetom ili je došlo do zasićenja i uspostavljanja ravnoteže (Slika 79b-83b).

Pored ovih navedenih fenolnih jedinjenja, ostala jedinjenja identifikovana u komini su bila siringinska, galna, kafeinska, ferulinska, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzoeva, elaginska, vanilinska kiselina kao i kvercetin, naringenin i kemferol. Naši uzorci komine zaostale posle klasičnog načina vinifikacije, sadržali su znatno višu količinu siringinske kiseline u odnosu na galnu kiselinu. Komina grožđa Cabernet sauvignon, prema Ribeiro et al. (2015) od hidroksicimetnih kiselina sadržala je samo kafeinsku kiselinu, dok je u našim uzorcima komine iste sorte zastupljena bila i *p*-kumarinska i ferulinska kiselina. Naši rezultati su pokazali da je siringinska kiselina bila zastupljenija u višoj količini u odnosu na galnu i vanilinsku, što je u skladu sa rezultatima Ribeiro et al. (2015) dobijenih u komini iste sorte vinove loze. Ekstrakt komine grožđa vinove loze sorte Pinot meunier koja je odvojena odmah nakon muljanja sadržao je nižu količinu galne kiseline u odnosu na kominu grožđa vinove loze sorte Pinot noir. Pomenuta sorta (Pinot noir) bila je izložena maceraciji u trajanju od 7 dana gde je došlo do ekstrakcije određenog dela galne kiseline (Cheng et al., 2012). Prema Antonioli et al. (2015), najdominantnija jedinjenja u ekstraktima komine grožđa vinove loze sorte Malbec su bila katehin, epikatehin i siringinska kiselina u koncentracijama od 1731 do 3387 $\mu\text{g/g}$ suvog ekstrakta komine, kao i galna kiselina, kvercetin i njegov glukozidni oblik. Dobijeni rezultati za identifikovana jedinjenja i njihov sadržaj u ekstraktima komine grožđa Malbec, pokazali su sličnost sa vinom od iste sorte, a razlika je uočena u slučaju siringinske i galne kiseline. U ekstraktima komine suprotno vinu, siringinska kiselina je bila dominantnija u odnosu na galnu kiselinu, a slično ponašanje nađeno je i za kvercetin i njegov glukozid (Antionioli et al., 2015).

Najviše vrednosti siringinske kiseline ekstrahovane su iz komine koja je macerirala u kljuku zasejanim Qa23 selekcionisanim vinski kvascem i kretale su se od 4,83 do 10,24 mg/kg prevrele komine (Tabela 38) u zavisnosti od vremena maceracije. Jedino za te uzorke je utvrđena značajna razlika ($p < 0,05$), u odnosu na sadržaj istog jedinjenja u komini spontane fermentacije (Tabela 38). Vreme maceracije je značajno uticalo na sadržaj siringinske kiseline u prevreloj komini, a jedino gde nije nađena značajna razlika bila je komina od petog i komina od sedmog dana.

Tabela 38. Sadržaj siringinske kiseline u uzorcima prevrele komine

Siringinska kiselina	3. dan (mg/kg)	5. dan (mg/kg)	7. dan (mg/kg)	14. dan (mg/kg)	21. dan (mg/kg)
Spontana	3,14	3,90	4,47	7,40	9,12
BDX	3,28	4,77	6,03	6,63	8,53
FX10	3,24	4,62	5,25	6,16	9,26
Qa23	4,83	6,83	6,56	10,45	10,24
BDX + EXV ₂₀₁₈	3,54	4,54	3,57	7,88	9,34
BDX + CB	4,02	4,68	6,70	6,86	8,75

Za razliku od siringinske kiseline, za galnu kiselinu nije ustanovljena značajna razlika među ogleđima (Tabela 39). Komina spontane fermentacije se nije značajno razlikovala od komine inokulisane fermentacije, niti je dodatak enzimskih preparata tokom maceracije (CB i EXV) značajno menjao sadržaj galne kiseline koji je zaostao u komini nakon odvajanja vina (Tabela 39).

Tabela 39. Sadržaj galne kiseline u uzorcima prevrele komine

Galna kiselina	3. dan (mg/kg)	5. dan (mg/kg)	7. dan (mg/kg)	14. dan (mg/kg)	21. dan (mg/kg)
Spontana	0,49	0,69	0,67	0,84	0,98
BDX	0,55	0,62	0,73	0,74	0,82
FX10	0,58	0,57	0,59	0,68	0,72
Qa23	0,73	0,99	0,88	0,75	0,66
BDX + EXV ₂₀₁₈	0,66	0,74	0,49	1,09	0,82
BDX + CB	0,72	0,65	0,72	0,74	0,75

Na ekstrakciju galne, siringinske i *p*-kumarinske kiseline, dokazano je da utiče dodatak enzimskih preparata tanaze i celulaze (Meini et al., 2019). Tanaze degradiraju hidrolizabilne tanine i oslobađa se galna i siringinska kiselina, dok celulaze hidrolizuju celulozna vlakna i oslobađaju zarobljena fenolna jedinjenja kao što je *p*-kumarinska kiselina. Količine ovih fenolnih kiselina dobijenih iz ekstrakta komine grožđa vinove loze sorte Syrah, bile su više u odnosu na naše rezultate. Veći uticaj od enzima na ekstrakciju galne kiseline dalo je vreme u kojem je komina bila u kontaktu sa čvrstom fazom. Tako utvrđena statistički značajna razlika u slučaju koncentracije galne kiseline u komini maceracije od 3 dana i u komini maceracije u periodu od 14 dana ($p < 0,05$).

Sadržaj kvercetina je bio najdominantniji od svih analiziranih flavonola (Tabela 40). Njegova koncentracija u uzorcima komine dobijene nakon klasične vinifikacije uz primenu spontane i inokulisane fermentacije i različitih enzimskih preparata kretala se od 1,70 do 12,17 mg/kg prevrele komine (Tabela 40). Nije nađena statistički značajna razlika u njegovom sadržaju između spontane i inokulisane kao i između BDX varijante ogleđa i BDX + CB i BDX + EXV₂₀₁₈ (Tabela 40). Vreme maceracije je bitno uticalo na sadržaj kvercetina koji je zaostao u komini. Značajna razlika je nađena između komine odvojene posle 3 dana i komine koja je macerirala 7, 14 i 21 dan, kao i komine koja je macerirala 5 dana i dužim periodima maceracije od 14 i 21 dan (Tabela 40). Koncentracija kvercetina bila je viša u uzorcima komine koji su duže vreme macerirali u odnosu na uzorke koji su odvojeni posle 3 ili 5 dana. To je u skladu sa istraživanjem Cheng et al. (2012) gde je sadržaj kvercetina bio je viši u komini grožđa vinove loze sorte Pinot noir koja je

macerirala 7 dana u poređenju sa sortom Pinot meunier koja nije bila izložena maceraciji nego je odvojena odmah nakon muljanja.

Tabela 40. Sadržaj kvercetina u uzorcima prevrele komine

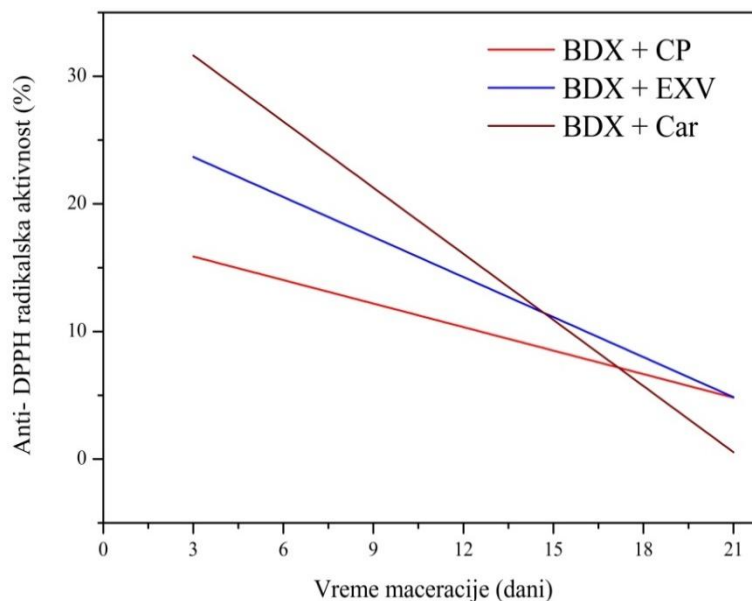
Kvercetin	3. dan (mg/kg)	5. dan (mg/kg)	7. dan (mg/kg)	14. dan (mg/kg)	21. dan (mg/kg)
Spontana	1,70	6,53	9,16	9,99	10,40
BDX	2,62	7,41	7,07	10,46	10,96
FX10	3,01	3,54	9,64	10,23	12,17
Qa23	3,83	10,31	11,30	10,59	10,99
BDX + EXV₂₀₁₈	1,80	8,92	6,00	11,27	11,09
BDX + CB	2,97	6,97	10,44	7,99	9,02

5.18. Antioksidativni kapacitet uzoraka vina

5.18.1. Anti-DPPH radikalska aktivnost

5.18.1.1. Anti-DPPH radikalska aktivnost vina iz 2016. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX uz enzimske preparate EXV, CP i Car

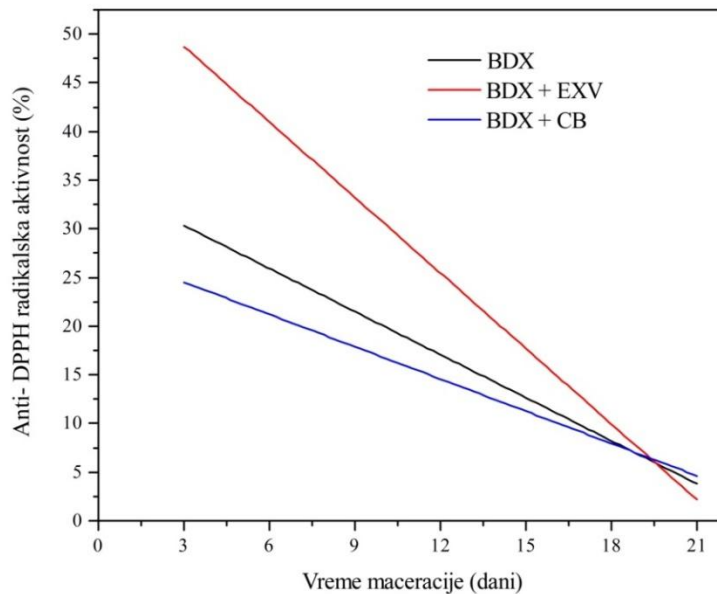
U eksperimentu kvasac + enzimski preparati (CP, EXV i Car), najniža anti-DPPH radikalska aktivnost, dobijena je za uzorak koji je macerirao 3 dana uz enzim Car (40,66%). Produženom maceracijom do 21. dan uz isti enzimski preparat dobijeno je vino sa najvišom anti-DPPH radikalskom aktivnošću i to 5,8% (Slika 84). Ukoliko je dobijena anti-DPPH radikalska aktivnost niža, ti uzorci ispoljavaju bolju antiradikalsku aktivnost. Vina koja su macerirala uz primenu BDX + EXV i BDX + CP, maceracija od 21 dan takođe je dala najbolje rezultate u pogledu anti-DPPH radikalske aktivnosti (Slika 84). Nađena je značajna razlika u antiradikalnoj aktivnosti između vina dobijenih u kombinaciji kvasca sa različitim enzimskim preparatima (CP, EXV i Car) ($p < 0,01$). Poredeći antiradikalsku aktivnost vina različitih perioda maceracije, nađena je statistički značajna razlika između vina koja su macerirala 14 i 21 dan ($p < 0,05$) za pomenute varijante oglada. Slično tome, prema Damijanić et al. (2012), antioksidativni kapacitet vina Teran, izmeren DPPH testom, je značajno bio veći 17. i 21. dan u poređenju sa 7. i 12. danom maceracije. Ovo potvrđuje viši sadržaj fenolnih jedinjenja u vinima sa dužom maceracijom, a samim tim i boljim antioksidativnim svojstvima (Villaño et al., 2006; Damijanić et al., 2012).



Slika 84. Anti-DPPH radikalska aktivnost vina fermentacije kvascem BDX uz CP, EXV i Car enzimske preparate

5.18.1.2. Anti-DPPH radikalska aktivnost vina iz 2018. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX i kvascem BDX i enzimskim preparatima EXV i CB

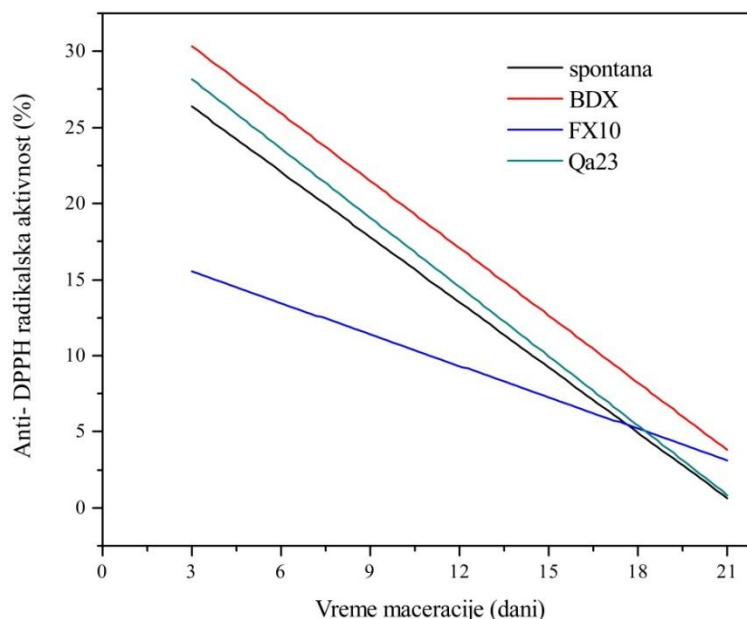
Nije ustanovljena statistički značajna razlika u antiradikalskoj aktivnosti između vina dobijenih korišćenjem selekcionisanog kvasca BDX bez dodatog enzimskog preparata i vina dobijenih uz dodatak enzimskih preparata EXV i CB ($p > 0,05$). Ipak, u svim prikazanim varijantama ogleda duži period maceracije dao je vina sa boljom antioksidativnošću (Slika 85). Nasuprot tome, prema Generalić Mekinić et al. (2019), veći % inhibicije DPPH radikala nađen je u vinima proizvedenim uz dodatak enzimskog preparata što znači da su ta vina imala bolji antioksidativni kapacitet u odnosu na vino bez dodatog enzima.



Slika 85. Poređenje anti-DPPH radikalske aktivnosti vina fermentacije kvascem BDX i kvascem BDX uz enzimске preparate EXV i CB

5.18.1.3. Anti-DPPH radikalska aktivnost vina spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10, Qa23)

Ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika u anti-DPPH radikalskoj aktivnosti između uzoraka vina spontane i inokulisane fermentacije ($p > 0,05$). Za razliku od vrste primenjenog kvasca, vreme maceracije je imalo uticaj na antiradikalsku aktivnost vina. Nadjena je statistički značajna razlika između vina dužih perioda maceracije (5, 7, 14 i 21 dan) i vina čija je maceracija trajala 3 dana (Slika 86).



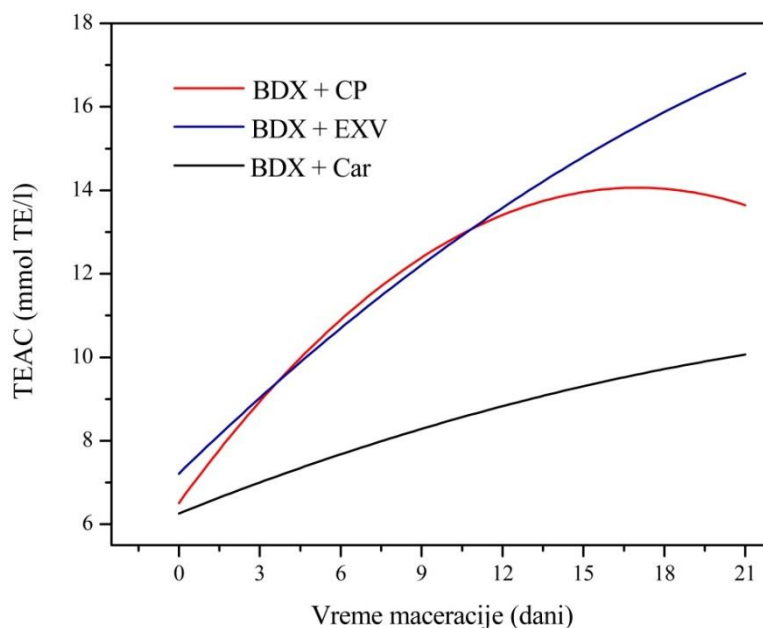
Slika 86. Anti-DPPH radikalska aktivnost vina spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10 i Qa23)

5.18.2. Test TEAC

5.18.2.1. Antioksidativni kapacitet vina iz 2016. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX uz enzimske preparate EXV, CP i Car

Od varijanti ogleda kvasac + enzimski preparati (CP, EXV i Car), najbolje se pokazala kombinacija BDX + EXV, gde je najveći antioksidativni kapacitet zabeležen 21. dana maceracije i to 16,80 mmol TE/l (Slika 87). Primenjen je T-test u cilju ispitivanja uticaja dodatka enzimskih preparata na antioksidativne karakteristike vina. Ustanovljena je razlika u antioksidativnom kapacitetu usled primene tri različita enzimska preparata ($p < 0,01$), što je u skladu sa Kocabey et al. (2016). Vina Cabernet sauvignon i Tempranillo su pokazala sličan trend vrednosti antioksidativnog kapaciteta tokom maceracije, merenog testom TEAC. Kod vina Cabernet sauvignon izmerena je viša vrednost ukupnih fenolnih jedinjenja, kao i antioksidativna svojstva nego kod druge ispitivane sorte (Villaño et al., 2006).

