Utjecaj koncentriranja membranskim procesom reverzne osmoze na tvari boje vina Cabernet Sauvignon

Korbar, Suzana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:817845

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Suzana Korbar

UTJECAJ KONCENTRIRANJA MEMBRANSKIM PROCESOM REVERZNE OSMOZE NA TVARI BOJE VINA CABERNET SAUVIGNON

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija vina
Tema rada je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 24. lipnja 2020. godine.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Anita Pichler*
Pomoć pri izradi: *Ivana Ivić,* mag. ing.

Utjecaj koncentriranja membranskim procesom reverzne osmoze na tvari boje vina Cabernet sauvignon

Suzana Korbar, 0113141697

Sažetak:
Utjecaj koncentriranja crnog vina Cabernet Sauvignon procesom reverzne osmoze te utjecaj na zadržavanje tvari boje pri četiri različita tlaka (25, 35, 45, 55 bara) i dva temperaturna režima (s primjenom i bez primjene hlađenja) cilj je provedbe ovog diplomskog rada. Postupak koncentriranja proveden je na uređaju za reverznu osmozu Lab Unit 20 s kompozitnim membranama Alfa Laval-RO tipa RO98pHt M20 složenih u pločasti modul. Profil tvari boje vina detektiran je spektrofotometrijskim analizama te metodom visoko tekućinske kromatografije (HPLC). Dobiveni rezultati pokazuju visoku učinkovitost postupka koncentriranja vina tehnologijom reverzne osmoze. Optimalni parametri zadržavanja antocijana, flavonoida, fenolnih kiselina i ostalih vrlo osjetljivih sastojaka vina postignuti su pri procesnom tlaka od 55 bara s primjenom hlađenja. Suprotno tome, najveći gubitak kako pojedinačnih tako i ukupnih polifenolnih komponenti zamijećen je pri tlaku 45 i 55 bara bez mogućnosti hlađenja sustava.

Ključne riječi: crno vino Cabernet Sauvignon, koncentriranje, reverzna osmoza, tvari boje

Rad sadrži: 65 stranica
21 sliku
2 tablice
0 priloga
54 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	prof. dr. sc. *Mirela Kopjar*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Anita Pichler*	član-mentor
3.	prof. dr. sc. *Nela Nedić Tiban*	član
4.	doc. dr. sc. *Ante Lončarić*	zamjena člana

Datum obrane: 28. rujna 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technology
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program of Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Wine technology
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII held on June 24, 2020
Mentor: *Anita Pichler*, PhD, associate prof.
Technical assistance: *Ivana Ivić,* mag. ing.

The influence of concentration with a membrane process of reverse osmosis on the colour compounds of Cabernet Sauvignon wine

Suzana Korbar, 0113141697

Summary:
Reverse osmosis (RO) concentration and influence on colour compounds of red wine Cabernet Sauvignon, which is exceptionally rich source of polyphenols and has a high level of antioxidative activity, at four different pressure levels (25, 35, 45, 55 bar) and two temperature regimes (with and without application of cooling) is the aim of this diploma paper. The procedure of concentration has been conducted on the apparatus for reverse osmosis Lab Unit 20 with composite membranes Alfa Laval-RO type RO98pHt M20 arranged in the laminated module. The profile of the wine pigment is detected through spectrophotometric analyses and high-performance liquid chromatography (HPCL). The results display a high efficiency of the wine concentration procedure using the technology of reverse osmosis. Optimum parameters of containing anthocyanins, flavonoids, phenol acids, and other highly sensitive wine components are achieved at the pressure of 55 bars, with cooling. Contrary to that, the biggest loss of both individual, as well as total polyphenol components, is noticed at the pressure of 45 and 55 bars without the application of the cooling system.

Key words: red wine Cabernet Sauvignon, concentration, reverse osmosis, colour compounds

Thesis contains: 65 pages
21 figures
2 tables
0 supplements
54 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Mirela Kopjar*, PhD, prof. — chair person
2. *Anita Pichler*, PhD, associate prof. — supervisor
3. *Nela Nedić Tiban*, PhD, prof. — member
4. *Ante Lončarić*, PhD, assistant prof. — stand-in

Defense date: September 28, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Pichler koja je svojim konstruktivnim savjetima doprinijela kreiranju ovog diplomskog rada. Hvala na pomoći i podršci!

Najveće zasluge za pruženo razumijevanje, pažnju i potporu tijekom procesa studiranja pripisujem mojim dragim roditeljima, cijeloj obitelji i prijateljima. Neizmjerno sam im zahvalna na svoj pruženoj pažnji!

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 5

2.1 TEHNOLOGIJA MEMBRANSKE FILTRACIJE 6

2.1.1 Svojstva membrana 8

2.1.2 Membranski materijali 9

2.1.3 Principi provedbe procesa 10

2.1.4 Kemijski osvrt 12

2.1.5 Koncentriranje prehrambenih proizvoda i primjena RO u toj grani industrije 14

2.2 PROIZVODNJA VINA 16

2.3 KEMIJSKI SASTAV VINA 20

2.3.1 Voda 20

2.3.2 Šećeri 21

2.3.3 Kiselinski sastav 21

2.3.4 Alkoholi 22

2.3.5 Esteri 22

2.3.6 Polifenoli 23

3. EKSPERIMENTALNI DIO 35

3.1 ZADATAK 36

3.2 MATERIJAL I METODE 36

3.2.1 Priprema koncentriranog vina Cabernet Sauvignon 36

3.2.2 Spektrofotometrijska analiza tvari boje 37

3.2.3 Određivanje polifenola HPLC metodom 41

4. REZULTATI I RASPRAVA 45

4.1 GRAFIČKI PRIKAZI ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA 46

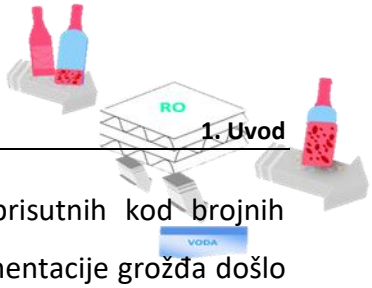
5. ZAKLJUČCI 53

6. LITERATURA 55

Popis oznaka, kratica i simbola

PTF	Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

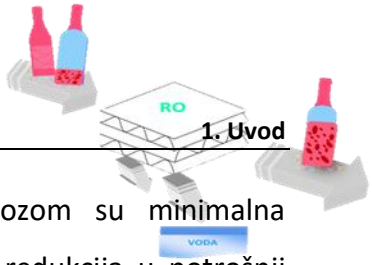
1.UVOD



Vino je posebna skupina fermentiranih prehrambenih proizvoda prisutnih kod brojnih civilizacija već tisućama godina. Jackson (2014) navodi kako je do fermentacije grožđa došlo slučajno zbog dužeg čuvanja grožđa u spremnicima, stoga je točno podrijetlo vina teško utvrditi, ali istodobno navodi da neka istraživanja pokazuju kako postoji arheološki zapis o vinu koji datira još iz 5500 godine prije Krista. Sukladno tim događajem i način čovjekova života promijenio se iz sakupljačkog u proizvođački. Za drevnog čovjeka rezultat takvog otkrića bila je transformacija pokvarljivog, privremeno dostupnog voća u relativno stabilan napitak.

Prepoznatljivost kvalitete vina potrošači uočavaju kroz međusobno ispreplitanje punoće senzorskih svojstava i bogatstva kemijskog sastava pojedine sorte grožđa. Jedan od najodgovornijih faktora za stvaranje predodžbe kvalitetnog crnog vina je njegovo sprecifično crveno obojenje. Ono je postignuto prožimanjem tvari boje s ostalim komponentama vina. Glavni nosioc tvari boje je pigment antocijan, pripadnik skupine polifenolnih spojeva. Osim što imaju značajan utjecaj na formiranje aromatskog profila i boje vina, fenoli su prepoznatljivi po antioksidativnom djelovanju koje je blagotvornog učinka na čovjekovo zdravlje. Obzirom da svaka faza "životnog ciklusa" vina obiluje promjenama; tijekom sazrijevanja, starenja, skladištenja potrebno je što više očuvati kvalitetu i zadržati poželjna svojstva vina. Koncentriranje tekućih namirnica predstavlja idealan način kako očuvati iznimno vrijedne sastojke hrane kroz dulji period. Ono podrazumijeva postupak uklanjanja vode iz profila proizvoda koje pogoduje duljoj stabilnosti i održivosti hrane i pića, pri čemu smanjenje volumena doprinosi smanjenju troškova skladištenja, pakiranja i dostave. Budući da se konvencionalni postupci uparavanja i zamrzavanja nisu pokazali efikasnim, membranske tehnologije reverzne osmoze i nanofiltracije obećavajući su modeli koncentriranja tekućih namirnica (Cassano i sur., 2020; Grainger i Tattersall, 2016; Jaffrin, 2015).

Reverzna osmoza je specifična tehnika separacije komponenti otopine kroz semipermeabilnu membranu, propusnu za molekule vode, ali ne i za ostale ione koji zbog djelovanja osmotskog tlaka bivaju zadržani na drugoj strani membrane. Ovim se postupkom uklanja 94-99% iona te 100% tvari organskog podrijetla. Veličina pora, uglavnom kompozitnih asimetričnih, membrana reverzne osmoze je manja od 1 nm (Hausmann i sur., 2012).

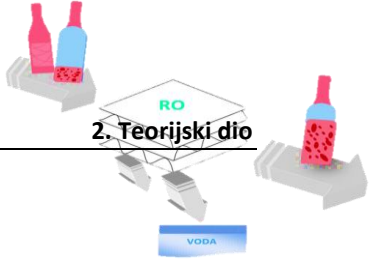


Najznačajnije prednosti provedbe koncentriranja reverznom osmozom su minimalna degradacija osjetljivih komponenti, posebice tvari boje i arome; te redukcija u potrošnji energije (Cassano i sur., 2020; Kotsanopoulos i Arvanitoyannis, 2013).

Cilj istraživanja bio je ispitati mogućnosti primjene membranskog procesa reverzne osmoze u koncentriranju vina Cabernet Sauvignon te ispitati zadržavanje tvari boje u dobivenim koncentratima obzirom na početni uzorak. Koncentriranje RO provedeno je na membranskom uređaju *LabUnit M20* pri različitim procesnim parametrima tlaka s primjenom hlađenja i bez njega.

U ovom radu se navođenjem općih značajki membranskih procesa, opisom tehnološke provedbe reverzne osmoze te zanimljivim grafičkim prikazom kemijskog sastava vina nastoji približiti uloga i učinkovitost metode koncentriranja vina uz isticanje prednosti i nedostataka cjelokupnog procesa.

2.TEORIJSKI DIO



2.1 TEHNOLOGIJA MEMBRANSKE FILTRACIJE

Membranska filtracija je tehnika selekcioniranja sastojaka tekućine na temelju različitosti u obliku, veličini i kemijskoj strukturi čestica, koja je od začetaka 1960-ih pa sve do danas doživjela progresivan rast i razvoj, a zbog visoke učinkovitosti, profitabilnosti i pouzdanosti svrstava se i među najsuvremenije separacijske procese.

Premda poznavanje membranskih principa seže daleko u povijest, zbog nepovoljnih tehnoloških razloga uporaba membrana ograničena je na posljednjih 60 godina (Grainger, 2012). Unaprjeđenje sastava i dizajna membrana rezultiralo je povećanjem robusnosti membrana i kompaktnosti sustava, prilagodljivošću aktualnim higijenskim standardima te boljem razumijevanju glavnih nedostataka – pojavi onečišćenosti, nedovoljnoj selektivnosti te pouzdanosti takvih sustava (Lovrić, 2003).

Suvremena tehnološka dostignuća u industriji membranskih materijala, polimernoj kemiji i procesnom inženjerstvu svakim danom realiziraju provedbu principa membranske tehnologije u različite svrhe.

Filtracija je fizikalna tehnika razdjeljivanja čestica iz suspenzije njenim propuštanjem kroz porozan materijal. Ukoliko takvo filtracijsko sredstvo predstavlja membrana, onda se radi o membranskoj filtraciji čija provedba počiva upravo na temeljnim principima klasične filtracije (Sparks i Chase, 2016). Membrane, određene fizikalne i kemijske kompozicije, imaju selektivnu sposobnost propuštanja, odnosno zadržavanja pojedinih molekula ulazne tekućine zbog djelovanja tlaka. Ulazna otopina biva potisnuta kroz polupropusnu membranu i razdijeljena u dvije struje: retentat (koncentrat) i permeat. Permeat predstavlja komponente otopine koje je membrana propustila, dok se retentatu pribrajaju sve frakcije koje nisu profundirale kroz membranu i čija se koncentracija tijekom filtracije povećava (Mazzotti i sur., 2016). Prema dobivenom produktu separacije, membranske procese dijelimo na one koji služe za pročišćavanje, koncentriranje, posredovanje pri reakciji, odjeljivanje (Pichler, 2017).

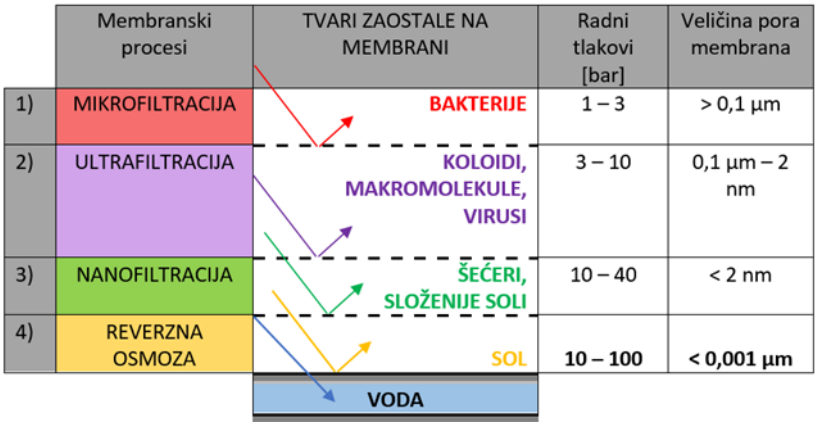
Čimbenici koji membransku filtraciju čine sve popularnijom nad ostalim separacijskim tehnikama su: kontinuirano zadržavanje čestica, manji troškovi i energetske potrebe, mogućnost kombinacije s drugim postupcima separiranja, podesivost sustava. Obzirom da svaki sustav teži savršenom, uključujući i ovaj, još uvijek se traže tehnološka rješenja koja će

osigurati produljenje životnog vijeka membrana, zaustaviti polarizaciju koncentracije i blokiranje membrane koji narušavaju opstanak visoke selektivnosti procesa (Jaffrin, 2015).

Jaffrin (2015), također, navodi opću klasifikaciju membranskih procesa (**Slika 1**) nastalu u ovisnosti o principu separacije čestica; razlici: tlakova, koncentracije, temperature te električnog potencijala kroz četiri skupine postupaka:

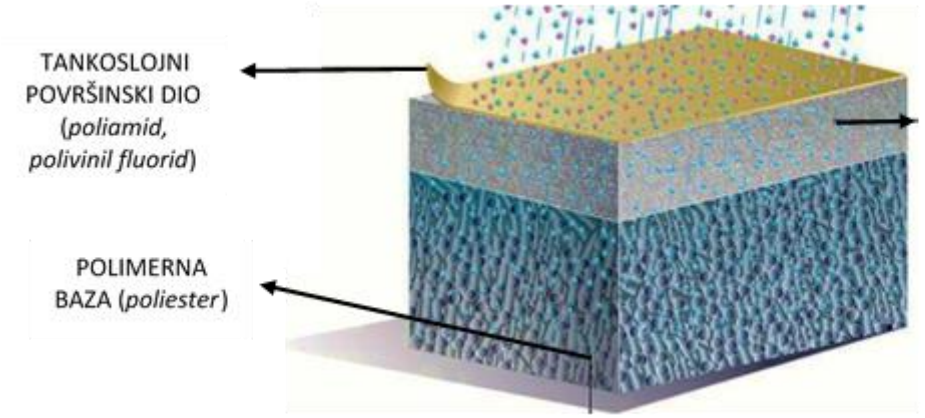
1) mikrofiltraciju (MF) koja je neizbježan postupak prehrambene industrije gdje se koristi kao pročišćivač, ali i predtretman svim ostalim postupcima filtracije;
2) ultrafiltraciju (UF), tehniku upotrebljavanu u svrhu koncentriranja i frakcioniranja različitih komponenti u mljekarstvu, pročišćavanja otpadnih voda, bistrenja voćnih sokova i alkoholnih pića;
3) te nanofiltraciju (NF) i reverznu osmozu (RO). Ove tehnike koriste se za uklanjanje vode iz složenih matriksa, izdvajanje malih molekula, iona, laktoze ili desalinaciju morske vode.

Kao iznimnu prednost primjene membranskih tehnologija u proizvodnji hrane navodi se kontinuiranost i aktivno djelovanje kroz period i od čak 24 h bez regeneriranja.



Slika 1 Opća podjela membranskih procesa (Hausmann i sur., 2012)

Membrana čini okosnicu svake membranske operacije budući da je to alat kojim se vrši razdjeljivanje suspenzija. Njihovu glavnu karakteristiku predstavlja selektivna propusnost koja je nastala uslijed specifične membranske građe u vidu tankoslojnog materijala koji se sastoji od tankog poroznog površinskog dijela, načinjenog od jedne vrste polimera, nanesenog preko debljeg središnjeg sloja i polimerne baze (**Slika 2**). Njen površinski sloj razdvaja molekule, a donji služi kao potporanj.

