

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Ana T. Topalović

**UTICAJ FOLIJARNOG PRIHRANJIVANJA NA
HEMIJSKI SASTAV NEKIH SEKUNDARNIH
METABOLITA GROŽĐA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Ana T. Topalović

**INFLUENCE OF FOLIAR FEEDING ON CHEMICAL
COMPOSITION OF SOME SECONDARY
METABOLITES OF GRAPE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

KOMISIJA

Dr Vlatka Vajs, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, mentor

Dr Vele Tešević, vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu,
komentor

Dr Natalija Perović, naučni savjetnik Biotehničkog fakulteta Univerziteta Crne Gore

Dr Snežana Trifunović, naučni saradnik Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Dejan Gođevac, naučni saradnik IHTM-Centra za hemiju

IZVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera* L., familija *Vitaceae*), globalno, je jedna od najznačajnijih voćaka zbog velike upotrebne vrijednosti grožđa. Grožđe i proizvodi od grožđa predmet su mnogih savremenih istraživanja, posebno zbog biološki aktivnih sekundarnih metabolita. Među ovim jedinjenjima se izdvajaju fenolna jedinjenja zbog izraženog antikancerogenog, antimutagenog, antiinflamatornog, antialergijskog i antimikrobnog djelovanja. Iako je fenolni sastav genetski određen, sadržaj fenolnih jedinjenja kao sekundarnih metabolita umnogome zavisi od primijenjenih agrotehničkih mjera, ali i uslova životne sredine. Od posebnog značaja su istraživanja vezana za mogućnost uticaja na akumulaciju fenolnih jedinjenja, kao na primjer preko primjene različitih formulacija, doza i kombinacija đubriva.

Glavni cilj ove doktorske disertacije bilo je ispitivanje hemijskog sastava grožđa i praćenje uticaja folijarnog đubrenja sa fosforom i kalijumom na sadržaj fenolnih jedinjenja, kao i šećera i organskih kiselina. Imajući u vidu da su P i K od ključnog značaja za sintezu ugljenih hidrata, kao i transport asimilata do skladišnih organa, očekivan je pozitivan efekat na akumulaciju primarnih, a indirektno i sekundarnih metabolita. S druge strane, mogućnost da sadržaj P u pojedinim organima vinove loze gajene na krečnjačkim zemljištima bude nizak predstavljala je još jedan od razloga zbog kojeg je odlučeno da se sprovede prihranjivanje preko lista sa đubrivom koje u svom sastavu sadrži i P.

Sastavni dio istraživanja bilo je i proučavanje međusobnih veza primarnih i sekundarnih metabolita u grožđu sa hranljivim elementima u listu vinove loze.

Istraživanje je izvedeno na stonoj sorti 'Kardinal' tokom sazrijevanja u tri termina, tokom dvije uzastopne godine. Folijarno je primjenjivano PK đubrivo, sa veoma malim količinama B, Mn i Mo, u tri navrata svakih 14–15 dana. Prvo tretiranje obavljeno je 15 dana prije početka šarka.

Zbog boljeg definisanja agroekoloških uslova, urađena je i analiza zemljišta, a podaci o srednjoj dnevnoj temperaturi, padavinama i broju sunčanih sati bili su

obezbijedeni preko Hidrometeorološkog zavoda Crne Gore. Analiza lista vinove loze je omogućila procjenu snabdjevenosti vinove loze hranljivim elementima.

Za ispitivanje hemijskog sastava grožđa primijenjena je tečna hromatografija. Sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze određen je pomoću HPLC/RID, vinske i jabučne kiseline HPLC/UV, a flavonoida (antocijanini, flavonoli i flavan-3-oli) primjenom HPLC/DAD/ESI/MS. Osnovni parametri zemljišta, kao i sadržaj makro- i mikronutrijenata u zemljištu i listu vinove loze određen je primjenom odgovarajućih analitičkih tehnika (spektrofotometrija, atomska apsorpciona spektrofotometrija i indukovano spregnuta-plazma-optička emisiona spektrometrija).

Folijarno prihranjivanje čokota sa PK đubrivom imalo je pozitivan efekat na akumulaciju šećera, antocijanina, ali ne i flavonola i flavan-3-ola. To je u skladu sa istraživanjima koja su pokazala da faktori koji utiču na sadržaj šećera takođe utiču i na boju grožđa, a da se veza između šećera i antocijanina može objasniti ili ulogom šećera kao regulatora u biosintezi antocijanina ili kao supstrata za nastanak antocijanina.

Gledajući po sezonama, koncentracija pojedinih antocijanina varirala je znatno na početku sazrijevanja, dok je na kraju sazrijevanja dostignuta vrijednost koja se statistički značajno nije razlikovala za delphinidin 3-*O*-glukozid, cijanidin 3-*O*-glukozid, petunidin 3-*O*-glukozid i malvidin 3-*O*-glukozid, ali ne i peonidin 3-*O*-glukozid, kao najviše zastupljen antocijanin u pokožici grožđa ispitivane sorte.

Iako se sa hemotaksonomske tačke gledišta obično uzima odnos između malvidin 3-*O*-glukozida i peonidin 3-*O*-glukozida za karakterizaciju sorte (kultivara), rezultati ove studije pokazali su da je odnos malvidin 3-*O*-glukozida i petunidin 3-*O*-glukozida imao slične vrijednosti (5,5–5,9) na kraju sazrijevanja, bez obzira na sezonu i tretman sa folijarnim đubrivom.

Uočen je znatan uticaj klimatskih faktora, prije svega temperature, na proučavane primarne i sekundarne metabolite (na temperaturama iznad 25 °C fotosintetska aktivnost opada).

Generalno, analiza principalne komponente i Pirsonova korelaciona analiza ($p < 0,05$) izdvajaju Mg, Cu, Zn i Mn kao elemente koji mogu pozitivno da utiču na stvaranje nekih sekundarnih metabolita (uglavnom flavonola i flavan-3-ola). Dobijene su pozitivne korelcije između B i većine ispitivanih fenolnih jedinjenja.

I pored optimalnog sadržaja N u listu, ipak su utvrđene negativne korelacije između N i ispitivanih metabolita (statistički značajne za većinu flavonola, kao i vinsku i jabučnu kiselinu, a sa relativno visokim stepenom značajnosti u slučaju proantocijanidin dimera i saharoze kao transportnog oblika šećera iz lista u plod).

Sadržaj monomera flavan-3-ola i tanina male molekulske mase u sjemenkama uglavnom je opadao, a galne kiseline rastao tokom sazrijevanja grožđa. Odnos između katehina i epikatehina takođe je opadao (od 1,8 do 1,2).

Na početku ispitivanog perioda sazrijevanja grožđa, dobijena je pozitivna korelacija između sadržaja kalijuma u listu i galne kiseline, metil-galata, katehina, proantocijanidin trimera, proantocijanidin dimera 3 i epikatehina u sjemenci. Pored toga, utvrđena je pozitivna korelacija P sa katehinom i epikatehin galatom. Ipak, uticaj folijarnog prihranjivanja vinove loze sa PK đubrivom nije statistički značajno uticao na sadržaj fenolnih jedinjenja u sjemenkama.

Evidentirana je pozitivna korelacija između sadržaja Zn u listu vinove loze i katehina, proantocijanidin trimera i proantocijanidin dimera 3 u sjemenkama zrelog grožđa.

Generalno, imajući u vidu bitan uticaj klimatskih uslova na primarni i sekundarni metabolizam, ali i da klimatski uslovi mogu uticati na usvajanje hranljivih elemenata, promjene u vrijednostima ispitivanih parametara grožđa je opravdano smatrati za posljedicu njihovog uzajamnog uticaja. Ipak, pomenute veze izdvajaju i ukazuju na mogući uticaj pojedinih elemenata na metabolizam šećera, kiselina i flavonoida u datim agroekološkim uslovima.

Ključne riječi: antocijanini, flavan-3-oli, flavonoli, folijarna prihrana, organske kiseline, šećeri, stono grožđe

Naučna oblast: Organska hemija

Uža naučna oblast: Hemija prirodnih proizvoda

UDK: 547

INFLUENCE OF FOLIAR FEEDING ON CHEMICAL COMPOSITION OF SOME SECONDARY METABOLITES OF GRAPE

ABSTRACT

The grapevine (*Vitis vinifera* L., *Vitaceae* family), is one of the most important fruit at a global level because of the extensive use of grapes around the world. Grapes and grape products are subject to many modern studies, especially those looking at biologically active secondary metabolites. Among these, phenolic compounds have received great attention due to their strong anticarcinogenic, antimutagenic, anti-inflammatory, antiallergenic and antimicrobial activity. Although phenolic composition is genetically determined, the content of phenolic compounds as secondary metabolites largely depends on applied agricultural practices and environmental conditions. Of particular interest are investigations on the possibility of influencing the accumulation of phenolic compounds, e.g. through the application of different formulations, rates and combinations of fertilisers.

The main objective of this dissertation was to examine the chemical composition of grapes and monitor the impact of foliar feeding with phosphorus and potassium on the content of phenolic compounds, sugars and organic acids. Bearing in mind the crucial importance of P and K in the synthesis of carbohydrates and transport of assimilates to storage organs, a positive effect on the accumulation of primary metabolites and indirect influence on secondary metabolites is expected. On the other hand, foliar fertilisation with P was also carried out because the possibility of low P content in some organs of grapevine grown on calcareous soils. An integral part of the research was the study of the relationships between primary and secondary metabolites in grapes and nutrients in the grapevine leaf.

This study was conducted on cv. 'Cardinal' during grape ripening in three terms over two consecutive years. PK foliar fertiliser containing very small amounts of B, Mn and Mo, was applied three times every 14–15 days. The first treatment was performed 15 days before the beginning of veraison. For a better definition of agricultural conditions, a soil analysis was conducted, and the data on mean daily temperature, rainfall and number of sunshine hours were provided by the Hydrological and

INFLUENCE OF FOLIAR FEEDING ON CHEMICAL COMPOSITION OF SOME SECONDARY METABOLITES OF GRAPE

Meteorological Service of Montenegro. Leaf analysis has enabled the assessment of grapevine supply with nutrients. For the determination of the chemical composition of grapes, liquid chromatography was used. Glucose, fructose and sucrose contents were determined by high-performance liquid chromatography with refractive index detector (HPLC/RID), tartaric acid and malic acid by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC/UV) and flavonoids (anthocyanins, flavonols and flavan-3-ols) by high-performance liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization mass spectrometry (HPLC/DAD/ESI/MS). The main soil parameters, as well as the content of macro- and micronutrients in the soil and grapevine leaf were determined using the appropriate analytical techniques (spectrophotometry, atomic absorption spectrophotometry and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry).

Foliar application of PK fertiliser had a positive effect on the accumulation of sugars and anthocyanins, but not flavonols or flavan-3-ols in grapes. This is consistent with research showing that factors affecting sugar content also influence the colour of grapes, but it also allows the connection between sugar and anthocyanin to be explained, as well as the role of sugar as a regulator of anthocyanin biosynthesis or as a substrate for the formation of anthocyanins.

Looking at the different seasons (for two consecutive years), the concentration of individual anthocyanins varied considerably at the beginning of ripening, while at the end of maturation, it reached a value that was not statistically different from delphinidin 3-*O*-glucoside, cyanidin 3-*O*-glucoside, petunidin 3-*O*-glucoside or malvidin 3-*O*-glucoside. The content of peonidin 3-*O*-glucoside, as the most abundant anthocyanin in grape skin cv. 'Cardinal' was statistically different during the investigated period.

Although from a chemotaxonomic point of view, the ratio between malvidin 3-*O*-glucoside and peonidin 3-*O*-glucoside is usually taken for the characterisation of varieties (cultivars), the results of this study showed that the ratio of malvidin 3-*O*-glucoside and petunidin 3-*O*-glucoside had similar values (5.5 to 5.9) at the end of maturation, regardless of the season and the treatment with foliar fertiliser.

There was a significant influence of climatic factors, primarily temperature, on the primary and secondary metabolites studied (at temperatures above 25°C, photosynthetic activity decreased).

INFLUENCE OF FOLIAR FEEDING ON CHEMICAL COMPOSITION OF SOME SECONDARY METABOLITES OF GRAPE

Generally, Mg, Cu, Zn and Mn were identified (by principal component analysis and the Pearson correlation analysis at $p < 0.05$) as elements which can positively influence the creation of some secondary metabolites (mainly flavonols and flavan-3-ols). Positive correlations between B and most of the phenolic compounds were obtained. Beside the optimal N content in the grapevine leaf, however, negative correlations between N and the determined metabolites were found (these were statistically significant for most flavonols and tartaric and malic acid, with a relatively high level of significance in the case procyanidin dimers and sucrose as a transport form of sugar from the leaf to the fruit).

The content of flavan-3-ol monomer and low molecular weight tannins in seeds generally decreased, while gallic acid increased during grape ripening. The ratio between catechin and epicatechin also declined (from 1.8 to 1.2). At the start of the examination period of maturation of grapes, positive correlations between potassium content in leaf and gallic acid, methyl gallate, catechin, procyanidin trimer, proanthocyanidin dimer 3 and epicatechin in the seed were obtained. In addition, phosphorus was positively correlated with catechin and epicatechin gallate. However, the influence of foliar nutrition of grapevine with PK fertiliser did not significantly influence on the content of phenolic compounds in seeds. Positive correlations were found between Zn content in leaf and catechins, proanthocyanidin trimer and proanthocyanidin dimer 3 in the seeds of ripe grapes.