Što se tiče uticaja dužine maceracije na antioksidativni kapacitet, vina koja su macerirala 5, 14 i 21 dan, značajno su se razlikovala od rezultata testa TEAC za kontrolni uzorak vina (nulti dan) uz sva tri enzimska preparata (EXV, CP i Car). U literaturi je nađeno da se vino Teran od 3 dana maceracije značajno razlikuje od vina dužih perioda maceracije u pogledu antioksidativnih svojstava merenih testom TEAC, pri čemu nije bilo dodatka enzimskih preparata (Damijanić et al., 2012).

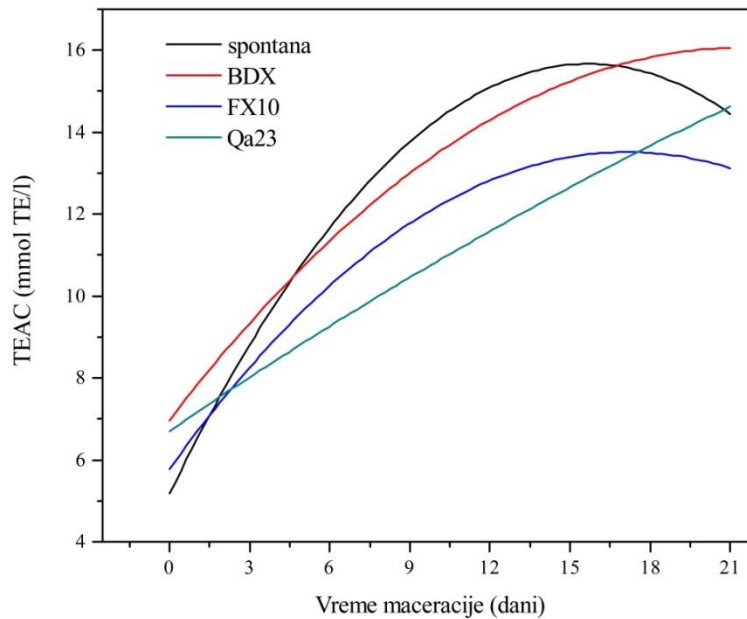


Slika 87. Antioksidativni kapacitet vina fermentacije kvascem BDX uz enzimske preparate CP, EXV i Car

Dobijeni rezultati se poklapaju sa podacima iz literature, za hrvatsku sortu vinove loze Teran čija je maceracija takođe trajala 21 dan (Damijanić et al., 2012). Prema Villaño et al. (2006), vrednost za antioksidativnost merenu testom TEAC, preko 11 mmol TE/l je smatrana visokom, što je u skladu sa našim rezultatima. Istraživanje Lingua et al. (2016) pokazalo je slične vrednosti TEAC (12,8 mmol/l) posle alkoholne fermentacije za Cabernet sauvignon vina iz Argentine. Autori Maletić et al. (2009) su konstatovali da je antioksidativni kapacitet vina uveliko uslovljen sortom i dobili 18,1 mmol TE/l za sortu Babić i 39,2 TE/l za sortu Plavac mali. Tokom 9 dana maceracije dve portugalske sorte vinove loze Tinta roriz i Touriga nacional izmeren je niži antioksidativni kapacitet u odnosu na naše uzorke ali je dinamika porasta bila ista (Jordão et al., 2011).

5.18.2.2. Antioksidativni kapacitet vina spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10, Qa23)

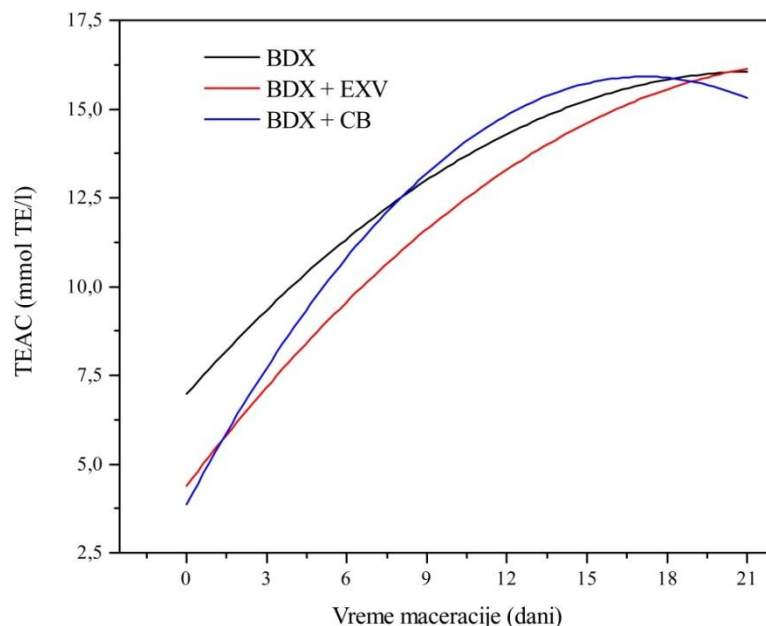
Određivanjem antioksidativnog kapaciteta testom TEAC vina dobijenih spontanom fermentacijom i vina sa dodatkom kultura selekcionisanih kvasaca BDX, FX10 i Qa23, ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika na nivou značajnosti 0,05. Kod eksperimenata sa kvascima i kombinacijom kvasaca i enzima u 2018. godini, najveći antioksidativni kapacitet dobijen je u vinu koje je fermentisalo kvascem BDX (16,06 mmol TE/l) (Slika 88) i u kombinaciji BDX + EXV (16,15 mmol TE/l) posle 21 dana maceracije (Slika 89). Tokom spontane fermentacije, najveću antioksidativnu aktivnost pokazalo je vino posle 15 dana maceracije i to 15,7 mmol TE/l (Slika 88). Ovakvu dinamiku porasta antioksidativnog kapaciteta vina, merenog testom TEAC potvrdili su Muñoz-Bernal et al. (2020), koji su uradili maceraciju iste sorte u periodu od 16 dana. Prema njihovim rezultatima najveća antioksidativna svojstva pokazalo je vino posle 8 dana maceracije, što se poklopilo i sa najvećom koncentracijom fenolnih jedinjenja. Prema Plavša et al. (2012), koji su takođe koristili kvasac BDX tokom vinifikacije sorte Teran, nađena je viša vrednost za antioksidativni kapacitet meren testom TEAC i posle 20 dana maceracije iznosio je 33,12 mmol TE/l.



Slika 88. Antioksidativni kapacitet vina spontane i inokulisane fermentacije kvascima BDX, FX10 i Qa23

5.18.2.3. Antioksidativni kapacitet vina iz 2018. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX i kvascem BDX i enzimskim preparatima EXV i CB

Postoji statistički značajna razlika u antioksidativnom potencijalu određenom testom TEAC, vina dobijenih korišćenjem selekcionisanog kvasca BDX bez dodatog enzimskog preparata i vina dobijenih uz dodatak enzimskog preparata EXV ($p < 0,05$). Korišćenjem enzimskog preparata CB nije ustanovljena statistički značajna razlika na nivou značajnosti 0,05. Najviše vrednosti za antioksidativne aktivnosti BDX varijante ogleda i BDX + EXV su postignute na kraju ispitivanog vremena maceracije (21. dan), dok je u varijanti BDX + CB najviša vrednost bila nešto ranije, 17. dan maceracije (Slika 89).



Slika 89. Poređenje antioksidativnog kapaciteta vina fermentacije kvascem BDX i kvascem BDX uz enzimske preparate EXV i CB

Ni u jednom ni u drugom eksperimentu u 2018. godini, vreme maceracije nije bilo od statističkog značaja, jer nije ustanovljena razlika antioksidativnosti kontrole i vina ostalih dana maceracije.

5.18.3. Metoda FRAP

5.18.3.1. Vrednosti FRAP vina iz 2016. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX uz enzimske preparate EXV, CP i Car

Fermentacija BDX kvascem uz enzimske preparate CP, EXV i Car u 2016. godini i maceracijom od 21 dan, dala je vina čija se izmerena FRAP vrednost značajno razlikovala od FRAP vrednosti kontrolnog uzorka vina (nulti dan). Osim toga, vina koja su macerirala 3 i 5 dana su se značajno razlikovala od vina koja su macerirala 14 i 21 dan u pogledu antioksidativnosti merene FRAP metodom. Slično tome, prema Muñoz-Bernal et al. (2020) nađena je značajna razlika između antioksidativnih svojstava uzoraka vina na početku maceracije i posle 15 dana maceraciono-fermentacionog procesa u slučaju merenja FRAP metodom. Prema Generalić Mekinić et al. (2019), najniža FRAP vrednost je nađena za kontrolno vino prvog dana maceracije, bez dodatka enzimskog preparata (3035 $\mu\text{mol TE/l}$), dok je nakon toga zabeležen porast kao i u našem istraživanju. Poređenjem više različitih enzimskih preparata u 2016. godini uz kvasac BDX, nađena je statistički značajna razlika u antioksidativnoj aktivnosti vina određenoj metodom FRAP.

5.18.3.2. Korigovane vrednosti FRAP na količinu SO_2 u vinu

Vinobran ili kalijum metabisulfit se koristi u vinarstvu počevši od primarne prerade grožđa zaključno sa negom i odležavanjem vina, u cilju sprečavanja oksidativnih procesa. Sumpordioksid u vinu, pored antimikrobnog dejstva, poseduje i antioksidativnu aktivnost (Abramović et al., 2015). Uticaj slobodnog SO_2 na ukupnu antioksidativnu aktivnost izmerenu metodom FRAP, eliminisana je konstruisanjem korigovane krive ($\text{FRAP}_{\text{korigovano}}$). Matriks rastvori su napravljeni u koncentracijama 2, 3, 5 i 7 g/hl $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Dodatkom vinske kiseline pH vrednost je podešena na pH=3,5. Vinobran je dodat u količini da se obezbedi koncentracija slobodnog SO_2 od 10 do 35 mg/l.

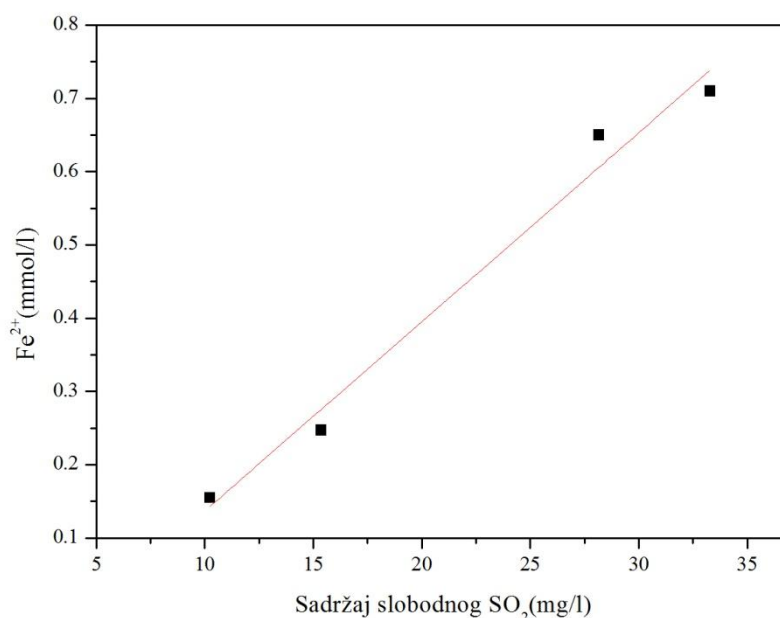
Jodometrijskom titracijom (prema Ripperu) je prethodno određena količina slobodnog SO₂ u matriks rastvorima kao i u uzorcima vina. Matriks rastvori su analizirani metodom FRAP, kao i uzorci vina, i dobijena vrednost je označena kao FRAP_{matriks rastvora}. Na osnovu vrednosti dobijenih metodom FRAP i sadržaja slobodnog SO₂ u matriks rastvorima (Tabela 41) konstruisana je kalibraciona kriva (Slika 90).

$$\text{FRAP}_{\text{korigovano}} = \text{FRAP}_{\text{ukupno}} - \text{FRAP}_{\text{matriks rastvora}}$$

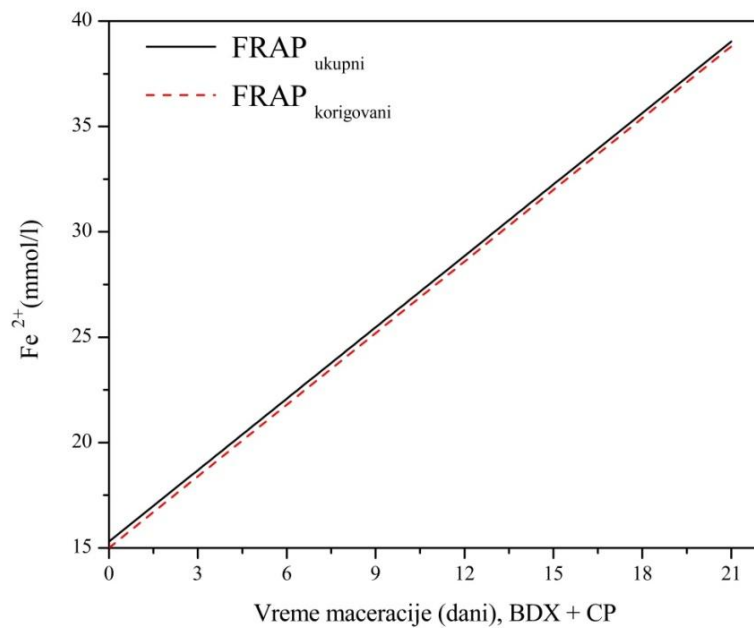
FRAP_{korigovano} za sve uzorke vina rezultat je antioksidativnosti svih jedinjenja koja se nalaze u vinu, bez uticaja antioksidativnosti koja potiče od SO₂. Poređenje antioksidativnosti vina različitih varijanti ogleada sa i bez uticaja SO₂ prikazano je na graficima (Slika 91-93).

Tabela 41. Slobodni SO₂ i vrednosti FRAP za pripremljene matriks rastvore

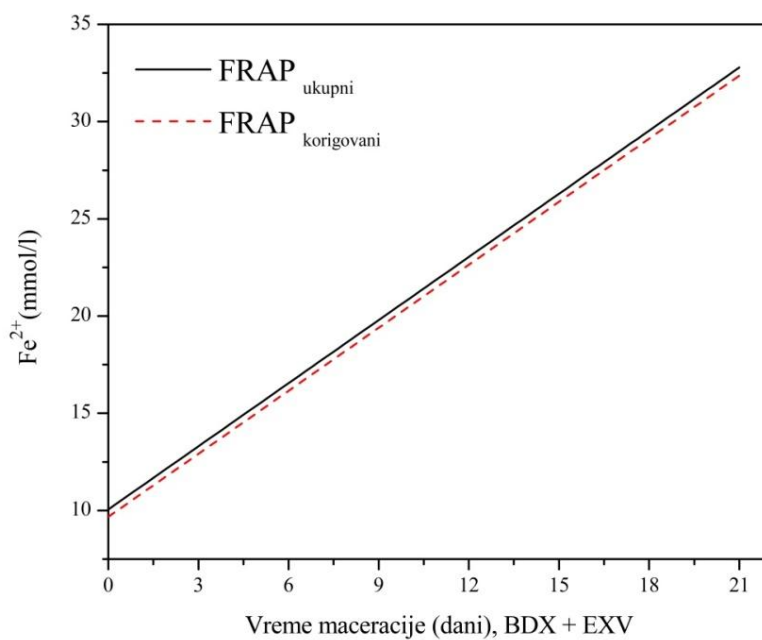
Koncentracija K ₂ S ₂ O ₅ u matriks rastvorima (g/hl)	Slobodni SO ₂ u matriks rastvorima (mg/l)	FRAP za matrix rastvore (mmol Fe ²⁺ /l)
2 g/hl	10,24	0,155
3 g/hl	15,36	0,247
5 g/hl	28,16	0,65
7 g/hl	33,28	0,71



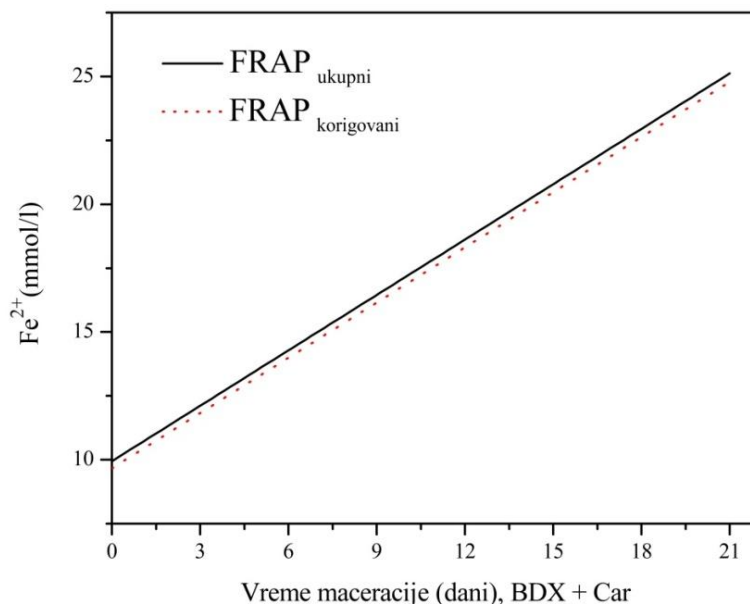
Slika 90. Kalibraciona kriva vrednosti za matriks rastvore u zavisnosti od sadržaja slobodnog SO₂



Slika 91. Uticaj SO₂ na antioksidativnu aktivnost merenu metodom FRAP u vinima sa dodatkom enzimskog preparata CP kljuku



Slika 92. Uticaj SO₂ na antioksidativnu aktivnost merenu metodom FRAP u vinima sa dodatkom enzimskog preparata EXV kljuku

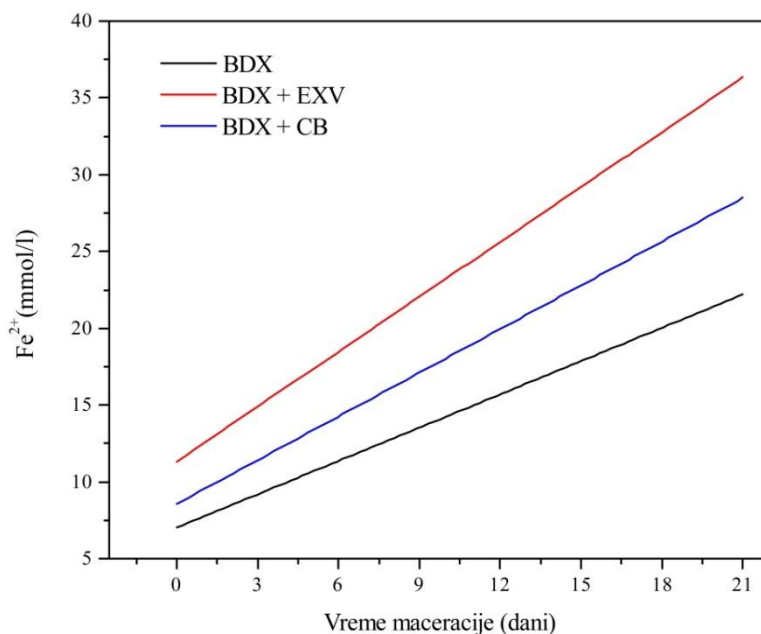


Slika 93. Uticaj SO_2 na antioksidativnu aktivnost merenu metodom FRAP u vinima sa dodatkom enzimskog preparata Car kljuku

5.18.3.3. Poređenje vrednosti FRAP vina iz 2018. godine dobijenih fermentacijom kvascem BDX i kvascem BDX uz enzimske preparate EXV i CB

Postoji statistički značajna razlika u antioksidativnom potencijalu određenom metodom FRAP, vina dobijenih korišćenjem selekcionisanog kvasca BDX bez dodatog enzimskog preparata i vina dobijenih uz dodatak enzimskog preparata EXV, što nije slučaj prilikom korišćenja enzimskog preparata CB gde nije ustanovljena statistički značajna razlika na novou značajnosti 0,05 (Slika 94). Antioksidativni potencijal izmeren metodom FRAP među ovim uzorcima bio je najviši posle 21 dana maceracije, gde su vina varijanti ogleđa sa enzimima pokazala bolju antioksidativnost u odnosu na ona sa samim kvascem. To je u skladu sa rezultatima Generalić Mekinić et al. (2019), gde je nađeno da vina sa dodatim enzimskim preparatima imaju bolja antioksidativna svojstva u odnosu na kontrolu.