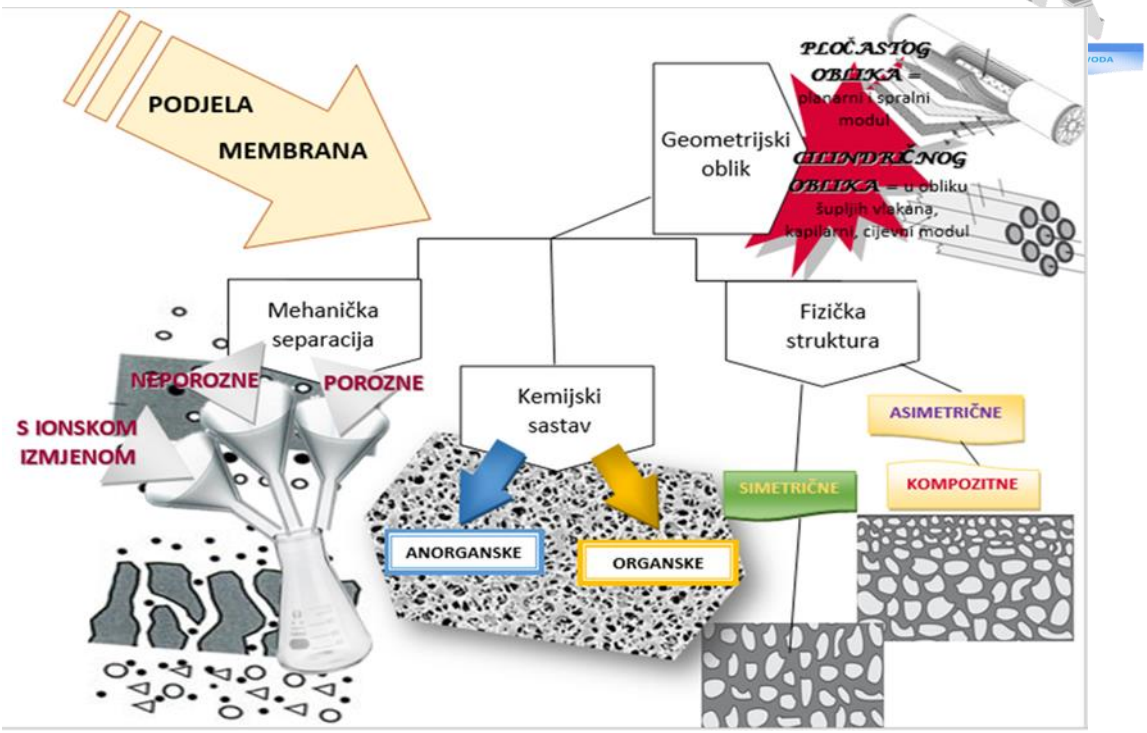


Slika 2 Poprečni presjek strukturne građe membrane (Idarraga-Mora i sur., 2018)

2.1.1 Svojstva membrana

Lovrić (2003) navodi da je uvjet koji je odredio podjelu membrana na razne skupine njihova granična vrijednost zadržavanja molekula, odnosno sposobnost zadržavanja molekula određene molekulske mase. To u pravilu znači da bi čestice manje mase od granične prelazile u permeat, a ostale bile odvojene u struji retentata. Glavna podjela membrana prikazana je na **Slici 3**.

Membrane se obzirom na različitost u strukturi dijele na simetrične i asimetrične. Međusobno se razlikuju po načinu odjeljivanja čestica koji je kod simetričnih aktivan kroz čitav presjek membrane, a kod asimetričnih membrana se odjeljivanje obavlja samo na površinskom gušćem sloju. Simetrične su homogene u svakom svom dijelu, dok asimetrične karakterizira heterogenost i nejednolikost strukture. Mogu biti načinjene od jednog ili više vrsta materijala. Asimetrične membrane su najčešće zastupljene u prehrambenoj industriji. Odlikuju se visokom mehaničkom stabilnošću. Posebna vrsta asimetričnih membrana su kompozitne membrane čija struktura također obuhvaća tanki gusti površinski sloj te porozni sloj nosač. No, za razliku od uobičajenih asimetričnih, kod kompozitnih membrana svaki sloj može biti izgrađen od različite vrste materijala. Najveću primjenu pokazale su u tehnologiji reverzne osmoze (Smith, 2012a).



Slika 3 Klasifikacija membrana prema mehaničkoj separaciji, kemijskom sastavu, fizičkoj strukturi i geometrijskom obliku (Pichler, 2017; Smith, 2012a; Pinnau i sur., 2000)

2.1.2 Membranski materijali

Komponente koje sačinjavaju ulaznu otopinu mogu reagirati s materijalom koji izgrađuje membranu, stoga se svi dijelovi membranskog sustava moraju optimizirati specifično određenoj namjeni. To znači da je za svako apliciranje novih vrsta membrana potrebno provesti preliminarna istraživanja.

Polimeri koji se koriste za proizvodnju membrana ovise o kemijskom sastavu i molekulskoj građi čestica koje će kroz nju protjecati. Neki od njih, poput celuloznog acetata, izuzetno su popularni zbog visokih performansi za određena svojstva. Modificirajući celulozu i invertirajući ju u asimetrične membrane omogućena je visoka selektivnost postupka membranske filtracije posebno uočenog kod desalinacije vode. Molekulu celuloznog acetata izgrađuju acetilirane jedinice celuloze. Ogromna primjena odlikuje ju nizom prednosti: visokom propustljivošću H_2O, odbijanjem iona soli, mehaničkom stabilnošću, a tome pridonosi i jeftina sirovina – pamuk. Međutim, primjena celuloznog acetata okarakterizirana je i nekim manama obzirom da je to spoj koji je nestabilan pri ekstremno visokim vrijednostima pH i temperature, ima sposobnost reagirati s organskim spojevima i



mikroorganizmima. Dugotrajno izlaganje membrane ekstremnim graničnim vrijednostima pH, može bitno utjecati na skraćenje njenog vijeka trajanja (Smith, 2012b). Spellman (2016) ističe kako se celulozni acetat pokazao najučinkovitijim kod procesa reverzne osmoze zbog visoke selektivnosti.

Ostali polimeri imaju malu primjenu za razliku od celuloznih derivata. Svrstavaju se u dvije skupine obzirom na podrijetlo, organski i anorganski materijali. Među organskim se izdvaja polisulfon koji u usporedbi s celuloznim acetatom ima veću otpornost na visoke temperature i pH vrijednosti, ali nema primjenu kod RO. Zatim poliamidi koji se koriste i u NF i RO. Osim što podnose visoke temperature, odlikuju se mehaničkom čvrstoćom te stabilnošću prema utjecaju kisika. Značaj ovoj skupini pridaju vinilni polimeri i elastomeri.

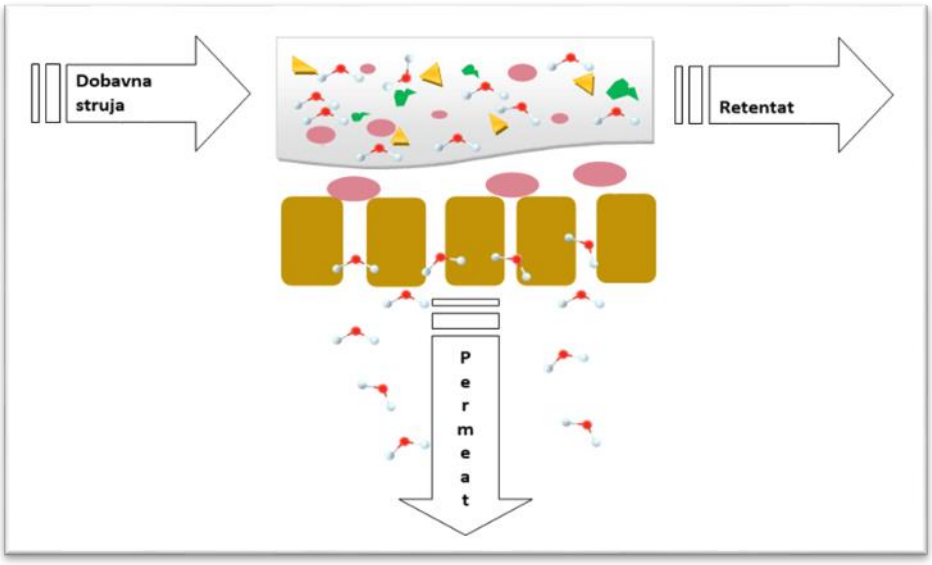
Skupini anorganskih materijala pridružuju se keramički, stakleni i metalni materijali. Budući da su metalne membrane zavarene u jednu jedinicu koja se ne može rastaviti radi vizualnog pregleda, one se ne smatraju prikladnim za korištenje u proizvodnji hrane.

Pri odabiru materijala membrane čiji je poprečni presjek prikazan **Slikom 2**, za formiranje tankog separacijskog sloja koriste se membrane poliamida i polivinil fluorida, a za sloj nosača polisulfon i polietersulfon. Kombinacija navedenih sirovina omogućit će konstruiranje membrana dobre kemijske i toplinske stabilnosti, otpornih na začepljenja, tolerantnijih na promjene pH i temperature (Smith, 2012b).

2.1.3 Principi provedbe procesa

Kod membranskih procesa razlikuju se dva osnovna postupka membranske filtracije: dead-end ili statička i cross-flow odnosno dinamička filtracija. U slučaju statičke filtracije ulazna otopina pada okomito na smjer pružanja membrane što često dovodi do stvaranja debelog sloja taloga na njenoj površini koji u konačnici uzrokuje njeno začepljenje. Tada je cijeli proces potrebno zaustaviti i provesti čišćenje te obzirom na to, ova vrsta filtriranja je diskontinuirana. Za razliku od takvog klasičnog principa, kod dinamičke filtracije dobavna struja biva tlačena paralelno sa smjerom pružanja membrane (tangencijalno) u kontinuitetu što je pogodno za operacije na hrani. Membrane u kontinuiranim procesima dolaze u jedinstveno dizajniranim jedinicama - modulima. Oblikovane membrane su međusobno povezane i smještene unutar cjevovoda. Svi moduli građeni su po istom principu, ali u različitim varijantama kako bi odgovarali svakoj membrani ponaosob pa se u vidu tog

kriterija dijele na: cjevaste, spiralne, module sa šupljim vlaknima i pločaste koji imaju veliku primjenu u prehrambenoj industriji.

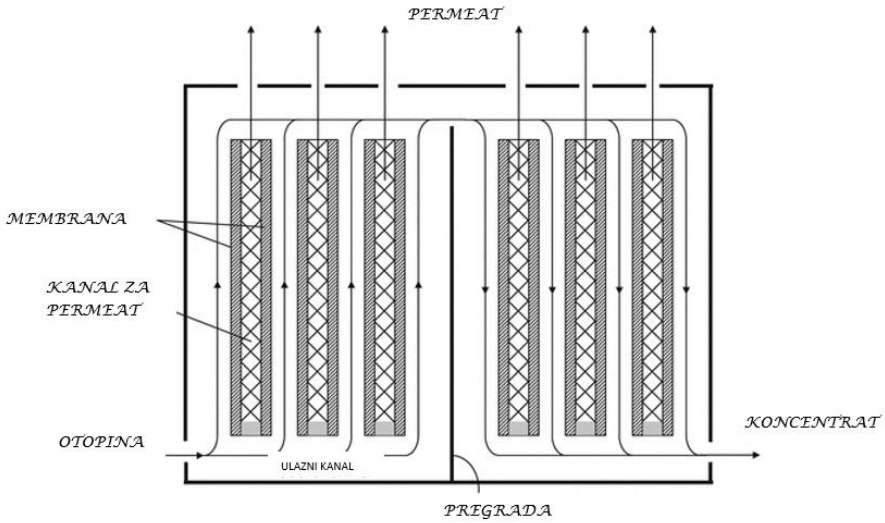


Slika 4 Shema cross-flow ili dinamičke filtracije (Hausmann, 2012; Pichler, 2017; Smith, 2012b)

Željene karakteristike dizajna obično uključuju mogućnost postizanja visoke učinkovitosti procesa na malom prostoru, odgovarajući stupanj mehaničke stabilnosti, higijenski dizajn koji odgovara propisanim standardima, mogućnost čišćenja na mjestu (CIP) i jednostavnost pristupa prilikom zamjene membrane.

U pločastom sistemu (**Slika 5**) membrane su načinjene u obliku folija smještenih između paralelno postavljenih ploča. Sastoji se od razdjelnih, nosećih ploča i membrana smještenih na jednu vertikalnu centralnu osovinu. Membrane se nalaze s obje strane ploče okrenute na van. Površina membrana isprepletena je žlijebovima koji tvore kanale za permeat koji ide u unutrašnjost ploče (mrežasta struktura). Razdjelna ploča se nalazi između dvije noseće ploče, na njenoj površini su rebrasti izvodi i na periferiji otvori za tečenje koncentrata (retentata). Ploče s membranom mogu biti različitih geometrijskih oblika, pravokutne, okrugle ili eliptične ovisno o proizvođaču. U početku su jedinice izrađene za vertikalnu opskrbu hranom od dna prema vrhu. Horizontalni dizajn trenutno se koristi u prehrambenoj industriji. Prednost sustava ploča i okvira je jednostavnost zamjene ili uklanjanja pojedinih membrana (Smith, 2012b).

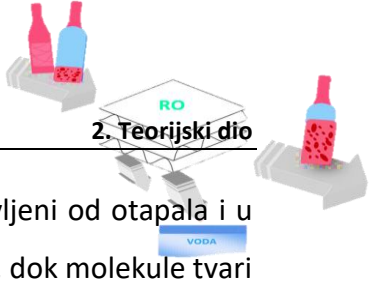
Na principu pločastog modula s kompozitnim membranama radi uređaj *LabUnit M20* koji je detaljnije opisan i korišten za provedbu eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.



Slika 5 Pločasti modul (Balster, 2015)

2.1.4 Kemijski osvrt

Osmoza je prirodni proces u kojem čisto otapalo difundira kroz semipermeabilnu membranu (propusnu samo za otapalo, a ne i za otopljenu tvar) u otopinu. Takva pojava može se naći u prirodnim, ali i umjetnim sustavima u kojima je membrana alat koji odjeljuje dvije tekućine različitih koncentracija. Prijelaz čestica otapala odvija se po prirodnom zakonu koji funkcionira na način da svaki sustav koji nije u ravnoteži teži njenom uspostavljanju. Budući da se u neravnotežnom sustavu želi stvoriti stanje ravnoteže, čisto otapalo će prelaziti u otopinu, odnosno prijelaz tvari će teći iz područja niže koncentracije u područje više koncentracije tvari. Razlog tomu je potreba za izjednačenjem koncentracija s obje strane, a kako membrana nije propustljiva za otopljenu tvar, jedino je moguć prijenos čistog otapala. Kako bi se koncentracije izjednačile, manje koncentrirana otopina (čisto otapalo) postaje koncentriranija, a više koncentrirana otopina postaje razrijeđena. Protok tvari u tom smjeru omogućen je zbog razlike u hidrostatskim tlakovima. Inače, hidrostatski tlak u otopini (otapalo + otopljena tvar) je veći od onog u čistom otapalu zato što ovisi o težini stupca tekućine unutar koje djeluje. Kada se tlakovi izjednače te postigne ravnotežno stanje proces je stopiran. Međutim, osim zaustavljanja prijelaz tvari se može odvijati reverzibilno, odnosno

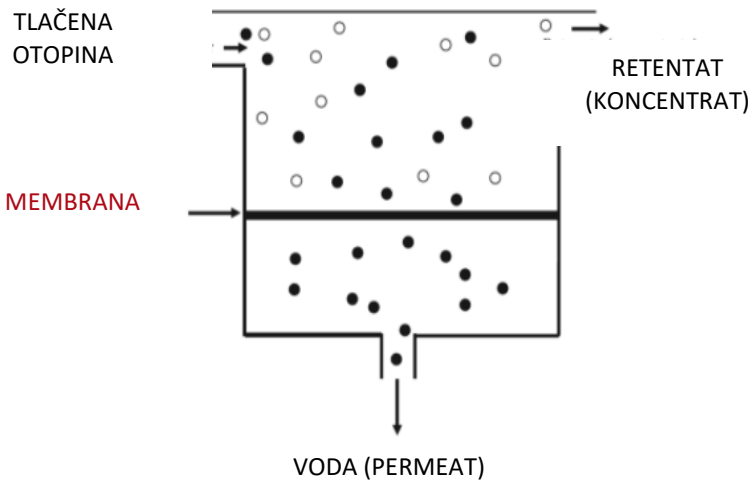


iz područja više u područje niže koncentracije. Otopine su sustavi sastavljeni od otapala i u njemu otopljenih tvari. Molekule otapala imaju određenu brzinu kretanja, dok molekule tvari uglavnom kretanje postižu zbog sudaranja s molekulama otapala prilikom čega razvijaju kinetičku energiju (Brownovo gibanje). Nastala energija proporcionalna je tlaku koji te čestice stvaraju u otopini, a naziva se osmotski tlak čije je djelovanje objasnio van't Hoff izrazom:

$$\pi = c \times R \times T$$

gdje je: π – osmotski tlak [Pa], c – koncentracija otopine [mol L^{-1}], R – opća plinska konstanta 8,314 [J $K^{-1}mol^{-1}$], T – temperatura [K] (Spellman, 2016).

Osmotski tlak nastaje u otopinama koje se kreću kroz polupropusnu membranu. Njegova jakost ovisi isključivo o množinskoj koncentraciji prisutnih tvari u sustavu. Definira se i kao tlak koji tlači koncentriraniju otopinu i tako sprječava prijelaz čistog otapala kroz polupropusnu membranu. Ukoliko je proces povratan osmotski tlak potrebno je nadvladati. Način na koji se provodi reverzibilan proces je povećanje hidrostatskog tlaka otopine koji će savladati osmotski i tako omogućiti prolaz molekula otapala kroz membranu obratnim redoslijedom. Opisan proces naziva se reverzna osmoza (hiperfiltracija, **Slika 6**). Prvu praktičnu membranu od celuloznog acetata za primjenu kod RO proizveli su, 1972., Loeb i Sourirajan. Ta je membrana pokazala visoku selektivnost zahvaljujući svojoj asimetričnoj strukturi. Kasnije su se razvile kompozitne membrane koje su doprinijele ključnom proboju primjene RO u industriji. Imale su toliki značaj da su sve membrane koje se i danas primjenjuju tankoslojne kompozitne poliamidne membrane. Naime, iako su proizvedene 1980-ih, njihove performanse su značajno poboljšane u odnosu na modele prve generacije. Osim membrana, uspješnom radu tehnologije RO pogodovali su dizajn modula, radni uvjeti koji umanjuju nepovoljne učinke klasičnih postupaka separacije te potpuno nov način transporta čestica tijekom filtriranja. Dok MF i UF učinkovitost prolaska tvari kroz membranu vežu uz veličinu, oblik i naboj čestica, NF i RO temelje model protoka na načelu otapanja i difuzije (Smith, 2012a).