In general, given the significant influence of climatic conditions on the primary and secondary metabolism and the nutrient uptake of grapes, the changes in values of the investigated parameters are considered to be the mutual effect of these factors. However, the mentioned relationships also indicate the possible influence of certain elements on the metabolism of sugars, acids and flavonoids in the given environmental conditions.

Key words: anthocyanins, flavan-3-ols, flavonols, foliar feeding, organic acids, sugars, table grape

Scientific field: Organic chemistry

Scientific discipline: Natural product chemistry

UDC: 547

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DIO.....	3
2.1. Primarni i sekundarni metabolizam.....	3
2.2. Vinova loza.....	7
2.2.1. Rasprostranjenost, botanički opis i proizvodno – organoleptička svojstva sorte 'Kardinal'.....	8
2.2.2. Osnovni fiziološki procesi.....	9
2.2.2.1. Fotosinteza.....	9
2.2.2.2. Fotorespiracija	12
2.2.2.3. Respiracija	12
2.2.2.4. Metabolizam jabučne i vinske kiseline.....	13
2.3. Fenolna jedinjenja.....	14
2.3.1. Klasifikacija fenolnih jedinjenja.....	14
2.3.2. Biosinteza fenolnih jedinjenja	15
2.3.2.1. Aktivnost enzima tokom sazrijevanja.....	22
2.3.2.2. Akumulacija i skladištenje fenolnih jedinjenja u ćeliji	23
2.3.3. Fenolna jedinjenja u grožđu	24
2.3.4. Promjene u bobici tokom sazrijevanja.....	30
2.3.5. Regulacija metabolizma fenolnih jedinjenja u plodu	31
2.3.6. Značaj i uloga fenolnih jedinjenja u biljci.....	35
2.3.7. Značaj fenolnih jedinjenja za kvalitet ploda.....	36
2.3.8. Zdravstveni efekti fenolnih jedinjenja.....	37
2.4. Analitičke metode.....	39
2.4.1. Ekstrakcija i tehnike hidrolize	40

2.4.2.	Hromatografske tehnike	41
2.4.3.	Detekcija i identifikacija fenolnih jedinjenja.....	45
2.5.	Uloga i značaj hranljivih elemenata	47
3.	REZULTATI I DISKUSIJA	51
3.1.	Preliminarna istraživanja i plan rada	51
3.2.	Fizičke i hemijske karakteristike zemljišta.....	55
3.3.	Klimatske karakteristike tokom trajanja ogleđa	57
3.4.	Promjena sadržaja hranljivih elemenata u listu vinove lože.....	59
3.5.	Parametri kvaliteta grožđa	61
3.5.1.	Promjena osnovnih parametra kvaliteta grožđa.....	61
3.5.2.	Promjene sadržaja šećera i organskih kiselina	64
3.5.3.	Promjene sadržaja flavonoida.....	73
3.5.4.	Generalna procjena razlika u kvalitetu grožđa	78
3.6.	Veze između parametara grožđa i lista.....	81
3.7.	Dopunska ispitivanja	94
3.7.1.	Promjene sadržaja fenolnih jedinjenja u sjemenkama.....	94
3.7.2.	Veze između parametara sjemenke i lista.....	97
4.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	104
4.1.	Reagensi i pribor.....	104
4.2.	Dizajn ogleđa	105
4.3.	Analiza lista vinove lože.....	106
4.3.1.	Uzimanje uzoraka listova vinove lože.....	106
4.3.2.	Priprema uzoraka liski za analizu	107
4.3.3.	Suvo spaljivanje uzoraka liski i obrada sa rastvorom HCl.....	107
4.3.4.	Obrada uzoraka liski sa koncentrovanim kiselinama (HNO ₃ + HClO ₄).....	107
4.3.5.	Određivanje sadržaja makro- i mikroelemenata	108

4.4.	Analiza grožđa	108
4.4.1.	Uzimanje uzoraka grožđa	108
4.4.2.	Određivanje osnovnih parametara kvaliteta grožđa (°Brix i ukupne kiseline)	109
4.4.3.	Ekstrakcija šećera i organskih kiselina	109
4.4.4.	Ekstrakcija fenolnih jedinjenja	110
4.4.5.	Određivanje koncentracije šećera i organskih kiselina	110
4.4.6.	Određivanje koncentracije fenolnih jedinjenja	110
4.5.	Dopunska ispitivanja	113
4.5.1.	Određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja u sjemenkama	113
4.5.1.1.	Ekstrakcija fenolnih jedinjenja	113
4.5.1.2.	Hromatografsko određivanje koncentracije fenolnih jedinjenja	113
4.6.	Statistička obrada podataka	114
4.7.	Skraćenice	115
5.	ZAKLJUČAK	117
6.	LITERATURA	120
	BIOGRAFIJA	137

1. UVOD

Grožđe i proizvodi od grožđa predmet su mnogih savremenih istraživanja, posebno zbog biološki aktivnih sekundarnih metabolita. Posebna pažnja posvećena je ispitivanju fenolnih jedinjenja zbog izraženog antikancerogenog, antimutagenog, antiinflamatornog, antialergijskog i antimikrobnog delovanja. Fenolna jedinjenja su na trećem mestu po zastupljenosti u grožđu, poslije ugljenih hidrata i voćnih kiselina. Dijelevaju se na neflavonoide (derivati benzoeve i cimetine kiseline i stilbeni) i flavonoide (antocijanini, flavonoli i flavan-3-oli). Pokožica je posebno bogata antocijaninima i flavanolima, sjemenka flavan-3-olima, a pulpa šećerima i organskim kiselinama.

Iako je fenolni sastav genetski određen, sadržaj fenolnih jedinjenja umnogome zavisi od primijenjenih agrotehničkih mera, ali i uslova životne sredine (Cantos *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2004; Vian *et al.*, 2006). Od posebnog značaja su istraživanja vezana za mogućnost uticaja na akumulaciju fenolnih jedinjenja.

U cilju poboljšanja kvaliteta grožđa, neophodno je poznavati faktore koji regulišu primarni i sekundarni metabolizam tokom sazrijevanja. Pristupačnost ključnih makroelemenata tokom rasta može uticati na akumulaciju pomenutih sastojaka grožđa.

Đubrenje preko zemljišta je jedna od važnih agrotehničkih mjera, kojom se može uticati ne samo na prinos, već i na kvalitet grožđa (Delgado *et al.*, 2004). U skorije vrijeme, često se primjenjuje folijarno prihranjivanje prvenstveno da bi se spriječio nedostatak, ali i poboljšao kvalitet ploda (Colapietra & Alexander, 2006).

Generalno, uticaj đubrenja na fenolni sastav grožđa je veoma malo proučavan. Pored toga, postoji mali broj istraživanja vezanih za identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja u grožđu stonih sorti, za razliku od vinskih sorti.

Među stonim sortama, čije grožđe je namijenjeno za konzumiranje u svježem stanju, posebnu pažnju zaslužuju sorte veoma ranog perioda sazrijevanja. S tim u vezi, 'Kardinal' daje veoma dobre komercijalne rezultate u proizvodnim rejonima, gdje u vrijeme sazrijevanja grožđa ne padaju kiše, i gdje tokom zime nema opasnosti od niskih temperatura. Zbog toga je odlučeno da predmet rada bude stono grožđe sorte 'Kardinal'.

Cilj ovog istraživanja je praćenje uticaja folijarnog prihranjivanja sa fosforom i kalijumom na hemijski sastav grožđa tokom sazrijevanja, sa naglaskom na fenolna jedinjenja kao sekundarne metabolite. Sastavni dio istraživanja je i proučavanje veza između hranljivih elemenata (N, P, K, Ca, Mg, B, Fe, Mn, Zn i Cu) u listu i šećera, organskih kiselina i fenolnih jedinjenja u grožđu.

Folijarno prihranjivanje vinove loze sa P i K je primijenjeno imajući u vidu ulogu ovih elemenata u sintezi ugljenih hidrata, a time indirektno i fenolnih jedinjenja. Naime, kalijum stimuliše fotosintetsku aktivnost i favorizuje translokaciju šećera u plod, i na taj način indirektno može uticati na sintezu fenolnih jedinjenja. Veoma je važna uloga P u transferu energije (Pirie & Mullins, 1977; Štampar *et al.*, 1999; Wiesler, 2012). Pored toga, u obzir je uzeta i mogućnost smanjene koncentracije P i K u vinovoj lozi gajenoj na jako krečnjačkom i skeletnom zemljištu (Bavaresco & Poni, 2003).

Očekuje se da rezultati ovog istraživanja praktično doprinesu poboljšanju kvaliteta grožđa i određivanju najpogodnijeg vremena berbe.

2. OPŠTI DIO

2.1. Primarni i sekundarni metabolizam

Biljke sintetišu veliki broj organskih jedinjenja, koja su tradicionalno klasifikovana kao primarni i sekundarni metaboliti, iako oštre granice između ove dvije grupe u nekim slučajevima nisu jasne. U odsustvu validnog razlikovanja zasnovanog ili na strukturi ili na biohemiji, uzima se u obzir funkcionalna definicija po kojoj su:

- **primarni metaboliti** označeni kao jedinjenja koja učestvuju u ishrani i esencijalnim metaboličkim procesima unutar biljke, i
- **sekundarni metaboliti** kao jedinjenja koja nemaju direktnu ulogu u pomenutim procesima, već imaju važan ekološki značaj (uticaj obojenih i mirisnih supstanci na reprodukciju) kao i zaštitnu ulogu u borbi protiv različitih oblika stresa (biotički faktori: biljke-paraziti, mikroorganizmi, životinje, antropogeni faktor; i abiotički faktori: svjetlost, temperatura, dostupnost vode, nutrijenti itd.) (Veberič, 2010).

Povezanost primarnog i sekundarnog metabolizma je prikazana na Slici 2-1.

Primarni metabolizam obuhvata:

- fotosintezu,
- glikolizu,
- ciklus limunske kiseline,
- sintezu aminokiselina,
- transaminaciju,
- sintezu proteina i enzima,
- sintezu koenzima,
- sintezu strukturnog materijala,

- duplikaciju genetskog materijala,
- reprodukciju ćelija (rast),
- apsorpciju hranjivih sastojaka.

Procesi primarnog metabolizma se odvijaju istim mehanizmima u svim biljkama, pri čemu nastaju, transformišu se i razgrađuju osnovna gradivna jedinjenja koja ujedno obezbjeđuju energiju za rast, razviće, funkcionisanje i reprodukciju živog organizma. Primarni metaboliti kao što su fitosteroli, acil lipidi, nukleotidi, aminokiseline i organske kiseline, nađeni su u svim biljkama i imaju metaboličku ulogu koja je bitna i obično evidentna (Croteau *et al.*, 2000).

Sekundarni metabolizam obuhvata hemijske procese jedinstvene za datu biljku, koji vode stvaranju prirodnog produkta. Sekundarni metabolizam nije univerzalan, kao ni esencijalan za rast i razviće biljke. Sekundarni metaboliti često nastaju u specijalizovanim ćelijama ili tkivima i mnogo su raznolikijih struktura u odnosu na primarne metabolite.

To su niskomolekulska jedinjenja, odlikuju se hemijskom raznovrsnošću i biološkom i farmakološkom aktivnošću i nemaju energetske značaj. Na osnovu njihovog biosintetskog porijekla, biljni prirodni produkti mogu se podijeliti u tri glavne grupe:

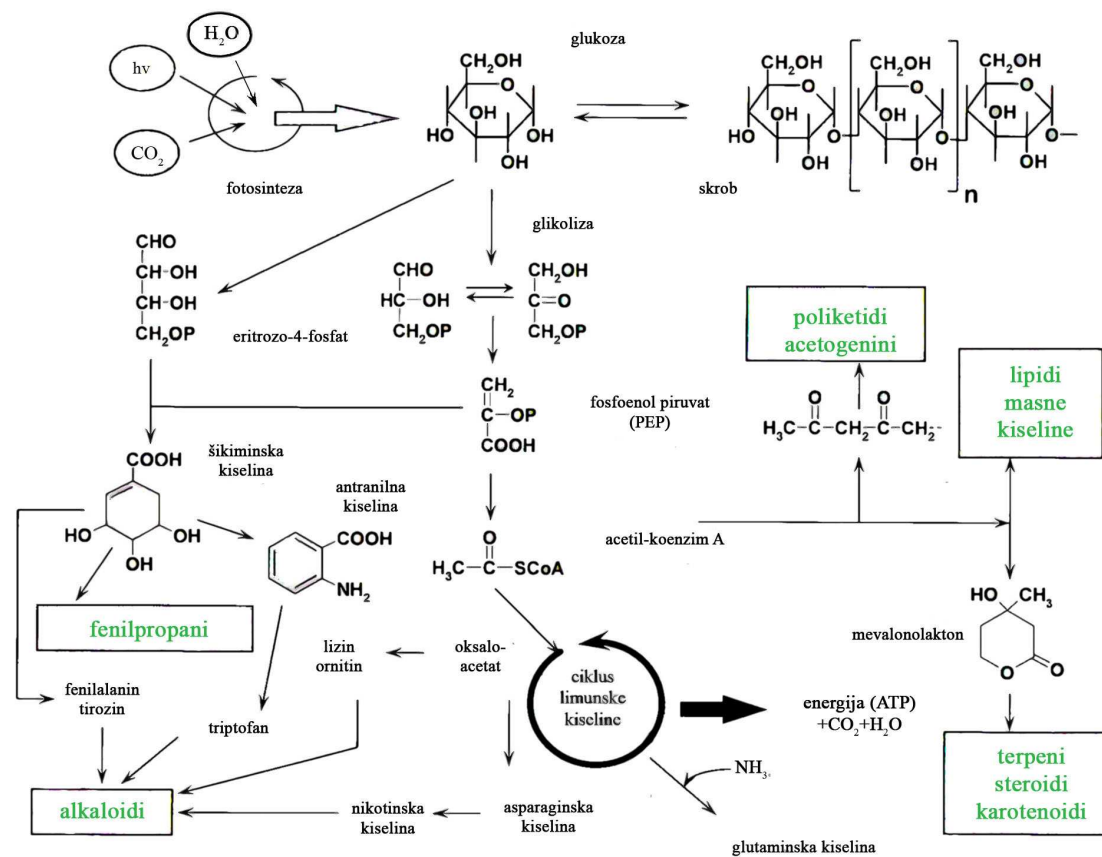
1. terpenoidi,
2. alkaloidi,
3. fenilpropanoidi i srodna fenolna jedinjenja (Croteau *et al.*, 2000).