Što se tiče uticaja vremena maceracije na vrednosti FRAP antioksidativne aktivnosti vina, ustanovljeno je da postoji značajna razlika između vina označenog kao kontrola i vina koja su macerirala preko 7 dana (7, 14 i 21 dan) za eksperimente kombinacije kvasca BDX i enzimskih preparata EXV i CB.

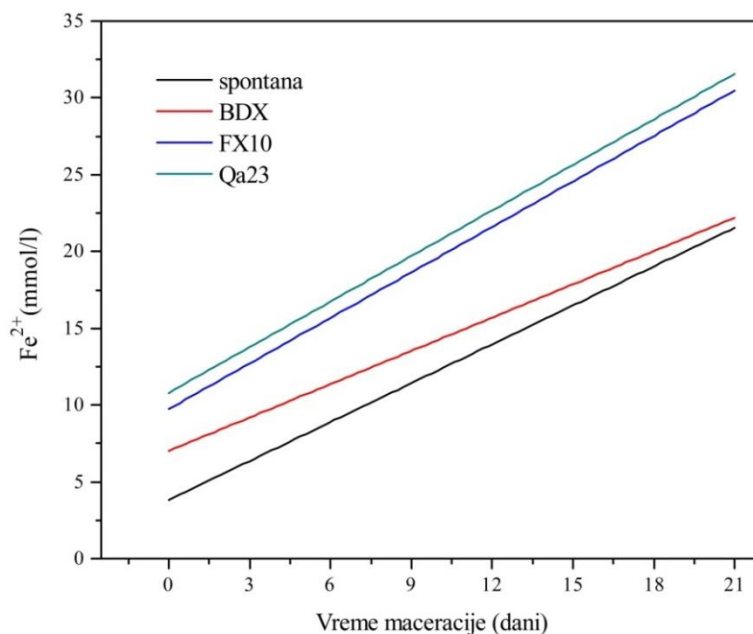


Slika 94. Antioksidativnost merena metodom FRAP u vinu inokulisanim kvascem BDX uz enzimske preparate EXV i CB

5.18.3.4. Poređenje vrednosti FRAP vina spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10, Qa23)

Analizirajući vina spontane i inokulisane fermentacije u pogledu dobijenih vrednosti FRAP, zaključeno je da postoji značajna razlika između antioksidativne aktivnosti vina spontane i inokulisane fermentacije ($p < 0,05$). Među ovim uzorcima najniži antioksidativni potencijal pokazala su vina spontane fermentacije, dok je primena selekcionisanog vinskog kvasca Qa23 dovela do najveće antioksidativne aktivnosti vina posle 21 dana maceracije i to 31,58 mmol Fe^{2+}/l (Slika 95). U radu Damijanić et al. (2012) korišćen je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* „Premium Zinfandel“ (Verona, Italija) i dobijena niža vrednost FRAP posle istog vremena maceracije i to 28,6 mmol Fe^{2+}/l .

U eksperimentima spontane i inokulisane fermentacije ustanovljena je razlika kontrole i vina koja su macerirala duže od 5 dana ($p < 0,05$). Za Teran vina, rezultati metode FRAP pokazali su najnižu vrednost za vino od 3 dana maceracije kao i u našem istraživanju, dok su se vina dužih perioda maceracije (7, 12, 17 i 21) značajno razlikovala od istog (Damijanić et al., 2012).



Slika 95. Promena vrednosti FRAP uzoraka vina koja su fermentisala sa i bez zasejavanja klijuka

Kod eksperimenata sa kvascima i u kombinaciji kvasca sa enzimima nađeno je da se antioksidativni kapacitet kontrole značajno razlikuje od vina koja su macerirala duži vremenski period, što je u skladu sa rezultatima rada Villaño et al., 2006. Kada je u pitanju kontrola (nulti dan), koja se može uporediti sa nekim belim vinom, moglo bi se reći u njoj dominiraju fenolne kiseline koje potiču iz mesa bobice grožđa, i posledično imaju najniži antioksidativni kapacitet, slično prethodnim radovima (Villaño et al., 2006; Fernández-Pachón et al., 2004). Najveće promene u koncentraciji fenolnih jedinjenja tokom maceracije dešavaju se tokom prve nedelje (ekstrakcija antocijanina kao i flavan-3-ola) pa je posledično u tom periodu najveći porast antioksidativne aktivnosti vina i u našim uzorcima.

U našim uzorcima vina, dominantno fenolno jedinjenje je bio katehin, i njegova koncentracija je bila u porastu tokom maceracije, što je pretpostavlja se izazvalo i veći antioksidativni kapacitet vina. U literaturi, kod sorti Merlot i Cabernet sauvignon, primećen je visok sadržaj katehina kao i veća antioksidativnost. Nasuprot tome, druge sorte kao što su Sangiovese, pokazale su niži sadržaj katehina i samim tim nižu antioksidativnost (Di Majo et al., 2008). Tokom produženja vremena maceracije, dolazi do bogate ekstrakcije fenolne frakcije (većinom flavan-3-ola i proantocijanidina), koja predstavlja najmoćnije antioksidanse i na taj način bi se mogla objasniti povećana antioksidativna aktivnost izazvana produženom maceracijom ispitivanih Cabernet sauvignon vina.

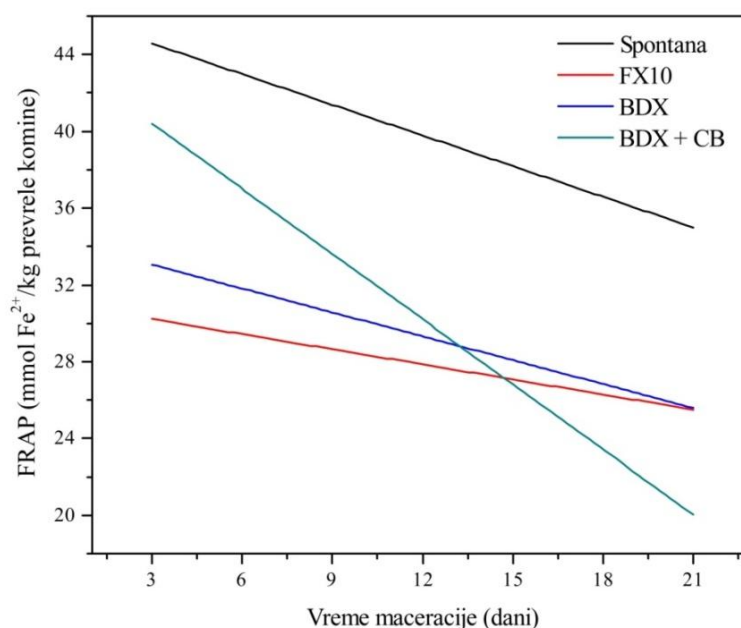
5.19. Antioksidativni kapacitet uzoraka prevrele komine

5.19.1. Vrednosti FRAP uzoraka prevrele komine

Nije nađena statistički značajna razlika u antioksidativnom kapacitetu izmerenom metodom FRAP uzoraka prevrele komine u varijantama ogleda spontane i inokulisane fermentacije (BDX i FX10), kao ni u slučaju inokulisane fermentacije sa kvascem BDX i inokulisane fermentacije u kombinaciji sa enzimskim preparatom CB, BDX + CB ($p > 0,05$) (Tabela 42).

Tabela 42. Vrednosti FRAP za različite uzorke prevrele komine

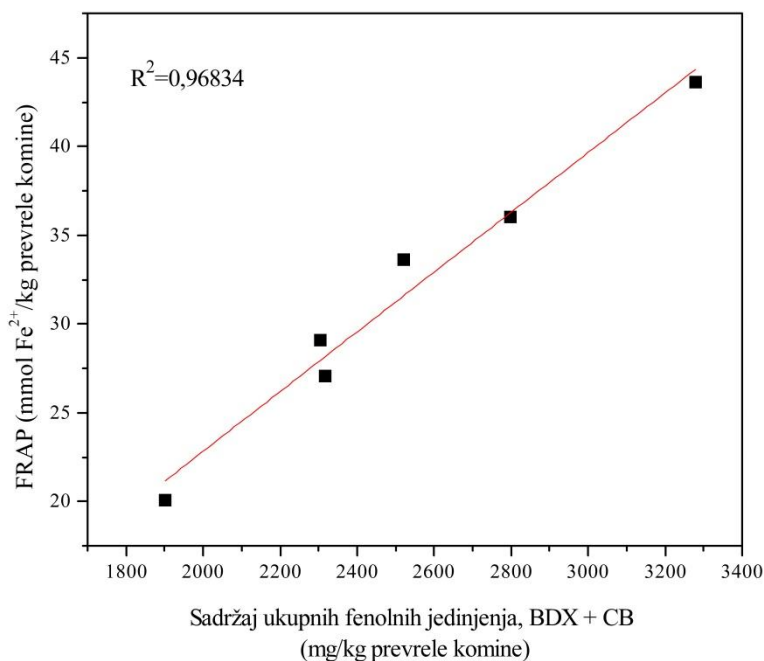
FRAP (mmol Fe ²⁺ /kg)	Vrsta fermentacije			
	BDX	FX10	BDX + CB	Spontana
Kontrola	27,08	27,08	27,08	27,08
3. dan	29,07	26,35	43,60	17,81
5. dan	39,35	30,50	36,00	49,46
7. dan	29,19	36,10	33,60	41,90
14. dan	26,84	21,30	29,10	41,82
21. dan	26,31	33,00	20,09	32,57



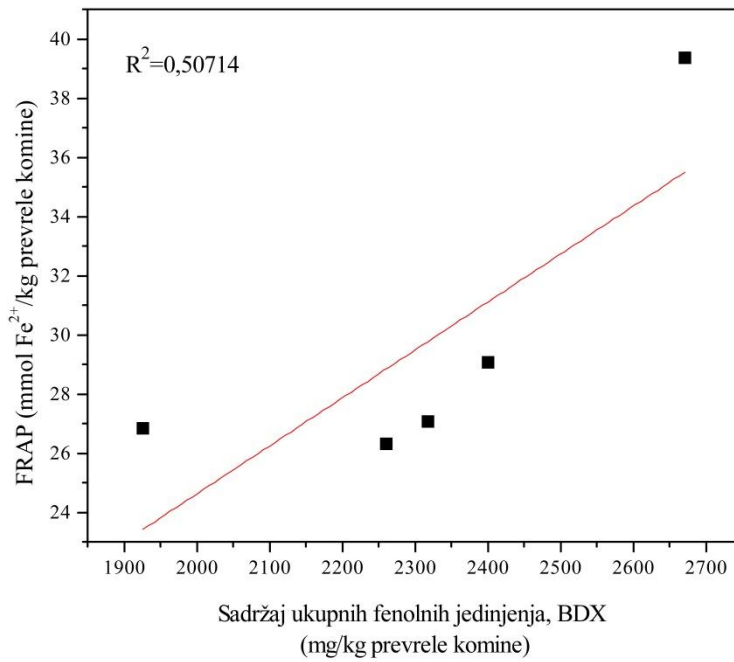
Slika 96. Vrednosti FRAP uzoraka prevrele komine različitog vremena maceracije za ispitivane varijante ogleda

Analizirajući dobijene rezultate (Tabela 42 i Slika 96), može se zaključiti da sa produženjem kontakta čvrste i tečne faze (čvrstih delova grožđa i šire/vina), dolazi do smanjenja sadržaja bioaktivnih jedinjenja u komini, upravo zbog njihove ekstrakcije u vino. Zbog toga je pretpostavlja se došlo do smanjenja antioksidativnosti uzoraka komine čija je maceracija trajala duži vremenski period. Suprotno tome, veća antioksidativnost nađena je za uzorke komine koji su kraće vreme macerirali, što znači da je većina fenolnih jedinjenja zaostala u toj komini, stoga je dala veći

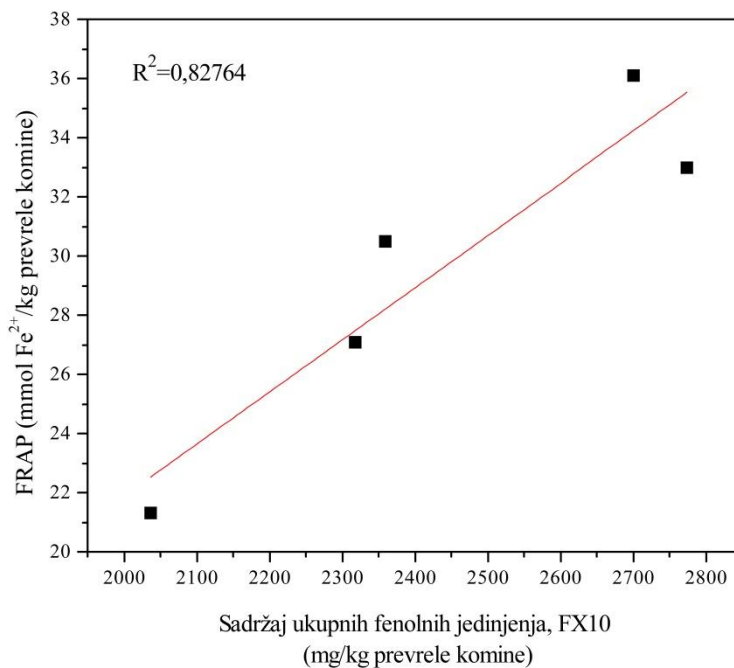
antioksidativni kapacitet. To je u saglasnosti sa izmerenim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja, gde je nađena viša količina u uzorcima sa kraćom maceracijom. Zabeležena je i pozitivna korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja uzoraka komine i antioksidativnog potencijala tokom 21 dan maceracije (Slika 97-100) što je u saglasnosti sa literaturom (Jara-Palacios et al., 2014). Najveći koeficijent korelacije nađen je za zavisnost sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i vrednosti FRAP za varijantu oglada BDX + CB i to $R^2 = 0,96834$ (Slika 97). Prema Moldovan et al. (2020), koji su pripremali etanolne ekstrakte komine od grožđa vinove loze sorti Cabernet sauvignon, Mamaia i Fetească neagră, nije uočena veza između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnosti.