Slika 6 Princip filtracije otopine primjenom reverzne osmoze (Spellman, 2016)

Učinkovitošću tehnološkog procesa RO upravlja brzina protoka tekućine kroz membranu. Bitni čimbenici koji reguliraju protok i imaju značajan utjecaj na njegova svojstva su: tlak, temperatura, polarizacija koncentracije, struktura membrana i permeabilnost. Također, sposobnost zadržavanja svih tvari koje se nalaze u otopini bitno je svojstvo čitavog procesa, posebice ako se provodi u cilju koncentriranja tekućine. Ukoliko je membrana u potpunosti uspjela zadržati sve tvari iz sustava ovaj koeficijent iznosi 100%. Koeficijent zadržavanja ili retencije dan je izrazom:

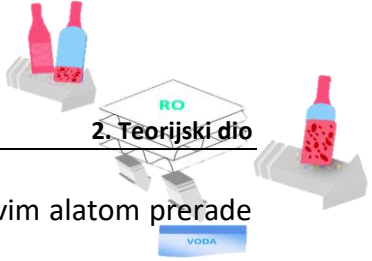
$$R = \frac{C_r - C_p}{C_r} \times 100 = \left(1 - \frac{C_p}{C_r}\right) \times 100 \ [\%]$$

gdje je: R – koeficijent zadržavanja ili retencije [%], C_r – koncentracija u retentatu, C_p – koncentracija u permeatu.

Karakteristike suvremenih sustava RO su veličina pora manja od 2 nm, radni tlakovi 10-100 bara te propusnost sićušnih iona i organskih molekula (Jaffrin, 2015).

2.1.5 Koncentriranje prehrambenih proizvoda i primjena RO u toj grani industrije

Iako su membranski sustavi proučavani dugi niz godina, prehrambena tehnologija je grana industrije koja je tek nedavno uključila membrane u široku primjenu. Stoga se uporabu



membranskih postupaka u proizvodnji hrane može smatrati relativno novim alatom prerade hrane vrlo obećavajuće budućnosti (Tamime, 2013).

Naime, najveću primjenu membranskih postupaka reverznom osmozom zauzimaju predtretmani prečišćavanja hrane i korištenje u desalinaciji vode, no sve se više koriste i kao alternativa procesima koncentriranja hrane. Budući da RO radi pri nižim temperaturama, primjena u preradi hrane i pića nudi posebne prednosti u odnosu na konvencionalne tehnologije, kao što su očuvanje toplinski osjetljivih komponenti, niži troškovi ulaganja, niska energetska potrošnja i zadržavanje aromatskih spojeva (Kotsanopoulos i Arvanitoyannis, 2013).

Općenito, koncentriranje je postupak uklanjanja vode iz profila proizvoda koje pogoduje duljoj stabilnosti i održivosti hrane i pića, pri čemu smanjenje volumena doprinosi redukciji financijskih izdataka kod skladištenja, pakiranja i dostave. Navedene prednosti membranskih tehnologija prepoznala je industrija vina. Premda membranski postupci u ovom sektoru industrije nisu zastupljeni u punoj dinamici, oni se već 50-ak godina primjenjuju u vinarstvu. U posljednjem je desetljeću došlo do naglog razvoja membranskih materijala i novih tipova modula. Time se proširila primjena membrana u postupcima filtriranja i stabilizacije vina. Tako je početna primjena membrana za MF primjenjivanu kod uklanjanja nečistoća proširena na korigiranje sadržaja alkohola, smanjivanje kiselosti, zakiseljavanje, koncentriranje (Cassano i sur., 2020).

Srž ovog diplomskog rada je utvrditi utjecaj koncentriranja crnog vina Cabernet Sauvignon na tvari boje tehnikom reverzne osmoze. Radovi objavljivani u razdoblju od posljednjih dvadesetak godina (Gurak i sur., 2010; Mietton-Peuchota i sur., 2002; Aguiar i sur., 2012) bazirani su isključivo na koncentriranje mošta, međutim već je u prethodnom odlomku navedeno kako je tehnika RO danas vrlo zastupljena u vinarstvu i u svrhu korigiranja udjela alkohola, kiselina, boje, arome itd. Koncentriranjem se nastoje ugustiti komponente suhe tvari na način da se dodaju određene komponente u matriks tekućine, provodi metoda višestrukog vakuum isparavanja ili zamrzavanjem. Ako se za ugušćivanje koriste tretmani vakuum isparavanja doći će do gubitka aromatskog profila, degradacije boje te poprimanja tipičnog okusa po kuhanom. Nadalje, zamrzavanjem se voda uklanja u obliku leda, a ne pare, što doprinosi očuvanju arome. Međutim, ovaj postupak karakterizira visoka potrošnja energije, a konačan proizvod pokazuje nižu kakvoću od isparavanja. Cassano i sur. (2020)

navode da je stupanj koncentracije mošta 50 °Brix kod zamrzavanja, a kod isparavanja 60-65 °Brix.

Spomenute metode uključuju izdvajanje vode kroz promjene agregacijskog stanja tekućine, dok je primjenom reverzne osmoze izbjegnuta fazna promjena.

Istraživanje Mietton-Peuchota i sur. (2002), čiji je cilj praćenje fizikalnih i kemijskih promjena tijekom koncentriranja mošta crnog i bijelog grožđa tehnologijom reverzne osmoze, pokazalo je da su temperature 10 - 15 °C i tlak od 75 bara optimalne varijable za provedbu ugušćivanja. Navode da je razlog primjene tako niskih temperatura nepovoljan utjecaj visoke temperature i tlaka na permeat. Visoke temperature pogoduju migraciji aromatskih komponenti u permeat, ali i stvaranju uvjeta za fermentacijsku aktivnost. S druge strane, vrlo visoki tlakovi poboljšavaju protok permeata, ali takav režim dovodi do taloženja soli i prekomjernog zasićenja membrana što u konačnici smanjuje protok permeata. Također je ustanovljeno da je postupak potrebno zaustaviti kada se dosegne 15% alkoholne jakosti. Nadalje, analizom kemijskog sastava crnog vina utvrđeno je da su čitav aromatski profil i širok spektar voćnih aroma zadržani. Prevladava kompaktnija struktura s izraženom mekoćom i puninom okusa. Kemijskim analizama pokazali su da je intenzitet boje jači, kao i udio antocijana, dok je udio tanina ostao jednak.

2.2 PROIZVODNJA VINA

„Vino je poljoprivredni prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnoga grožđa“ (Zakon o vinu, NN 32/2019).

Na temelju *članka IV Zakona o vinu* (NN 96/2003), vina se, u ovisnosti o najznačajnijem parametru kvalitete istaknutom od strane potrošača - boji, dijele na tri kategorije: bijelu, ružičastu (rose, opolo) i crnu (crvenu).

Glavna razlika između bijelih i crnih vina temelji se u načinu proizvodnje. Premda je tehnološki proces izrade vrlo sličan i kod bijelih i crnih vina, ključna razlika leži u prisustvu čvrstih dijelova crnog grožđa koji podliježu fermentaciji, dok se kod bijelih vina u postupu runjanja izdvajaju svi čvrsti dijelovi uključujući i vanjski omotač bobice.

Ružičasta vina specifična su vrsta vina koja zbog priprave leže na granici bijelih i crnih. Izrađuju se od crnih sorti grožđa, a za dobivanje svijetle boje primjenjuje se tehnološki postupak proizvodnje bijelih vina.

Proizvodnja crnih vina može se odvijati na razne načine ovisno o kakvoći i količini vina koja se želi proizvesti. Klasična vinifikacija crnih vina provodi se paralelnim postupkom maceracije krutih dijelova grozda (kožice, sjemenke i peteljke) i alkoholne fermentacije mošta. Na taj se način fermentira cjelokupan masulj. No, mogući su i drugi načini proizvodnje crnih vina poput predfermetativne i postfermentativne maceracije. Klasična vinfikacija crnih vina, prema Graingeru i Tattersallu (2016), obuhvaća sljedeće korake:

A. berbu i transport grožđa;
B. muljanje i runjanje;
C. maceraciju i alkoholnu fermentacija;
D. otakanje vina ocjeđivanjem i prešanjem;
E. tiho vrenje (dovršetak alkoholne fermentacije); mogućnost eventualne malolaktičke fermentacije;
F. njegu i doradu vina;
G. skladištenje;
H. punjenje u boce i starenje vina u bocama (samo neke vrste).

Prerada grožđa u vino započinje berbom u vinogradu. To je početna faza koja je presudna za krajnju kvalitetu i svojstva vina. Samo se od tehnološki zrelog i zdravog grožđa može proizvesti kvalitetno vino. Međutim, grožđe se ne ubire uvijek s optimalnom zrelošću, niti u potpunosti zdravo. Zbog toga tehnolog mora postaviti vođenje procesa u smjeru dobivanja najkvalitetnijeg proizvoda što ga određena berba može dati. Izbor vinifikatora i popratne opreme svaki proizvođač mora prilagoditi svojim zahtjevima i željenom ili već uhodanom postupku proizvodnje i dorade vina. Uređaji za preradu grožđa (runjače, muljače, pumpe…) moraju odgovarati vrsti prerade (tehnologija bijelih ili crnih vina), a oprema za doradu mora udvoljavati prethodno postavljenim koracima proizvodnje. Prva operacija vinifikacije crnih vina je runjanje grožđa. Runjanje se obavlja na centrifugalnom uređaju, runjači, gdje se odjeljuje peteljka od bobice. Iako peteljka sadrži velik udio polifenolnih spojeva ona ne ulazi

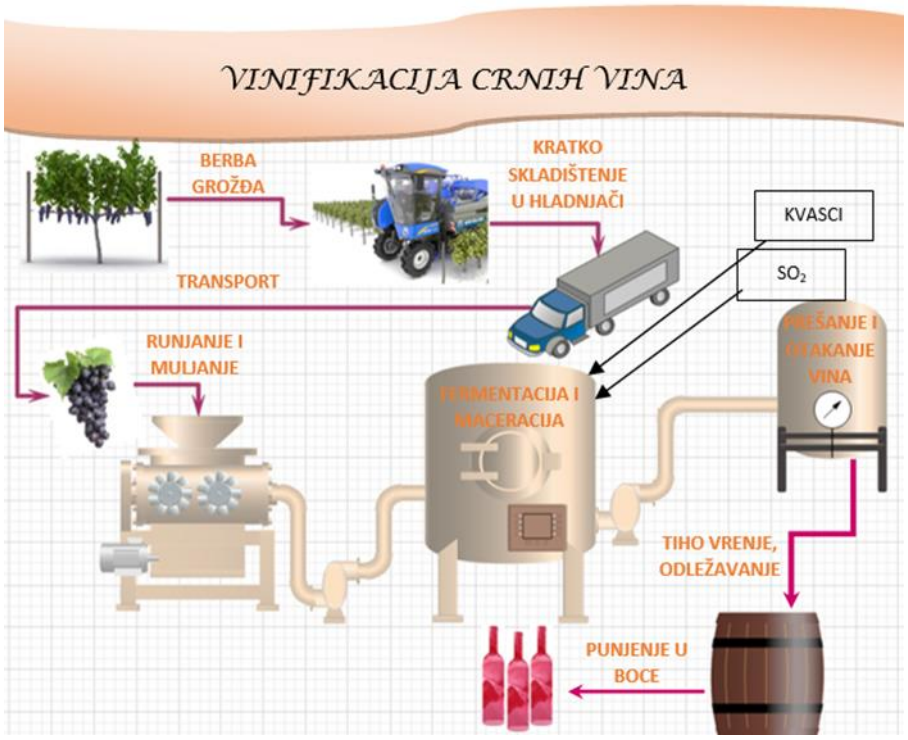
u fazu muljanja budući da se radi o „grubim“ polifenolima koji narušavaju organoleptiku mošta u kasnijim fazama. Zatim se vrši operacija muljanja, odnosno gnječenja grožđa iz kojeg se iscjeđuje sok. Tako nastali sok naziva se mošt, a cjelokupni ostatak (čvrsti i tekući dio) masulj. Nakon muljanja i runjanja mošt se prebacuje u fermentacijske spremnike, uz prethodno sumporenje. Doze od 10 g hl^{-1} k-metabisulfita su dovoljne za zaštitu crnog masulja obzirom da je crno grožđe otpornije na oksidaciju od bijelog. Fermentacijski spremnici ne napune se do poklopca, već se ostavi određen volumen praznog prostora jer se tijekom fermentacije stvara ugljikov (IV) oksid koji uzrokuje pjenjenje.Slijedi fermentacija, no prije njena početka masulju se dodaje selekcionirani vinski kvasac koji uzrokuje previranje šećera do alkohola. Proces fermentacije je turbulentan i prirodno stvara toplinu. Tijekom proizvodnje vina fermentacija može započeti na oko 20 °C, ali temperature mogu narasti i do 30 – 32 °C. Obzirom da kvasci ne preživljavaju više temperature, uobičajena fermentacija provodi se na 25-28 °C (Grainger i Tattersall, 2016).

Specifične vizualne, mirisne i okusne karakteristike kojima odišu crna vina nastaju kao rezultat provedbe maceracije. Ovim se postupkom postupno izdvajaju pojedini sastojci iz krutih dijelova grožđa. Glavna odlika maceracije je ekstrahiranje polifenolnih tvari iz masulja dajući tako vinu punoću boje i skladnu strukturu. Istodobno se s tvarima boje ekstrahiraju i druge tvari: tvari arome, prekursori arome, spojevi s dušikom, polisaharidi (pektini) i mineralni sastojci. Najveći značaj u vinifikaciji crnih vina ima duljina trajanja maceracije. Gómez-Plaza i sur. (2002) utvrdili su da je dulja maceracija na uzorcima crnih vina rezultirala boljom kakvoćom boje.

Otakanje vina sastoji se od odvajanja vina od dropa u posudu gdje će se dovršiti alkoholna i eventualno kasnije i malolaktična fermentacija. Nakon odvajanja vina iz posude započinje faza vađenja ocjeđenog masulja i prešanja.

Period burne fermentacije kojeg karakterizira nagli pad šećera, povišena temperatura, oslobađanje CO_2 u visokim udjelima, sljeduje tzv. tiha fermentacija ili doviranje. Ovaj period iznimno je značajan za vino jer se osim završetka fermentacije odigravaju i drugi procesi odgovorni za buduća svojstva vina. Malolaktična fermentacija obično sljeduje alkoholnu pa se ponekad naziva i sekundarna fermentacija. Ovdje kvasac nije aktivan već je riječ o transformaciji uzrokovanoj djelovanjem sojeva bakterija roda *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*. Oštra jabučna kiselina pod njihovim djelovanjem pretvara se u mliječnu kiselinu

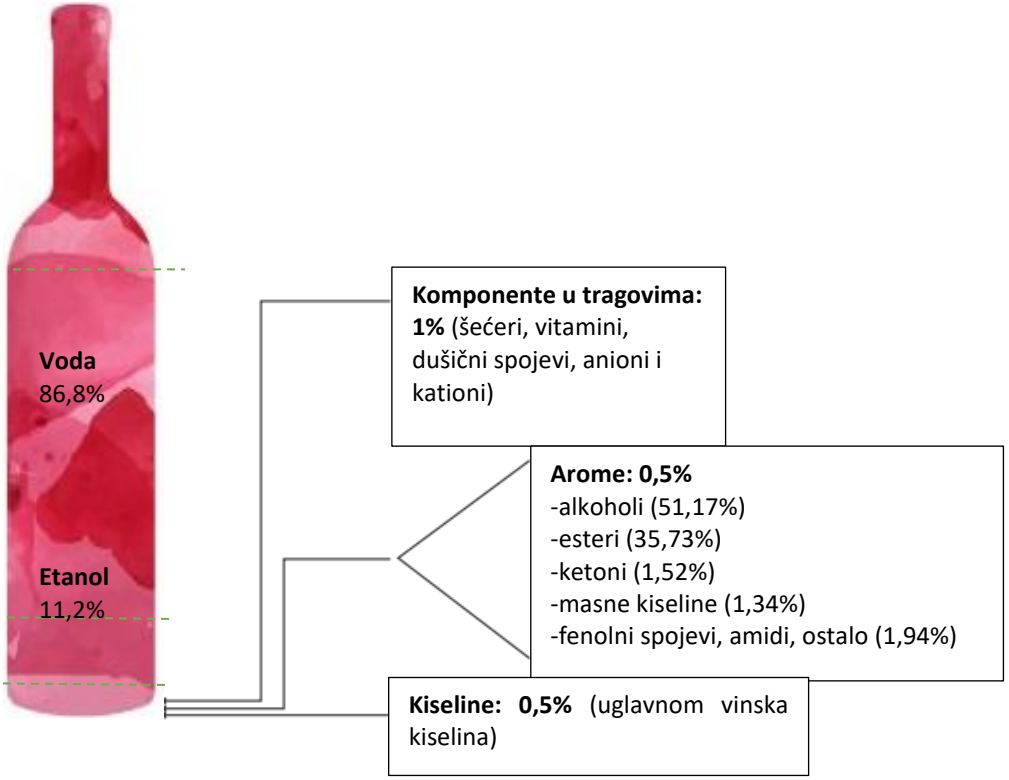
nježnijeg okusa. Po završetku fermentacije vina imaju oštar i prilično neugodan miris. Obično im je potrebno razdoblje sazrijevanja tijekom kojeg se odvijaju određene kemijske promjene uključujući omekšavanje tanina i integraciju kiselosti. Najkvalitetnija crna vina sazrijevaju u periodu 9 - 22 mjeseca. Tijekom tog vremena apsorbirat će i određene sastojke iz bačve poput vanilina i hidroliziranih tanina. Vino može sazrijevati i u tankovima koji mogu biti izgrađeni od betona ili nehrđajućeg čelika. **Slika 7** shematski je prikaz opisanih faza vinifikacije crnih vina (Grainger i Tattersall, 2016).