Karakteristika metabolizma sekundarnih biomolekula je vrlo visoka složenost biosintetskih puteva, koji su višefazni i uključuju veći broj enzima, multienzimskih sistema, regulatora ovih enzima, i njihovu ćelijsku organizaciju. Najznačajniji biosintetski putevi sekundarnih biomolekula obuhvataju:

- put mevalonske kiseline, kojim nastaju izoprenoidi (steroidi i terpenoidi);
- metabolički put šikiminske kiseline, kojim nastaju fenolna jedinjenja i aromatične aminokiseline;

- biosintezu iz acetata (acetogeninski put), kojim nastaju masne kiseline, voskovi, fosfolipidi, eikosanoidi, poliketidi (antrahinoni, aflatoksini, makrolidi), poliketidi mješovitog porijekla (flavonoidi);
- divergentni putevi biosinteze azotnih jedinjenja (alkaloida) iz aminokiselina.

Procesi sekundarnog metabolizma se samo donekle mogu generalizovati, odnosno samo se donekle odvijaju istim mehanizmima u različitim biljkama.



Slika 2-1 Veza primarnog i sekundarnog metabolizma

Srodne hemijske strukture samo do jedne određene faze nastaju ujednačenim biosintetskim putevima.

Svaka pojedinačna biljna vrsta (ili tkivo) unosi specifičnosti u ovakve metaboličke procese. Ove specifičnosti se ogledaju u enzimu koji je prisutan (ili aktivnosti enzima) u nekom određenom tkivu, ili u različitom supstratu. Sve to može doprinijeti promjenama osnovnog biosintetskog puta ili njegovom račvanju, što rezultira sintezom različitih metabolita.

Prisustvo i aktivnost određenih enzima i enzimskih sistema je osnovni preduslov za početak nekih metaboličkih procesa.

Određeni geni su odgovorni za sintezu proteina (enzima), a ekspresija gena je uslovljena genetskim i fiziološkim faktorima. U određenoj fazi ontogenetskog razvića ili djelovanjem nekog spoljašnjeg faktora, ćelija biva dovedena do fiziološkog stanja optimalnog za aktiviranje gena i sintezu enzima, kada počinje jedan biohemijski proces.

Enzimi, koji uslovljavaju pojedine korake određenih procesa sekundarnog metabolizma, samo su delimično identifikovani. Najveći broj biosintetskih puteva, kojima nastaju farmakološki aktivna jedinjenja biljaka, nije enzimološki razriješen.

Iako poznati po kompleksnosti svojih hemijskih struktura i biosintetskih puteva, prirodni produkti dugo su smatrani biološki nevažnim i nisu mnogo privlačili pažnju istraživača.

Međutim, u novije vrijeme, interes za prirodne produkte potaknut je njihovom velikom upotrebom (boje, polimeri, vlakna, ljepila, ulja, voskovi, parfemi i lijekovi).

Pojačan interes za veoma raznolike biološke efekte prirodnih produkata pokrenuo je ponovno sagledavanje i vrednovanje mogućih uloga ovih jedinjenja u biljkama, posebno u kontekstu ekoloških interakcija (Croteau *et al.*, 2000).

2.2. Vinova loza

U najranijim zapisima i arhivima vezanim za sve vrste poljoprivrednih aktivnosti značajno mjesto zauzimaju vinova loza i njeni proizvodi. Vinova loza (*Vitis vinifera* L., familija *Vitaceae*), globalno, je jedna od najznačajnijih voćaka zbog velike upotrebne

vrijednosti grožđa (proizvodnja vina, sokova, suvog grožđa itd.). Postoji oko 5000 sorti, a zasadi vinove loze u svijetu danas dostižu površinu od oko 8 miliona hektara. Uspješno se gaji na svim kontinentima, u regionima sa umjerenom klimom koju odlikuju duga, topla i suva ljeta i relativno blage zime. Blizu 70% svih površina pod vinovom lozom se nalazi u Evropi (Milosavljević, 1998; Ali *et al.*, 2010).

Ukupna produktivnost vinove loze je uslovljena intenzitetom fotosinteze i međusobnim odnosima procesa metabolizma. Prinosa grožđa zavisi od fotosintetske aktivnosti (lišća) i od usmjeravanja sintetisanih proizvoda više prema grozdovima, a manje prema drugim organima. Od usaglašenosti biotskih i abiotskih činilaca zavisi odnos između rasteinja i plodonošenja loze, kao i odnos između prinosa i kvaliteta grožđa (Milosavljević, 1984a).

Hemijski sastav grožđa i vina je intenzivno proučavan i brojna jedinjenja su identifikovana zahvaljujući analitičkim tehnikama kakve su: gasna i tečna hromatografija, nuklearna magnetna rezonanca i masena spektrometrija.

Kvalitet vinove loze zavisi uglavnom od njenih metabolita. Akumulacija metabolita je posebno osjetljiva na spoljašnje uslove. Hemijska različitost varijeteta vinove loze najviše se odnosi na sekundarne metabolite, koji pripadaju različitim fitohemijskim grupama kao što su alkaloidi, terpeni, antibiotici, isparljiva ulja, steroli, saponini i fenolna jedinjenja. Zbog toga je vinova loza od velikog značaja za prehrambenu, farmaceutsku, agrohemijsku i kozmetičku industriju (Ali *et al.*, 2010).

2.2.1. Rasprostranjenost, botanički opis i proizvodno – organoleptička svojstva sorte 'Kardinal'

'Kardinal' je nastao kao rezultat ukrštanja sorti 'Flame Tokay' i 'Ribier' 1939. godine u eksperimentalnoj stanici u Fresnu u Kaliforniji. Na prostorima bivše Jugoslavije je introdukovana 1960. godine. Na većim površinama se gaji u Sjedinjenim Američkim Državama, Italiji i Francuskoj, ali i u mnogim drugim zemljama.

Kako navode Cindrić *et al.* (2000) čokot je vrlo bujan, a zreo lastar je debeo, ima srednje duge internodije svijetlornke boje sa ljubičastom nijansom na nodijama. List je

srednje veličine ili veliki, slabo izdijeljen, svijetlozelene boje, ravan i bez malja. Cvijet je morfološki i funkcionalno hermafroditan. Grozd je konusnog oblika, srednji do veliki (300–600 g), srednje zbijen. Bobice su veoma krupne, ujednačene veličine, okrugle, ali često neujednačene boje. Pokožica je dosta debela i mekana, crvenkasto-ljubičaste boje do ljubičasto-plave u podmaklom stanju zrelosti. Mezokarp je čvrst i hrskav, prijatnog ukusa i neutralnog mirisa i ima relativno nizak sadržaj šećera i kiselina. Milosavljević (1998) navodi da u punoj zrelosti groždani sok 'Kardinala' ima 14–18% šećera i 4–5 g/l kiselina.

'Kardinal' relativno kasno započinje vegetaciju, dok mu grožđe sazrijeva vrlo rano. Grožđe je vrlo ukusno, gotovo od samog početka šarka do pune tehnološke zrelosti¹. Dobro se transportuje, ali nije pogodno za duže čuvanje u hladnjačama (Milosavljević, 1998). Zbog navedenih karakteristika, grožđe 'Kardinala' gotovo da nema konkurenciju među stonim sortama ranog sazrijevanja, zbog čega postiže vrlo visoku cijenu na tržištu. Sazrijevanje grožđa u velikoj mjeri zavisi od ekoloških uslova (Cindrić *et al.*, 2000). Od velikog privrednog značaja je zbog mogućnosti probirne berbe, koja može da traje i tridesetak dana (Mirošević & Karoglan-Kontić, 2008). U Crnoj Gori prva probirna berba se najčešće obavlja polovinom jula.

2.2.2. Osnovni fiziološki procesi

2.2.2.1. Fotosinteza

Kod vinove loze se fotosinteza ostvaruje u svim organima u čijim ćelijama ima hlorofila: u lišću, mladim lastarima i u plodovima do početka njihovog sazrijevanja. Iako je udio fotosinteze lastara i plodova mali, u poređenju sa listovima, ne može se reći da je beznačajan.

U svijetloj fazi fotosinteze pigmenti apsorbuju svetlosnu energiju, dolazi do pobuđivanja molekula hlorofila i oksidacije vode. U složenim procesima prenosa elektrona,

¹ Botanička ili fiziološka zrelost je stadijum u razvitku ploda kada je sjeme sposobno za reprodukciju. Konzumna zrelost je stadijum kada je plod prikladan za konzumiranje. Tehnološka zrelost je stadijum u razvitku ploda kada postaje prikladan za preradu.

sintetiše se NADPH kao visoko redukovano jedinjenje. Uporedo, teče proces fotofosforilacije u kome se ADP u prisustvu neorganskog fosfora prevodi u ATP, jedinjenje veoma bogato energijom.

Osnovni proces tamne faze fotosinteze je usvajanje i vezivanje CO₂. Iz atmosfere (0,03% CO₂), tokom difuzije kroz stome i ćelijske membrane, CO₂ ulazi u žive ćelije sa hloroplastima. Do procesa fiksacije CO₂ dolazi u stomi hloroplasta u prisustvu i na račun utroška NADPH i ATP, koji vode porijeklo iz svijetle faze fotosinteze (NADPH se oksiduje u NADP⁺, a ATP se hidrolizira u ADP). Za sve biljke C₃-tipa, kojima pripada i vinova loza, zna se da je primarni akceptor CO₂ 1,5 ribuloza-difosfat i da se kao prvi produkt sinteze javlja 3-fosfoglicerinska kiselina (PGA) – jedinjenje sa 3 C atoma, po čemu je i ovaj tip fotosinteze dobio ime. Sintetisana PGA pomoću ATP i fosfoglicerat kinaze daje 1,3-difosfoglicerat, koji u prisustvu NADPH i gliceraldehid dehidrogenaze prelazi u 3-fosfogliceraldehid i njegov izomer – dihidroksiaceton fosfat. Kondenzovanjem ovih dviju trioza u prisustvu posebne aldolaze dolazi do obrazovanja 1,6-fruktoze difosfata koja se u procesu hidrolize defosforilira u 6-fruktozu monofosfat, a ovaj izomeracijom u 6-glukozu monofosfat, koji se defosforilira i prelazi u stabilnu glukozu. Uporedo sa navedenim reakcijama, u fotosintetskom procesu teku i reakcije koje imaju za cilj sintezu pentoze – ribuloza-5-fosfata (Kalvinov ciklus), koja se u prisustvu ATP stvorenog u svijetloj fazi i enzima fosforibulokinaze transformiše u ribulozu 1,5-difosfat – akceptora CO₂ (Milosavljević, 1984b).

Pretpostavlja se da pored genetskog činioca, na intenzitet fotosinteze utiču ekološki uslovi i morfološko-fiziološka specifičnost vrste i sorte. Dokazano je da se po sadržaju hlorofila sorte međusobno znatno razlikuju, i da upotrijebljene lozne podloge utiču na sadržaj ovog pigmenta u lišću kalemljene loze. Biološka svojstva sorti i loznih podloga značajno utiču i na dinamiku fotosinteze u toku vegetacionog perioda i na dnevnom nivou.

Jačina svjetlosti do izvjesnog stepena povećava intenzitet fotosinteze, a nakon toga biljka ne reaguje povećanjem intenziteta. U prirodnim uslovima gajenja vinove loze, tačka zasićenja ne postoji, jer drugi činioci, koji su obično povezani sa intenzivnim osvjetljavanjem, visoka temperatura i opadanje relativne vlažnosti vazduha zaustavljaju porast fotosinteze.

Temperatura neposredno utiče na intenzitet fotosinteze. Za sorte sa kratkim vegetacionim periodom i pri vlažnosti vazduha od 65–75%, intenzitet fotosinteze raste do 20–25 °C, a idući dalje prema temperaturi od 30 °C intenzitet fotosinteze naglo opada. U australijskim uslovima, sorta 'Sultanina' ispoljava maksimum fotosinteze na temperaturama između 30 i 35 °C (Milosavljević, 1984a).