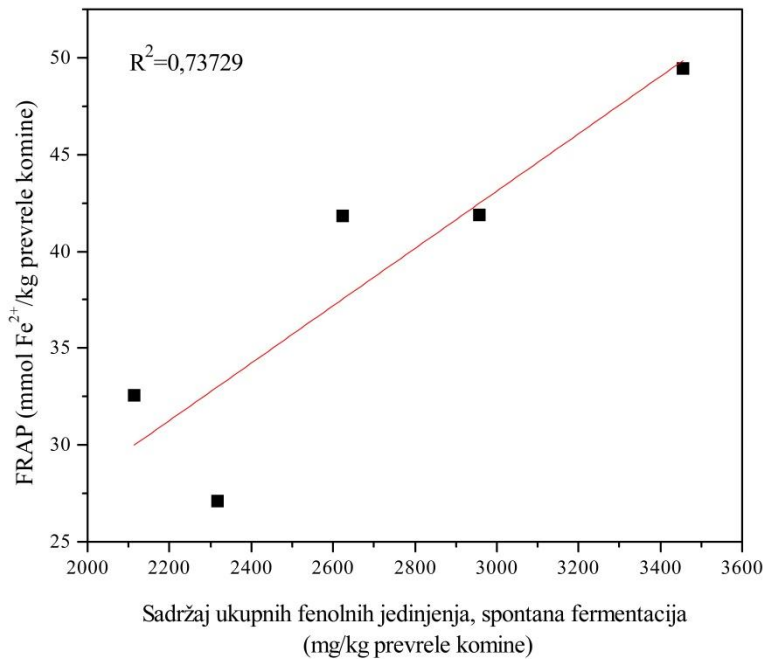
Slika 97. Pozitivna korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i vrednosti FRAP za uzorke komine varijante oglada BDX + CB



Slika 98. Pozitivna korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i vrednosti FRAP za uzorke komine varijante ogleda BDX



Slika 99. Pozitivna korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i vrednosti FRAP za uzorke komine varijante ogleda FX10



Slika 100. Pozitivna korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i vrednosti FRAP za uzorke komine varijante ogleđa spontane fermentacije

5.19.2. Vrednosti TEAC uzoraka prevrele komine

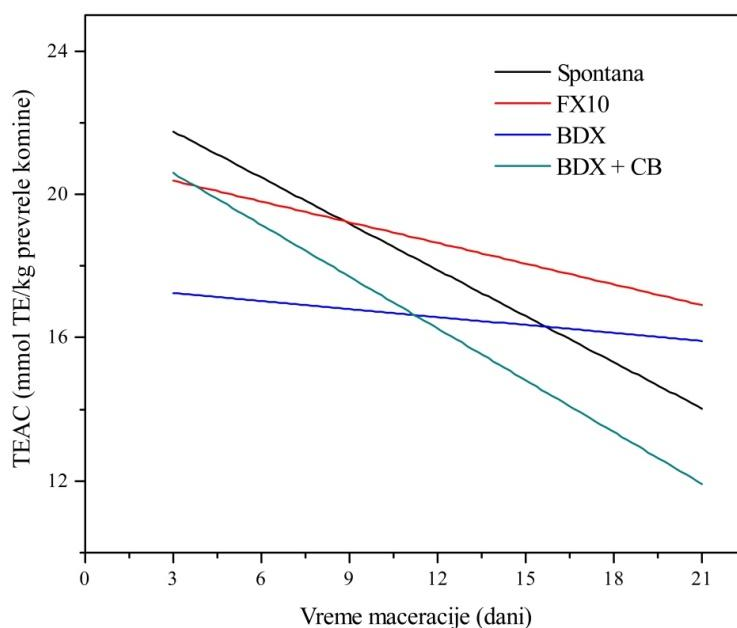
Nije nađena statistički značajna razlika u antioksidativnom kapacitetu izmerenom testom TEAC uzoraka prevrele komine u varijantama ogleđa spontane i inokulisane fermentacije (BDX i FX10), kao ni u slučaju inokulisane fermentacije sa kvascem BDX i inokulisane fermentacije u kombinaciji sa enzimskim preparatom CB, BDX + CB ($p > 0,05$).

Tabela 43. Vrednosti TEAC različitih uzoraka prevrele komine

TEAC (mmol TE/kg)	Vrsta fermentacije			
	BDX	FX10	BDX + CB	Spontana
Kontrola	13,63	13,63	13,63	13,63
3. dan	17,80	19,90	22,90	16,90
5. dan	15,12	13,90	19,10	25,80
7. dan	18,60	21,25	15,60	22,04
14. dan	16,20	16,20	16,70	14,30
21. dan	15,90	17,80	11,80	14,70

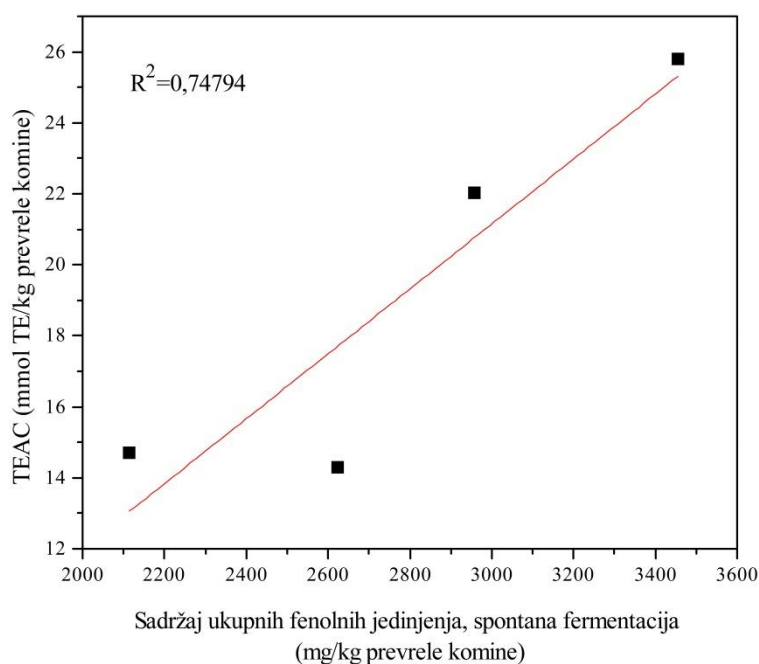
Rezultati testa TEAC (Tabela 43) mogli bi se poistovetiti sa rezultatima metode FRAP, a to jeste da sa produžetkom vremena maceracije dolazi do smanjenja izmerene vrednosti TEAC upravo zbog sve manje koncentracije fenolnih jedinjenja koja zaostaju u komini. Najveći pad antioksidativnog potencijala uočen je kod varijante ogleđa sa enzimskim preparatom (BDX + CB), pretpostavlja se zbog dejstva enzimskih preparata koji su povoljno uticali na ekstrakciju fenolnih jedinjenja u vino. Posmatrajući sa druge strane doveli su do manje zaostalih bioaktivnih jedinjenja u komini (Slika 101). Dobijena je i pozitivna korelacija sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta izmerenog testom TEAC u slučaju varijanti ogleđa spontane fermentacije (Slika 102),

FX10 (Slika 103), BDX + CB (Slika 104). Najveći koeficijent korelacije $R^2 = 0,89875$, dobijen je kao i kod antioksidativnosti izmerene metodom FRAP, a to je varijanta ogleda sa enzimskim preparatom, BDX + CB (Slika 104).

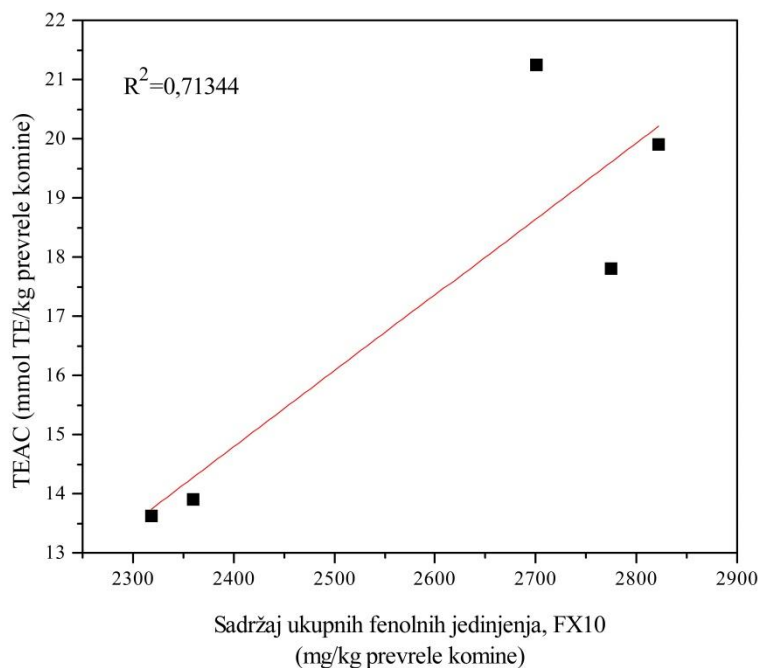


Slika 101. Promena antioksidativnog kapaciteta uzoraka prevrele komine tokom 21 dan maceracije, izmerenog testom TEAC

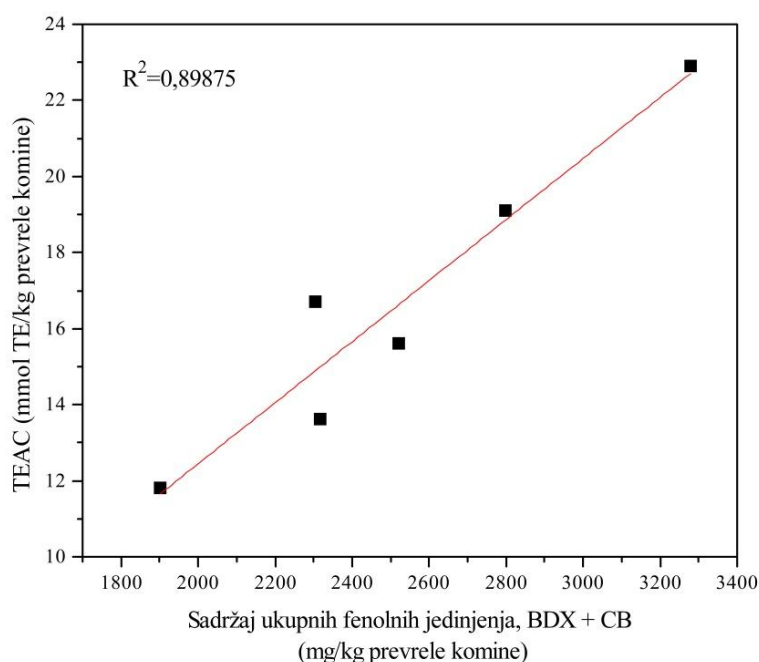
Kao i kod rezultata metode FRAP, zabeležena je pozitivna korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i vrednosti TEAC (Slika 102-104).



Slika 102. Pozitivna korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i vrednosti TEAC za uzorke komine varijante ogleda spontane fermentacije



Slika 103. Pozitivna korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i vrednosti TEAC za uzorke komine varijante ogleda FX10



Slika 104. Pozitivna korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i vrednosti TEAC za uzorke komine varijante ogleda BDX + CB

Rezultati našeg istraživanja mogli bi se donekle uporediti sa Ky et al. (2014), koji govore da semenke iz komine pokazuju veću antioksidativnost nego pokožica grožđa, koliko god trajala maceracija. Ipak, poredeći različito vreme maceracije dve iste sorte (Syrah i Grenache), bolju antioksidativnost pokazali su uzorci koji su kraće macerirali, a najveću antioksidativnost pokazala je sorta Alicante čija je maceracija bila najkraća. Veći antioksidativni kapacitet pokazao je uzorak semenki sorte Grenache koje je maceriralo 15 dana (FRAP: 114,6 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$ suvog uzorka; ABTS: 94,8 $\mu\text{M TE}/\text{g}$ suvog uzorka) u odnosu na istu sortu koja je macerirala 16 dana i uzorak sorte Syrah

čija je maceracija trajala 19 dana u odnosu na maceraciju iste sorte od 22 dana. Sve uzorke u radu Ky et al. (2014) kod kojih je zabeležena visoka antioksidativnost, prati i visok sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja što je u skladu sa našim istraživanjem. Prema Jara-Palacios et al. (2014), nađeno je da sadržaj ukupnih fenola ima visok i značajan stepen korelacije sa antioksidativnim svojstvima komine grožđa belih sorti ($R^2 = 0,818$), što je niži koeficijent u odnosu na našu varijantu ogleđa sa enzimskim preparatom, BDX + CB. Jasno je prikazano da sorta Parellada sadrži najveću količinu fenolnih jedinjenja u 100 g suve komine, a to je $3113,29 \pm 167,95$ mg GAE, i da ujedno taj uzorak komine ima i najveći antioksidativni kapacitet izmeren metodom ABTS (59 mmol/100g suve komine). Rezultati istraživanja de la Cerda-Carrasco et al. (2015), koji su poredili antioksidativni kapacitet dve bele i dve crne sorte među kojima je i Cabernet sauvignon, zaključili su da bolji antioksidativni kapacitet ima komina belog grožđa, jer tu nije sprovedena maceracija. Komina crnog grožđa koja je macerirala 3 dana imala je nižu izmerenu antioksidativnost, ali i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Francuske crne sorte Petit verdot i Syrah dale su kominu sa dosta većim vrednostima antioksidativnog kapaciteta izmerenog testom TEAC u odnosu na naše rezultate (Melo et al., 2015). Te razlike objašnjive su prvenstveno različitim sortama, lokacijom, klimom, zemljištem, vremenom berbe, a naposljetku i samim procesom proizvodnje i ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja (Wang et al., 2010).

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Grožđe, vino i prevrela komina iz različitih faza zrelosti (faze šarka, pune zrelosti i prezrelosti) ispoljili su razlike u zastupljenosti pojedinih fenolnih jedinjenja. U vinima od grožđa vinove loze sorte Cabernet sauvignon u različitim fazama zrelosti nije ustanovljena statistički značajna razlika u sadržaju derivata benzoeve kiseline, katehina i epikatehina. Najveća koncentracija *trans*-resveratrola nađena je u vinu faze šarka. Nije nađena značajna razlika u sadržaju kvercetina, naringenina i *trans*-resveratrola detektovanih u pokožici grožđa. Analizom prevrele komine zaostale nakon proizvodnje vina različitih faza zrelosti, ustanovljeno je da nema značajne razlike u sadržaju derivata benzoeve kiseline, katehina i epikatehina. Od derivata hidroksicimetine kiseline u komini različitih faza zrelosti nađena je kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina u niskim koncentracijama među kojima nije nađena značajna razlika. Ni za pokožične fenole detektovane u komini nije bilo značajne razlike među uzorcima različitih faza zrelosti.
- U vinima od botritiziranog grožđa zabeležen je pad koncentracije epikatehina za 10,90% i katehina za 28,51% u odnosu na vino od zdravog grožđa. Poredeći koncentracije pojedinih fenolnih jedinjenja u vinima od zdravog i plesnivog grožđa nije ustanovljena statistički značajna razlika u njihovom sadržaju.
- Primena različitih pritisaka ceđenja prevrele komine imala je značajan uticaj na fenolni sastav vina u odnosu na vino proizvedeno od samotoka. Uticaj presovanja prevrele komine pritiskom 1,5 bar je imao značajan uticaj na ekstrakciju derivata benzoeve kiseline (siringinske, galne, *p*-hidroksibenzoeve, protokatehuinske, vanilinske i elaginske kiseline) u odnosu na ekstrakciju samotokom. Analizom zaostalih fenolnih jedinjenja u komini nađena je značajna razlika između samotoka i preševina (0,5 bara, 1 bar i 1,5 bara) kada su u pitanju derivati benzoeve kiseline. Sadržaj derivata hidroksicimetine kiseline (kafeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina) nije se značajno razlikovao u komini od samotoka i preševina.
- Dodatak amonijačnog hraniva kljuku pokazao je značajnu razliku u sadržaju derivata benzoeve kiseline u odnosu na vino proizvedeno bez dodatka hraniva kvascu. Za ostala analizirana fenolna jedinjenja nije ustanovljena statistički značajna razlika između ispitivanih varijanti ogleđa.
- Tokom maceracije u trajanju od 21 dan i spontane fermentacije, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je bio u stalnom porastu. Zasejavanjem kljuka kulturom selekcionisanog vinskog kvasca Qa23, tokom maceracije primećen je eksponencijalni porast sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja tokom 19 dana maceracije, nakon čega je došlo do opadanja njihovog sadržaja usled reakcija kondenzacije, polimerizacije ili degradacije. Ostvarena je značajna razlika u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u kontrolnim vinima svih primenjenih ogleđa spontane i inokulisane fermentacije (BDX, FX10, Qa23) i vinima istih varijanti ogleđa ali sa različitim periodima maceracije. Primena inokulisane fermentacije nije dovela do značajne promene sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na spontanu fermentaciju. Primena enzimskih preparata EXV i CB nije ostvarila značajnu promenu u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na vina koja su fermentisala uz kvasac bez enzimskih preparata. Da je vreme maceracije presudno za veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja potvrđuje značajna razlika u njihovom sadržaju u kontrolnom vinu i vinima fermentacije kvascem BDX sa dužim maceracijama uz enzimske preparate EXV, CP i Car.
- Poredeći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u komini zaostaljoj posle spontane i u komini zaostaljoj nakon inokulisane fermentacije, jedino je uz kvasac BDX nađena statistički značajna razlika u odnosu na spontanu fermentaciju. Dodatak enzimskih preparata EXV i CB kljuku nije doveo do značajne promene u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u zaostaljoj komini u odnosu na kominu zaostalju posle fermentacije samim kvascem BDX.

Trajanje maceracije značajno je uticalo na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja koja su zaostala u komini posle fermentacije kvascem BDX i kvascem BDX uz dodatak enzimskih preparata EXV₂₀₁₆, CP i Car. To potvrđuje značajna razlika u njihovom sadržaju u komini koja je macerirala 3 i 5 dana u poređenju sa 14 i 21 dan, kao i razlika između 7 i 14 dana. Bitna razlika u sadržaju ovih jedinjenja nađena je u komini ogleđa spontane i inokulisane fermentacije čija je maceracija trajala 3 dana i sa druge strane 7 i 14 dana. Ostvarena je značajna razlika između ukupnih fenolnih jedinjenja zaostalih u komini koja je macerirala 3 i 7 dana, kao i između 5 i 21 dan u ogleđima BDX + EXV₂₀₁₈ i BDX + CB.