Slika 7 Koraci vinifikacije crnih vina (Grainger i Tattersall, 2016)

Balans biokemijskih osobina sirovine za izradu vina i jednostaničnog vinskog kvasca - uzročnika alkoholnog vrenja, uvjeti pri kojima se odvija fermentacija i vanjski utjecaji koji djeluju na čitav proces prerade, fermentiranja i skladištenja rezultiraju iznimno kompleksnim sastavom vina.

2.3 KEMIJSKI SASTAV VINA



Slika 8 Kemijski sastav vina (Jackson, 2014)

Jackson (2014) je predočio kemijski sastav vina prikazavši udjele vode i etanola koji predstavljaju dominantne komponente vina u većem predjelu boce te proporcionalno tome udjele spojeva odgovornih za tvorbu aromatskog profila (alkoholi, esteri, ketoni, masne kiseline, polifenoli, amidi) i općenito utemeljitelja organoleptičkih svojstava vina (komponente u tragovima, kiseline) pri dnu boce (**Slika 8**).

2.3.1 Voda

Vino je prehrambeni proizvod u najvećem dijelu sačinjen od vode koja je sadržana u količini od čak 86,8%. Razlog tomu je prisustvo njenog visokog udjela unutar same sirovine od koje se vino pripravlja (Jackson, 2014). Molekula vode ima sposobnost otapanja različitih spojeva. Prilikom proizvodnje voda se ne izdvaja već prenosi u konačni proizvod pa zbog toga ima mogućnost povezivati se s ostalim sastojcima vina, prvenstveno alkoholima, kiselinama i solima, ali i manjim sastojcima poput ulja, voska i tako stvoriti značajan utjecaj na njegova

svojstva (Alpeza, 2008). Voda je bitna komponenta u mnogim kemijskim reakcijama koje se odvijaju tijekom zrenja, fermentacije, starenja, ali i koncentriranja vina (Jackson, 2014). To je sastojak koji se nastoji ukloniti kako bi se povećala gustoća, odnosno udio suhe tvari vina. Već provedena istraživanja koncentriranja reverznom osmozom nekih gotovih tekućih proizvoda (Gurak i sur., 2010) pokazala su da postupak rezultira stvaranjem kvalitetnijeg proizvoda uz očuvanje svih komponenti koje se drugim tehnikama uklanjanja vode, poput uparavanja, nisu uspjele očuvati, sa zadrškom na očuvanje tvari boje i arome.

2.3.2 Šećeri

Iako zastupljeni u vrlo malim količinama u odnosu na ostale sastojke, šećeri, kao glavni predstavnici ugljikohidrata, posreduju u reakcijama nastanka spojeva čijim se prožimanjem u vinu oblikuje njemu svojstvena aromatska kompozicija. Količina šećera zastupljena u grožđu proporcionalna je veličini koja utječe na udio alkohola u vinima. Šećer se može dodatno dodavati ukoliko udio slada u grožđu nije dovoljan za postizanje željene alkoholne jakosti. Šećer se u vinima klasira na fermentirajući i nefermentirajući. *Saccharomyces cerevisiae* razgrađuje fermentirajuće šećere. Budući da ima ograničene sposobnosti fermentiranja drugih tvari važno je da većina sastojaka bude razgrađena do glukoze i fruktoze koje ta vrsta kvasca može u potpunosti razgraditi. Nefermentirajući šećeri uglavnom utječu na slatkoću vina. Osim toga, šećeri mogu metabolizirati u spojeve poput viših alkohola, masnih kiselina, estera, aldehida, tj. u tvari koje postavljaju temeljnu aromu u vinima.

Međutim, šećer je ključan isključivo za provedbu procesa fermentacije pri kojem nastaje etanol kao najznačajniji produkt. Skupini ugljikohidrata pripadaju pektinske tvari i polisaharidi koji tijekom fermentacije imaju sposobnost stvarati složene koloide. Slijedom toga uzrokuju nepoželjna zamućenja u vinima, a samim time i probleme kod filtracije (Jackson, 2014).

2.3.3 Kiselinski sastav

Nadalje, suhu tvar vina čine u njemu prisutne hlapljive i nehlapljive kiseline. Važnost prisustva kiselina u vinima očituje se kroz zaštitna te organoleptička svojstva. Kiseline su ključni spojevi koji pojačavaju učinak SO_2 koji u osnovi štiti vina od kvarenja. Kiselo područje inhibira rast većine neželjenih bakterija koje u okolini niskog pH nemaju sposobnost

preživljavanja (Gammon i sur., 2010). Osim toga, one su ključna komponenta prilikom sljubljivanja vina s hranom te odgovorne za stvaranje cjelokupnog dojma određene sorte vina. Prvoj skupini pripadaju hlapljive kiseline čiji je predstavnik octena kiselina. Upravo je octena kiselina u vinima nepoželjna jer se očituje kao pokazatelj bolesti vina ukoliko je prisutna izvan dopuštenih granica. Nehlapljive kiseline su sastojci zdravog vina u čiju se skupinu ubrajaju: vinska, jabučna i mliječna kiselina. Tijekom dozrijevanja vina događaju se promjene u kiselinskom sastavu vina zbog reakcija organskih kiselina s etanolom kroz proces esterifikacije. Raznolikost kiselina doprinosi različitom okusu, odnosno aromatskom dojmu - jabučna kiselina ima grubi, oštri okus, dok limunska kiselina daje vrlo svježi citrusni dojam (Alpeza, 2008). Mcrae i sur. (2018) objašnjava da je kiselost u vinima usko povezana s tvarima boje, posebice polifenolnim spojevima, na način da prisustvo niskog pH povezuje s intenzivnijom i stabilnijom crvenom bojom vina.

2.3.4 Alkoholi

Alkoholi prisutni u vinu su: etanol, metanol, viši alkoholi, dioli, polioli. Etanol kao najzastupljeniji među njima ima antimikrobno djelovanje te velik utjecaj na stabilnost u reakciji s kiselinama. Također djeluje kao otapalo nepoželjnih aromatskih tvari. Ima utjecaj na okus mijenjajući percepciju kiselosti. Pri normalnim uvjetima fermentacije akumulira se 14 - 15% etanola(Jackson, 2014). *Članci XXVIII i XXIX Zakona o vinu* navode kako se udio alkohola može povisiti došećeravanjem vina tijekom alkoholne fermentacije samo ako je zbog loših vremenskih prilika sadržaj grožđanog šećera u masulju ili moštu manji od prosječnog sadržaja šećera za tu sortu i to područje ili kod proizvodnje vrhunskog vina (NN 32/19). U pravilu, količina nastalog etanola ovisi o udjelu šećera, temperaturi fermentacije te soju kvasca.

Viši alkoholi poput propanola, izobutilnog, izoamilnog alkohola te fenola značajnost iskazuju kroz utjecaj na aromu. Polioli su spojevi koji doprinose većoj viskoznosti vina. Kao najznačajniji predstavnik izdvaja se glicerol (Jackson, 2014).

2.3.5 Esteri

Esteri su komponente odgovorne za okus i aromatski profil vina. Alpeza (2008) navodi dvije skupine estera prisutne u vinima: prva „grupa voćnih estera“ koja nastaje tijekom alkoholne

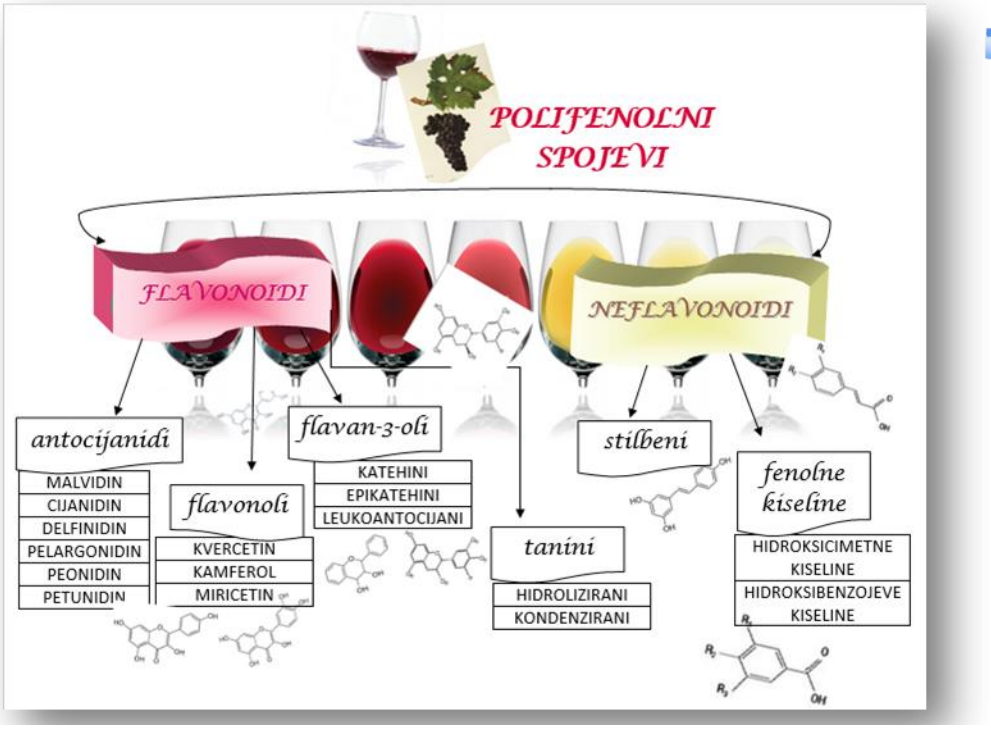
fermentacije i druga tijekom dozrijevanja. Fermentacijski esteri nastali kao rezultat djelovanja metabolizma kvasaca zaslužni su za svježe, privlačne, voćne arome vina, a dijele se na skupine acetatnih estera viših alkohola i etil estera masnih kiselina.

Ključni proces za očuvanje ovih vrlo hlapljivih spojeva je dozrijevanje vina. Ukoliko se ono provodi pri nepovoljnim uvjetima, osobito pri visokoj temperaturi, smanjit će se udio estera i izgubiti voćni segment arome. Također, izloženost kisiku može izazvati kvarenje vina s izrazitom aromom na ocat (Jackson, 2014).

Najzastupljeniji ester u vinu je etil acetat, u velikoj mjeri odgovoran za osjetilne karakteristike vina. Plata i sur. (2003) navode da u koncentraciji ispod 80 mg L^{-1} ima povoljan učinak.

2.3.6 Polifenoli

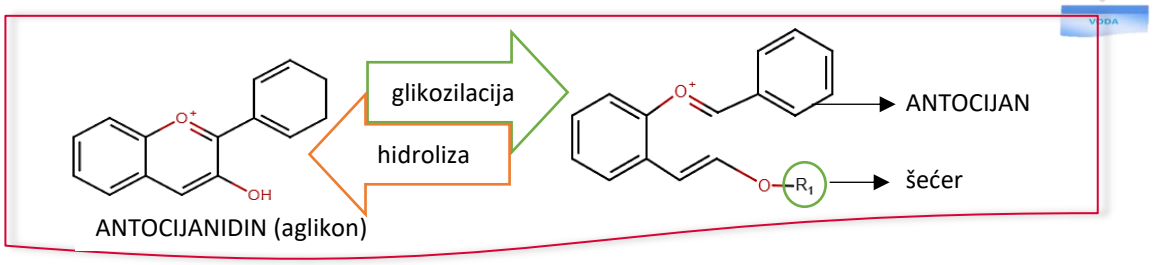
Polifenoli su heterogena skupina spojeva prepoznatljiva po prisustvu jednog ili više hidroksilnih aromatskih prstenova. Ti su spojevi klasificirani, na temelju razlike u broju C atoma prisutnih unutar molekule, na flavonoide i neflavonoide premda se, osim po razlikama u kemijskoj strukturi, kategorizacija može provesti i u ovisnosti o podrijetlu ili njihovoj raznolikoj biološkoj aktivnosti (Tsao, 2010). Podjela flavonoidnih i neflavonoidnih spojeva iskazana je **Slikom 9**.



Slika 9 Podjela polifenolnih spojeva (Jackson, 2014; Rein, 2005; Teixeira, 2013)

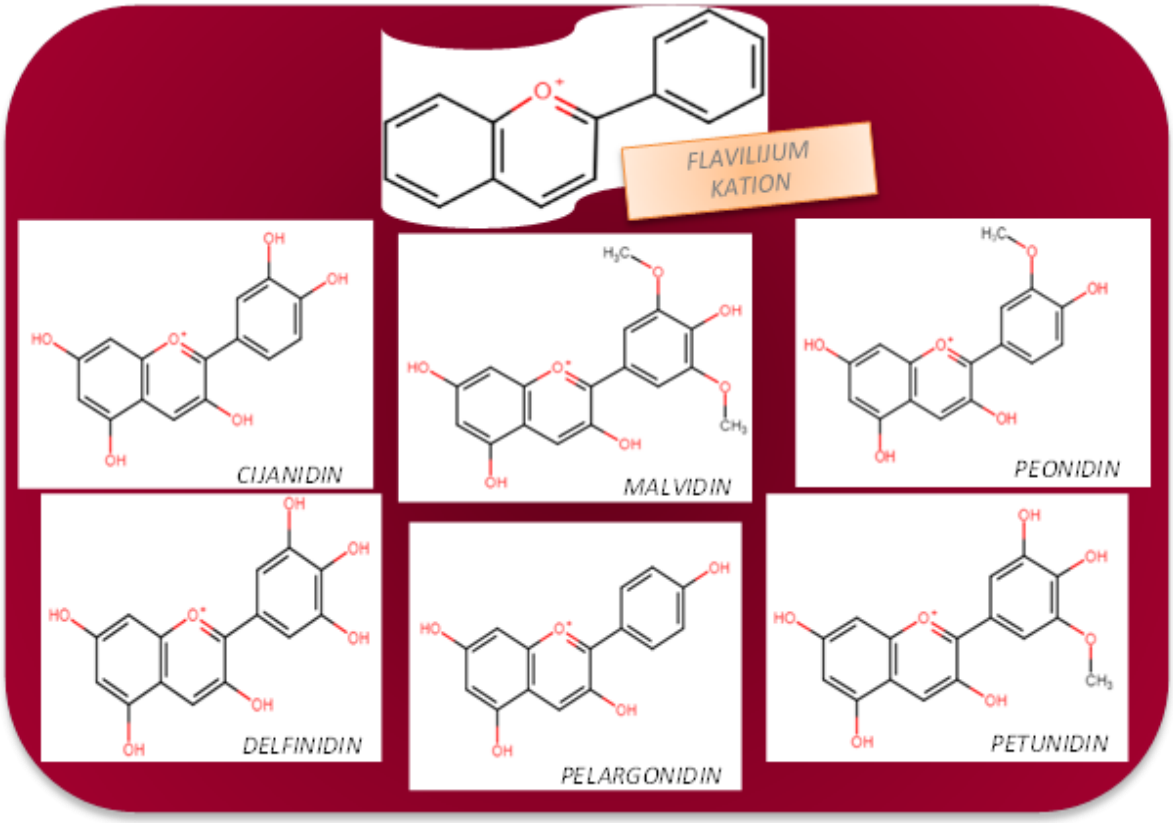
Neflavonoidi su spojevi jednostavne strukture, građeni od samo jednog fenolnog prstena, za razliku od flavonoidnog kompleksnijeg sastava čiji su najznačajniji predstavnici u vinima flavonoli, flavan-3-oli, antocijani i tanini, dok se kod neflavonoidnih spojeva izdvajaju stilbeni i fenolne kiseline. Flavonoidne komponente zastupljene su u kožici, sjemenkama i peteljci, a neflavonoidi u mesu bobice grozda (Niculescu i sur., 2018). Kako su rasprostranjeni u različitim dijelovima bobice tako je ograničena i njihova prisutnost u različitim vrstama vina(Kennedy, 2008).

Kod crnih vina se udio fenola znatno razlikuje zbog specifičnog načina proizvodnje koji uključuje ekstrakciju pigmenata iz svih dijelova grožđa. Najbrojniji među njima, ujedno i nosioci boje crnih vina su antocijani (Kennedy, 2008; Tsao, 2010; Pereira de Freitas i sur., 2017). Značajno svojstvo crnih vina upravo je boja koja, kako navode Pereira de Freitas i sur. (2017), predstavlja glavni segment prepoznatljivosti kvalitete u potrošača, stoga je bitno očuvati ju. Antocijani predstavljaju spojeve nastale glikozilacijom antocijanidina (**Slika 10**).



Slika 10 Nastanak antocijana iz molekule aglikona (Rein, 2005)

Trenutno su poznata 22 različita antocijanidina od kojih je njih šest izdvojeno kao značajan sastojak hrane: cijanidin, pelargonidin, peonidin, delfinidin te petunidin. Oni nastaju kao derivati flavilijum kationa koji se međusobno razlikuju u odnosu na broj hidroksilnih i metoksilnih skupina zastupljenih na B prstenu flavilijum kationa. Prikaz flavilijum kationa kao i ostalih derivata dan je **Slikom 11**.



Slika 11 Molekula flavilijum kationa i derivati (Rein, 2005**)**

Obzirom da je molekula antocijanidina aglikon kojeg karakterizira slabo obojenje, nestabilnost te podložnost degradaciji, nastoji se vezati u stabilniji oblik kroz mehanizme intermolekularnog ili intramolekularnog povezivanja ili čak i stvarati komplekse s metalima.

Nastali kopigmenti ovisit će o pH vrijednosti medija, temperaturi i kemijskoj strukturi. Antocijani su prisutni u vinu u slobodnom i vezanom obliku. Tsiakkas i sur. (2020) navode kako je uobičajen udio slobodnih antocijana u crnim vinima oko 500 mg L^{-1} premda ističu da u nekim sortama poput Cabernet Sauvignona i njegovih hibrida doseže vrijednosti i do 2000 mg L^{-1}.