Relativna vlažnost vazduha veoma značajno utiče na intenzitet fotosinteze i na prirodu metabolizma usvojenog ugljenika. U uslovima smanjene relativne vlažnosti vazduha, intenzitet fotosinteze opada, prije svega zbog toga što takvo stanje vazduha uslovljava zatvaranje stoma, a to dovodi do slabijeg usvajanja CO₂. Uticaj smanjenja relativne vlažnosti sa 70 na 50% na intenzitet fotosinteze je jak – mijenja se sinteza šećera, organskih kiselina i aminokiselina (Milosavljević, 1984a).

Ukupan uticaj mineralne ishrane na fotosintezu vinove loze može se podijeliti na uticaj na produktivnost fotosinteze, zatim obrazovanje asimilacionog pribora i obrazovanje pigmentata. Zavisnost fotosinteze od mineralne ishrane nije ista kod svih sorti. U poljskim uslovima uticaj mineralne ishrane na intenzitet fotosinteze u velikom stepenu zavisi od vegetacionog perioda i od vlažnosti zemljišta. Relativno velik uticaj kako u fazi cvjetanja, tako i u fazi intenzivnog porasta plodova imala je fosforno-kalijumova varijanta (Milosavljević, 1984a). Ipak, treba naglasiti da pitanje uticaja mineralne ishrane na intenzitet fotosinteze vinove loze nije dovoljno dobro proučeno. Smanjenje sadržaja rastvorljivih čvrstih supstanci može biti rezultat efekta razblaženja uzrokovanog prekomjernim rastom kao rezultatom primjene većih količina azota (Ahlawat, 1988). Optimalna mineralna ishrana je od neposrednog značaja za postizanje višeg sadržaja šećera u grožđu (Lović, 1984). Primjenom neadekvatnih količina azotnih đubriva smanjuje se sadržaj rastvorljivih čvrstih supstanci (Martin *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2004; Conradie, 2001; Christensen *et al.*, 1994; Ahlawat, 1988; Ruhl *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 1998). Vodeni rastvor kalijum jodida povećava prinos za 15% i sadržaj šećera za 2%, a u kombinaciji sa rastvorom bordovske čorbe (Ca(OH)₂ + CuSO₄) nešto manje – 1,7% (Lović, 1984).

Navodnjavanje utiče na fotosintezu preko vodnog režima lišća. Dovoljna vlaga u zemljištu može da otkloni pojavu depresije u fotosintezi, koja se više-manje redovno javlja

u podnevnim časovima. Riječ je o kratkotrajnom povećanju koncentracije šećera u lišću, što dovodi do zastoja u fotosintezi. Kada se povećane koncentracije šećera u lišću zadrže duže, dolazi do promjena u procesima metabolizma – šećeri "prelaze" u antocijanine, dolazi do razaranja hloroplasta i lišće mijenja boju (Milosavljević, 1984a).

Zakidanje i zalamanje lastara, kao i proređivanje lišća su mjere za koje je utvrđeno da podstiču fotosintezu i pretpostavlja se ubrzavaju transport asimilata. Sa obrazovanjem grožđa, proizvodi rodnih lastara se počinju pretežno usmjeravati prema grozdovima, a proizvodi nerodnih lastara pretežno prema korijenu. U fazi sazrijevanja grožđa, proizvodi fotosinteze se iz svih lastara prenose u pravcu grozdova (Milosavljević, 1984a).

2.2.2.2. Fotorespiracija

Postoji više puteva razgradnje proizvoda fotosinteze, sa kojom je najtjesnije povezana fotorespiracija. Proces se odvija u zelenim djelovima biljke (uz učešće ćelijskih organela: hloroplasta, peroksizoma i mitohondrija), na svjetlosti, kada dolazi do oksidacije fotosintetskih međuproizvoda (usvojenim kiseonikom iz atmosfere) i oslobađanja CO₂. Vinova loza, kao i sve biljke sa fotosintezom C₃-tipa, ima visok intenzitet fotorespiracije. Na intenzitet fotorespiracije pozitivno utiče povišena koncentracija kiseonika u spoljnoj sredini, pojačan intenzitet svjetlosti i povišena temperatura (Milosavljević, 1984b).

2.2.2.3. Respiracija

Respiracija je veoma složen proces koji se odvija na nivou mitohondrija i u odsustvu svjetlosti, a na nivou cijele biljke manifestuje se kao proces gasne izmjene u kojoj se usvaja O₂ i oslobađa CO₂. Suština je u degradaciji molekula organskih jedinjenja i oslobađanju energije, koju žive ćelije koriste za obavljanje raznovrsnih fizioloških procesa i za svoju reprodukciju. U procesu razgrađivanja složenih organskih jedinjenja, u prvom redu šećera dobijenih u procesu fotosinteze, javljaju se međuproizvodi i ostvaruje sinteza mnogih jedinjenja.

Putevi stabilnog oblika glukoze su različiti: akumulira se u plodovima, u obliku skroba služi kao osnovna rezervna supstanca u raznim organima vinove loze, transformiše

se u procesima bioloških oksidacija oslobađajući energiju i stvarajući osnovu za sintezu drugih organskih jedinjenja (Milosavljević, 1984b).

Intenzitet disanja je veoma visok kod zelenih bobica i opada poslije deformisanja stoma. Na kraju faze sazrijevanja intenzitet je minimalan. Smatra se da se do 20 °C kao materijal za disanje troši šećer, 20–30 °C jabučna kiselina, a iznad 30 °C vinska kiselina. Ustanovljeno je da je različit intenzitet disanja bobica raznih epoha sazrijevanja grožđa. Kod ranih sorti proces disanja je intenzivniji nego kod srednje poznih i poznih sorti (Burić, 1984).

2.2.2.4. Metabolizam jabučne i vinske kiseline

U organima vinove loze srijeću se mnoge organske kiseline. Samo su tri organske kiseline posebno karakteristične za metabolizam vinove loze. To su jabučna, vinska i limunska kiselina. U zelenim plodovima vinove loze, više od 90% kiselosti dolazi od jabučne i vinske kiseline.

Jabučna kiselina se posebno u zelenim plodovima sintetiše u procesu vezivanja CO₂ za pirogroždanu kiselinu. Ovaj proces je znatno izraženiji u zelenim plodovima, nego u lišću vinove loze, jer se u lišću, zahvaljujući visokom sadržaju hlorofila, značajniji dio CO₂ vezuje procesom fotosinteze. Pomenuti proces se nastavlja u toku noći, čime se objašnjava veliko nakupljanje jabučne kiseline. Jabučna kiselina se sintetiše i u procesima vezanim za glikolizu, jer je poznato da se tom prilikom dobija fosfoenol piruvat (fosforilovani derivat pirogroždane kiseline), čijom se karboksilacijom dobija jabučna kiselina. U reakcijama suprotnog smjera, moguća je sinteza šećera odnosno glukoze. Na taj način se jabučna kiselina transformiše u šećere u toku sazrijevanja grožđa. Jabučna kiselina se razlaže u procesima respiracije u čijem lancu je nezamjenjivi član. U zreloom grožđu nije otkrivena sinteza jabučne kiseline.

Nekada se smatralo da postoji mogućnost prelaska vinske u jabučnu kiseline i obratno. Međutim, utvrđeno je da sinteza vinske kiseline nije povezana sa sintezom jabučne kiseline. Smatra se da se vinska kiselina sintetiše u pentozo-fosfatnom ciklusu od glukoze preko glukonske kiseline kao međuproizvoda. U zelenom grožđu je sinteza vinske kiseline veoma intenzivna. U početnim fazama razvića plodova, sinteza vinske kiseline je po svom

intenzitetu slična sintezi jabučne kiseline. Sa razvojem plodova, sinteza vinske kiseline brzo opada i na početku faze zrenja se potpuno zaustavlja. Stanovište, po kome vinska kiselina u grožđu vodi porijeklo iz lista je odbačeno, jer je utvrđeno da se iz lišća prema grožđu uglavnom prenose šećeri. Pomoću obilježenog ^{14}C je utvrđeno da su se i jabučna i vinska kiselina sintetisale iz šećera porijeklom iz lišća (Milosavljević, 1984b).

2.3. Fenolna jedinjenja

2.3.1. Klasifikacija fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja imaju u svojoj strukturi jednu ili više hidroksilnih grupa vezanih direktno za aromatično jezgro. U prirodi se nalaze u slobodnom obliku ili kao glikozidi, a mogu da stvaraju komplekse i sa nekim drugim molekulima. Najčešće su prisutna u biljkama, ali ih ima i u životinjama i mikroorganizmima. Do sada je u biljnom svijetu otkriveno oko 10000 fenolnih struktura. Fenolna jedinjenja su prisutna u visokim koncentracijama u epidermisu lista i pokožici ploda.

Vrlo često se misli da su "polifenoli" polimeri pojedinih fenolnih molekula, koji takođe postoje u biljnom svijetu (najčešće kao glikozidi ili estri, a rjeđe u slobodnom obliku). Međutim, polifenoli su jedinjenja koja sadrže više od jedne fenolne hidroksilne grupe supstituisane za jedan ili više aromatičnih prstenova.

Fenolna jedinjenja se mogu klasifikovati na razne načine. Harborn & Simmonds (1964) su izvršili klasifikaciju na osnovu broja ugljenikovih atoma u molekulu (Tabela 2-1).

Tabela 2-1 Klasifikacija fenolnih jedinjenja

Struktura	Klasa
C_6	prosti fenoli
$C_6 - C_1$	fenolne kiseline i srodna jedinjenja
$C_6 - C_2$	acetofenoni i fenilsirćetne kiseline
$C_6 - C_3$	cimetne kiseline, aldehidi i alkoholi
$C_6 - C_3$	kumarini, izokumarini i hromoni
C_{15}	halkoni, auron i dihidrohalkoni
C_{15}	flavani
C_{15}	flavoni
C_{15}	flavanoni
C_{15}	flavanonoli
C_{15}	antocijanidini
C_{15}	antocijanini
C_{30}	biflavonili
$C_6 - C_1 - C_6, C_6 - C_2 - C_6$	benzofenoni, ksantoni, stilbeni
C_6, C_{10}, C_{14}	hinoni
C_{18}	betacijanini
Lignani, neolignani	dimeri ili oligomeri
Lignin	polimeri
Tanini	dimeri ili oligomeri
Flobafeni	polimeri

2.3.2. Biosinteza fenolnih jedinjenja

Poznata su tri različita biogenetska puta nastajanja fenolnih jedinjenja u biljkama:

1. šikimatno-arogenatni put (put šikiminske kiseline)
2. acetatno-malonatni put (poliketidni put) i
3. acetatno-mevalonatni put.

Biosintetički put šikiminske kiseline je najvažniji u sintezi fenolnih jedinjenja u biljkama. Ključni intermedijer je šikiminska kiselina, koja nastaje kondenzacijom eritroza-4-fosfata i fosfoenol piruvata, preko niza međuproizvoda. Iz šikiminske kiseline dobijaju se aromatične amino kiseline, L-fenilalanin i L-tirozin. Fenilalanin je prekursor najvećeg broja fenolnih jedinjenja u višim biljkama (Slika 2-2). Hidroksicimetne kiseline, nastale od fenilalanina, i naročito njihovi koenzim A estri su obično strukturni elementi različitih klasa fenolnih jedinjenja, kakvi su estri i amidi cimetne kiseline, lignin, benzoeve kiseline, flavonoidi i kondenzovani tanini. Istraživanja metabolizma fenolnih jedinjenja u plodu, zasnovana na dodavanju fenilalanina i cimetne kiseline obilježenih radioaktivnim ^{14}C , pokazala su da se pored *p*-kumarinske kiseline ili njenih estara, stvaraju i derivati hidroksicimetne kiseline i flavonoidi. Fenilalanin/hidroksicinamatni put je definisan kao opšti fenilpropanoidni metabolizam. Ovaj metabolizam se odnosi posebno na promjene od fenilalanina do *p*-kumarinske kiseline, kao i na enzime neophodne za biosintezu praktično svih fenolnih jedinjenja, koji katalizuju pojedinačne korake kao što su: fenilalanin amonijum liaza (PAL), cinamat 4-hidroksilaza (C4H) i hidroksicinamat CoA ligaza (CoAL). Sve je više rezultata koji ukazuju da je fenilpropanoidni i flavonoidni put katalizovan sa nekoliko membranski asociranih multienzimskih kompleksa (Dixon & Paiva, 1995; Winkel-Shirley, 1999).

PAL je ključni enzim u biosintezi fenolnih jedinjenja, koji katališe deaminaciju fenilalanina i na taj način omogućava stvaranje *trans*-cimetne kiseline. Enzim je tetramer i svaka subjedinica ima molekulsku masu oko 83000. Velike fluktuacije u aktivnosti ovog enzima odnose se na fiziološko stanje i osjetljivost na brojne spoljašnje faktore (temperaturu, svjetlost, različite tipove stresa itd.). Aktivnost PAL može znatno varirati (čak 4 puta) i u istom fiziološkom stanju.

C4H je enzim odgovoran za prelazak cimetne kiseline u 4- odnosno *p*-hidroksicimetnu kiselinu. Ova reakcija zahtijeva molekularni kiseonik i NADPH. Hidroksilacija u *orto* položaju vodi ka formiranju *o*-kumarinske kiseline, prekursora biosinteze kumarina.