- Sadržaj galne kiseline u vinima različitog vremena maceracije, spontane i inokulisane fermentacije je značajno promenjen u poređenju sa kontrolom. Dodatak enzimskih preparata CP i Car imao je isti uticaj na sadržaj galne kiseline, dok ostali primenjeni enzimski preparati nisu bili značajno različiti od kontrolnog vina.
- Kontrolno vino i vina različitog vremena maceracije ogleđa sa i bez kvasaca kao i uz dodatak enzimskih preparata EXV i CB (2018. godina) kao i Car i CP (2016. godina), značajno su se razlikovala po sadržaju protokatehuinske kiseline.
- Dodatak enzimskog preparata EXV tokom maceracije i fermentacije kvascem BDX značajno je promenio sadržaj *p*-hidroksibenzojeve kiseline u tim vinima u poređenju sa vinima istih perioda maceracije, fermentacije istim kvascem ali bez dodatog enzimskog preparata. Vina spontane i fermentacije kvascem Qa23 značajno su se razlikovala od kontrolnog vina po sadržaju *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Isti uticaj na sadržaj *p*-hidroksibenzojeve kiseline imao je i dodatak enzimskih preparata (EXV, CP i Car) u 2016. godini, dok ogleđi uz enzimske preparate EXV i CB u 2018. godini nisu dali iste rezultate.
- Primena tri različita enzimska preparata (EXV, CP i Car) nije dovela do značajne razlike u pogledu sadržaja kafeinske kiseline u vinima.
- Prateći dinamiku ekstrakcije u različitim ogleđima sa kvascima i enzimskim preparatima u 2018. godini, zaključeno je da se najviša koncentracija elaginske kiseline ekstrahovala u vino posle 21 dan maceracije uz kvasac BDX i enzimski preparat EXV.
- Sadržaj katehina i epikatehina nije se značajno razlikovao u vinu spontane i inokulisane fermentacije, kao ni u ogleđima kvasca sa enzimskim preparatima.
- Fermentacija uz kvasce BDX i FX10 i različito vreme maceracije značajno je uticalo na sadržaj kvercetina u odnosu na kontrolni uzorak, dok spontana i fermentacija kvascem Qa23 nisu dovele do bitnih promena.
- Vina dobijena termičkom maceracijom na 60 i 80°C i kontrolna vina klasične maceracije nisu se značajno razlikovala po sadržaju katehina, epikatehina, *trans*-resveratrola, kvercetina i kemferola. Jedino je primenjena maceracija na 80°C značajno uticala na sadržaj derivata hidroksicimetne i benzojeve kiseline u poređenju sa klasičnom maceracijom. Karbonska maceracija nije ostvarila značajan uticaj na sadržaj ispitivanih fenolnih kiselina, a sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je bio viši primenom klasične maceracije.
- Zaključeno je da postoji statistički značajna razlika za sve oglede bistrenja u poređenju sa kontrolom, kao i u slučaju međusobnog poređenja istih sredstava u različitim dozama. Koncentracija derivata benzojeve kiseline (galna, protokatehuinska, *p*-hidroksibenzojeva, siringinska, vanilinska i elaginska kiselina) bila je značajno smanjena tretiranjem želatinom u višoj koncentraciji (10 g/hl) ribljim mehurom (10 i 20 g/hl), kalijum kazeinatom (10 g/hl i 15 g/hl) i albuminom (5 g/hl i 10 g/hl).
- Dodatak askorbinske kiseline nije značajno uticao na promenu koncentracije derivata benzojeve i hidroksicimetne kiseline, *trans*-resveratrola, kvercetina, naringenina, katehina i epikatehina. Kada je u pitanju uticaj slobodnog SO₂ na fenolni sastav vina, utvrđeno je da količine od 43 i 55 mg/l slobodnog SO₂ značajno utiču na sadržaj derivata benzojeve i hidroksicimetne kiseline, katehina, epikatehina, *trans*-resveratrola, kvercetina i naringenina u odnosu na kontrolu koja je sadržala 15 mg/l slobodnog SO₂.

- Sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline u vinima posle primenjene malolaktičke fermentacije bio je približno isti kao njihov sadržaj u kontrolnom uzorku. Primenjena pasterizacija vina nije dovela do značajne promene fenolnog sastava vina.
- Poređenjem 12 istih fenolnih jedinjenja kvantifikovanih u vinu proizvedenom po istoj tehnologiji proizvodnje 2016. i 2018. godine, zaključeno je da postoji statistički značajna razlika u sadržaju galne, elaginske, *p*-kumarinske, *p*-hidroksibenzojeve, protokatehuinske, siringinske i vanilinske kiseline.
- Tokom dvogodišnjeg odležavanja vina u inoks sudu i u staklenoj boci (buteljci), nađena je značajna razlika u sadržaju katehina i epikatehina.
- Nađena je viša koncentracija fenolnih jedinjenja u vinima od grožđa iz starog zasada (višedecenijska eksploatacija) u poređenju sa mladim zasadom vinograda i ta razlika je bila značajna.
- Sadržaj *trans*-resveratrola, rutina, katehina, epikatehina i *p*-kumarinske kiseline nije se značajno menjao u komini zaostaloj nakon spontane i inokulisane fermentacije i maceracije od 3, 5, 7, 14 i 21 dan. Primena enzimskih preparata nije imala uticaja na sadržaj ovih jedinjenja zaostalih u komini posle maceracije. Na sadržaj vanilina u prevreloj komini samo je primena kvasca Qa23 dala značajnu promenu u odnosu na spontanu fermentaciju. Komina koja je macerirala 14 i 21 dan sadržala je statistički višu količinu *trans*-resveratrola u odnosu na kominu koja je odvojena nakon 3, 5 i 7 dana maceracije. U pogledu sadržaja vanilina značajno se razlikovala komina koja je odvojena nakon 3 dana i nakon 21 dan maceracije, dok je za *p*-kumarinsku kiselinu značajno bilo vreme maceracije od 7 dana u odnosu na 3, 5 i 21 dan maceracije. Za pomenuta jedinjenja dominantne su bile reakcije desorpcije od 3. do 14. dana maceracije. Katehin i epikatehin su bila najdominantnija jedinjenja nađena u komini grožđa i to onoj koja je macerirala kraći vremenski period pa je zaključeno da je vreme maceracije značajno uticalo na sadržaj pojedinih jedinjenja u komini.
- Konstantovano je da vreme maceracije značajno utiče na anti-DPPH radikalsku aktivnost vina, dok izbor inokulisane ili spontane fermentacije i dodatak enzimskih preparata (EXV i CB) nije bio značajan. U eksperimentu kvasca BDX sa enzimskim preparatima (EXV, CP i Car), najniža anti-DPPH radikalska aktivnost dobijena je za uzorak koji je macerirao 3 dana uz enzim Car (40,66%), a produženom maceracijom do 21. dana uz isti enzimski preparat dobijeno je vino sa najvišom anti-DPPH radikalskom aktivnošću (5,8%). Inokulacija kljuka različitim kvascima značajno je uticala na antioksidativnost merenu metodom FRAP, u odnosu na antioksidativnost vina spontane fermentacije. U istim ogleđima ustanovljena je razlika kontrole i vina koja su macerirala duže od 5 dana. Primena pojedinih enzimskih preparata tokom maceracije je značajno uticala na antioksidativni kapacitet vina (vrednosti TEAC i FRAP). Vrednosti dobijene metodom FRAP za kontrolni uzorak vina značajno su se razlikovale od rezultata za vina koja su macerirala 21 dan, uz primenu enzimskih preparata EXV₂₀₁₆, CP i Car, dok je uz enzimске preparate EXV₂₀₁₈ i CB značajno bilo vreme duže od 7 dana.
- Određivanjem antioksidativnog kapaciteta uzoraka komine (FRAP i TEAC) zaostale nakon spontane i inokulisane fermentacije (FX10 i BDX), utvrđeno je da nema značajne razlike niti je dodatak enzimskog preparata CB (uz BDX kvasac) imao značajan uticaj. Zajednički zaključak, koji se može izvesti, na osnovu rezultata metode FRAP i testa TEAC jeste da sa produžetkom vremena maceracije dolazi do smanjenja antioksidativnog kapaciteta zbog sve manje koncentracije fenolnih jedinjenja koja zaostaju u komini.
- Dobijeni rezultati dinamike sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja u vinima kao i prevreloj komini otvaraju mogućnost za proizvodnju vina sa visokim sadržajem biološki aktivnih komponenti kao i potencijalnom iskorišćenju komine koja zaostaje kao nuz proizvod.

7. LITERATURA

Abramovič, H., Košmerl, T., Ulrih, N.P., Cigić, B. (2015): Contribution of SO₂ to antioxidant potential of white wine. *Food Chemistry* 174: 147-153.

Aguilar, T., Loyola, C., de Bruijn, J., Bustamante, L., Vergara, C., von Baer, D., Mardones, C., Serra, I. (2016): Effect of thermomaceration and enzymatic maceration on phenolic compounds of grape must enriched by grape pomace, vine leaves and canes. *European Food Research and Technology* 242(7): 1149-1158.

Alberto, M.R., Gómez-Cordovés, C., Manca de Nadra, M.C. (2004): Metabolism of gallic acid and catechin by *Lactobacillus hilgardii* from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(21): 6465-6469.

Alencar, N.M.M., Cazarin, C.B.B., Corrêa, L.C., Maróstica Junior, M.R., Biasoto, A.C.T., Behrens, J.H. (2017): Influence of maceration time on phenolic compounds and antioxidant activity of the Syrah must and wine. *Journal of Food Biochemistry* 42(1): e12471.

Andrich, G., Zinnai, A., Venturi, F., Fiorentini, R. (2005): A tentative mathematical model to describe the evolution of phenolic compounds during the maceration of Sangiovese and Merlot grapes. *Italian Journal of Food Science* 17(1): 45-58.

Anđelkovic, M., Radovanović, B., Radovanović, A., Anđelkovic, A. M. (2013): Changes in polyphenolic content and antioxidant activity of grapes cv Vranac during ripening. *South African Journal of Enology and Viticulture* 34(2): 147-155.

Antoniolli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P., Bottini, R. (2015): Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry* 178: 172-178.

Arnous, A., Meyer, A.S. (2010): Discriminated release of phenolic substances from red wine grape skins (*Vitis vinifera* L.) by multicomponent enzymes treatment. *Biochemical Engineering Journal* 49(1): 68-77.

Artem, V., Antoce, A.O., Geana, E.I., Ranca, A. (2021): Effect of grape yield and maceration time on phenolic composition of 'Fetească neagră' organic wine. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 49(2): 12345.

Atanacković, M., Petrović, A., Jović, S., Gojković-Bukarica, Lj., Bursać, M., Cvejić, J. (2012): Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry* 131(2): 513-518.

Auw, J.M., Blanco, V., O'Keefe, S.F., Sims, C.A. (1996): Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet sauvignon, Chambourcin, and Noble wines and juices. *American Journal of Enology and Viticulture* 47: 279-286.

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., Das, D.K., Ray, S.D., Kuszynski, C. A., Joshi, S.S., Pruess, H.G. (2000): Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148(2-3): 187-197.

Bai, B., He, F., Yang, L., Chen, F., Reeves, M.J., Li, J. (2013): Comparative study of phenolic compounds in Cabernet sauvignon wines made in traditional and Ganimede fermenters. *Food Chemistry* 141: 3984–3992.

Barril, C., Clark, A.C., Prenzler, P.D., Karuso, P., Scollary, G.R. (2009): Formation of pigment precursor (+)-1''-methylene-6''-hydroxy-2 H-furan-5''-one-catechin isomers from (+)-catechin and a degradation product of ascorbic acid in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(20): 9539-9546.

Barril, C., Clark, A.C., Scollary, G.R. (2012): Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. *Analytica Chimica Acta* 732: 186-193.

Barril, C., Rutledge, D.N., Scollary, G.R., Clark, A.C. (2016): Ascorbic acid and white wine production: A review of beneficial versus detrimental impacts. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 22(2): 169-181.

Bautista-Ortín, A.B., Fernández-Fernández, J.I., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E. (2007): The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis* 20(7): 546–552.

Bautista-Ortín, A.B., Martínez-Cutillas, A., Ros-García, J.M., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E. (2005): Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology* 40: 867–878.

Bautista-Ortín, A.B., Busse-Valverde, N., Fernández-Fernández, J.I., Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R. (2016): The extraction kinetics of anthocyanins and proanthocyanidins from grape to wine in three different varieties. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 50(2): 91-100.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239(1): 70–76.

Blesić, M. (2016): Tehnologija vina. Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Sarajevo, pp. 294-301.

Borazan, A.A., Bozan, B. (2013): The influence of pectolytic enzyme addition and prefermentative mash heating during the winemaking process on the phenolic composition of Okuzgozu red wine. *Food Chemistry* 138 (1): 389–395.

Boulton R. (2003): Red Wines. In: Lea A.G.H., Piggott J.R. (eds) *Fermented Beverage Production*. Springer, Boston, MA, pp. 107-137.

Bradshaw, M.P., Scollary, G.R., Prenzler, P.D. (2004): Examination of the sulfur dioxide–ascorbic acid antioxidant system in a model white wine matrix. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(4): 318-324.

Braga, A., Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J.M., Laureano, O. (2007): Gelatine, casein and potassium caseinate as distinct wine fining agents: different effects on colour, phenolic compounds and sensory characteristics. *Journal international des sciences de la vigne et du vin* 41(4): 203-214.

Brandolini, V., Fiore, C., Maietti, A., Tedeschi, P., Romano, P. (2007): Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on wine total antioxidant capacity evaluated by photochemiluminescence. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(4): 581-586.

- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velić, D. (2007): Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81(1): 236–242.
- Budić-Leto, I., Garcin, L., Lovrić, T., Vrhovsek, U. (2008): Effects of maceration conditions on the polyphenolic composition of red wine 'Plavac mali'. *Vitis* 47(4): 245–250.
- Bührle, F., Gohl, A., Weber, F. (2017): Impact of xanthylum derivatives on the color of white wine. *Molecules* 22(8): 1376.
- Burns, J., Gardner, P.T., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., McPhail, D.B., Lister, C., Matthews, D., MacLean, M.R., Lean, M.E.J., Duthie, G.G., Crozier, A. (2000): Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(2): 220–230.
- Cabrita, M.J., Torres, M., Palma, V., Alves, E., Patão, R., Freitas, A.C. (2008): Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta* 74(5): 1281-1286.
- Cacace, J.E., Mazza, G. (2003): Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59(4): 379–389.
- Cadot, Y., Miñana Castelló, M.T., Chevalier, M. (2006): Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Franc) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta* 563: 65–75.
- Campos, F.M., Figueiredo, A.R., Hogg, T.A., Couto, J.A. (2009): Effect of phenolic acids on glucose and organic acid metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Food Microbiology* 26(4): 409-414.
- Canals, R., Llaudy, M.C., Valls, J., Canals, J.M., Zamora, F. (2005): Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10): 4019-4025.
- Careri, M., Corradini, C., Elviri, L., Nicoletti, I., Zagnoni, I. (2003): Direct HPLC analysis of quercetin and *trans*-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(18): 5226–5231.
- Caridi, A., Cufari, A., Lovino, R., Palumbo, R., Tedesco, I. (2004): Influence of yeast on polyphenol composition of wine. *Food Technology and Biotechnology* 42(1): 37-40.
- Castellari, M., Spinabelli, U., Riponi, C., Amati, A. (1998): Influence of some technological practices on the quantity of resveratrol in wine. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* 206(3): 151-155.
- Castillo-Muños, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. (2007): Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(3): 992-1002.
- Cerpa-Calderón, F.K., Kennedy, J.A. (2008): Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(19): 9006–9014.

- Cheng, V.J., Bekhit, A.E.D.A., McConnell, M., Mros, S., Zhao, J. (2012): Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry* 134(1): 474-482.
- Chescheir, S., Philbin, D., Osborne, J.P. (2015): Impact of *Oenococcus oeni* on wine hydroxycinnamic acids and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis*. *American Journal of Enology and Viticulture* 66(3): 357-362.
- Clark, A.C., Vestner, J., Barril, C., Maury, C., Prenzler, P.D., Scollary, G.R. (2010): The influence of stereochemistry of antioxidants and flavanols on oxidation processes in a model wine system: ascorbic acid, erythorbic acid, (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(2): 1004-1011.
- Claus, H. (2017): Laccases of *Botrytis cinerea*. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (eds) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 339-356.
- Cosme, F., Capão, I., Filipe-Ribeiro, L., Bennett, R.N., Mendes-Faia, A. (2012): Evaluating potential alternatives to potassium caseinate for white wine fining: Effects on physicochemical and sensory characteristics. *LWT - Food Science and Technology* 46(2): 382-387.
- Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J.M., Laureano, O. (2008): Interactions between protein fining agents and proanthocyanidins in white wine. *Food Chemistry* 106(2): 536-544.
- Cotoras, M., Vivanco, H., Melo, R., Aguirre, M., Silva, E., Mendoza, L. (2014): In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace. *Molecules* 19(12): 21154–21167.
- Cvejić, J.M., Djekić, S.V., Petrović, A.V., Atanacković, M.T., Jović, S.M., Breski, I.D., Gojković-Bukarica, L.C. (2010): Determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Serbian commercial wines. *Journal of Chromatographic Science* 48(3): 229-234.
- Čakar, U., Grozdanić, N., Petrović, A., Pejin, B., Nastasijević, B., Marković, B., Đorđević, B. (2017): Fruit wines inhibitory activity against α -glucosidase. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 18(15): 1264–1272.
- Čakar, U.D., Petrović, A.V., Živković, M., Vajs, V., Milovanović, M.M., Zeravik, J., Đorđević, B. I. (2016): Phenolic profile of some fruit wines and their antioxidant properties. *Hemijaska industrija* 70(6): 661-672.
- Čakar, U., Petrović, A., Pejin, B., Čakar, M., Živković, M., Vajs, V., Đorđević, B. (2019): Fruit as a substrate for a wine: A case study of selected berry and drupe fruit wines. *Scientia Horticulturae* 244: 42–49.
- Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J.M., Laureano, O. (1995): Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation. *Vitis* 34(1): 51-56.
- Damijanić, K., Staver, M., Kovačević Ganić, K., Bubola, M., Palman, I. (2012): Effects of maceration duration on the phenolic composition and antioxidant capacity of “Teran” (*Vitis vinifera* L.) wine. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 77(2): 103-107.