Ipak, slobodni antocijani nisu posebno stabilni. Polimerizacija je ključan proces koji doprinosi povećanju stabilnosti boje. Dakle, stabilna crvena boja nastaje kao posljedica reakcija kopigmentacije, odnosno polimerizacije antocijana s drugim spojevima vina. Opisani spojevi predstavnici su široko rasprostranjenih pigmenata odgovornih za žutu, narančastu, crvenu, plavu i ljubičastu boju biljaka i njihovih proizvoda, čija je pogodnost svojstvo topljivosti u vodi. U vodenim otopinama pojavljuju se u različitim strukturama ovisno o prisutnom pH otopine. Antocijani se stoga mogu pronaći u pet, dinamički uravnoteženih oblika. Ljubičasto i plavo obojenje daju kinoidalne baze, a žuto halkoni. Ovi oblici prisutni su pri povišenim temperaturama sustava. Pri normalnim uvjetima koji za vino označavaju kiselo područje zastupljene su slabo obojene karbinol baze i crveni flavilijum kationi-nosioci crvene boje vina. Sljubljivanjem flavilijum kationa s ostalim spojevima vina omogućena je polimerizacija (Oliveira i sur., 2019). Polimer štiti molekulu antocijanidina od oksidacije i drugih kemijskih modifikacija poput sulfitne dekoloracije. Time doprinosi većoj stabilnosti i očuvanju kvalitete vina.

Zajedno s flavilijum kationima kopigmentiraju i flavonoli. Najzastupljeniji među njima su: kvercetin, kamferol i mircetin. U većoj količini prevladavaju u vinima od grožđa s debljom kožicom poput vina Cabernet Sauvignon. Nadalje, polimerizaciji se priključuju i pigmenti odgovorni za trpkost i gorčinu vina – tanini. Tanini su prisutni u vinima u dva stanja, hidroliziranom i kondenziranom. Hidrolizirane tanine predstavljaju polimeri galne kiseline i šećera (najčešće glukoze), a kondenzirane proantocijanidini. Većina tanina prisutnih u grožđu i vinima je kondenzirana. Njihova koncentracija opada paralelno s procesom starenja vina zbog oksidativnih reakcija i taloženja. Osim što utječu na okus vina, imaju ulogu u bistrenju zbog sposobnosti stvaranja kompleksa s proteinima. Proteini uzrokuju mutnoću u vinu pa se povezivanjem s taninima omogućuje njihovo taloženje, a ujedno i izdvajanje (Jackson, 2014).

Tvari koje pridonose aromatičnosti, ali i znatnom utjecaju na boju vina su flavan-3-oli. Obzirom da su smješteni u sjemenkama i kožici grožđa njihova je koncentracija veća u crnim

vinima (González-Manzano, 2009). Predstavnici skupine su katehini, epikatehini i leukoantocijani. Nositelji su gorčine i trpkosti, međutim, kako se pri polimerizaciji maskiraju antocijanima, bitno ih je očuvati jer utječu na obojenost vina. U reakciji kondenzacije flavan-3-ola nastaju već spomenuti proantocijanidini. Ti bezbojni sekundarni biljni produkti predstavljaju skupinu monomera, dimera i polimera katehina i epikatehina. Količina proantocijanidina u vinima varira ovisno o sorti. Najbogatije proantocijanidinima su Cabernet Sauvignon, Merlot i Pinot crni. Unatoč tome što ih bijelo i crno grožđe sadrži podjednako, bijelo vino je siromašno proantocijanidinima (Teixiera i sur., 2013). Koncentracija proantocijanidina u crnom grožđu varira 1-4 g L^{-1} ovisno o sorti i procesu proizvodnje vina (Ribéreau-Gayon, 2006).

Fenolne kiseline i stilbeni najvažniji su neflavonoidni spojevi prisutni u grožđu i vinu među kojima ključnu ulogu u sastavu vina igraju hidroksicimetna i hidroksibenzojeva kiselina. Akumuliraju se u vakuolama kože i pulpi bobice te ekstrahiraju maceracijom. Najbrojniji među njima su derivati hidroksicimetne kiseline koji se obično povezuju s vinskom kiselinom, alkoholima, šećerima ili drugim organskim kiselinama pri čemu nastaju esteri cimetne, p-kumarinske i ferulinske kiseline. Hidroksicimetne kiseline odgovorne su za oksidaciju i posmeđivanje vina. No, uz njih za efekt posmeđivanja veže se i kaftarinska kiselina koja djeluje na sirovinu, posebice ako je njeno tkivo oštećeno. Ponašanju kaftarinske kiseline nalik polifenoloksidazi doprinosi fizičko oštećenje biljke kod kojeg fenoli dolaze u direktan kontakt s kisikom. Tada posrednici reakcija enzimskog posmeđivanja, polifenoloksidaza i peroksidaza, pretvaraju fenole u kinone koji kasnije polimeriziraju do smeđe obojenih tvari. Opisane reakcije dovode do značajnih promjena boje i arome te u konačnici smanjenja kvalitete vina. Reakcija promjene boje može se odvijati i neenzimskim putem. Hidroksicimetna kiselina u crnim vinima ima sposobnost kopigmentirati s drugim tvarima vina. Njeno prisustvo tada je jedva uočljivo zbog prekrivenosti antocijanima.

S druge strane, hidroksibenzojeve kiseline zastupljene su u puno nižim koncentracijama nego prethodno opisane, međutim, njihovo prisustvo povećava boravak u hrastovim bačvama. Razlog tomu je visok udio njihovih derivata u drvenim bačvama, posebice elaginske kiseline. Hrast je drvo koje sadrži oko 10% hidroliziranih tanina. Hidrolizom se razlažu na galnu kiselinu i dilakton-elaginska kiselina, čije prisustvo i reaktivnost s antocijanima pojačava crvenu boju vinima.

Stilbeni su spojevi koji se sintetiziraju kao odgovor biljke na stres, odnosno prisustvo biljne infekcije. Najzastupljeniji među njima je resveratrol, tj. 3,5,4'-trihidroksistilben. Nastaje u grožđu kako bi zaštitio bobice od štetnog djelovanja plijesni ili UV zračenja. Njegova je koncentracija veća u crnim vinima što se pripisuje duljoj ekstrakciji tvari iz kožice u tekućinu, ali i općenito većem udjelu fenolnih komponenti u crnom grožđu.

Među navedenim pigmentima odgovornim za organoleptička svojstva vina kao najznačajnije **tvari boje** izdvajaju se antocijani. Općenito, vizualni atributi vina ovise o načinu na koji komponente materije, u ovom slučaju vina, upijaju, odnosno odbijaju zračenje vidljivih valnih duljina. Iako se jačina boje i koncentracija prisutnih tvari može mjeriti spektrofotometrom treba imati na umu da dobiveni podaci nikada neće imati toliki utjecaj kao potrošačevo oko. Boja vina često se ocjenjuje primjenom sustava koji je osmislila Internacionalna komisija (CIE, 1986). Određuje se propusnost svjetlosnih zraka pri 445, 495, 550 i 625 nm te procjenjuje intenzitet boje. Jakost boje sugerira na visoku aromatičnost vina. Ona se postiže dovoljno dugom ekstrakcijom tvari iz kožice grožđa. Također, interakcija između boje i sadržaja suhe tvari utječe na kvalitetu vina. Crna vina poprimaju ljubičasto-crvene nijanse. Intenzivnije pigmentirane sorte poput Cabernet Sauvignona mogu boju zadržati desetljećima (Jackson, 2014).

Na stabilnost boje antocijana snažno utječu brojni fizikalni i kemijski parametri obzirom da je samostalna jedinica antocijana izrazito nestabilna što je posebice naglašeno u matriksu hrane. Rein (2005) je istaknuo devet faktora koji utječu na njihovu stabilnost: struktura, pH vrijednost sredine, temperatura, kisik, svjetlost, enzimi, askorbinska kiselina, šećeri i kopigmentacija.

Utjecaj *strukturne građe*. Značajan utjecaj na kemijsku stabilnost i reaktivnost antocijana imaju glikozilne i acilne skupine te mjesta na kojima se povezuju na aglikon. Osim toga, utjecaj na ponašanje molekule pigmenta ima pojačana hidroksilacija koja doprinosi stabilnosti aglikona, odnosno antocijanidina, dok povećana metilacija djeluje suprotno. Također, stabilnost kemijskoj strukturi daju i ostale preinake poput glikozilne supstitucije ili aciliranja. Nadalje, stabilnost boje raste povećanjem koncentracije antocijana u sustavu.

Utjecaj *pH*. Antocijani su stabilniji u kiselom mediju pri niskim pH vrijednostima nego u alkalnim otopinama. Boja koju poprimaju različita je ovisno o pH otopine u kojoj se nalaze. Osim kiselosti sredine koja je iznimno bitna za formiranje boje, ona ovisi i o stanju u kojem se

molekula pigmenta nalazi. Kako je već navedeno, u ravnotežnom stanju postoje sljedeća stanja: kinoidalna baza, flavilijev kation, karbinol ili pseudo baza i halkon. Za dominantnu crvenu boju vina odgovoran je antocijan prisutan u obliku flavilijum kationa. Kako se pH sredine snižava tako i boja vina jača. Povećanje pH uzrokovat će smanjenje intenziteta i koncentracije pigmenta budući da je flavilijum kation u tom stanju hidratiziran nukleofilnim napadom molekule vode što rezultira stvaranjem bezbojnog karbinol oblika. Tada dolazi do gubitka konjugirane dvostruke veze pa zbog toga ovaj oblik nema mogućnost apsorbcije vidljivog dijela svjetlosti. S druge strane, kod vrlo visokog pH kation se deprotonira te nastaje anion koji zrači plavu obojenost.

Utjecaj *temperature*. Antocijani se lako razgrađuju tijekom termičke obrade što može utjecati na kvalitetu boje, ali i kvalitetu čitavog proizvoda. Brzina njihove degradacije povećava se povišenjem temperature tijekom procesiranja i skladištenja. Temperatura, zajedno s promjenama pH i u ovisnosti o vremenu trajanja procesa, igra ključnu ulogu u promjenama antocijana. Povoljna situacija događa se na temperaturama od 50 °C koje su pogodne za inaktivaciju enzima polifenol oksidaze odgovorne za enzimsku razgradnju antocijana. Time se postiže pozitivan utjecaj na zadržavanje antocijana. Djelovanje povišene temperature u kombinaciji s pH 2-4 dovodi do hidrolize glikozidnih jedinica, stvaranja aglikona te postepenog gubitka boje obzirom da je novonastali produkt izrazito nestabilan. Osim toga, degradacijski produkti podložni su stvaranju nepoželjnog smeđeg obojenja.

Smatra se da acilacija molekule poboljšava stabilnost antocijana (Brouillard i sur., 1981). Također, Sadilova i sur. (2009) izvjestili su da je metoksilacija doprinijela strukturnoj otpornosti prema toplini. Međutim, jedini mehanizam koji omogućuje visok stupanj stabilnosti antocijana prema promjenama pH, topline i svjetlosti je kopigmentacija (Francis, 1992).

Utjecaj *enzima*. Enzimi također imaju nepovoljan učinak na stabilnost boje. Glavni enzimi koji sudjeluju u razgradnji pigmenata su glikozidaze koje djeluju specifično na mjesto vezanja aglikona i glikoziliranog ostatka pri čemu nastaje antocijanidin. Svi ostali enzimi koji su prirodno prisutni u grožđu, poput polifenol oksidaze i fenol oksidaze, također imaju razgrađujuće djelovanje. Mehanizam ovog nepovoljnog učinka započinje enzimatskom oksidacijom fenola te stvaranjem kinona. Oni reagiraju s antocijanima i razgrađuju ih stvarajući smeđe produkte razgradnje.

Utjecaj *kisika i svjetlosti*. Kisik može djelovati na antocijane putem dvaju mehanizama: direktnom oksidacijom ili indirektnim enzimatskim mehanizmima. No, kakvo je god djelovanje kisika aktivno, prisustvo kisika utječe na ubrzavanje degradativnih promjena. Također, ukoliko antocijani djeluju s radikalima kisika, ponašaju se kao antioksidansi. Njihovo prisutstvo u crnim vinima bilježi pozitivan utjecaj na zdravlje (Rein, 2005).

Svjetlost ima različit utjecaj na prisutstvo antocijana, s jedne strane je neophodna za njihovu biosintezu, a s druge djeluje disruptivno (Patras i sur., 2010).

Utjecaj *askorbinske kiseline*. Tretiranje voćnih proizvoda askorbinskom kiselinom uobičajena je metoda zaštite od oksidacije, ali i obogaćivanja prehrambene vrijednosti proizvoda. U njenu prisustvu dolazi do ubrzane razgradnje antocijana pri čemu se proizvod obezboji (Rein, 2005). Međutim, Del Pozo-Insfran i sur. (2004) su uočili da se u prisustvu askorbinske kiseline stabilnost aciliranih antocijana povećava.

Utjecaj *šećera*. Šećeri su prirodno prisutni ugljikohidrati u voću, a većina se prerađevina i dodatno dosladuje u svrhu povećanja udjela šećera i alkohola ili povećanja konzervirajuće moći. Pri normalnim temperaturama šećeri imaju razgrađujući učinak na antocijane. Međutim, kod tehnološkog postupka smrzavanja javlja se njihovo zaštitno djelovanje. Kao razlog tomu navodi se smanjenje udjela vode u čijem prisutstvu šećeri imaju veću reaktivnost.

Utjecaj *kopigmentacije*. Kopigmentacija je mehanizam koji sudjeluje u stvaranju antocijanidnih pigmenata u crnim vinima. Nastaje kao rezultat povezivanja molekule kopigmenta s antocijanom pri odgovarajućim uvjetima pH medija, temperature, koncentracije, molekularne strukture, otapala. Izrazito niske pH vrijednosti, povišene temperature, dodavanje metanola i soli otapalu faktori su koji imaju nepovoljan odnos prema provedbi polimerizacije. Najpogodniji preduvjeti su pH između 2 i 5 te tetraedarska struktura molekule vode u kojoj djeluju jake vodikove veze koje posljedično tomu rezultiraju uspješnijom kopigmentacijom (Rein, 2005). Prema Asenu (1976) koncentracija antocijana mora biti veća od $3{,}5\times10^{-5}$ M da bi do reakcija sparivanja uopće došlo. Kopigmente čine tvari bogate elektronima koje vežu flavilijum kation, neke molekule antocijana te tako stvaraju polimere odgovorne za stabilnost boje. Ovaj se proces naziva i prirodnim alatom poboljšanja boje prehrambenih proizvoda koji sadrže biljne vrste bogate antocijanima. Kopigmentima pripadaju ostali polifenoli, alkaloidi, aminokiseline i neke organske kiseline. Primarni

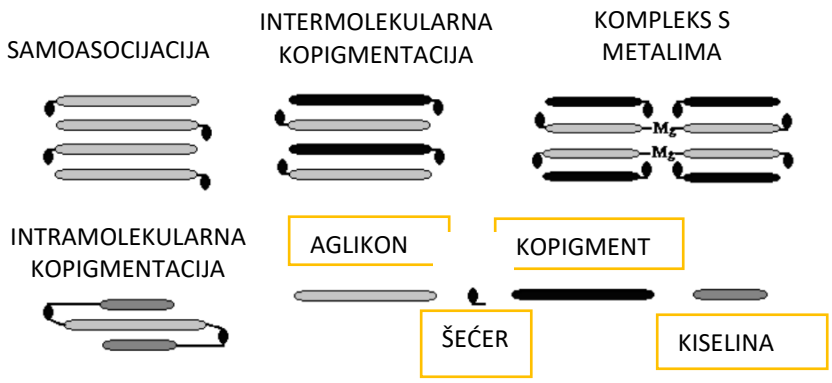
mehanizmi kopigmentacije obuhvaćaju stvaranje složenih intermolekularnih i intramolekularnih kompleksa. Ona se može odvijati i sekundarnim mehanizmima, međusobnim sparivanjem antocijana, ali i stvaranjem kompleksa s metalima:

A) intermolekularna kopigmentacija definirana je kao nekovalentna interakcija između obojenog antocijana i bezbojnog kopigmenta. Vodikove veze i hidrofobne interakcije predložene su kao glavne pokretačke sile ovog mehanizma;

B) intramolekularna kopigmentacija definirana je kao kovalentna interakcija pri čemu je kopigment dio antocijanske molekule. Navodi se da je ovaj vid kopigmentacije jači i učinkovitiji od intermolekularnog mehanizma jer rezultira stabilnijom i izražajnijom bojom antocijana (Rein, 2005);

C) samoasocijacija je pogodna za očuvanje boje antocijana posebice tijekom starenja vina;

D) mnoge varijacije boja nastaju stvaranjem metalnih kompleksa s antocijanima, međutim, prehrambena industrija ih rijetko koristi zbog mogućnosti kontaminiranja proizvoda. Najčešći metali u antocijanskim kompleksima su: kositar (Sn), bakar (Cu), željezo (Fe), aluminij (Al), magnezij (Mg) i kalij (K) (Starr i Francis, 1973). Samo antocijani na bazi cijanidina, delfinidina i petunidina, koji imaju više od jedne slobodne hidroksilne skupine u B prstenu su sposobni za vezanje s metalima (Osawa, 1982).



Slika 12 Mehanizmi kopigmentacije (Rein, 2005)

Sadržaj i sastav pojedinih polifenolnih spojeva varira ovisno o sorti, klimatskim uvjetima uzgoja, procesu vinifikacije. Budući da su sjemenke i kožica bobice grozda ispunjene fenolnim spojevima, crno vino je zahvaljujući specifičnom postupku proizvodnje, njihov bogat izvor. U postupku koncentriranja trebaju se očuvati u što većoj količini jer su od presudnog utjecaja za kvalitetu vina zbog njihovog doprinosa osjetilnim karakteristikama boje, okusa, mirisa, arome (Hornedo-Ortega i sur., 2020; Jackson, 2014).