CoAL omogućava stvaranje CoA estara hidroksicimetnih kiselina u prisustvu koenzima A, ATP-a, i u mnogim slučajevima Mg^{2+} jona. CoA estri hidroksicimetnih kiselina igraju glavnu ulogu u biosintezi različitih grupa fenolnih jedinjenja, a posebno *p*-kumaroil CoA (4CL, 4-kumaroil:CoA ligaza) kao prekursor flavonoida i lignina. Utvrđeno je da se aktivnost ovog enzima može značajno razlikovati ne samo između različitih biljnih vrsta, već i u okviru iste vrste.

Modifikacijom jedinjenja formiranih u fenilpropanoidnom putu stvaraju se kumarini, lignini, benzojeve kiseline, flavonoidi i derivati hidroksicimetnih kiselina.

Stvaranje kafene, ferulinske i sinapinske kiseline od *p*-kumarinske kiseline zahtijeva 2 tipa reakcija: hidroksilaciju i metilaciju. Uvođenjem druge hidroksilne grupe u molekul *p*-kumarinske kiseline nastaje kafena kiselina, što je katalizovano monofenol monooksigenazama, dobro poznatim biljnim enzimima (Macheix *et al.*, 1990; Strack, 1997). Metilacija kafene kiseline vodi do formiranja ferulinske kiseline koje su zajedno sa *p*-kumarinskom kiselinom prekursori lignina (biosinteza lignina uključuje čitavu seriju enzima, pri čemu je konačni korak polimerizacija i akumulacija u ćelijskom zidu). Metilacija je katalizovana sa *O*-metil transferazom (Macheix *et al.*, 1990; Strack, 1997). Kafena kiselina je supstrat za rijetku 5-hidroksiferulinsku kiselinu od koje nastaje sinapinska kiselina kao rezultat *O*-metilacije. Formiranje derivata hidroksicimetnih kiselina zahtijeva stvaranje hidroksicinamoil CoA estara (na primjer *p*-kumaroil-CoA) katalizovanih sa hidroksicinamoil-CoA ligazama ili *O*-glikozil transferazama. Hidroksicinamoil CoA estri ulaze u različite specifične fenilpropanoidne reakcije, kakve su kondenzacije sa malonil-CoA, što vodi do flavonoida ili preko NADPH-zavisnih redukcija do lignina.

Stvaranje derivata hidroksicimetnih kiselina sa organskim kiselinama se odvija preko formiranja CoA estara, a potom transesterifikacije sa hidroksi kiselinama (hinska, jabučna, šikiminska itd.) katalizovane hidroksicinamat transferazom (HT). U biosintezi derivata hidroksicimetnih kiselina sa šećerima, transfer glukoze od uridin difosfoglukoze do hidroksicimetne kiseline je katalizovan sa glikozil transferazom (Macheix *et al.*, 1990; Strack, 1997).

Trans-cimetna kiselina je opšti prekursor za sve kumarine, i njena *orto*- i *para*-hidroksilacija vodi do formiranja kumarina i hidroksikumarina.

Pretpostavlja se da postoji nekoliko puteva za biosintezu pojedinih hidroksibenzoevih kiselina zavisno od biljke. Mogu nastati direktno šikimatnim putem, naročito od dehidrošikiminske kiseline kao u slučaju galne kiseline (Haddock *et al.*, 1982; Strack, 1997). Međutim, pomenute kiseline mogu nastati i degradacijom hidroksicimetnih kiselina (na sličan način kao kod β -oksidacije masnih kiselina) pri čemu su glavni intermedijeri cinamoil-CoA estri (Macheix *et al.*, 1990; Strack, 1997). Hidroksibenzoati takođe mogu nastati prilikom degradacije flavonoida (Strack, 1997). Hidroksilacije i metilacije hidroksibenzoevih kiselina se odvijaju analogno kao kod fenilalanin/hidroksicinamatnog puta (Strack, 1997). Poznavanje mehanizama, a posebno enzima uključenih u biosintezu hidroksibenzoevih kiselina i njihovih derivata, je u većem stepenu ograničeno, iako galna kiselina i njeni derivati igraju važnu ulogu u stvaranju hidrolizujućih tanina (Macheix *et al.*, 1990).

Elaginska kiselina se formira oksidacijom i dimerizacijom galne kiseline (Maas *et al.*, 1991). Oksidacija se ubrzava u alkalnim uslovima, a hidroliza i laktonizacija u kiselim uslovima (Tulyathan *et al.*, 1989). Galna kiselina i elaginska kiselina sa jedinjenjima koja sadrže hidroksilnu grupu mogu formirati estre. Ove kiseline su glavne komponente hidrolizujućih tanina. Tanini koji hidrolizom daju galnu kiselinu su galotanini, a elaginsku kiselinu (dilaktonsku formu heksahidroksidifenske kiseline) su elagitanini.

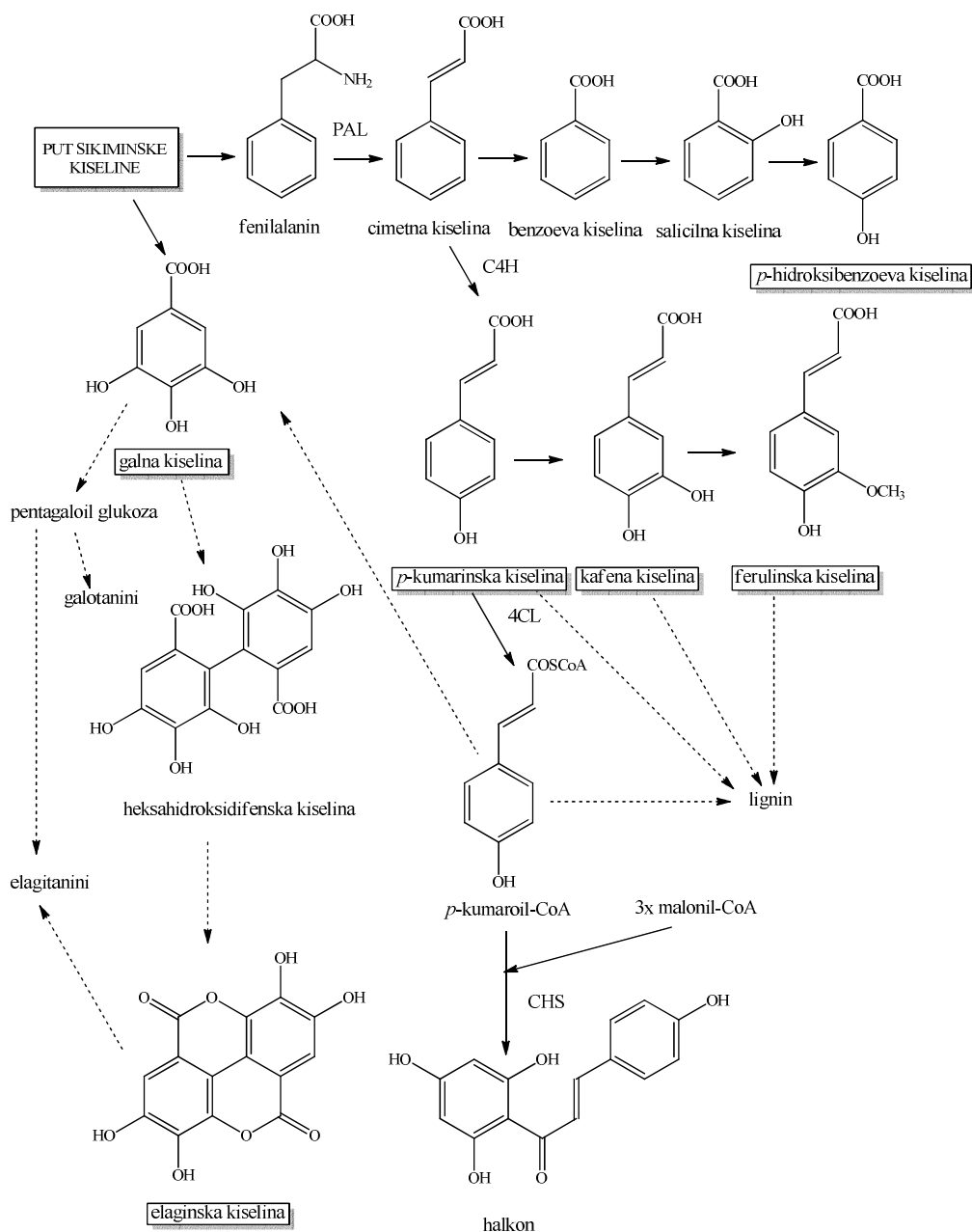
Ključni korak u biosintezi flavonoida je kondenzacija tri molekula malonil-CoA sa *p*-kumaroil-CoA pri čemu nastaje C₁₅ intermedijer 4,2',4',6'-tetrahidroksihalkon (Strack, 1997). Enzim koji katalizuje ovaj korak je halkon sintaza.

Sljedeći korak nakon halkon sinteze je stereospecifična izomerizacija do (2*S*)-flavanona, naringenina, što je katalizovano sa halkon izomerazom. Halkon odnosno izomerni flavanon je glavni intermedijer u sintezi svih flavonoida, jer predstavlja mjesto račvanja u biosintezi (Slika 2-3). Enzim flavanon-3-hidroksilaza katalizuje konverziju (2*S*)-naringenina u (2*R*,3*R*)-dihidro Kempferol i takođe (2*S*)-eriodiktiola u (2*R*,3*R*)-dihidrovercetin (Britsch & Grisebach, 1985). Enzim flavonol sintaza konvertuje dihidrokempferol u kempferol. Pored enzimske hidroksilacije u prstenu B flavonola, u

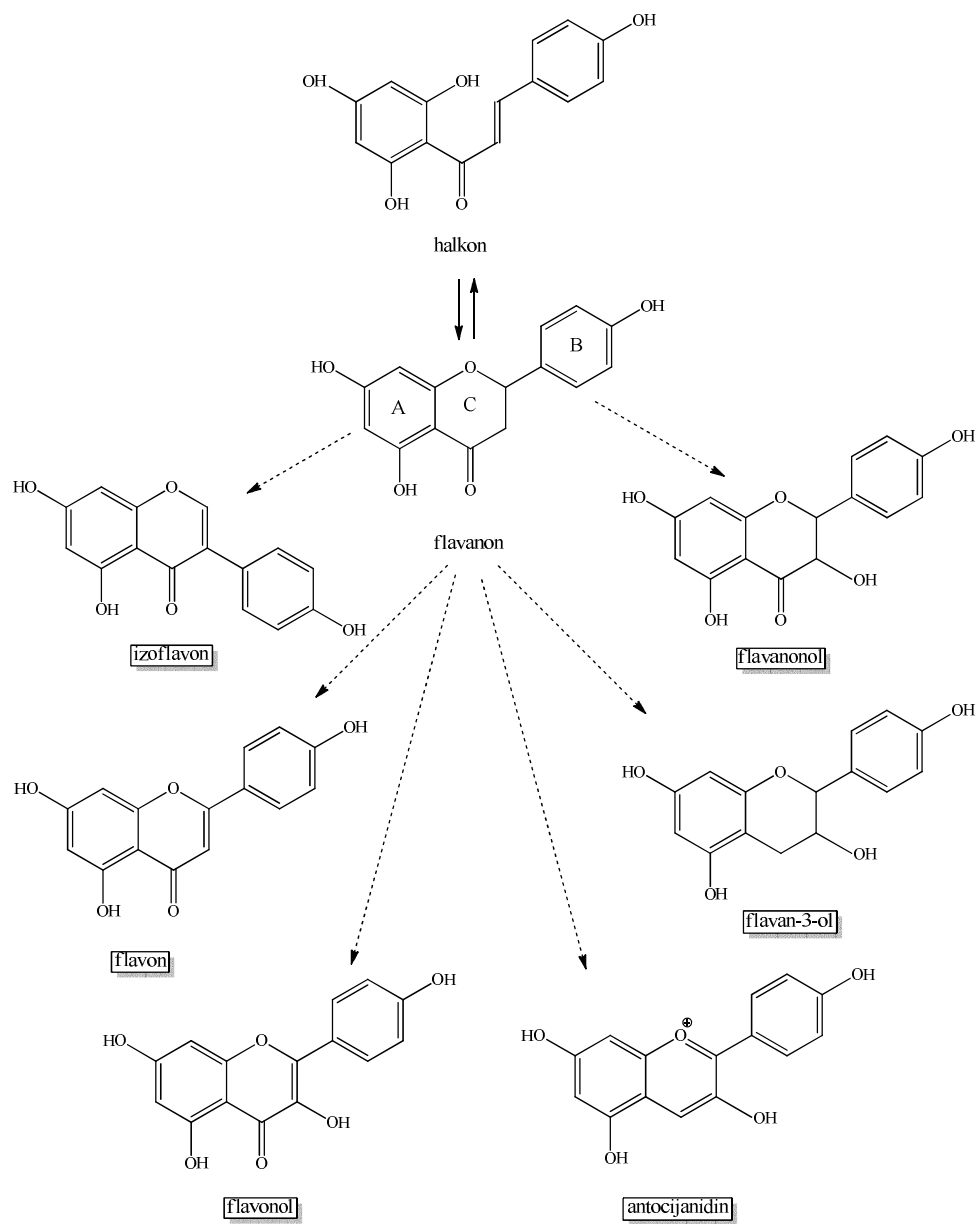
nekim slučajevima verovatno dolazi i do hidroksilacije *p*-kumarinske kiseline u kafenu kiselinu prije uključivanja u molekul flavonoida (Hakkinen, 2000). Dodatne hidroksilacije mogu se javiti u praktično svim stepenima oksidacije flavonoidnog skeleta. Dihidroflavonol može ući u drugi biosintetički put koji vodi do antocijanina. Najprije NADPH-zavisna dihidroflavonol 4-reduktaza katalizuje stvaranje leukoantocijanidin strukture (Strack, 1997). Zatim dolazi do konverzije leukoantocijanidina u obojene antocijanidine, što uključuje reakcije oksidacije i dehidratacije (Hakkinen, 2000), u koje su najvjerojatnije uključeni enzimi antocijanidin sintaze (Holton & Cornish, 1995). Šablon ekspresije gena pokazuje značajne razlike između organa i kultivara vinove loze, posebno za gene uključene u sintezu antocijanina. Kod crvenih sorti, svi geni su izraženi u pokožici, iako sa različitim temporalnim šablonima. U pulpi je ekspresija gena niska, a pojedini geni nisu izraženi, kao što su: PAL i UFGT (uridin difosfat-glukoza:flavonoid 3-*O*-glukozil transferaza) gen (Boss *et al.*, 1996a). Ova dva gena kodiraju enzime uključene u prvi i posljednji korak u sintezi antocijanina: PAL dozvoljava hidrolizu amonijaka iz fenilalanina, dok UFGT katalizuje glikolizaciju antocijanidina za proizvodnju antocijanina (obojenih i stabilnih proizvoda). Odsustvo UFGT gena je također pokazano i kod sjemenki. Kod bijelih sorti UFGT nije detektovan, a ekspresija drugih gena je niska, u poređenju sa pokožicom crvenih sorti (Boss *et al.*, 1996b).