- Daničić M. (1988): Praktikum iz tehnologije vina. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Danilewicz, J.C. (2003): Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture* 54: 73-85.
- Danilewicz, J.C. (2007): Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture* 58(1): 53-60.
- Danilewicz, J.C. (2011): Mechanism of autoxidation of polyphenols and participation of sulfite in wine: Key role of iron. *American Journal of Enology and Viticulture* 62(3): 319-328.
- Decker, E.A. (1997): Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? *Nutrition Reviews* 55(11): 396-407.
- de la Cerda-Carrasco, A., López- Solís, R., Nuñez- Kalasic, H., Peña- Neira, Á., Obreque- Slier, E. (2015): Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (*Vitis vinifera L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(7): 1521-1527.
- de Simón, B.F., Hernández, T., Estrella, I. (1992a): Relationship between chemical structure and biosynthesis and accumulation of certain phenolic compounds in grape skins during ripening. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 195(2): 124-128.
- de Simón, B.F., Hernández, T., Estrella, I., Gómez-Cordovés, C. (1992b): Variation in phenol content in grapes during ripening: Low-molecular-weight phenols. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 194(4): 351-354.
- Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., Giammanco, M. (2008): The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry* 111(1): 45–49.
- Donovan, J.L., McCauley, J.C., Nieto, N.T., Waterhouse, A.L. (1998): Effects of small-scale fining on the phenolic composition and antioxidant activity of Merlot wine. In *Chemistry of Wine Flavor* Chapter 11 pp. 142-155.
- Ducasse, M.A., Canal-Llauberes, R.M., de Lumley, M., Williams, P., Souquet, J.M., Fulcrand, H., Doco, T., Cheynier, V. (2010): Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry* 118(2): 369-376.
- El Darra, N., Turk, M.F., Ducasse, M.A., Grimi, N., Maroun, R.G., Louka, N., Vorobiev, E. (2016): Changes in polyphenol profiles and color composition of freshly fermented model wine due to pulsed electric field, enzymes and thermovinification pretreatments. *Food Chemistry* 194: 944-950.
- 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.
- Ferreira, V., Carrascon, V., Bueno, M., Ugliano, M., Fernandez-Zurbano, P. (2015): Oxygen consumption by red wines. Part I: consumption rates, relationship with chemical composition, and role of SO₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(51): 10928-10937.
- Ferreira-Lima, N.E., Burin, V.M., Caliari, V., Bordignon-Luiz, M.T. (2016): Impact of pressing conditions on the phenolic composition, radical scavenging activity and glutathione content of

- Brazilian *Vitis vinifera* white wines and evolution during bottle ageing. *Food and Bioprocess Technology* 9(6): 944–957.
- Fernández-Pachón, M.S., Villaño, D., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M. (2004): Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta* 513(1): 113–118.
- Flamini, R., Mattivi, F., De Rosso, M., Arapitsas, P., Bavaresco, L. (2013): Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences* 14(10): 19651-19669.
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., Maciejewski, R. (2021): Antioxidants: classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials* 14(15): 4135.
- Francesca, N., Romano, R., Sannino, C., Le Grottaglie, L., Settanni, L., Moschetti, G. (2014): Evolution of microbiological and chemical parameters during red wine making with extended post-fermentation maceration. *International Journal of Food Microbiology* 171: 84–93.
- Frantzeskaki, A. (2017): Effect of different fermentation management practices on the composition of the phenolic fraction of Cabernet Franc wines produced in North-East Italy. Doctoral dissertation. Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Human Nutrition, Athens, Greece.
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., Cheynier, V. (2006): Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 57(3): 289-297.
- Gabriele, M., Gerardi, C., Lucejko, J.J., Longo, V., Pucci, L., Domenici, V. (2018): Effects of low sulfur dioxide concentrations on bioactive compounds and antioxidant properties of Aglianico red wine. *Food Chemistry* 245: 1105-1112.
- Gambutì, A., Strollo, D., Ugliano, M., Lecce, L., Moio, L. (2004): *trans*-Resveratrol, quercetin, (+)-catechin, and (–)-epicatechin content in south Italian monovarietal wines: relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(18): 5747-5751.
- Gancel, A.L., Feneuil, A., Acosta, O., Pérez, A.M., Vaillant, F. (2011): Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International* 44(7): 2243-2251.
- Garaguso, I., Nardini, M. (2015): Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. *Food Chemistry* 179: 336-342.
- García-Alonso, J., Ros, G., Vidal-Guevara, M.L., Periago, M.J. (2006): Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutrition Research* 26(7): 330-339.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A.J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V. (2008): Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control* 19(9): 835-841.
- Garrido, J., Borges, F. (2013): Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International* 54: 1844-1858.

Geana, E.I., Dinca, O.R., Ionete, R.E., Artem, V., Niculescu, V.C. (2015): Monitoring *trans*-resveratrol in grape berry skins during ripening and in corresponding wines by HPLC. *Food Technology and Biotechnology* 53(1): 73-80.

Generalić Mekinić, I., Skračić, Ž., Kokeza, A., Soldo, B., Ljubenković, I., Banović, M., Skroza, D. (2019): Effect of winemaking on phenolic profile, colour components and antioxidants in Crljenak kaštelanski (sin. Zinfandel, Primitivo, Tribidrag) wine. *Journal of Food Science and Technology* 56(4): 1841-1853.

Ghanem, C., Taillandier, P., Rizk, M., Rizk, Z., Nehme, N., Souchard, J.P., El Rayess, Y. (2017): Analysis of the impact of fining agents types, oenological tannins and mannoproteins and their concentrations on the phenolic composition of red wine. *LWT-Food Science and Technology* 83: 101-109.

Ghanem, C., Taillandier, P., Rizk, Z., Nehme, N., Souchard, J.P., El Rayess, Y. (2019): Evolution of polyphenols during Syrah grapes maceration: Time versus temperature effect. *Molecules* 24(15): 2845.

Gil, M., Kontoudakis, N., González, E., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., Zamora, F. (2012): Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet sauvignon and Tempranillo wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(32): 7988-8001.

Giovanelli, G., Brenna, O.V. (2007): Evolution of some phenolic components, carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties. *European Food Research and Technology* 225(1): 145-150.

Girard, B., Yuksel, D., Cliff, M.A., Delaquis, P., Reynolds, A.G. (2001): Vinification effects on the sensory, colour and GC profiles of Pinot noir wines from British Columbia. *Food Research International* 34(6): 483-499.

Gojković-Bukarica, Lj., Marković-Lipkovski, J., Heinle, H., Čirović, S., Rajković, J., Djokić, V., Zivanović, V., Bukarica, A., Novaković, R. (2019): The red wine polyphenol resveratrol induced relaxation of the isolated renal artery of diabetic rats: The role of potassium channels. *Journal of Functional Foods* 52: 266–275.

Gómez-Míguez, M., Heredia, F.J. (2004): Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(16): 5117-5123.

Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J.M., Martínez-Cutillas, A., Fernández-Fernández, J.I. (2001): Phenolic compounds and color stability of red wines: effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture* 52(3): 266–270.

González-Arenzana, L., Santamaría, R., Escribano-Viana, R., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R. (2020): Influence of the carbonic maceration winemaking method on the physicochemical, colour, aromatic and microbiological features of Tempranillo red wines. *Food Chemistry* 319(6): 126569.

González-Neves, G., Favre, G., Gil, G. (2014): Effect of fining on the colour and pigment composition of young red wines. *Food Chemistry* 157: 385–392.

- Gordillo, B., Chamizo-González, F., González-Miret, M.L., Heredia, F.J. (2021): Impact of alternative protein fining agents on the phenolic composition and color of Syrah red wines from warm climate. *Food Chemistry* 342: 128297.
- Gutiérrez, I.H., Lorenzo, E.S.P., Espinosa, A.V. (2005): Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry* 92(2): 269-283.
- Hanlin, R.L., Hrmova, M., Harbertson, J.F., Downey, M.O. (2010): Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16(1): 173-188.
- Halliwell, B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141(2): 312-322.
- Hernández, T., Estrella, I., Carlavilla, D., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V. (2006): Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analytica Chimica Acta* 563(1-2): 116-125.
- Hernández, T., Estrella, I., Pérez-Gordo, M., Alegría, E. G., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F., & Moreno-Arribas, M. V. (2007): Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(13): 5260-5266.
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M.J., Cacho, J., Ferreira, V. (2006): Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety: Effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation. *Food Chemistry* 98(2): 300–310.
- Hopfer, H., Buffon, P.A., Ebeler, S.E., Heymann, H. (2013): The combined effects of storage temperature and packaging on the sensory, chemical, and physical properties of a Cabernet Sauvignon wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(13): 3320-3334.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L. (2008): Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis* 21(8): 589-598.
- Iora, S. R.F., Maciel, G.M., Zielinski, A.A.F., da Silva, M.V., Pontes, P.V.D.A., Haminiuk, C.W.I., Granato, D. (2015): Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *International Journal of Food Science & Technology* 50(1): 62-69.
- Ivanova, V., Dörnyei, Á., Márk, L., Vojnoski, B., Stafilov, T., Stefova, M., Kilár, F. (2011a): Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions. *Food Chemistry* 124(1): 316-325.
- Ivanova, V., Stefova, M., Vojnoski, B., Dörnyei, Á., Márk, L., Dimovska, V., Stafilov, T., Kilár, F. (2011b): Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International* 44(9): 2851-2860.
- Ivanova, V., Vojnoski, B., Stefova, M. (2012): Effect of winemaking treatment and wine aging on phenolic content in Vranec wines. *Journal of Food Science and Technology* 49(2): 161-172.

- Ivanova-Petropulos, V., Durakova, S., Ricci, A., Parpinello, G.P., Versari, A. (2016): Extraction and evaluation of natural occurring bioactive compounds and change in antioxidant activity during red winemaking. *Journal of Food Science and Technology* 53(6): 2634–2643.
- Ivanova-Petropulos, V., Ricci, A., Nedelkovski, D., Dimovska, V., Parpinello, G.P., Versari, A. (2015): Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Food Chemistry* 171: 412–420.
- Jara-Palacios, M.J., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J. (2014): Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Research International* 66: 150-157.
- Jeremić, J., Ricci, A., Tacconi, G., Lagarde-Pascal, C., Parpinello, G.P., Versari, A. (2020): Monitoring Oxidative Status in Winemaking by Untargeted Linear Sweep Voltammetry. *Foods* 9(6): 728.
- Jordão, A.M., Simões, S., Correia, A.C., Gonçalves, F.J. (2011): Antioxidant activity evolution during Portuguese red wine vinification and their relation with the proanthocyanidin and anthocyanin composition. *Journal of Food Processing and Preservation* 36(4): 298–309.
- Jung, H.J., Hwang, I.A., Sung, W.S., Kang, H., Kang, B.S., Seu, Y.B., Lee, D.G. (2005): Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Archives of Pharmacal Research* 28(5): 557-560.
- Karamanidou, A., Kallithraka, S., Hatzidimitriou, E. (2011): Fining of red wines: effects on their analytical and sensory parameters. *Oeno One* 45(1): 47-60.
- Katalinić, V., Mozina, S.S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P. and Boban, M. (2010): Polyphenolic Profile, Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity of Grape Skin Extracts of 14 *Vitis vinifera* Varieties Grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry* 119: 715-723.
- Kazazić, S. (2004): Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 55: 279-290.
- Kelebek, H., Canbas Selli, S., Saucier, C., Jourdes, M., Glories, Y. (2006): Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Boğazkere and Öküzgözü. *Journal of Food Engineering* 77(4): 1012-1017.
- Keller, M. (2004): Grape ripening and determination of grape maturity. *Proceedings of the 33rd Annual New York Wine Industry Workshop. CSIRO INQUIRIES: Geneva, New York, pp.119-123.*
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L. (2000): Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55(1): 77–85.
- Kennedy, J.A., Robinson, S.P., Walker, M. (2007): *Grape and Wine Tannins: Production, Perfection, Perception. Practical Winery and Vineyard, pp. 57-67.*
- Kilmartin, P.A., Zou, H., Waterhouse, A.L. (2001): A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(4): 1957-1965.

- Kocabey, N., Yilmaztekin, M., Hayaloglu, A.A. (2016): Effect of maceration duration on physicochemical characteristics, organic acid, phenolic compounds and antioxidant activity of red wine from *Vitis vinifera* L. Karaoglan. *Journal of Food Science and Technology* 53(9): 3557–3565.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., De Freitas, V., Zamora, F. (2011): Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chemistry* 124(3): 767-774.
- Kovač, V., Alonso, E., Bourzeix, M., Revilla, E. (1992): Effects of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1953–1957.
- Kovač, V., Pekić, B. (1991): Proanthocyanidols from grape and wine. *Contemporary Agriculture* 39: 5-17.
- Koyama, K., Goto-Yamamoto, N., Hashizume, K. (2007): Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71(4): 958-965.
- Kurt-Celebi, A., Colak, N., Hayirlioglu-Ayaz, S., Kostadinović Veličkowska, S., Ilieva, F., Esatbeyoglu, T., Ayaz, F. A. (2020): Accumulation of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity during Berry Development in Black ‘Isabel’ Grape (*Vitis vinifera* L. x *Vitis labrusca* L.). *Molecules* 25(17): 3845.
- Ky, I., Lorrain, B., Jourdes, M., Pasquier, G., Fermaud, M., Gény, L., Rey, P., Donesche, B., Teissedre, P.L. (2012): Assessment of grey mould (*Botrytis cinerea*) impact on phenolic and sensory quality of Bordeaux grapes, musts and wines for two consecutive vintages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 18(2): 215-226.
- Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., Teissedre, P.L. (2014): Wine by-products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules* 19(1): 482-506.
- Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., Shia, X. (2003): Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309(4): 1017–1026.
- Lerno, L., Reichwage, M., Panprivech, S., Ponangi, R., Hearne, L., Oberholster, A., Block, D.E. (2017): Chemical gradients in pilot-scale Cabernet sauvignon fermentations and their effect on phenolic extraction. *American Journal of Enology and Viticulture* 68(4): 401-411.
- Lingua, M.S., Fabani, M.P., Wunderlin, D.A., Baroni, M.V. (2016): From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chemistry* 208: 228–238.
- López-Vélez, M., Martínez-Martínez, F., Del Valle-Ribes, C. (2003): The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43(3): 233–244.
- Ma, L., Watrelot, A.A., Addison, B., Waterhouse, A.L. (2018): Condensed tannin reacts with SO₂ during wine aging, yielding flavan-3-ol sulfonates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(35): 9259-9268.

- Madsen, M.G., Edwards, N.K., Petersen, M.A., Mokwena, L., Swiegers, J.H., Arneborg, N. (2017): Influence of *Oenococcus oeni* and *Brettanomyces bruxellensis* on hydroxycinnamic acids and volatile phenols of aged wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 68(1): 23-29.
- Makhotkina, O., Kilmartin, P.A. (2009): Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 633(1): 165-174.
- Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Preiner, D., Jeromel, A., Patz, C.D., Dietrich, H. (2009): Anthocyanin profile and antioxidative capacity of some autochthonous Croatian red wines. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7(1): 48-51.
- Malletroit, V., Guinard, J.X., Kunkee, R.E., Lewis, M.J. (1991): Effect of pasteurization on microbiological and sensory quality of white grape juice and wine. *Journal of Food Processing and Preservation* 15(1): 19-29.
- Martínez-Pinilla, O., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B. (2012): Sensory profiling and changes in colour and phenolic composition produced by malolactic fermentation in red minority varieties. *Food Research International* 46(1): 286-293.
- McCord, J. (2003): Application of toasted oak and micro-oxygenation to ageing of Cabernet sauvignon wines. *Australian and New Zealand Grapegrower Winemaker* 7: 43-51.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F. (2005): Yeast interactions with anthocyanins during red wine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 56: 104-109.
- Meini, M.R., Cabezudo, I., Boschetti, C.E., Romanini, D. (2019): Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process. *Food Chemistry* 283: 257-264.
- Melo, P.S., Massarioli, A.P., Denny, C., dos Santos, L.F., Franchin, M., Pereira, G.E., Ferreira de Souza Vieira, T.M., Rosalen, P.L., de Alencar, S.M. (2015): Winery by-products: extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. *Food Chemistry* 181: 160-169.
- Messina, C.M., Manuguerra, S., Catalano, G., Arena, R., Cocchi, M., Morghese, M., Montenegro, L., Santulli, A. (2021): Green biotechnology for valorisation of residual biomasses in nutraceutical sector: Characterization and extraction of bioactive compounds from grape pomace and evaluation of the protective effects in vitro. *Natural Product Research* 35(2): 331-336.
- Mihnea, M., González-San José, M.L., Velasco-López, M.T., Rivero-Pérez, M.D., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S. (2016): Effect of pre-fermentative strategies on the composition of Prieto Picudo (*Vitis vinífera*) red wines. *Open Access Library Journal* 3: e3197.
- Miller, K.V., Noguera, R., Beaver, J., Medina-Plaza, C., Oberholster, A., Block, D.E. (2019): A mechanistic model for the extraction of phenolics from grapes during red wine fermentation. *Molecules* 24(7): 1275.
- Milosavljević, M., Jović, S. (1999): *Grožđe i vino*. Avena, Beograd.
- Moine-Ledoux, V., Dubourdieu, D. (2002): Role of yeast mannoproteins with regard to tartaric stabilization of wines. *Bulletin de l'OIV (France)* 75(857-858): 471-482.