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST POLIFENOLA

Brojni blagotvorni učinci poput antialergijskog, antimutagenog, protuupalnog, antikancerogenog i antibakterijskog djelovanja pripisuju se vinskim fenolima, posebno flavonoidima crnih vina (Rodríguez-Vaquero i sur., 2013).

Antioksidansi su tvari prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji se oksidira pri čemu inhibiraju njegovu oksidaciju (Halliwell i Gutteridge, 1995). Djeluju kao reducirajuća sredstva neutralizirajući, pri tom, slobodne radikale na način da im predaju svoj elektron postižući pravilnu ravnotežu organizma te spriječivši daljnju aktivnost radikala. Slobodni radikali predstavljaju ione, atome i molekule koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u elektronskom omotaču što ih čini vrlo reaktivnim prema susjednim molekulama. Jednim takvim djelovanjem vežu se za molekulu deoksiribonukleinske kiseline (DNK) i uzrokuju oštećenje. Konačno, takva nepovoljna reaktivnost dovodi do oštećenja staničnih struktura i razvoja degenerativnih bolesti. To se posebno odvija u stanju oksidativnog stresa, odnosno disbalansa oksidansa i antioksidansa u metabolizmu, praćenog povećanjem razine slobodnih radikala. Način na koji se zdrave stanice bore protiv opisanog stanja je produkcija antioksidansa. Samim time, njihov manjak dovodi do smanjenja sposobnosti uklanjanja reaktivnih molekula. Mehanizam popravaka tada ne može efikasno otklanjati nastala oštećenja što rezultira pojavom oboljenja (Lobo i sur., 2010).

Fenolni spojevi su antioksidansi prisutni u biljkama i hrani. Upravo specifičnost kemijske građe koju karakterizira mnoštvo hidroksilnih (-OH) skupina i nezasićenih dvostrukih veza osjetljivih na oksidaciju čini polifenole izuzetnim antioksidansima. Antioksidacijska svojstva polifenola važna su kod određivanja zaštitne uloge protiv slobodnih radikala. Pretpostavlja se da su za takvo djelovanje u biološkim sustavima odgovorne –OH skupine prstena B. Doniranjem vodikovog atoma ili elektrona radikalima omogućuje se njihova, do tad nezastupljena, stabilnost (Niculescu i sur., 2018).



Obzirom da je vino matriks iznimno bogat polifenolnim spojevima, epidemiološke studije su pokazale da je umjeren unos vina koristan za ljudsko zdravlje (López-Vélez i sur., 2003).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 ZADATAK

Istražiti utjecaj koncentriranja reverznom osmozom na zadržavanje tvari boje u vinu Cabernet Sauvignon pri tlakovima od 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja. Pokuse provesti na uređaju za reverznu osmozu Lab Unit 20 s membranom Alfa Laval-RO. Početni volumen je 3 L.

3.2 MATERIJAL I METODE

3.2.1 Priprema koncentriranog vina Cabernet Sauvignon

U provedenim istraživanjima korišteno je vino Cabernet Sauvignon. Početna suha tvar vina bila je 8,2 %. Nakon provedenog postupka koncentriranja reverznom osmozom ispitivane su tvari boje u koncentriranom vinu.

Pribor

1. Za proces koncentriranja vina reverznom osmozom upotrijebljene su kompozitne membrane tipa RO98pHt M20. Kod RO membrana porozni sloj (nosač) je izrađen od poliestera. Karakteristike membrana navedene su u **Tablici 1**.

Tablica 1 Karakteristike RO membrana

Tip membrane	RO98pHt M20
Proizvođač	Alfa Laval Danska
Materijal	poliamid
R_{NaCl}	> 0,98
Maksimalna radna temperatura °C	60
Maksimalni radni tlak bar	55
Dozvoljeni pH	2 – 11

Upotrijebljeno je šest kompozitnih membrana, složenih u pločasti modul, ukupne površine 0,1736 m^2 (jedna membrana ima površinu od 0,02893334 m^2).

2. **Slika 13** prikazuje laboratorijski uređaj za reverznu osmozu „Lab Unit M20“ danske tvrtke Dow Danmark Separation Systems De Danske Sukkerfabrikker, Copenhagen, s pločastim modulom i membrana tipa Alfa Laval-RO.



Slika 13 Prikaz uređaja „Lab Unit M20“ (Smiljanić, 2013)

Pokusi su provedeni sa vinom Cabernet Sauvignon početnog udjela suhe tvari 8,2 %. Početna temperatura vina u tanku kod svih pokusa bila je 20°C. Količina uzorka u tanku iznosila je 3 L. Koncentriranje je provedeno pri tlakovima od 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja. Kod svih pokusa vino je koncentrirano do maksimalne koncentracije koju je bilo moguće postići, a to je nakon izdvajanja alkohola 22,9 % suhe tvari. Svake 4 minute bilježio se volumen permeata, temperatura uzorka u tanku (ukoliko se radilo o postupku s primjenom hlađenja bilježila se i temperatura rashladnog sredstva) i udio suhe tvari. U pokusu s hlađenjem korištena je pokretna rashladna jedinica koja je priključena na izmjenjivač topline uređaja za membransku filtraciju. Kao rashladno sredstvo koristila se voda.

3.2.2 Spektrofotometrijska analiza tvari boje

Određivanje antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda. pH-diferencijalna metoda se zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra absorbancije. pH-diferencijalna metoda za određivanje antocijana omogućava brzo i točno mjerenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenata i drugih tvari koje bi mogle smetati. Antocijani su određivani metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001) s malom modifikacijom (Giusti i Wrolstad, 2001.). Otpipetirano je 0,2 mL ekstrakta uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 1

mL pufera pH 1, a u drugu 1 mL pufera pH 4,5. Nakon stajanja od 15 minspektrofotometrijski je mjerena absorbanca uzoraka pri valnim duljinama od 512 nm i 700 nm. Sadržaj antocijana je izračunat prema slijedećoj formuli:

$$c_{(antocijana)}\ (mg/kg) = (A \times M \times FR \times 1000) / \varepsilon \times l$$

gdje je:

A - absorbancija uzorka, a izračunava se prema izrazu:

$$A = (A_{512} - A_{700})_{pH\ 1} - (A_{512} - A_{700})_{pH\ 4,5}$$

M - 449,2

FR - faktor razrjeđenja

ε - molarna absorptivnost;

26 900 l - duljina kivete; 1 cm

(M i ε su uzeti za dominantnu vrstu antocijanina odnosno za cijanidin-3-glukozida).

Određivanje degradacije antocijana

Degradacija antocijana odnosno smanjenje intenziteta crvene boje (A_{512}) i povećanje posmeđivanja (A_{420}) se izračunava prema formuli:

Gustoća boje kontrolnog uzorka (tretiranog vodom):

$$\text{Gustoća boje} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] \times FR$$

Boja nastala polimerizacijom (uzorak tretiran bisulfitom):

$$\text{Boja nastala polimerizacijom} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] \times FR$$

FR – faktor razrjeđenja

% boje nastale polimerizacijom = boja nastala polimerizacijom/gustoća boje x 100

Određivanje polifenolnih spojeva

Koncentracija ukupnih fenola se određuje Folin-Ciocalteu metodom. Metoda se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja (apsorbance) pri valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988.). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline a pri oksidaciji fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni.

Otpipetirano je 0,2 ml uzorka soka određenog razrijeđenja, te dodano 1,8 ml destilirane vode, 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa (1:10; pripremljen tako da da je otpipetirano 3,3 ml Folin-Ciocalteu reagensa u odmjernu tikvicu od 100 ml i do oznake dopunjeno s destiliranom vodom), te nakon stajanja 30 sekundi do 8 minuta dodano 8 ml 7,5% Na_2CO_3 (ukupni volumen mora biti 20 ml). Za slijepu probu otpipetira se 2 ml destilirane vode u epruvetu, te doda 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 8 ml 7,5% Na_2CO_3. Nakon stajanja u mračnom prostoru 2-20 sati, pri čemu dolazi do razvijanja boje, mjeri se apsorbanca na spektrofotometru pri valnoj dulji od 765 nm. Sadržaj polifenolnih spojeva je interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/L uzorka.

Određivanje antioksidativne aktivnosti

DPPH metoda

Jedna od najrazvijenijih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti, na osnovi sintetskih radikala, je reakcija s 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom (DPPH). To je stabilni slobodni radikal organskog dušika. Kod DPPH testa, nestanak DPPH radikala se prati smanjenjem apsorbancije pri 517 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa ili reakcije s radikalima (Brand-Williams i sur., 1995.). Dodatkom antioksidansa dolazi do redukcije DPPH radikala te nastaje aroksil radikal koji dalje ulazi u reakciju s još jednim DPPH radikalom pri čemu dolazi do njihove kondenzacije te konačno nastaje stabilni oblik. Prednost metode je brza i jednostavna izvedba, a neki od nedostataka su usko linearno područje te sterička priroda molekule DPPH radikala, koja je pogodnija za male molekule te one imaju bolji pristup DPPH radikalu.

ABTS metoda

U ABTS metodi prati se raspadanje radikala $ABTS^{\cdot}+$ koji nastaje oksidacijom plavo-zelenog 2,2`-azinobis (3-etilbenzotiazilin-6-sulfonat) (ABTS) djelovanjem fenolnih tvari. U odsutnosti fenolnih tvari, $ABTS^{\cdot}+$ je relativno stabilan, ali u prisustvu donora H^+ brzo reagira te prelazi u neobojeni oblik ABTS-a. Promjena boje detektira se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 734 nm.

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS, dobro promiješa i smjesa se ostavi reagirati 1h i 35 min u mraku. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 734 nm.

Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje trolox-a koji se koristi kao standard za izražavanje antioksidacijske aktivnosti. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka doda ista količina destilirane vode. Mjerenja su provedena u tri paralele.

CUPRAC metoda

Ova metoda ima za cilj procijeniti sposobnost uzorka da reducira bakrene ione u vodenom mediju, odnosno određuje sposobnost uzorka da reducira Cu (II)-neokuproin kompleks (Apak i sur., 2004). Osnova metode je da kompleks Nc s reduciranim oblikom metala prikazuje karakteristične vidljive apsorpcijske vrpce s maksimalnim intenzitetom na 593 i 450 nm za CUPRAC test. Prema tome, sposobnost uzorka da reducira metalne komplekse, nakon određenog vremena inkubacije stvara odgovarajuće vidljive apsorpcijske vrpce koje se koriste za određivanje CUPRAC vrijednosti.

Postupak: otpipetira se 1 mL otopine bakar klorida, 1 mL otopine neokuproina, 1 mL amonij acetata, 0,2 mL uzorka te 0,8 mL vode. Smjesa se homogenizira te ostavi stajati 30 minuta. Nakon inkubacije mjeri se absorbanca na 450 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje trolox-a koji se koristi kao standard za izražavanje antioksidacijske aktivnosti. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka doda ista količina destilirane vode. Mjerenja su provedena u tri paralele.

FRAP metoda

U FRAP metodi se prati redukcija Fe^{3+} iona (feri oblik) u Fe^{2+} ion (fero oblik) u prisutnosti antioksidansa. Nastali ion u prisutnosti TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin) reagensa formira intenzivno obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorbancije pri 593 nm (Roginsky i Lissi, 2005.).

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka i doda 3 mL FRAP otopine. Reakcijska smjesa se dobro promiješa i ostavi stajati 30 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 593 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodana je voda. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard. Određivanje je provedeno u tri paralele.

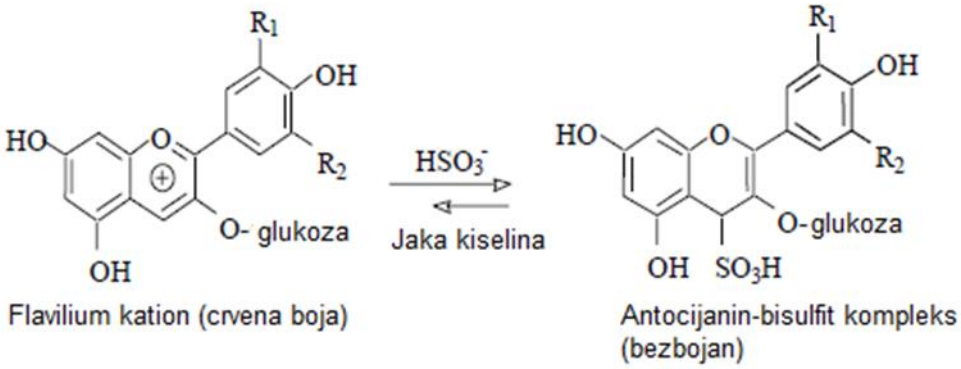
Određivanje ukupnih flavonoida

Metoda za određivanje ukupnih flavonoida je Kim, Jeong i Lee s modifikacijom. Kalibracija se radi s različitim koncentracijama kvarcetina, a linearnost je 0,9953. U epruvete se stavlja 1

mL otopine vina promiješanog s 0,3 ml 5 % NaNO2, a nakon 5 minuta dodaje se 0,3 mL 10 % $AlCl_3$. Nadalje se nakon 6 minuta sadržaj neutralizira s 2 mL 1M otopine NaOH. Pri čemu sadržaj mijenja boju, a zatim se mjeri absorbanca na 510 nm. Izvodi se kvantifikacija koristeći kalibracijsku krivulju. Rezultat je izražen u mg ekvivalenata kvarcetina (QE)/100 g vina, a izražava se kao srednja vrijednost tri ponavljanja.

Određivanje polimerne boje

Degradacija antocijana može se pratiti očitanjem apsorbance u uzorcima koji su tretirani bisulfitom. Antocijani s bisulfitom tvore bezbojan kompleks (**Slika 14**). Boja koja nastaje polimerizacijom antocijana odnosno nastajanjem kompleksa antocijani/tanini, je otporna na djelovanje bisulfita. Apsorbanca uzorka tretiranog bisulfitom, na 420 nm predstavlja stupanj posmeđivanja, a gustoća boje se definira kao suma apsorbanci na 420 nm i λvis-max (512 nm). Omjer između polimerne boje i gustoće boje se koristi kao postotak boje koja je nastala polimerizacijom.



Slika 14 Nastajanje bezbojnog kompleksa između antocijana i bisulfita (Wrolstad i sur., 2005)

3.2.3 Određivanje polifenola HPLC metodom

HPLC analitički sustav

Analiza flavan -3-ola i fenolnih kiselina izvedena je na HPLC analitičkom sustavu (HPLC 1260 Infinity II s PDA detektorom; Agilent Technologies, CA, USA). Separacija polifenolnih spojeva izvedena je na Poroshell 120 EC-C18 koloni koja je zaštićena pretkolonom (Poroshell 120 EC-C18, Agilent, USA). Za svaki uzorak provedena su dva mjerenja.

Koncentrati su razrijeđeni na udio topljive suhe tvari osnovnog soka (8,2 %) i profiltrirani kroz filter Chromafil Xtra (PTFE; 0,45 µm, 25 mm) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prije HPLC analize. Permeati su analizirani nerazrijeđeni. Metode za analizu flavan -3-ola i fenolnih kiselina su prethodno validirane (Jakobek i sur., 2012b.). Flavanoli su identificirani na valnoj 360 nm, te fenolne kiseline na 320 nm. Kvantifikacija flavanola i fenolnih kiselina provedena je na osnovi kalibracijskih krivulja standardnih spojeva (rutina, kvercetina i klorogenske kiseline). Neki spojevi su određeni djelomično (neoklorogenska kiselina). Zbrajanjem količina pojedinih flavanola i fenolnih kiselina, dobivene su količine ukupnih flavanola i fenolnih kiselina, određenih pomoću HPLC.



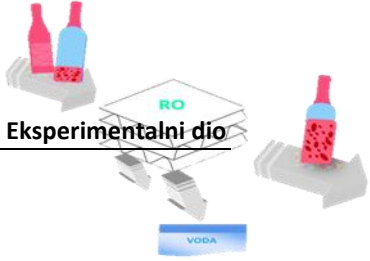
Slika 15 HPLC analitički sustav

HPLC metoda za analizu flavanola i fenolnih kiselina

Flavanoli i fenolne kiseline razdvojeni su reverzno-faznom HPLC metodom primjenom 0,1 % fosforne kiseline kao mobilne faze A te 100 %-nog metanola kao mobilne faze B. Uvjeti analize prikazani su u Tablici 2. Period re-ekvilibracije izmedu pojedinih analiza bio je 10 minuta. Spektar je sniman u području valnih duljina od 200 do 600 nm.

Uvjeti rada:

- kolona: Poroshell 120 EC-C18 column (4.6 x 100 mm, 2.7 µm); pretkolona: Poroshell 120 EC-C18 guard column (4.6 x 5 mm, 2.7 µm);
- Protok: 1 mL/min;



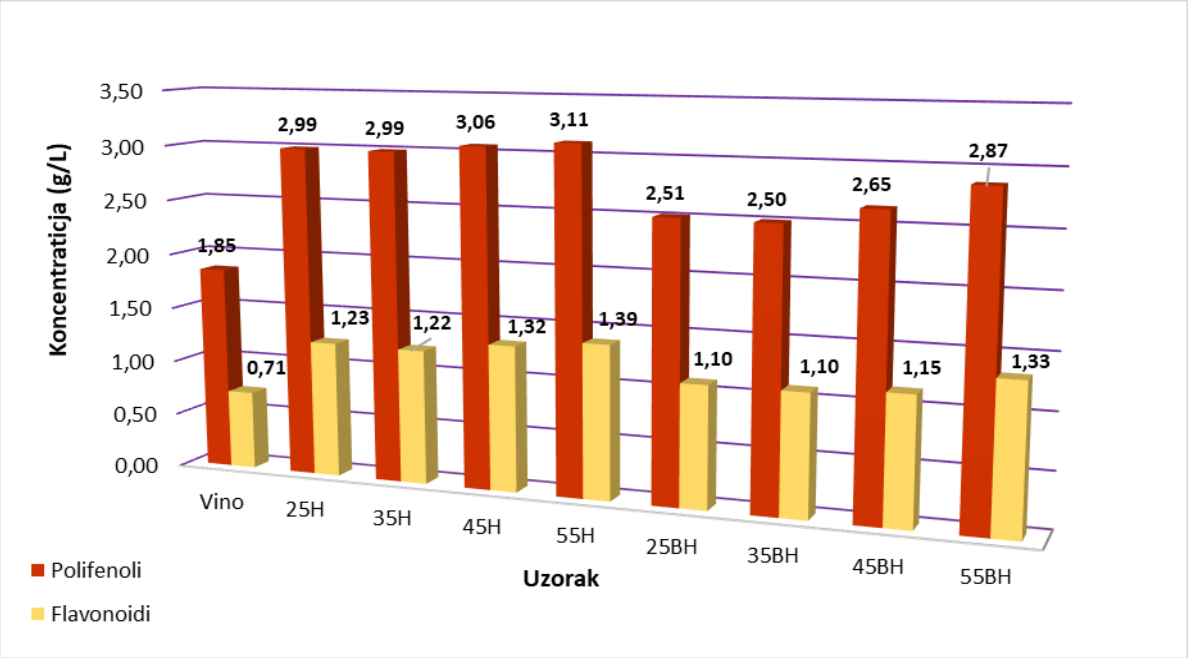
- Volumen injektiranja: 10 µL;
- Spektar: 200 do 600 nm.