Generalno, mnogi flavonoidi se javljaju kao glikozidi u aktivno metabolizujućim biljnim tkivima. Postoje stotine različitih glikozida sa: glukozom, galaktozom, ramnozom, ksilozom i arabinozom kao najčešćim šećerima. Konjugacije flavonoida nisu ograničene na glikolizaciju. Mnogi flavonoidi sadrže acilovane šećere. Acil grupe potiču ili od hidroksicimetnih ili alifatičnih kiselina, kakva je malonska kiselina (hidroksilna grupa šećera i kiselinska grupa podliježu reakciji esterifikacije) (Strack, 1997).

Važan intermedijer u stvaranju flavan-3-ola je flav-3-en-3-ol (koji potiče od halkona), od kojeg se dvostepenom stereospecifičnom redukcijom (NADPH) uključujući stvaranje karbokationa formiraju dva stereoizomera (+)-katehin i (–)-epikatehin. Postoje velike razlike u shvatanju biosinteze flavan-3-ola i proantocijanidina među autorima, a jedno od važnijih pitanja je da li je kondenzacija enzimaska ili ne. Postoji opšte slaganje da



Slika 2-2 Biosinteza hidroksicimetnih kiselina, hidroksibenzoevih kiselina i halkona (Macheix *et al.*, 1990; Hakkinen, 2000). Pune linije predstavljaju dobro-okarakterisane reakcije katalizovane pojedinačnim enzimima. Isprekidane linije predstavljaju transformacije koje zahtijevaju multienzimske komplekse, ili su manje okarakterisane ili variraju zavisno od biljne vrste. Enzimi: C4H – cinamat 4-hidroksilaza, CHS – halkan sintaza, 4CL – 4-kumarat: CoA ligaza, PAL – fenilalanin amonijum liaza



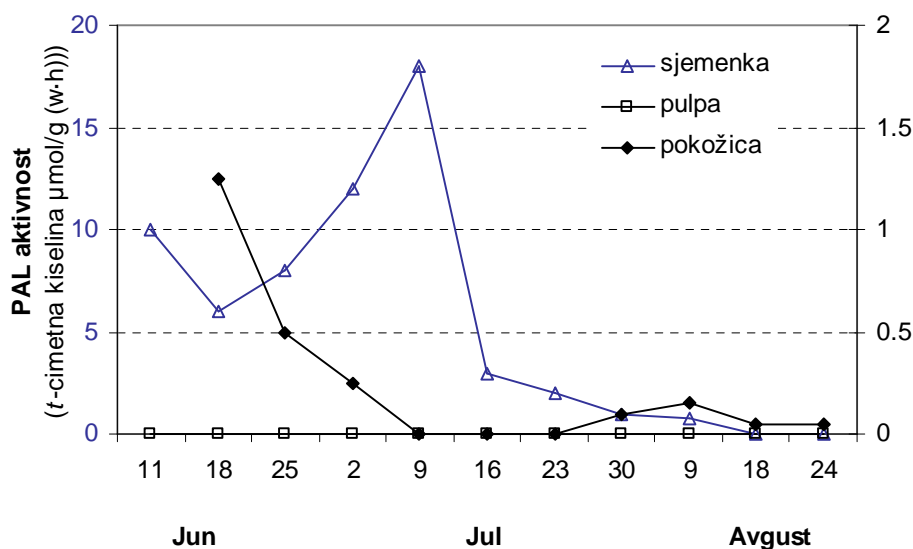
Slika 2-3 Biosinteza flavonoida (Macheix *et al.*, 1990)

se oligomerni proantocijanidini formiraju adicijom stereospecifičnog flavanil-4-karbokatjona na jedan od dva stereospecifična flavan-3-ola ili na postojeći lanac prije nego preko samo-kondenzacije karbokatjona (Macheix *et al.*, 1990).

Biosinteza proantocijanidinina dijeli zajedničke korake sa antocijaninima, ali se nakon redukcije leukocijanidina ili cijanidina račva, idući do katehina ili epikatehina, uz učešće enzima leukocijanidin reduktaze ili antocijanidin reduktaze. Ekspresija gena koji kodiraju pomenute enzime u sjemenci i pokožici crvenih sorti pokazuje specifičnu vremensku regulaciju sinteze proantocijanidinina, počevši rano tokom razvoja grozda do početka zrenja. Utvrđena je značajna razlika u relativnoj ekspresiji ovih gena u tkivima pokožice i sjemenke, sa većim vrijednostima u sjemenci, ili čak prisustvom samo u sjemenci (Braidot *et al.*, 2008).

2.3.2.1. Aktivnost enzima tokom sazrijevanja

Sazrijevanje ploda je praćeno povećanjem brzine sinteze proteina i aktivnosti brojnih enzima. Različitosti u pogledu fenolnog sastava su rezultat aktivnosti enzima odgovornih za njihovu biosintezu i degradaciju. Aktivnost PAL je maksimalna u veoma mladom plodu i onda opada tokom rasta ploda. Međutim, u voću u kojem se akumuliraju antocijanini, kakvo je grožđe, šljive, breskve, višnje i jagode, PAL ponovo raste. Aktivnost ovog enzima se najbolje može ilustrovati na primjeru grožđa, gdje je aktivnost fenilalanin amonijum liaze maksimalna u nezrelim bobicama, zatim se smanjuje tokom rasta, i kod crvenih sorti (Slika 2-4) ponovo raste početkom sazrijevanja, dok se kod bijelih ne mijenja. Iako je aktivnost PAL apsolutno neophodna za sintezu fenolnih jedinjenja, smatra se da nije ograničavajuća za data fiziološka stanja. Suprotno tome, njen supstrat fenilalanin može biti limitirajući faktor u sintezi fenolnih jedinjenja. Ipak, poređenje različitih fizioloških stanja na brojnim primjerima je pokazalo dobru korelaciju između promjena u aktivnosti PAL i akumulacije fenolnih jedinjenja (kod grožđa u slučaju derivata hidroksicimete kiseline). U grožđu, sve proučavane enzimске aktivnosti rastu i dostižu maksimum tokom perioda najveće akumulacije antocijanina. Ovo uključuje enzime koji su specifični za biosintezu flavonoida, halkan sintazu, halkan izomerazu i glukozil transferazu, kao i sve enzime uključene u opšti fenilpropanoidni metabolizam (PAL, CoAL i C4H). Aktivnost PAL je deset puta veća u sjemenkama u odnosu na pokožicu, dok je u pulpi zanemarljiva (Slika 2-4). Promjene aktivnosti PAL su u saglasnosti sa promjenama sadržaja antocijanina u pokožici i flavan-3-ola u sjemenkama (Macheix *et al.*, 1990).



Slika 2-4 Promjene u aktivnosti fenilalanin amonijum liaze u grožđu (Macheix *et al.*, 1990)

2.3.2.2. Akumulacija i skladištenje fenolnih jedinjenja u ćeliji

Iako se biosinteza flavonoida odvija u citoplazmi, najveći dio proizvoda se transportuje i akumulira u različitim djelovima, uglavnom ćelijskom zidu i vakuolama, slično kao kod drugih sekundarnih metabolita. Mikroskopska posmatranja su pokazala da su antocijanini prisutni u vakuolama epidermisa i/ili prvih spoljašnjih slojeva hipodermisa pokožice (koja se sastoji od kutiniziranog epidermisa i unutrašnjih slojeva hipodermisa), izuzev kod sorti bojadisera koje sadrže antocijanine i u pulpi (Braidot *et al.*, 2008). S druge strane, antocijanini se mogu naći u citoplazmatičnim mjehurićima protoplasta dobijenim iz ćelijske kulture, zvanim antocijanoplasti (Calderon *et al.*, 1993). Antocijanoplasti se ne nalaze u vakuolama, ali mogu predstavljati transportni mehanizam antocijanina u antocijanske inkluzije unutar vakuole. U skorije vrijeme je utvrđeno da su antocijanske vakuolarne inkluzije membranski razgraničene i da sadrže veliku količinu miješanih acilovanih antocijanina, ali i tanina i organskih jedinjenja (Zhang *et al.*, 2006; 2007).

Za razliku od antocijanina, flavan-3-oli i tanini su locirani ne samo u vakuolama, već i u ćelijskom zidu pokožice i sjemenke. Studije sa pokožicom su pokazale da tanini

imaju različite oblike, od onih slobodnih unutar vakuole, vezanih za proteine i lociranih u unutrašnjem dijelu tonoplasta do onih povezanih sa polisharidima u ćelijskom zidu (Amrani-Joutei *et al.*, 1994). Analiza sastava tanina lociranih u ćelijskom zidu i u unutrašnjoj ćelijskoj frakciji pokožice 'Kaberne Sovinjona' je pokazala da su tanini uglavnom prisutni u unutrašnjem dijelu ćelijske frakcije u odnosu na ćelijski zid, ali da je flavanolni sastav sličan. Međutim, tanini iz ćelijskog zida imaju mDP 2-3 puta veći od onih unutrašnjih. To navodi na pretpostavku da je sinteza tanina, tokom prve faze rasta, praćena transportom u ćelijski zid (Gagne, 2006).

Što se tiče sjemenke, tanini iz ćelijskog zida imaju veći mDP u odnosu na one iz unutrašnjeg dijela ćelije, a ova razlika raste u periodu od šarka do faze sazrijevanja. Taninski sastav je sličan kod obje ćelijske frakcije, s tim što je udio epikatehin galata veći u ćelijskom zidu (Geny *et al.*, 2003).

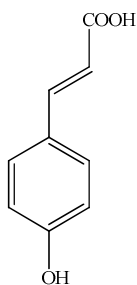
Važno je naglasiti da noviji radovi pokazuju da su flavonoidi prisutni i u ćelijskom jedru različitih biljnih vrsta, iako još uvijek nema takvih proučavanja vezanih za grožđe (Braidot *et al.*, 2008).

2.3.3. Fenolna jedinjenja u grožđu

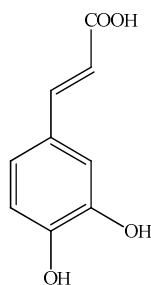
Kao što je navedeno u prethodnom odjeljku, fenolna jedinjenja u grožđu su lokalizovana u perikarpu (pokožici) i u slojevima omotača sjemenke, a u veoma malim količinama u mezokarpu (pulpi).

Tri primarne grupe fenolnih jedinjenja koje se javljaju u grožđu su: prosti fenoli, flavonoidi i stilbeni.

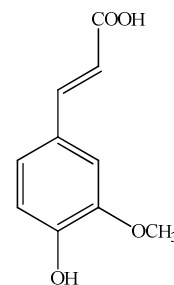
Prosti fenoli su derivati hidroksicimetnih i hidroksibenzoevih kiselina. Poznate hidroksicimetne kiseline su *p*-kumarinska, kafena, sinapinska i ferulinska kiselina. Identifikovani su i estarski oblici sa vinskom kiselinom (kutarna kiselina, kaftarna kiselina i fertarna kiselina). Evidentirani su glukozidi *p*-kumarinske, ferulne i kutarne kiseline. Hidroksicimetne kiseline su važni konstituenti acilovanih antocijanina (Macheix *et al.*, 1990).



p-Kumarinska kiselina

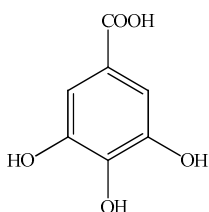


Kafena kiselina

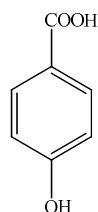


Ferulinska kiselina

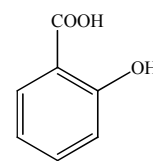
U poređenju sa hidroksicimetnim kiselinama, sadržaj hidroksibenzoevih kiselina i njihovih derivata je znatno niži. Najpoznatije su galna kiselina, *p*-hidroksibenzoeva, salicilna, siringinska, protokatehuinska, koje se uglavnom javljaju u slobodnom obliku. Galna kiselina je prisutna i kao acil-supstituent flavan-3-ola (Ali *et al.*, 2010).