- Moldovan, M., Bogdan, C., Sonia, I., Roman, C., Oniga, I., Benedec, D. (2020): Phenolic content and antioxidant capacity of pomace and canes extracts of some *Vitis Vinifera* varieties cultivated in Romania. *Farmacia* 68(1): 15–21.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., Suárez, J.A. (2003): Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(14): 4084-4088.
- Moreno, A., Castro, M., Falqué, E. (2008): Evolution of *trans*- and *cis*-resveratrol content in red grapes (*Vitis vinifera* L. cv Mencía, Albarello and Merenzao) during ripening. *European Food Research and Technology* 227(3): 667-674.
- Moreno-Arribas, M.V., Carmen Polo, M. (2009): *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, New York, pp. 161-163.
- Morris, J.R., Main, G.L. (1995): Fining agents for wine. Proceeding 14th of Annual NM conference pp. 116.
- Muñoz-Bernal, Ó.A., Coria-Oliveros, A.J., Vazquez-Flores, A.A., de la Rosa, L.A., Núñez-Gastélum, J.A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J.F., Alvarez-Parrilla, E. (2020): Evolution of phenolic content, antioxidant capacity and phenolic profile during cold pre-fermentative maceration and subsequent fermentation of Cabernet sauvignon red wine. *South African Journal of Enology and Viticulture* 41(1): 72-82.
- Netzel, M., Strass, G., Bitsch, I., Könitz, R., Christmann, M., Bitsch, R. (2003): Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. *Journal of Food Engineering* 56(2): 223-228.
- Nikolantonaki, M., Waterhouse, A.L. (2012): A method to quantify quinone reaction rates with wine relevant nucleophiles: A key to the understanding of oxidative loss of varietal thiols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(34): 8484-8491.
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Cáceres-Mella, A., Toledo-Araya, H., López-Rivera, A. (2013): Phenolic composition of skins from four Carmenet grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT-Food Science and Technology* 54(2): 404-413.
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Zamora-Marín, F., Ricardo-da Silva, J.M., Laureano, O. (2010): Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(6): 3591-3599.
- Ó-Marques, João do., Reguinga, R., Laureano, O., Ricardo-da-Silva, J.M. (2005): Changes in grape seeds, skin and pulp condensed tannins during berry ripening: effect of fruit pruning. *Ciência e Técnica Vitivinícola* 20(1): 35–52.
- Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M.L. (2012): Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. *LWT-Food Science and Technology* 48(1): 1-8.
- Oszmianski, J., Sapis, J.C., Mcheix, J.J. (1985): Changes in grape seed phenols as affected by enzymic and chemical oxidation in vitro. *Journal of Food Science* 50(5): 1505-1506.

- Özcan, M.M., Al Juhaimi, F., Gülcü, M., Uslu, N., Geçgel, Ü., Ghafoor, K., Dursun, N. (2017): Effect of harvest time on physico-chemical properties and bioactive compounds of pulp and seeds of grape varieties. *Journal of Food Science and Technology* 54(8): 2230-2240.
- Pace, C., Giacosa, S., Torchio, F., Río Segade, S., Cagnasso, E., Rolle, L. (2014): Extraction kinetics of anthocyanins from skin to pulp during carbonic maceration of winegrape berries with different ripeness levels. *Food Chemistry* 165: 77–84.
- Papadopoulou, C., Soulti, K., Roussis, I.G. (2005): Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology* 43(1): 41–46.
- Parley, A. (1997): The effect of pre-fermentation enzyme maceration on extraction and colour stability in Pinot noir wine. Doctoral dissertation. Lincoln University, New Zealand.
- Pateraki, C., Paramithiotis, S., Doulgeraki, A.I., Kallithraka, S., Kotseridis, Y., Drosinos, E.H. (2014): Effect of sulfur dioxide addition in wild yeast population dynamics and polyphenolic composition during spontaneous red wine fermentation from *Vitis vinifera* cultivar Agiorgitiko. *European Food Research and Technology* 239(6): 1067-1075.
- Peng, Z., Duncan, B., Pocock, K.F., Sefton, M.A. (1998): The effect of ascorbic acid on oxidative browning of white wines and model wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4(3): 127-135.
- Peña-Neira, A., Dueñas, M., Duarte, A., Hernandez, T., Estrella, I., Loyola, E. (2004): Effects of ripening stages and of plant vegetative vigor on the phenolic composition of grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet sauvignon in the Maipo Valley (Chile). *Vitis* 43(2): 51–57.
- Pellegrini, N., Simonetti, P., Gardana, C., Brenna, O., Brighenti, F., Pietta, P. (2000): Polyphenol content and total antioxidant activity of Vini Novelli (young red wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3): 732-735.
- Pérez-Magariño, S., González-San José, M.L. (2005): Effect of ripening stage of grapes on the low molecular weight phenolic compounds of red wines. *European Food Research and Technology* 220(5): 597-606.
- Peri, P., Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Ozcelik, B. (2015): Investigating the effect of aging on the phenolic content, antioxidant activity and anthocyanins in Turkish wines. *Journal of Food Processing and Preservation* 39(6): 1845-1853.
- Petrović, A. (2011): Uticaj načina prerade i vinifikacije na sadržaj resveratrola u vinu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Republika Srbija.
- Petrović, A. (2022): Praktikum za tehnologiju vina. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Plavša, T., Jurinjak, N., Antunović, D., Peršurić, Đ., Kovačević Ganić, K. (2012): The influence of skin maceration time on the phenolic composition and antioxidant activity of red wine Teran (*Vitis vinifera* L.). *Food Technology and Biotechnology* 50(2): 152–158.
- Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M., Watson, B.T. (1995): Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 187-194.

- Quijada-Morin, N., Garcia, F., Lambert, K., Walker, A.S., Tiers, L., Viaud, M., Sauvage, F.X., Hirtz, C., Saucier, C. (2018): Strain effect on extracellular laccase activities from *Botrytis cinerea*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 24(2): 241-251.
- Radovanović, B., Radovanović, A., Souquet, J.M. (2010): Phenolic profile and free radical-scavenging activity of Cabernet sauvignon wines of different geographical origins from the Balkan region. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(14): 2455–2461.
- Raičević, D., Božinović, Z., Petkov, M., Ivanova Petropulos, V., Kodžulović, V., Mugoša, M., Šućur, S., Maraš, V. (2017): Polyphenolic content and sensory profile of Montenegrin Vranac wines produced with different oenological products and maceration. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 36(2): 229–238.
- Ramos, T., Fleuriet, A., Rascalou, M., Macheix, J.J. (1993): The effect of anaerobic metabolism of grape berry skins on phenolic compounds. *American Journal of Enology and Viticulture* 44(1): 13-16.
- Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J.M., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. (2002): Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(25): 7432-7437.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10): 1231-1237.
- Revilla, I., González-SanJosé, M.L. (2003): Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivative levels. *Food Chemistry* 80(2): 205-214.
- Revilla, E., Ryan, J.M. (2000): Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A* 881(1-2): 461-469.
- Ribeiro, L.F., Ribani, R.H., Francisco, T.M.G., Soares, A.A., Pontarolo, R., Haminiuk, C.W.I. (2015): Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *Journal of Chromatography B* 1007: 72-80.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006a): *Handbook of Enology: The chemistry of wine stabilization and treatments*. Vol. 2, 2nd edition. John Wiley & Sons, Chichester, England
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006b): *Handbook of Enology: The microbiology of wine and vinifications*. Vol. 1., 2nd edition. John Wiley & Sons, Chichester, England
- Rinaldi, A., Errichiello, F., Moio, L. (2021): Alternative fining of Sangiovese wine: effect on phenolic substances and sensory characteristics. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 27(1): 128–137.

- Rinaldi, A., Louazil, P., Iturmendi, N., Moine, V., Moio, L. (2020): Effect of marc pressing and geographical area on Sangiovese wine quality. *LTW- Food Science and Technology* 118(4): 108728.
- Río Segade, S., Pace, C., Torchio, F., Giacosa, S., Gerbi, V., Rolle, L. (2015): Impact of maceration enzymes on skin softening and relationship with anthocyanin extraction in wine grapes with different anthocyanin profiles. *Food Research International* 71: 50–57.
- Rizzon, L.A., Miele, A., Meneguzzo, J., Zanuz, M.C. (1999): Efeito de três processos de vinificação sobre a composição química e a qualidade do vinho Cabernet Franc. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34(7): 1285-1293.
- Robinson, A.L., Adams, D.O., Boss, P.K., Heymann, H., Solomon, P.S., Trengove, R.D. (2012): Influence of Geographic Origin on the Sensory Characteristics and Wine Composition of *Vitis vinifera* cv. Cabernet sauvignon Wines from Australia. *American Journal of Enology and Viticulture* 63: 467-476.
- Rockenbach, I.I., Rodrigues, E., Valdemiro Gonzaga, L., Caliari, V., Genovese, M.I., de Souza Schmidt Gonçalves, A.E., Fett, R. (2011): Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry* 127(1): 174-179.
- Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J.I., Ros-García, J.M., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E. (2008): Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *International Journal of Food Science and Technology* 43(7): 1295–1305.
- Romero-Cascales, I., Ros-García, J.M., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E. (2012): The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chemistry* 130(3): 626-631.
- Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Andrés-Lacueva, C., de la Torre-Boronat, M.C. (2001): Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(1): 210-215.
- Sacchi, K.L., Bisson, L.F., Adams, D.O. (2005): A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 56(3): 197-206.
- Salmon, J.M., Fornairon- Bonfond, C., Mazauric, J.P. (2002): Interactions between wine lees and polyphenols: influence on oxygen consumption capacity during simulation of wine aging. *Journal of Food Science* 67(5): 1604-1609.
- Setford, P.C., Jeffery, D.W., Grbin, P.R., Muhlack, R.A. (2017): Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. *Trends in Food Science & Technology* 69: 106-117.
- Setford, P.C., Jeffery, D.W., Grbin, P.R., Muhlack, R.A. (2019a): Mass transfer of anthocyanins during extraction from pre-fermentative grape solids under simulated fermentation conditions: Effect of convective conditions. *Molecules* 24(1): 73.

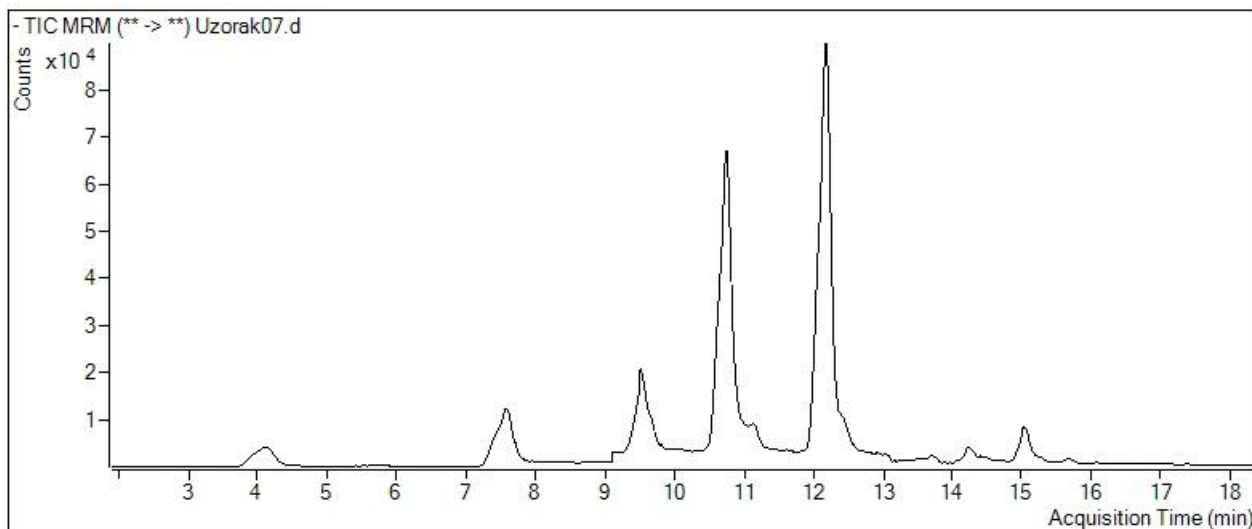
- Setford, P.C., Jeffery, D.W., Grbin, P.R., Muhlack, R.A. (2019b): Mathematical modelling of anthocyanin mass transfer to predict extraction in simulated red wine fermentation scenarios. *Food Research International* 121: 705–713.
- Solari-Godiño, A., Lindo-Rojas, I., Pandia-Estrada, S. (2017): Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of two grapes residues (*Vitis vinifera*) of varieties dried: Quebranta (red) and Torontel (white). *Cogent Food & Agriculture* 3(1): 1361599.
- Soto-Vázquez, E., Río Segade, S., Orriols Fernández, I. (2010): Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. *European Food Research and Technology* 231(5): 789-802.
- Sparrow, A.M., Smart, R.E., Damberg, R.G., Close, D.C. (2016): Skin particle size affects the phenolic attributes of Pinot noir wine: Proof of concept. *American Journal of Enology and Viticulture* 67(1): 29-37.
- Steel, C.C., Blackman, J.W., Schmidtke, L.M. (2013): Grapevine bunch rots: Impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(22): 5189–5206.
- Sun, B., Neves, A.C., Fernandes, T.A., Fernandes, A.L., Mateus, N., De Freitas, V., Leandro, C., Spranger, M.I. (2011): Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(12): 6550–6557.
- Sun, B., Spranger, I., Roque-do-Vale, F., Leandro, C., Belchior, P. (2001): Effect of different winemaking technologies on phenolic composition in Tinta Miúda red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(12): 5809-5816.
- Tahmaz, H., Söylemezoğlu, G. (2017): Effects of vinification techniques combined with UV- C Irradiation on phenolic contents of red wines. *Journal of Food Science* 82(6): 1351-1356.
- Tanner, H., Brunner, H.R. (1979): *Gentranke-Analytik*. Verlag Heller-Chemie und Verwaltungsgesellschaft mbH, Deutschland.
- Tao, J., Dykes, S.I., Kilmartin, P.A. (2007): Effect of SO₂ concentration on polyphenol development during red wine micro-oxygenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(15): 6104-6109.
- Threlfall, R. T., Morris, J. R., Mauromoustakos, A. (1999): Effects of fining agents on *trans*-resveratrol concentration in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 5(1): 22-26.
- Topalović, A., Mikulić-Petkovsek, M. (2010): Changes in sugars, organic acids and phenolics of grape berries of cultivar Cardinal during ripening. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 8 (3-4): 223-227.
- Vicens, A., Fournand, D., Williams, P., Sidhoum, L., Moutounet, M., Doco, T. (2009): Changes in Polysaccharide and Protein Composition of Cell Walls in Grape Berry Skin (Cv. Shiraz) during Ripening and Over-Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(7): 2955–2960.

- Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J.M., Fulcrand, H., Cheynier, V. (2002): Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(8): 2261-2266.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. (2006): Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chemistry* 95(3): 394–404.
- Vrhovsek, U., Vanzo, A., Nemanic, J. (2002): Effect of red wine maceration techniques on oligomeric and polymeric proanthocyanidins in wine, cv. Blaufrankisch. *Vitis* 41(1): 47-52.
- Wang, S., Amigo-Benavent, M., Mateos, R., Bravo, L., Sarriá, B. (2017): Effects of in vitro digestion and storage on the phenolic content and antioxidant capacity of a red grape pomace. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 68(2): 188-200.
- Wang, X., Tong, H., Chen, F., Gangemi, J.D. (2010): Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. *Food Chemistry* 123(4): 1156-1162.
- Waterhouse, A.L., Sacks, G.L., Jeffery, D.W. (2016): *Understanding Wine Chemistry*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 140-286.
- Wojdyło, A., Samoticha, J., Chmielewska, J. (2020): The influence of different strains of *Oenococcus oeni* malolactic bacteria on profile of organic acids and phenolic compounds of red wine cultivars Rondo and Regent growing in a cold region. *Journal of Food Science* 85(4): 1070-1081.
- Wojdyło, A., Samoticha, J., Chmielewska, J. (2021): Effect of different pre-treatment maceration techniques on the content of phenolic compounds and color of Dornfelder wines elaborated in cold climate. *Food Chemistry* 339: 127888.
- Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J., Li, H.B. (2010): Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences* 11(2): 622-646.
- Yakushiji, H., Sakuraib, N., Morinaga, K. (2001): Changes in cell-wall polysaccharides from the mesocarp of grape berries during veraison. *Physiologia Plantarum* 111(2): 188–195.
- Yokotsuka, K., Sato, M., Ueno, N., Singleton, V.L. (2000): Colour and sensory characteristics of Merlot red wines caused by prolonged pomace contact. *Journal of Wine Research* 11(1): 7-18.
- Zanoni, B., Siliani, S., Canuti, V., Rosi, I., Bertuccioli, M. (2010): A kinetic study on extraction and transformation phenomena of phenolic compounds during red wine fermentation. *International Journal of Food Science and Technology* 45(10): 2080-2088.
- Zhang, P., Ma, W., Meng, Y., Zhang, Y., Jin, G., Fang, Z. (2021): Wine phenolic profile altered by yeast: Mechanisms and influences. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20: 3579–3619.
- Zhou, Y., Su, P., Yin, H., Dong, Z., Yang, L., Yuan, C. (2019): Effects of different harvest times on the maturity of polyphenols in two red wine grape cultivars (*Vitis vinifera L.*) in Qingtongxia (China). *South African Journal of Enology and Viticulture* 40(2): 120–131.
- Zinnai, A., Venturi, F., Sanmartin, C., Quartacci, M.F., Andrich, G. (2013): Chemical and laccase catalysed oxidation of gallic acid: Determination of kinetic parameters. *Research Journal of Biotechnology* 8(7): 62-65.

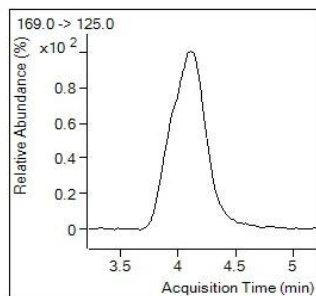
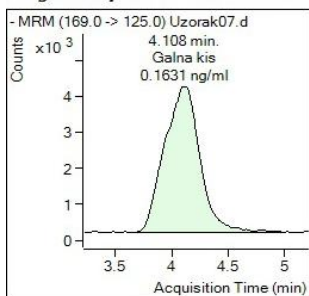
Žunić, D., Ristić, M., Radojević, I. (2009): Atlas sorti vinove loze. Centar za vinogradarstvo i vinarstvo, Niš.