Tablica 2 HPLC metoda za analizu polifenolnih spojeva

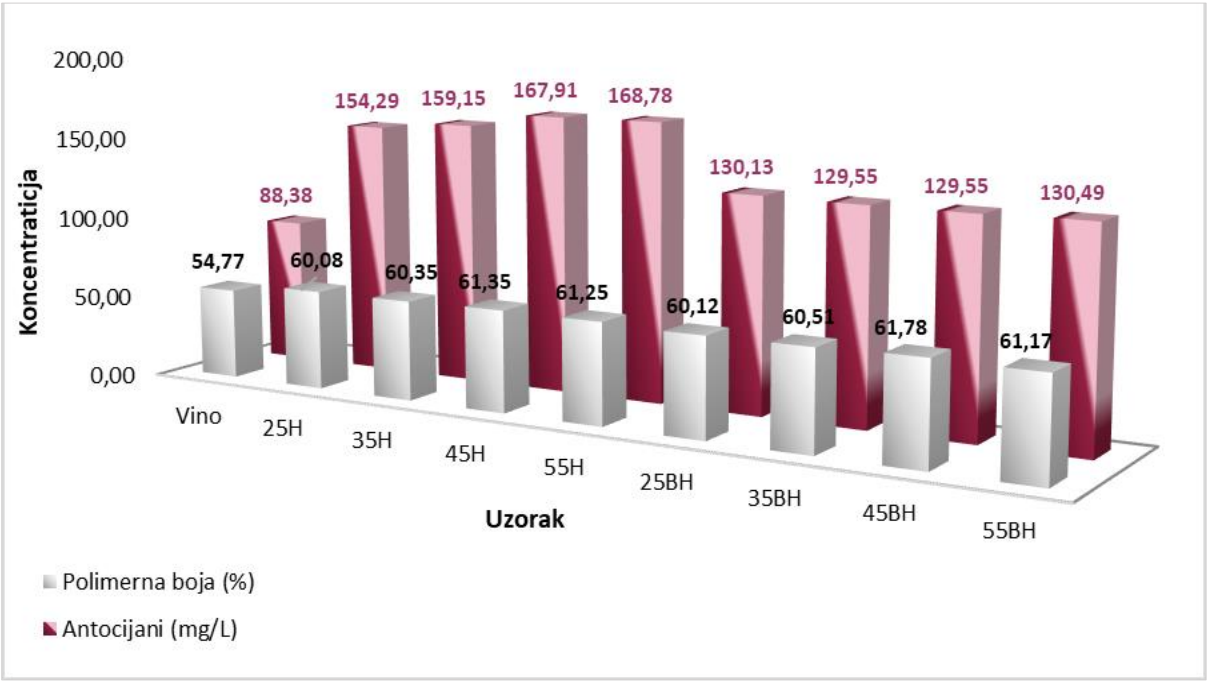
min	A (%)	B (%)
0	95	5
3	70	30
15	65	35
22	63	37
30	59	41
32	55	45
40	51	49
45	20	80
48	20	80
50	95	5
53	95	5

4.REZULTATI I RASPRAVA

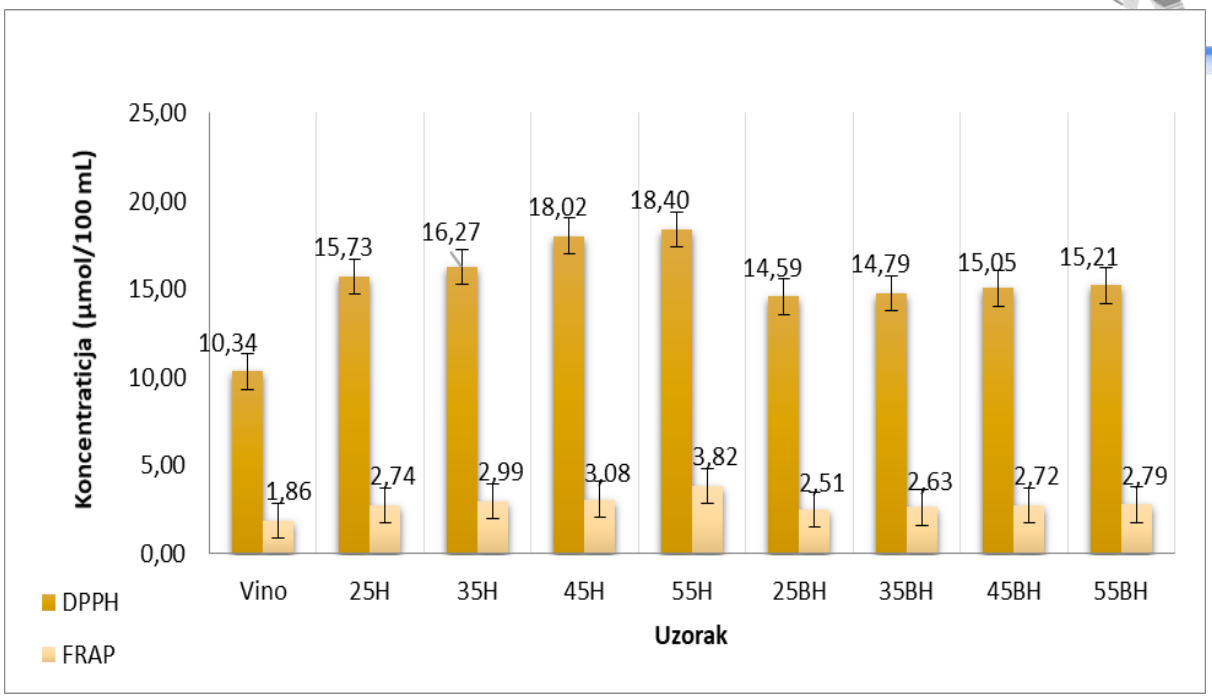
4.1 GRAFIČKI PRIKAZI ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA



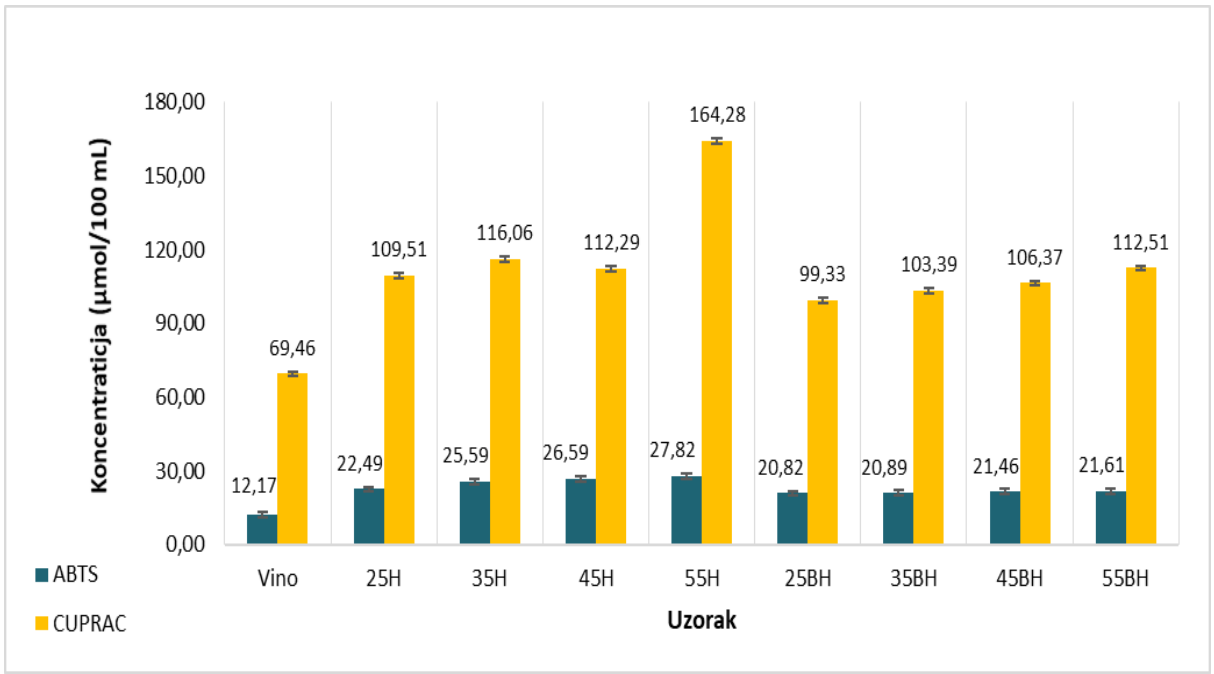
Slika 16 Sadržaj polifenola i flavonoida u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon i koncentratima dobivenim procesom reverzne osmoze pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja



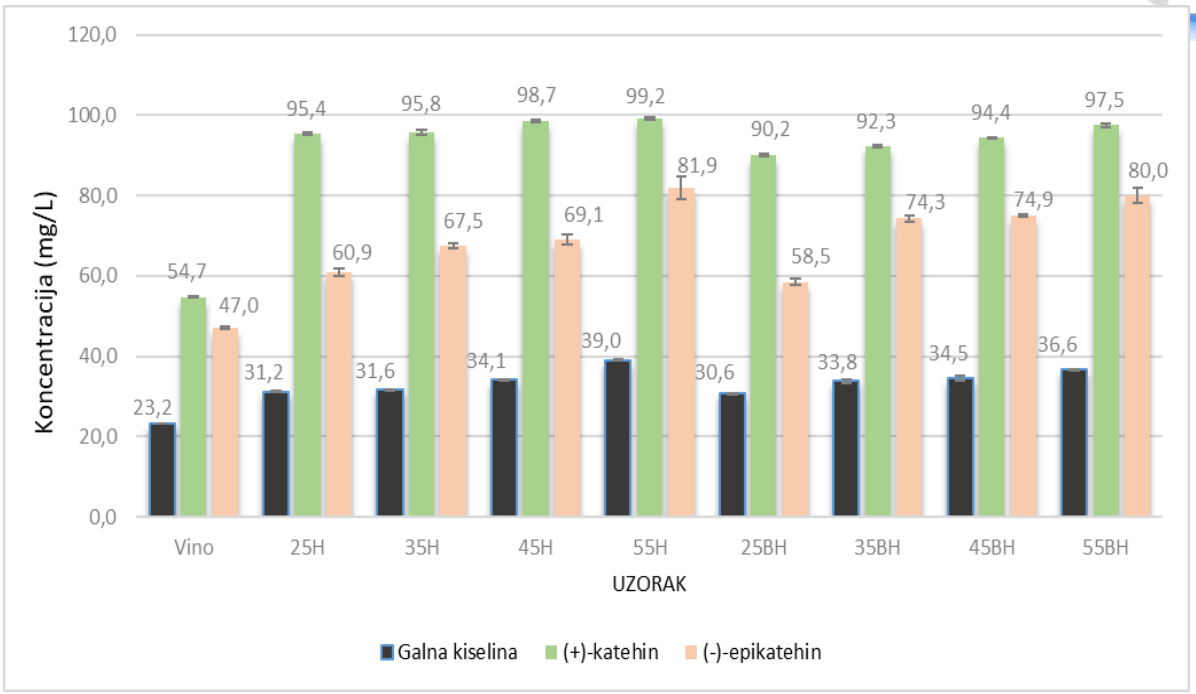
Slika 17 Sadržaj antocijana i polimerne boje u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon i koncentratima dobivenim procesom reverzne osmoze pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja



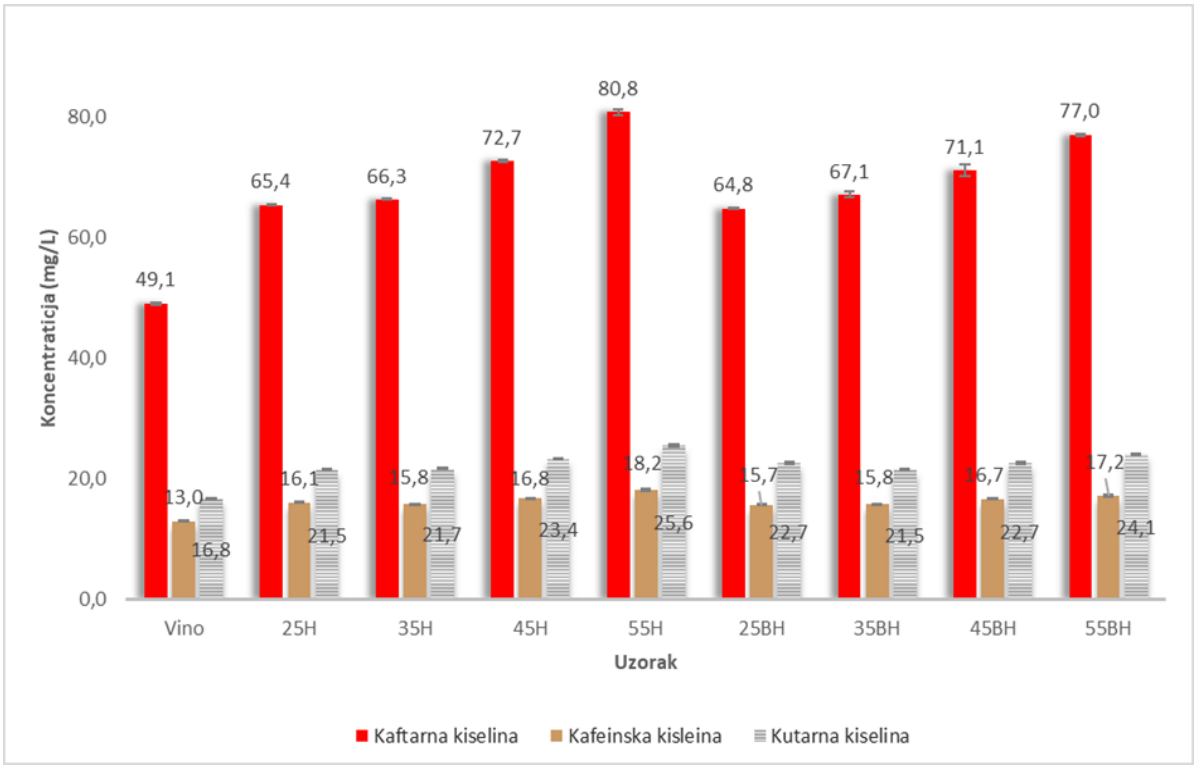
Slika 18 Antioksidacijska aktivnost DPPH i FRAP metodom u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon i koncentratima dobivenim procesom reverzne osmoze pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja



Slika 19 Antioksidacijska aktivnost ABTS i CUPRAC metodom u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon i koncentratima dobivenim procesom reverzne osmoze pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja



Slika 20 Sadržaj galne kiseline, (+) – katehina u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon i koncentratima dobivenim procesom reverzne osmoze pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja



Slika 21 Sadržaj kaftarne, kafeinske i kutarne kiseline u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon i koncentratima dobivenim procesom reverzne osmoze pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja

Koncentriranje voćnih sokova uparavanjem jedan je od procesa konzerviranja u prehrambenoj industriji koji se upotrebljava već dugi niz godina. Uz mnogobrojne prednosti jedan od najvećih nedostataka ovog procesa je značajan gubitak arome i osjetljivih, a nutritivno vrlo značajnih sastojaka namirnica kao što su antocijani i vitamini. Stoga se provode mnogobrojna istraživanja kako bi se primijenili drugi postupci koncentriranja i mogući gubitci sveli na minimum. Neki od alternativnih postupaka koncentriranja su koncentriranje zamrzavanjem, perevaporacija i membranski procesi.

Koncentriranje nije uobičajen postupak u tehnologiji proizvodnje vina. Uglavnom se koriste postupci korekcije vina s ugušćenim moštom.

Predmet istraživanja ovog diplomskog rada bio je utvrditi utjecaj membranskog procesa reverzne osmoze na zadržavanje tvari boje vina Cabernet Sauvignon primjenom različitih procesnih tlakova s hlađenjem i bez hlađenja uz minimalnu degradaciju visokokvalitetnih sastojaka samoga vina.

Udjeli polifenola, flavonoida, antocijana, polimerne boje, antioksidacijska aktivnost (određena DPPH, FRAF, ABTS i CUPRAC metodom) te udjeli galne, kaftarne, kafeinske i kutarne kiseline uz udjele (+) katehina i (-) epikatehina u početnom uzorku vina i koncentratima dobivenih postupkom reverzne osmoze pri različitim procesnim uvjetima tlaka i temperature prikazani su na **Slikama 16 – 21**.