Galna kiselina



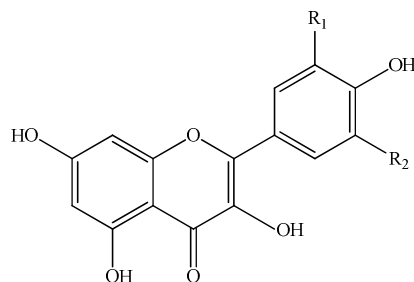
p-Hidroksibenzoeva kiselina



Salicilna kiselina

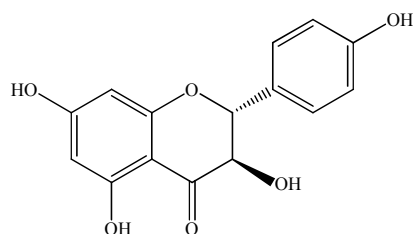
Flavonoidi su prisutni u pokožici i sjemenkama. Mogu se podijeliti na nekoliko podgrupa: flavoni, flavonoli, dihidroflavonoli, flavanoli i antocijaninini, sa istim skeletom ali različitim oksidacionim stanjem centralnog piranskog prstena (Ali *et al.*, 2010).

Uglavnom su 3-*O*-glukozid i 3-*O*-glukuronid kvercetina, miricetina, kempferola prisutni u grožđu, a nađeni su i drugi mono- i diglikozidi, ali u nižim koncentracijama.

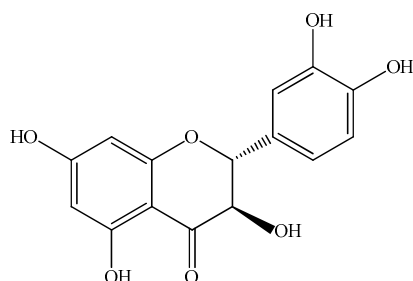


$R_1 = H, R_2 = H$; Kempferol
 $R_1 = OH, R_2 = H$; Kvercetin
 $R_1 = OH, R_2 = OH$; Miricetin
 $R_1 = OCH_3, R_2 = H$; *izo*-Ramnetin

Detektovano je prisustvo dihidroflavonola (flavanonoli) kao što je astilbin (dihidrokvercetin 3-ramnozid) i engeletin (dihidro Kempferol 3-ramnozid) (Jin *et al.*, 2009).

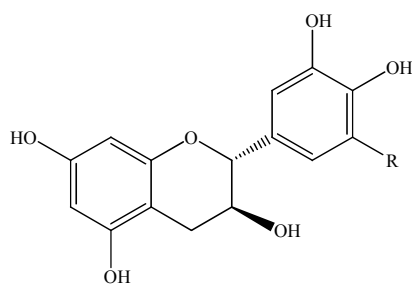


Dihidro Kempferol

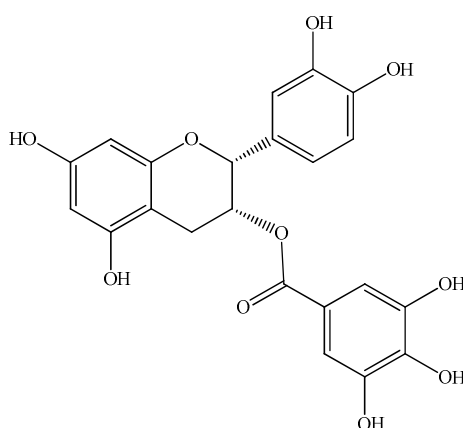
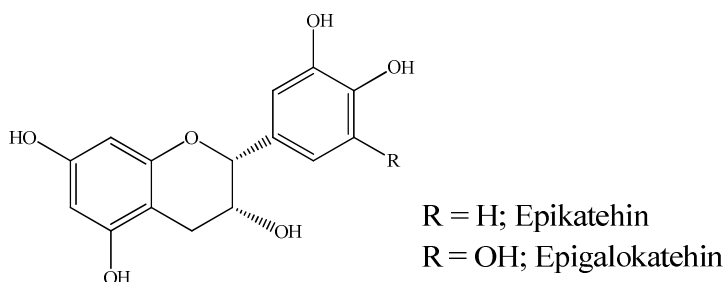


Dihidrokvercetin

Slobodni flavan-3-ol monomeri, kao katehin i epikatehin, prisutni su u pokožici, obično u nižim koncentracijama, pretpostavlja se zbog moguće uloge kao prekursora u procesu kondenzacije tanina (Braidot *et al.*, 2008).



R = H; Katehin
R = OH; Galokatehin



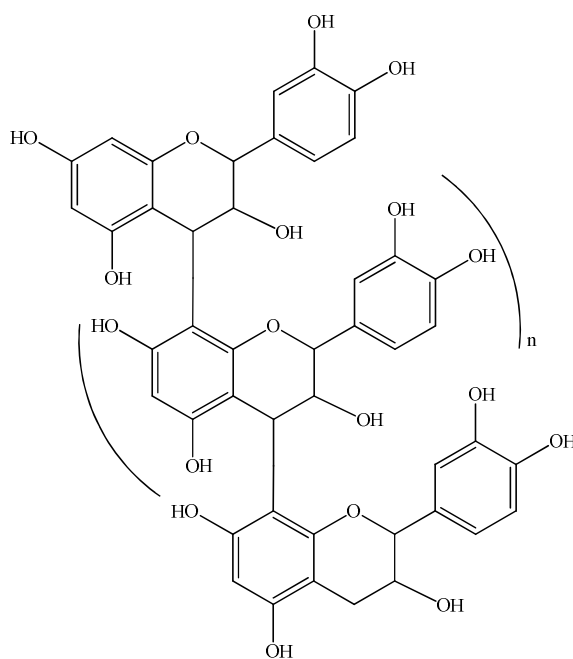
Epikatehin galat

Polimerizacijom polihidroksi flavan-3-olnih monomera, (+)-katehina i (-)-epikatehina, i njihovih estara galne kiseline nastaju oligomeri i polimeri zvani proantocijanidini (kondenzovani tanini).

Tanini u pokožici grožđa su polimeri epikatehina i epigalokatehina, kao "ekstenzionih" subjedinica i katehina kao "terminalne" jedinice. Epikatehin galat je obično prisutan u tragovima (Braidot *et al.*, 2008). Tanini pokožice se razlikuju od onih prisutnih u sjemenkama po većoj prosječnoj masi, sa srednjim stepenom polimerizacije od oko 28, i nižim udjelom galoil jedinica (Souquet *et al.*, 1996).

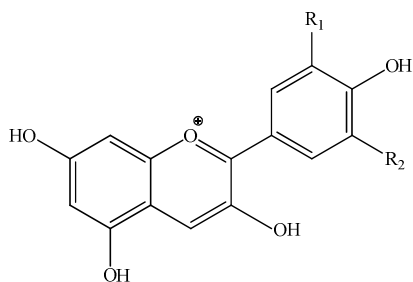
Sjemenka je drugi veliki izvor flavonoida, čak iako čini najviše do 6% mase bobice. U ovom organu, glavni flavonoidi su flavan-3-oli (monomeri i kondenzovani polimeri), dok su flavonoli prisutni u tragovima. Skoro svi flavonoidi sjemenke su u spoljašnjem ili mekom omotaču sjemenke, a tanini i u epidermisu kao i zadnjim slojevima unutrašnjeg dijela sjemenke (Pinelo *et al.*, 2006; Cadot *et al.*, 2006; Braidot *et al.*, 2008).

U poređenju sa pokožicom, sadržaj ukupnih tanina je značajno viši u sjemenkama, a prosječni stepen polimerizacije (mDP) generalno nekoliko puta niži u sjemenkama u svim fazama razvoja bobice. Pored toga, manji tanini sjemenke se obično razlikuju po sastavu od onih u pokožici (Pinelo *et al.*, 2006; Braidot *et al.*, 2008).



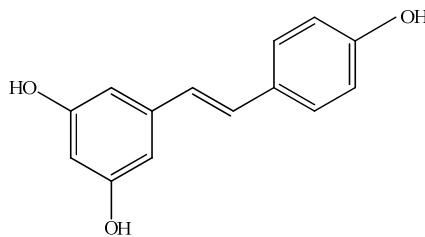
Proantocijanidin

Kod crvenih varijeteta, antocijanini mogu biti smješteni ne samo u epidermisu, već zajedno sa taninima i u hipodermalnim slojevima pokožice. Antocijanini, koji su odgovorni za boju grožđa su glikozidi antocijanidina. Kod vinove loze, 3-monoglukozidi su glavni antocijanini, gdje glukoza može biti acilovana. U grožđu su detektovani: delfinidin, cijanidin, petunidin, peonidin i malvidin 3-glukozidi, 3-(6-acetil)-glukozidi i 3-(6-*p*-kumaroil)-glukozidi, peonidin i malvidin 3-(6-kafeoil)-glukozidi (Pinelo *et al.*, 2006; Braidot *et al.*, 2008, Ali *et al.*, 2010).

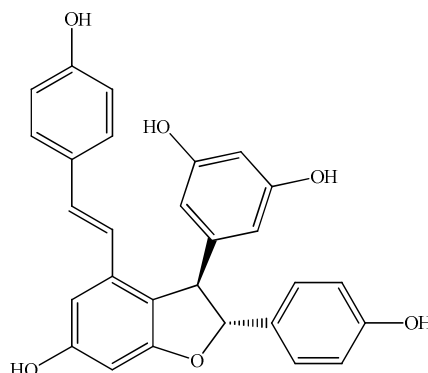


- $R_1 = H, R_2 = H$; Pelargonidin
- $R_1 = OH, R_2 = H$; Cijanidin
- $R_1 = OH, R_2 = OH$; Delfinidin
- $R_1 = OCH_3, R_2 = H$; Peonidin
- $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$; Petunidin
- $R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3$; Malvidin

Stilbeni (1,2-diarileteni) su neflavonoidi smješteni u pokožici, ali i u znatno malim količinama u sjemenkama. Značajne količine ovih jedinjenja su prisutne u peteljci i peteljčici grozda. Resveratrol (monomerni stilben) je glavni stilben u grožđu. Stilbeni prisutni u oligomernoj i polimernoj formi, poznati su kao viniferini. Viniferini identifikovani u grožđu su: α -, ϵ -, δ -viniferin, dimerni i trimerni resveratrol (Ali *et al.*, 2010).



Resveratrol



ϵ -Viniferin

2.3.4. Promjene u bobicama tokom sazrijevanja

U bobicama se, kao i u drugim organima vinove loze, odvijaju fiziološki procesi: disanje, transpiracija, i dok su bobice zelene fotosinteza.

Tokom faze sazrijevanja grožđa dolazi do složenih biohemijских promjena u bobicama. Početkom ove faze – u šarku ili kod nekih sorti nekoliko dana prije pojave šarka dolazi do naglog povećanja količine šećera u bobicama. Računa se da je to, s jedne strane, posljedica smanjenog disanja bobica usljed iščezavanja stoma a, s druge strane, da je u vezi sa osiguravanjem fiziološkog sazrijevanja sjemenki (Burić, 1984). Eksperimentalno je utvrđeno da znatan dio šećera sintetisan u lišću, za vrijeme sazrijevanja grožđa, prenosi se u plodove u obliku saharoze (transportni oblik šećera) i tu se nakuplja u obliku glukoze i fruktoze. Drugi dio šećera koji se sakupi u plodovima vodi porijeklo iz skroba smještenog u stablu i korijenu, i sintetisanog u periodu koji prethodi sazrijevanju. Brzina hidrolize skroba u zelenim plodovima je velika i zato se skrob može naći samo u tragovima (Milosavljević, 1984b). Količina šećera u grožđu – bobicama povećava se sve do nastupanja pune zrelosti. Posle nastupanja pune zrelosti grožđa, dio peteljke grozda (počev od lastara) se zadrveni i asimilati više ne pristižu u bobicu.

U zelenim bobicama veoma je visok intenzitet disanja, zato nastaju relativno velike količine kiselina kao proizvod nepotpune oksidacije šećera. U fazi sazrijevanja grožđa, sadržaj kiselina opada, zbog opadanja intenziteta disanja, formiranja soli i transformacije u šećer. Ipak, najveća količina kiselina u procesu disanja razloži se do CO₂ i vode. U grožđu (zelenom i zreлом) jabučna i vinska kiselina čine više od 90% ukupnih kiselina. Intenzitet formiranja vinske kiseline u grožđu za vrijeme šarka je praktično zanemarljiv.

Azotnih materija ima više u zreлом nego u zelenom grožđu. Posebno je veliki porast od šarka do stanja pune zrelosti, kada se povećava sadržaj organskih oblika azota (aminokiseline, polipeptidi, peptoni i proteini).

U fazama razvoja zelenih bobica i sazrijevanja bobica neprekidno se povećava količina mineralnih materija. Priticaj je znatno brži tokom prve polovine faze sazrijevanja grožđa, nego pri kraju. Naročito je veliko povećanje kalijuma.

Taninskih materija je znatno više u zelenom nego u zreлом grožđu (Burić, 1984).