8. PRILOG

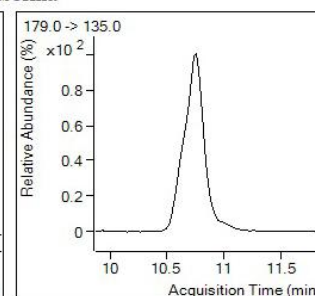
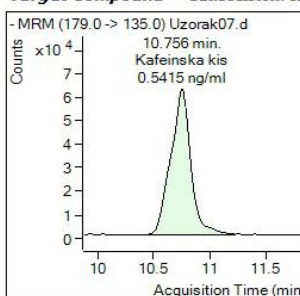
Hromatogrami pojedinih fenolnih jedinjenja dobijeni LC-MS/MS tehnikom



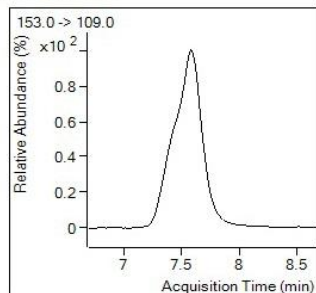
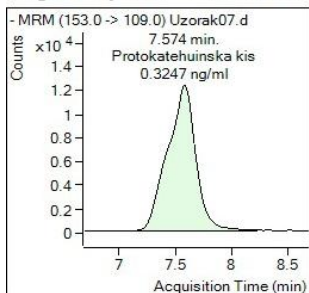
Target Compound Galna kiselina



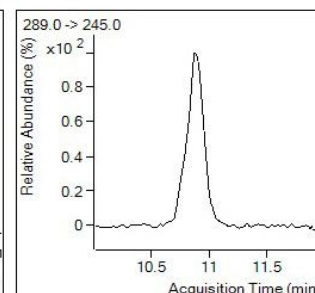
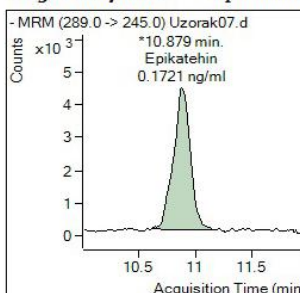
Target Compound Kafeinska kiselina



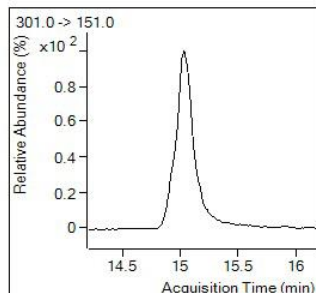
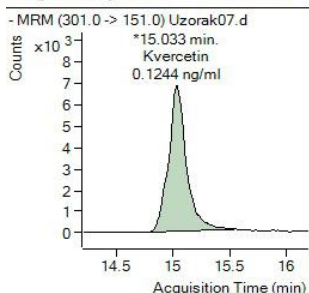
Target Compound Protokatehuinska kiselina



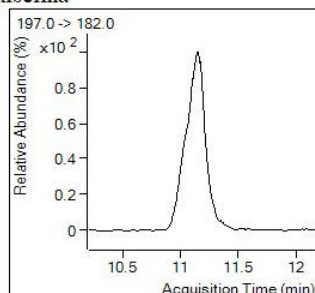
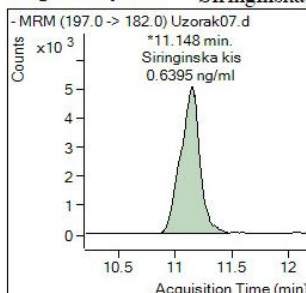
Target Compound Epikatehin



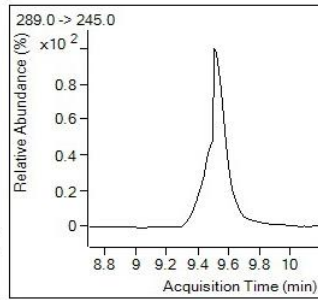
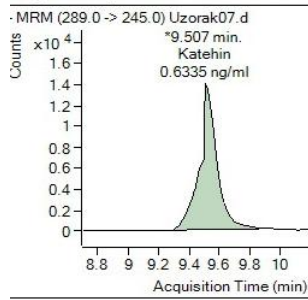
Target Compound Kvercetin



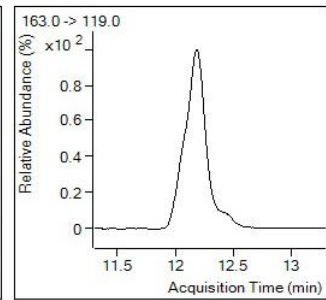
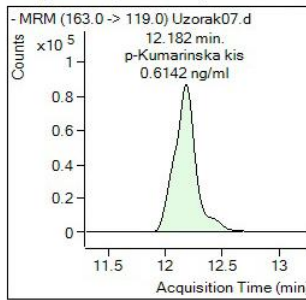
Target Compound Siringinska kiselina



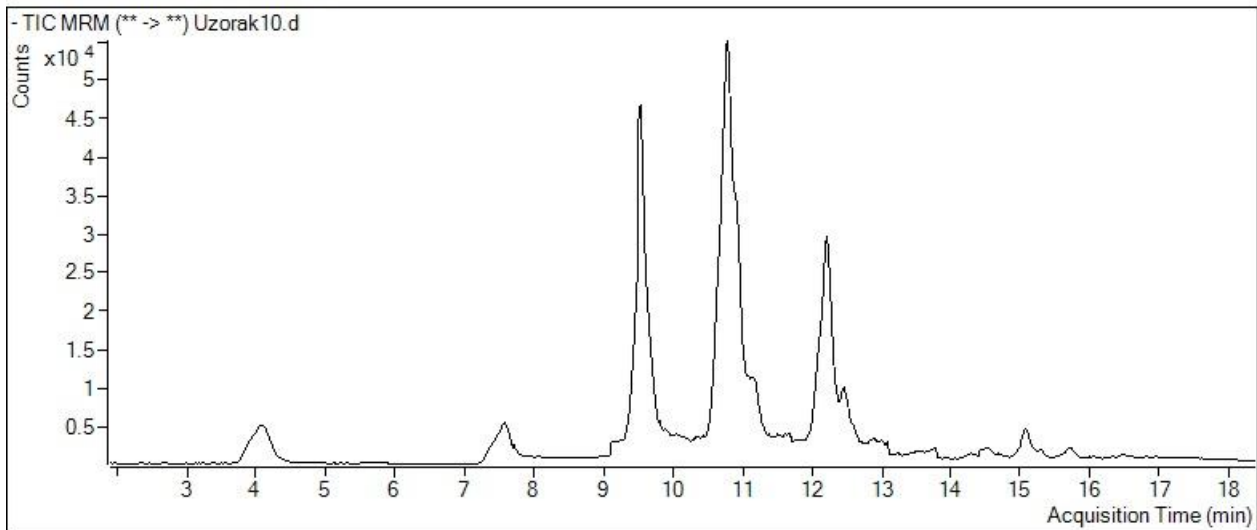
Target Compound Katehin



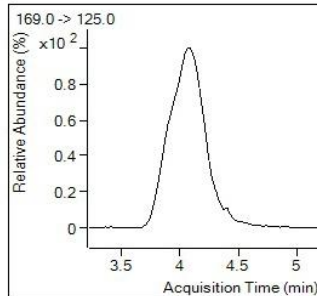
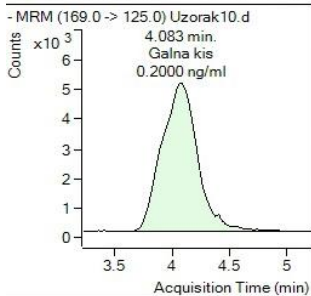
Target Compound p-kumarinska kiselina



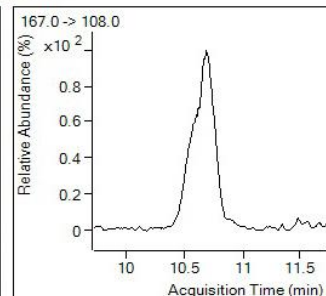
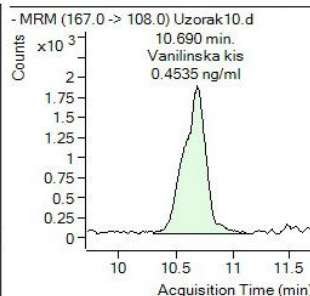
Sample Chromatogram



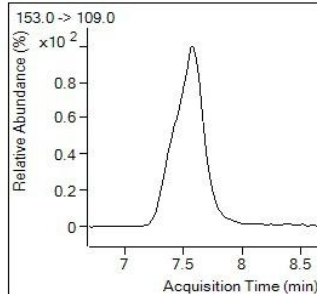
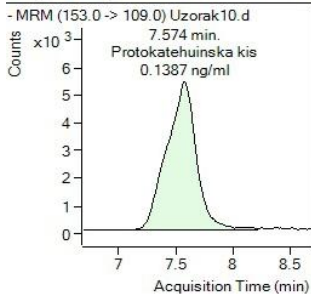
Target Compound Galna kiselina



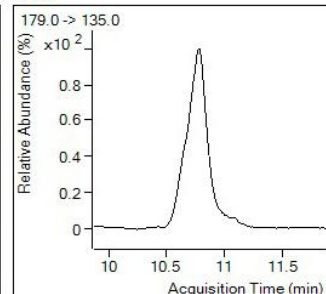
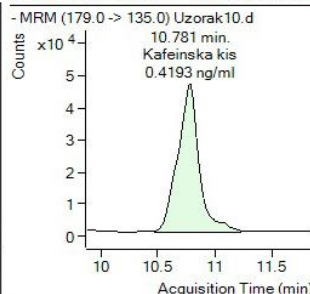
Target Compound Vanilinska kiselina



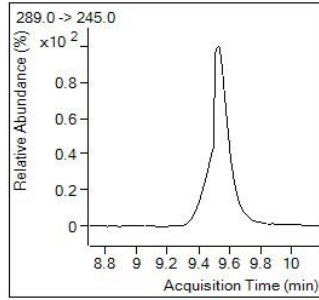
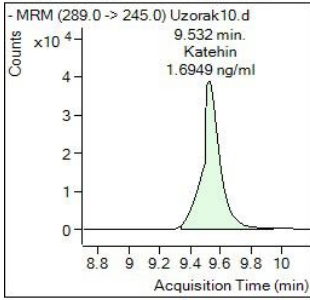
Target Compound Protokatehuinska kiselina



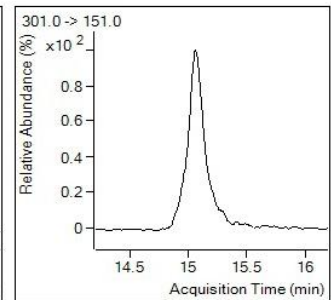
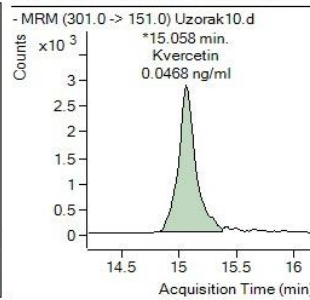
Target Compound Kafeinska kiselina



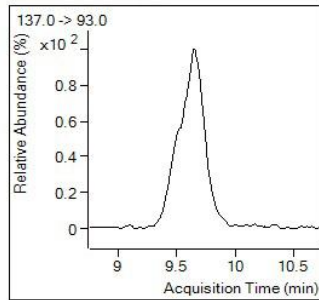
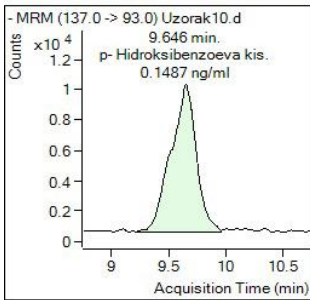
Target Compound Katehin



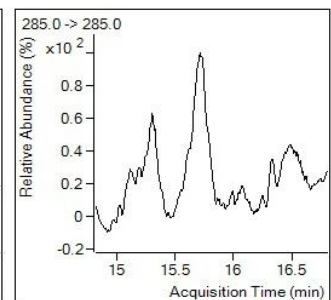
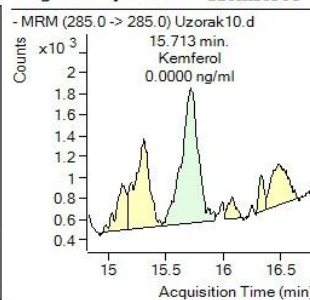
Target Compound Kvercetin



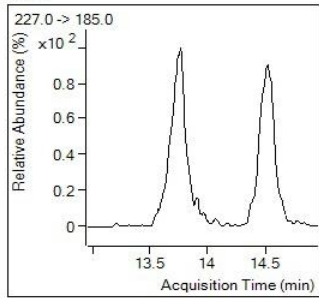
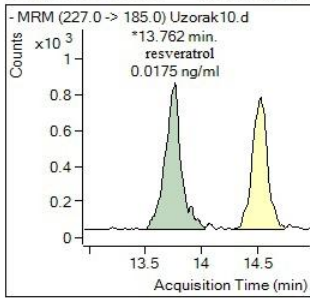
Target Compound p-hidroksibenzoeva kiselina



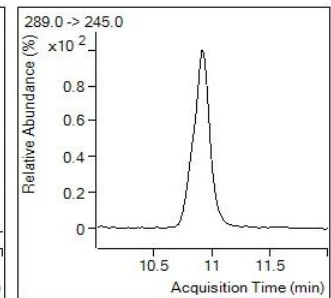
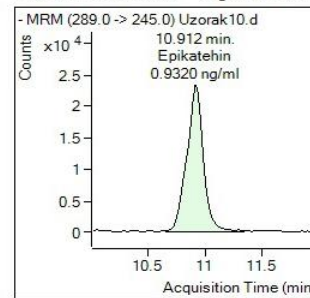
Target Compound Kenferol



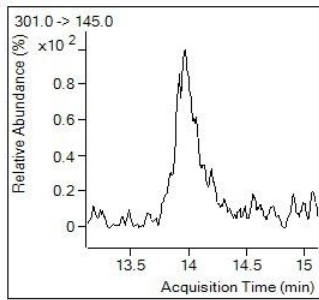
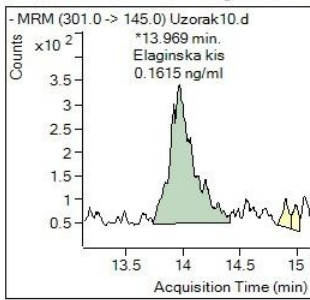
Target Compound trans-resveratrol



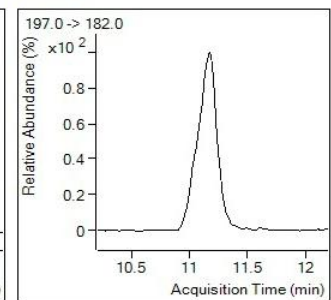
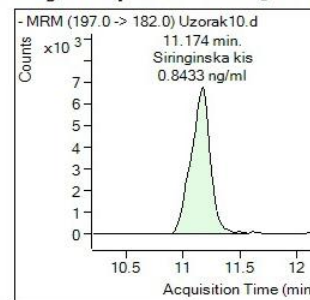
Target Compound Epikatehin



Target Compound Elaginska kiselina



Target Compound Siringinska kiselina



BIOGRAFIJA AUTORA

Kandidatkinja Nikolina Lisov rođena je 02.03.1990. godine u Trebinju, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina. Osnovno i srednje obrazovanje (Gimnazija, opšti smer) stekla je u Bileći. Poljoprivredni fakultet, studijski program Prehrambena tehnologija, modul Tehnologija konzervisanja i vrenja, upisala je školske 2008/09. godine. Osnovne akademske studije završila je u septembru 2012. godine, sa prosečnom ocenom 9,30 (devet, 30/100), odbranivši završni rad pod naslovom "Enzimi i enzimski preparati u enologiji" sa ocenom 10 (deset).

Školske 2012/13. godine upisala je master akademske studije studijski program Prehrambena tehnologija, koje je završila sa prosečnom ocenom 9,00 (devet, 00/100). U novembru 2013. godine odbranila je master rad pod nazivom "Karakteristike proizvodnje i osobine vina proizvedenih po barik postupku", sa ocenom 10 (deset).

Doktorske akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Prehrambena tehnologija upisala je školske 2014/15. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9,43 (devet, 43/100). U periodu od aprila 2016. do maja 2018. godine bila je angažovana kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na projektu „Razvoj tehnologije proizvodnje crvenog vina i dijetetskih proizvoda iz vina bogatih biološki aktivnim fenolima sa kardioprotektivnim dejstvima“ (evidencioni br. projekta TR 31020), a od maja 2018. godine bila je angažovana i kao saradnik na istom projektu u zvanju istraživač pripravnik na period od 3 godine. Izabrana je u zvanje istraživač saradnik na sednici održanoj 24.09.2020. (300/ 9-5) od strane Izbornog veća Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na period od četiri godine. Član je međunarodnog projekta COST Action CA 17111 INTEGRAPPE (Data integration to maximise the power of omics for grapevine improvement).

Kandidatkinja je samostalno ili u saradnji sa drugim autorima do sada objavila ukupno 37 radova od čega 1 rad u Međunarodnom časopisu (kategorija M23), 1 rad u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (kategorija M24), 33 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima (kategorije M33 i M34), 1 saopštenje na nacionalnom naučnom skupu (kategorija M64) i 1 u nacionalnom časopisu (kategorija M51).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Nikolina Lisov

Broj indeksa TH 14/41

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Dinamika sadržaja biološki aktivnih fenolnih jedinjenja grožđa sorte Cabernet Sauvignon tokom fenofaza sazrevanja, primarne prerade, vinifikacije i uticaj na antioksidativni kapacitet vina

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Nikolina Lisov

Broj indeksa TH 14/41

Studijski program Prehrambena tehnologija

Naslov rada Dinamika sadržaja biološki aktivnih fenolnih jedinjenja grožđa sorte Cabernet Sauvignon tokom fenofaza sazrevanja, primarne prerade, vinifikacije i uticaj na antioksidativni kapacitet vina

Mentor Dr Aleksandar Petrović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Dinamika sadržaja biološki aktivnih fenolnih jedinjenja grožđa sorte Cabernet Sauvignon tokom fenofaza sazrevanja, primarne prerade, vinifikacije i uticaj na antioksidativni kapacitet vina

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.