Početni uzorak vina s kojim je provedeno istraživanje sadržavao je 1,85 g/L ukupnih polifenola. Tijekom procesa koncentriranja nije došlo do gubitka ukupnih polifenola, već je s koncentriranjem vina pri svim primijenjenim tlakovima došlo do većeg zadržavanja polifenola u koncentratima. Pri koncentriranju s hlađenjem uočava se nešto veće zadržavanje ukupnih polifenola nego u postupku bez hlađenja. Unatoč tome, jasno je vidljivo da povećanje procesnog tlaka ima povoljan utjecaj na povećanje, odnosno zadržavanje ukupnih polifenola.

Istraživanje Guraka i sur. (2010), već spomenuto u isticanju kvalitete rada postupkom koncentriranja reverznom osmozom (RO), pokazalo je da se najveći udio polifenola i antocijana zadržava u koncentratu dobivenom pri visokom tlaku (60 bara) i nisko održavanoj temperaturi (20 ^{o}C). Rezultati prikazani u ovom diplomskom radu, u skladu s prethodno navedenim, pokazuju da udjeli ukupnih polifenola i flavonoida prikazani na **Slici 16** pri tlaku

od 55 bara, primjenom sustava hlađenja, imaju veće zadržavanje polifenola u odnosu na ostale postupke koncentriranja pri različitim tlakovima, sa i bez hlađenja. Tim postupkom zabilježeno je najveće zadržavanje ukupnih polifenola (3,11 g/L). Isti trend prati zadržavanje flavonoida (1,39 g/L) (**Slika 16**) i antocijana (16,88 g/L) (**Slika 17**) u odnosu na ostala mjerenja. To znači da je koncentriranjem vina sorte Cabernet Sauvignon dobiven koncentrat koji u odnosu na nulti uzorak sadrži 1,68 puta više ukupnih fenola, 1,96 puta više flavonoida i 1,91 puta više antocijana. Nadalje, primjenom nižeg tlaka pri koncentriranju vina dolazi do smanjenja udjela ukupnih polifenola i flavonoida u retentatu. Najmanji sadržaj polifenola i flavonoida zamijećen je pri procesnom tlaku od 35 bara bez hlađenja.

Slično navedenom, najmanji sadržaj antocijana zamijećen je pri procesnim tlakovima od 35 i 45 bara, također u uvjetima bez hlađenja (**Slika 17**). Iz navedenih rezultata proizlazi da povećanjem tlaka uz povećanje radne temperature u procesu dolazi do smanjenja sadržaja antocijana u ispitivanim uzorcima vina. Može se reći da su navedeni faktori začetnici degradacije antocijana. Razlog tome je povećanje energije u sustavu primjenom visokih tlakova. Takav sustav potrebno je hladiti, jer ukoliko se oslobođena energija u obliku topline ne odvodi pravovremeno iz sustava, doći će do povećanja temperatura što naposljetku uzrokuje termičku razgradnju osjetljivih komponenata poput antocijana.

Monomeri antocijana, odnosno slobodni antocijani su vrlo nestabilni i kao takvi podložniji raspadu. Polimerizacija je proces koji doprinosi povećanju stabilnosti boje. Najčešće se antocijani vežu s taninima (galna kiselina) te pomoću različitih mehanizama mogu stvarati nove spojeve s drugim komponentama vina. Dakle, ukoliko je u vinu zastupljena visoka koncentracija slobodnih antocijana oni će dodatkom bisulfita stvoriti bezbojan kompleks. Slijedom toga, intenzitet crvene boje će se smanjiti. Količina polimerne boje preko koje se određuju degradirani antocijani predstavlja udio obojenja polimernog materijala nastalog raspadom antocijana (Danişman i sur., 2015; Santana i sur., 2014). Rezultati prikazani na **Slici 17** pokazuju da postotak degradacije antocijana u koncentratima ne odstupa puno u odnosu na vrijednost degradacije antocijana u početnom uzorku vina. Prosječan udio degradiranih antocijana iznosi 60,83% što se od nultog stanja razlikuje za 6,06%. Najveća razgradnja uočena je pri procesnom tlaku od 45 bara i režimu bez hlađenja, a degradativne promjene od prosjeka odstupaju za manje od 1%. Iako je odstupanje jedva uočljivo, ono postoji, a razlog tome je primjena temperaturnog režima bez mogućnosti odvođenja energije koja pogoduje

razgradnji antocijana. Istraživanje Danişmana i sur. (2015) također je pokazalo da porast temperature utječe na razgradnju antocijana i stvaranje smeđih produkata.

Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom (**Slika 18**) sličnog je trenda kao i prethodno komentirani spojevi. Pri nižim tlakovima u sustavu bez hlađenja vidljiva je slaba antioksidacijska aktivnost, dok je najveća postignuta primjenom procesnog tlaka od 55 bara uz hlađenje.

Polifenolni spojevi su iznimni antioksidansi te kao takvi sprječavaju nepoželjno djelovanje slobodnih radikala donirajući svoj elektron kako bi zaustavili„napad“ slobodnih radikala. Oni mogu izazvati disbalans našeg organizma te utjecati na razvoj kroničnih bolesti (Lobo i sur., 2010). Usporedbom rezultata istraživanja dobivenih primjenom četiri različite metode (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC) koje se međusobno razlikuju prema samom mehanizmu određivanja antioksidacijske aktivnosti uočeno je da proporcionalno povećanju tlaka raste sposobnost zadržavanja antioksidacijske aktivnosti vinskih koncentrata. Metoda DPPH očituje se u mjerenju apsorbancije nakon reakcije antioksidansa s radikalom DPPH. Rezultati pokazuju da je najveća antioksidacijska aktivnost (18,40 ± 0,1 µmol TE/100 mL) detektirana u koncentratu dobivenom pri procesnom tlaku od 55 bara s hlađenjem. FRAP metodom dobivene su niže vrijednosti u odnosu na ostale metode. Početni uzorak sadržavao je 1,86 ± 0,04 µmol TE/100 mL, a u koncentratima vrijednost antioksidacijske aktivnosti kretala se u rasponu od 2,51 ± 0,01 do 3,82 ± 0,29 µmol TE/100 mL. Na **Slici 19** dana je usporedba ABTS i CUPRAC metode. ABTS metodom najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena je u količini od 27,82 ± 0,93 µmol TE/100 mL, dok je CUPRAC metodom detektirana znatno veća antioksidacijska aktivnost u odnosu na ostale primijenjene metode, a iznosi 164,28 ± 7,31 µmol TE/100 mL.

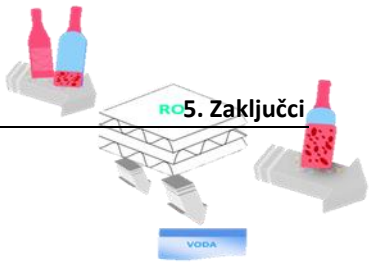
Sadržaj ostalih fenolnih spojeva zastupljenih u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon i koncentratima prikazani su na **Slikama 20 i 21**. Na **Slici 20** je vidljivo da se (+) katehin i (-) epikatehin u najvećem udjelu nalaze u koncentratu dobivenom pri procesnom tlaku od 55 bara s hlađenjem. U odnosu na početni uzorak vina koncentracija (+) katehina je znatno veća, dok je udio (-) epikatehina nešto manji.

Sadržaj u vinu prisutnih fenolnih kiselina prikazan je na **Slici 21**. Dominantne fenolne kiseline u vinu i koncentratima su kaftarna, kafeinska i kutarna kiselina, inače derivati poznate hidroksicimetne kiseline. Količina kafeinske kiseline kretala se između 15,70 ± 0,1 i 18,20 ±

0,2 mg/L u koncentratu i 13,00 ± 0,1 mg/L u početnom uzorku. Za razliku od kafeinske, u početnom uzorku pronađene su nešto veće količine kaftarne kiseline 49,10 ± 0,2 mg/L, a koncentrat je sadržavao od 64,80 ± 0,1 do 80,80 ± 0,5 mg/L. Sadržaj kutarne kiseline u koncentratu kreće se u rasponu od 21,50 ± 0,1 do 25,60 ± 0,2 mg/L.

Fenolne kiseline kao primarni supstrati za polifenoloksidaze imaju sposobnost stvaranja smeđih produkata. Također, podložne su enzimskoj oksidaciji uslijed kontakta s kisikom pri čemu fenoli bivaju pretvoreni u kinone pri čemu dolazi do pojave vrlo nepoželjne boje crnog vina (Rein, 2005).

5.ZAKLJUČCI



Na osnovi dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Primjena membranskog procesa RO vrlo je uspješna metoda koncentriranja crnog vina Cabernet Sauvignon. Optimalni parametri zadržavanja svih ispitivanih komponenata vina; tvari boje postignuti su pri procesnom tlaku od 55 bara s primjenom hlađenja.

2. Porastom tlaka u sustavu raste sposobnost zadržavanja antioksidativne aktivnosti koncentrata.

3. U procesima s hlađenjem zamijećeno je veće zadržavanje ukupnih polifenola. Povećanjem tlaka povećava se i njihovo zadržavanje. Međutim, rast koncentracije polifenola zabilježen je i u postupku bez hlađenja, iako se porast kreće nešto slabijim trendom i dalje je pri višim tlakovima udio polifenola veći.

4. Djelovanjem visokih tlakova oslobađa se velik udio energije koja, ukoliko se ne odvede iz sustava, može imati štetne učinke na sastojke vina, prije svega degradaciju antocijana. Najveća degradacija zabilježena je pri tlaku od 45 bara bez hlađenja.

5. Procesom RO postignuta je visoka retencija antocijana kao glavnih nositelja boje crnih vina.

6. Veći tlakovi s primjenom hlađenja pogoduju boljem zadržavanju tvari boje i većoj antioksidativnoj aktivnosti.

6.LITERATURA

Aguiar IB, Miranda N, Gomes F, Santos M, Freitas D, Tonon R, Cabral L: Physicochemical and sensory properties of apple juice concentrated by reverse osmosis and osmotic evaporation. Innovative *Food Science & Emerging Technologies* 16: 137-142, 2012.

Alpeza I: Temelji kemijskog sastava vina. *Glasnik zaštite bilja* 31: 143-150, 2008.

Asen S: Known factors responsible for infinitive flower color variation. *Acta Horticultura* 63: 217-223, 1976.

Balster J: Plate and frame membrane modul. *Encyclopedia od membranes*, 2015.

Brouillard R: The chemistry of anthocyanin pigments. Part 7. Origin of the exceptional color stability of the Zebrina anthocyanin. *Phytochemistry* 20: 143-145, 1981.

Cassano A, Rastogi NK, Basile A: Reverse osmosis in food processing. U *Current trends and future developments on (bio-) membranes. Reverse and forward osmosis, principles, applications, advances*, str. 229-257. Elsevier, London, 2020.

Danişman G, Arslan E, Toklucu AK: Kinetic analysis of anthocyanin degradation and polymeric. *Czech Journal of food science* 33: 103-108, 2015.

Colour Formation in Grape Juice during Heating

Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST: Phytochemical composition and pigment stability of açai. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 1539-1545, 2004.

Francis FJ: A new group of food colorants. *Trends Food Science Technology* 3: 27-30, 1992.

Gammon DW, Moore TB, O'Malley MA: A toxicological assessment of sulfur as a pesticide. *Handbook of pesticide toxicology,* str. 1889-1901. Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, Sacramento, USA, 2010.

Gómez-Plaza E, Gil-Muñoz R, López-Roca JM, Martínez-Cutillas A, Fernández JI: Maintenance of colour composition of a red wine during storage. Influence of prefermentative practices, maceration time and storage. *LWT - Food Science and Technology* 35: 46-53, 2002.

González-Manzano S, Dueñas M, Rivas-Gonazalo J C, Escribano-Bailón M T, Santos-Buelga C: Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food chemistry* 114: 649-656, 2009.

Grainger K i Tattersall H: *Wine production and quality*. Wiley-Blackwell, UK, 2016.

Grainger, K: Wine. U Tamime AY: *Membrane processing: dairy and beverage applications*, str. 316-333. Blackwell publishing Ltd, SAD, 2012.

Gurak PD, Cabral MC, Rocha-Leão M H, Matta VM: Quality evaluation of grape juice concentrated by reverse osmosis. *Journal of food engineering* 96: 421-426, 2010.

Halliwell B i Gutteridge JMC: The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free radical biology and medicine* 18: 125-126, 1995.

Hausmann A, Duke MC, Demmer T: Principles of membrane filtration. U Tamime AY: Membrane processing, str. 17-51. Blackwell publishing Ltd, SAD, 2012.

Hornedo-Ortega R, Reyes Gonzalez-Centeno M, Chira K, Jourdes M, Teissedre P-L: *Phenolic compounds of grapes and wines: key compounds and impications in sensory perception.* 2020.

https://www.intechopen.com/online-first/phenolic-compounds-of-grapes-and-wines-key-compounds-and-implications-in-sensory-perception [18.08.2020.].

Idarraga-Mora J, Childress AS, Friedel P, Ladner D, Rao A, Husson SM: Role of nanocomposite support stiffness on tfc membrane water permeance. Membranes 8: 111, 2018.

Jackson R: *Wine Science: principles and applications*. Elsevier, USA, 2014.

Jaffrin, M: Membrane filtration processes. Bookboon, 2015.

https://www.mobt3ath.com/uplode/book/book-13346.pdf [02.07.2020.].

Kennedy JA: Grape and wine phenolics: observations and recent findings. *Ciencia e investigación agraria* 35: 107-120, 2008.

Kotsanopoulos K i Arvanitoyannis I: Membrane processing technology in the food industry: food processing, wastewater treatment, and effects on physical, microbiological, organoleptic, and nutritional properties of foods. *Food science and nutrition* 55, 2013.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy review 4: 118-126, 2010.

López- Vélez M, Martínez F, Valle-Ribes C: The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Food science and nutrition* 43: 233-244, 2003.

Lovrić T: *Procesi u prehrambenoj industriji*. Hinus, Zagreb, 2003.

https://issuu.com/hinus/docs/procesi-u-prehrambenoj-industriji/15 [17.07.2020.].

Mazzotti M, Gazzani M, Milella F, Gabrielli P: Membrane separations, rate controlled separation process. Zurich, 2016.

https://ethz.ch/content/dam/ethz/special-interest/mavt/process-engineering/separation-processes-laboratory-dam/documents/education/RCS/Membrane_course.pdf [29.06.2020.].

McRae J, Teng B, Bindon K: Factors influencing red wine color from the grape to the glass. Encyclopedia of Food Chemistry: 97-106, 2019.

Mietton-Peuchot M, Milisic V, Noilet P: Grape must concentration by using reverse osmosis. *Desalination* 148: 125-129, 2002.

Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva: Zakon o vinu (Narodne novine br. 32/2019), 2019.

Niculescu V-C, Paun N, Ionete R-E: The evolution of polyphenols from grapes to wines. U *Grape and wines - advances in production, processing, analysis and valorization*. Intech, Rijeka, str. 119-138. 2018.

Oliveira J, Freitas V, Mateus N: Polymeric pigments in red wines. U Morata A: *Red wine technology,* str. 207-218. Elsevier, London, 2019.

Osawa Y: Copigmentation of anthocyanins. U Markakis P: *Anthocyanins as food colors*, str. 41-65. Academic press INC, London, 1982.

Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK: Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology* 21: 3-11, 2010.

Pereira de Freitas VA, Fernandes A, Oliveira J, Teixeira N, Mateus N: A review of the current knowledge of red wine colour. *OENO One, vine and wine open access journal* 51: 1-15, 2017.

Pichler, A: Procesi u prehrambenoj industriji. *Interna skripta*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.

http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski_studij/Procesi_u_prehrambenoj_industriji/Membranski%20procesi.pdf [20.08.2020.]

Pinnau I, Freeman BD: Formation and modification of polymeric membranes: overview. U *Membrane formation and modification*, American Chemical Society, USA 2000.

Plata C, Millán JC, Ortega JM: Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food microbiology* 20: 217-224, 2003.

Prehrambeno-tehnološki fakultet: Upute za pisanje diplomskog rada. PTF, Osijek, 2001.

Rein M: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *Disertacija.* Sveučilište Helsinki, Helsinki, 2005.

Ribereau- Gayon P i Stonestreet E: Determination of anthocyanins in red wine. *Bulletin de la Société Chimique de France* 9: 2649- 2652, 1965.

Rodríguez-Vaquero MJ, Aredez-Fernández P, Manca de Nadra MC: Phenolic compounds from wine as natural preservatives of fish meat. *Food technology and biotechnology* 51: 376-382, 2013.

Sadilova E, Stintzing FC, Kammerer DR, Carle R: Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food research international* 46: 1023-1033, 2009.

Santana I, Cabral LMC, Matta VM, Araújo MCP, Gouvêa ACMS, Godoy RLO: Influence of the temperature of reverse osmosis process on the anthocyanin composition of grape juice. *Acta Horticulturae* 1040(39): 281-288, 2014.

Smith, K: Development of membrane processes. U Tamime AY: *Membrane processing: dairy and beverage applications*, str. 1-16. Blackwell publishing Ltd, SAD, 2012a.

Smith, K: Commercial membrane technology. U Tamime AY: *Membrane processing: dairy and beverage applications*, str. 52-72. Blackwell publishing Ltd, SAD, 2012b.

Sparks T i Chase G: Filtration – introduction, physical principles and ratings. U *Filters and filtration handbook,* str. 2-49. Elsevier, UK, 2016.

Spellman, FR: *Reverse osmosis*. CRC Press, 2016.

https://books.google.hr/books?id=_xYqCgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=hr&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false [04.07.2020.].

Starr MS i Francis FJ: Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. *Journal of food science* 38: 1043-1046, 1973.

Tamime AY: *Membrane processing: dairy and beverage applications.* Wiley-Blackwell, UK, 2013.

Teixiera A, Eiras-Dias J, Castellarin S, Gerós H: Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International journal of Molecular Sciences* 14: 18711-18739, 2013.

Tsao R: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-1246, 2010.

Tsiakkas O, Escott C, Loira I, Morata A, Rauhut D, Suárez-Lepe J A: Determination of anthocyanin and volatile profile of wines from varieties yiannoudi and maratheftiko from the island of Cyprus. *Beverages* 6, 2020.