Ako se ne uzmu u obzir antocijanini, flavonoidni sastav pokožice je sličan i kod crvenog i kod bijelog grožđa (Pinelo *et al.*, 2006; Braidot *et al.*, 2008), a kao što je poznato, varira tokom sazrijevanja grožđa. U stvari, akumulacija proantocijanidina se javlja od faze formiranja ploda do 1–2 sedmice prije šarka, a potom njihova koncentracija opada između šarka i berbe (Downey *et al.*, 2003). Različito od tanina, akumulacija antocijanina počinje od šarka i dostiže maksimum u posljednjim fazama sazrijevanja ploda, mada može doći i do pada koncentracije naročito u toplim klimatima. Sinteza flavonola se odvija u dva različita perioda, prvi blizu cvjetanja i drugi koji počinje nakon šarka (Downey *et al.*, 2006). Međutim, njihova ukupna koncentracija je viša na početku razvoja ploda (Downey *et al.*, 2003).

Sastav flavonoida se mijenja u toku sazrijevanja sjemenke, zajedno sa makroskopskim promjenama u tkivima, kakve su boja i tvrdoća. Prije šarka, unutrašnji slojevi srednjeg omotača podliježu procesu odebljavanja i jake lignifikacije ćelijskih zidova, dok ćelije mekog spoljašnjeg omotača počinju intenzivno da dobijaju boju nakon šarka. Smatra se da je tamnjenje sjemenke, tokom sazrijevanja, uglavnom rezultat oksidacije flavan-3-ola i tanina akumuliranih u ćelijama tankih zidova spoljašnjeg omotača, čime se obezbjeđuje fizička i hemijska barijera za kiseonik i infekciju patogenima. Najviša koncentracija flavan-3-ola (monomeri i kondenzovani tanini) je evidentirana u šarku, kada akumulacija dostiže maksimum, a onda tokom sazrijevanja opada za 90% u slučaju monomera i 60% za proantocijanidine (Downey *et al.*, 2003; Cadot *et al.*, 2006; Braidot *et al.*, 2008).

2.3.5. Regulacija metabolizma fenolnih jedinjenja u plodu

Različitosti u metabolizmu fenolnih jedinjenja, s aspekta fizioloških stanja, zavise direktno od sinteze proteina. Međutim, sekundarni metabolizam uopšte, a posebno metabolizam fenolnih jedinjenja, takođe mnogo zavisi od brojnih faktora, bilo spoljašnjih (svjetlost, temperatura, snabdjevenost vodom, đubrenje itd.) bilo unutrašnjih (hormoni itd.). Poznavanje uloge ovih faktora u regulisanju metabolizma fenolnih jedinjenja je posebno interesantno zbog mogućnosti praktične primjene u pogledu intenziviranja tj. povećavanja

ili smanjivanja sinteze određenih grupa fenolnih jedinjenja u plodu. Mnogi od ovih faktora izgleda da djeluju po "zvonastoj" zavisnosti, što znači da mogu povećati količinu flavonoida samo pri optimalnom intenzitetu. Smanjenje biosinteze flavonoida je uočeno kada su ili endogeni ili egzogeni faktori niskog ili visokog intenziteta djelovanja (Braidot *et al.*, 2008).

Svjetlost kao faktor životne sredine koji utiče na metabolizam fenolnih jedinjenja je mnogo proučavan, naročito sa stanovišta uticaja na akumulaciju antocijanina, posebno u plodu, a u znatno manjem stepenu na glikozide flavonola i derivate hidroksicimetne kiseline. Nedostatak je što su istraživanja bazirana uglavnom na proučavanju uticaja klimata, pri čemu nije lako identifikovati posljedice uticaja isključivo svjetlosti, jer je prisutan i uticaj drugih faktora, a posebno temperature. Odavno je poznato da je nivo sunčevog zračenja važan faktor u "bojenju" bobice grožđa. Smanjenje sunčevog zračenja ima za posljedicu snižavanje sadržaja antocijanina, a veoma malo utiče na ukupne rastvorljive čvrste supstance (Macheix *et al.*, 1990). Zasjenjenost može takođe promijeniti udio između različitih antocijanina, što je evidentirano kod sorte 'Shiraz', gdje malvidin, petunidin i delfinidin glukozidi opadaju u odnosu na peonidin i cijanidin glukozide (Downey *et al.*, 2004). Studije pokazuju da zasjenjenost značajno smanjuje količinu flavonoida u bobicama, dok je biosinteza samo flavonola ograničena svjetlošću, što je konzistentno sa ulogom ovih molekula u zaštiti od UV svjetlosti (Downey *et al.*, 2004).

Ipak, efekat niske insolacije je mnogo manje izražen kada je prosječna temperatura niska. Smatra se da je glavni faktor regulacije metabolizma fenolnih jedinjenja aktivnost PAL, koja raste u grožđu izloženom svjetlosti što je praćeno povišenjem koncentracije antocijanina.

Veoma uopšten pristup objašnjenja uticaja **temperature** odnosi se na njenu ulogu u regulisanju brzine hemijske reakcije, što rezultira usporavanjem metabolizma kada temperatura pada. Posebna pažnja je posvećena proučavanju temperaturnog efekta kod grožđa. Generalno, sadržaj fenolnih jedinjenja u grožđu iz oblasti hladnog klimata i kratkog vegetacionog perioda je viši u odnosu na druge regione. Temperatura oko 15 °C (dnevna/noćna) dovodi do boljeg obojenja grožđa nekoliko kultivara vinove loze (*Vitis vinifera*) u poređenju sa višom temperaturom (na primjer 35 °C d/ 15 °C n ili 35 °C d/ 25

°C n ili 25 °C d/ 15 °C n) (Macheix *et al.*, 1990). Jako izraženi efekti su zabilježeni kod određenih osjetljivih varijeteta kao što su 'Tokay' ili 'Emperor', kada su temperature preko 30 °C (na primjer 35 °C d/ 30 °C n ili 37 °C d/ 32 °C n) dovele do potpune blokade sinteze antocijanina. Uticaj termoperiodizma ne mora uvijek biti određujući. Naime, iako je najintenzivnije obojavanje grožđa često zapaženo pod dnevnim temperaturama 15–25 °C, a noćnim 10–20 °C, na konstantnoj temperaturi od 15 °C obojavanje grožđa takođe može biti veoma efektivno. Međutim, obojavanje se može umanjiti kada je razlika između dnevne i noćne temperature veća od 10 °C.

U stvari, temperatura može na dva načina uticati na akumulaciju antocijanina: 1) stimulacijom ili smanjivanjem aktivnosti PAL i 2) modifikacijom nivoa inaktivatora PAL. Visoke temperature mogu dovesti do stimulacije sinteze inhibitora PAL prije nego direktno negativno uticati na aktivnost PAL. Inaktivacija PAL se ne javlja ili je zastupljena u manjem stepenu na niskim (naizmjenično 6/20 °C) u odnosu na više temperature (konstantno 25 °C) (Macheix *et al.*, 1990).

Uticaj zemljišta na sastav grožđa je teže procijeniti od uticaja mezoklimata. Zemljište može uticati na:

- pristupačnost vlage, zavisno od kapaciteta zadržavanja vlage;
- pristupačnost hranljivih elemenata, koja zavisi od ekohemijskih uslova;
- mikroklimat, zavisno od kapaciteta zadržavanja toplote i reflektovanja svjetlosti i
- rast korijena, zavisno od zbijenosti (Jackson & Lombard, 1993).

Brojni drugi faktori, kao što je primjena raznih agrotehničkih mjera, mogu takođe uticati na fenolna jedinjenja. Na primjer, usljed ograničenog **snabdijevanja** vinove loze **vodom** bobice su manje i imaju višu koncentraciju antocijanina i tanina u odnosu na bobice u uslovima optimalnog navodnjavanja. Dakle, nedostatak vode može uticati na veličinu bobice, i tako indirektno mijenjati odnos između veličine bobice i površine pokožice. U tom slučaju se sadržaj kiselih fenola i katehina smanjuje. To znači da uticaj nedostatka vode nije uniforman za sva fenolna jedinjenja (Macheix *et al.*, 1990). U skorije vrijeme se navodi da vodeni stres može imati slične efekte kada se primjenjuje prije ili poslije šarka. Tokom vodenog stresa sinteza antocijanina se odvija paralelno sa povećanjem ekspresije

transportera flavonoida. Utvrđeno je da veće količine vode mogu izazvati smanjenje količine tanina (Braidot *et al.*, 2008).

U pogledu uticaja **hranljivih elemenata** dodatih đubrenjem, mnoge studije su pokazale povećan sadržaj antocijanina u slučaju primjene umjerenih doza azota (50 g/čokotu) i, kao što je već napomenuto, kod većih količina opadanje sadržaja čvrstih rastvorljivih supstanci (Matin *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2004; Conradie, 2001; Christensen *et al.*, 1994; Ahlawat, 1988; Ruhl *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 1998).

Pored toga, evidentirano je povećanje sadržaja antocijanina za 23% odnosno 40% prilikom primjene 60 odnosno 120 g kalijuma po čokotu, respektivno (Delgado *et al.*, 2004).

Prekomjerna primjena azotnih i kalijumovih đubriva dovodi do bujnijeg rasta, zbog čega se odlaže sazrijevanje i smanjuje obojenost grožđa. Ovakvi efekti su posljedica indukcije metaboličke neravnoteže i kompeticije između vegetativnih djelova i bobica za translokaciju šećera. Zbog veće bujnosti ograničena je izloženost grožđa suncu, što zajedno sa temperaturom predstavlja glavne faktore životne sredine koji mogu uticati na biosintezu flavonoida (Delgado *et al.*, 2004). Od makroelemenata na sadržaj bojnih materija najpozitivniji uticaj ispoljavaju kalijum i fosfor zajedno, a zatim kalcijum i magnezijum. Optimalne količine azota (naročito u obliku uree) utiču pozitivno, a veće količine, pogotovo u drugoj polovini vegetacije, negativno (Lović, 1984).

S aspekta uticaja na fenolna jedinjenja u grožđu stonih sorti, među **bioregulatorima raste**nja izdvojeni su: etilen i abscisinska kiselina kao endogeni, i etefon kao egzogeni.

Etilen je hormon koji igra fundamentalnu ulogu u sazrijevanju ploda i starenju biljnih organa uopšte. Uočeno je da tretman sa etilenom ili etefonom uzrokuje povećanje sadržaja antocijanina preko stimulacije enzima uključenih u biosintezu fenolnih jedinjenja, a posebno PAL. U pokožici grožđa stonih sorti 'Ribier' i 'Emperor' je utvrđeno povišenje sadržaja antocijanina kao i ukupnih fenola, kod 'Ribiera' prilikom tretiranja sa etefonom u fazi šarka. Pored etefona znatan uticaj imala je i svjetlost. Kod 'Kardinala' saharoza i etefon su imali sinergistički efekat na sintezu antocijanina na temperaturi 22 °C, dok je uticaj na akumulaciju ukupnih fenola u pokožici grožđa bio mali.

Regulatori rasta djeluju na različite načine na rast i sazrijevanje ploda. Primjena abscisinske kiseline stimulira akumulaciju antocijanina u bobicama grožđa, ali nema efekta na ukupne rastvorljive čvrste supstance ili na sadržaj ukupnih kiselina (Macheix *et al.*, 1990; Braidot *et al.*, 2008).

Generalno, ostaje teško odrediti da li su različitosti u fenolnom sastavu rezultat specifičnog efekta na njihov metabolizam ili su indirektni rezultat opštih fizioloških promjena (poremećaja) na nivou ploda ili cijele biljke. Posljednja hipoteza čini se vjerovatnijom (Macheix *et al.*, 1990).

2.3.6. Značaj i uloga fenolnih jedinjenja u biljci

Fenolna jedinjenja su od velike važnosti, jer kao sastavni dio strukture ćelijskog zida, uglavnom u obliku lignina, predstavljaju mehaničku barijeru protiv mikroba. Lignini su poslije celuloze najzastupljenija organska struktura na Zemlji (Strack, 1997).

Najznačajnija funkcija flavonoida, naročito antocijanina, zajedno sa flavonima i flavonolima kao kopigmentima, odnosi se na boju cvijeća i plodova (Hakkinen, 2000). To je značajno zbog privlačenja insekata i ptica u oprašivanju i raznošenju sjemena. Fenolna jedinjenja mogu uticati na kompeticiju među biljkama (alelopatija). Pored dobro poznatih isparljivih terpenoida, toksični vodorastvorljivi fenoli, kakvi su prosti fenoli, hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline takođe mogu biti alelopatička jedinjenja (Strack, 1997). Uslovi stresa – višak UV svjetlosti, mehanička oštećenja ili infekcije, podstiču biosintezu fenolnih jedinjenja. Ustanovljen je doprinos fenolnih jedinjenja mehanizmima otpornosti na parazite, iako su fiziološke funkcije i načini djelovanja još uvijek nedovoljno dobro istraženi. Značajna je uloga flavonoida i fenolnih jedinjenja u odbrani biljke (Dixon & Paiva, 1995). Dva načina djelovanja u odbrani biljke su: direktni toksični efekti (npr. slobodni radikali stvoreni od prekursora lignina) i aktivna i brza depozicija lignina (Strack, 1997). Kao rezultat „napada“ mikroba mogu se akumulirati jedinjenja male molekulske mase zvana fitoaleksini. Fitoaleksini su jedinjenja nastala nakon infekcije, iako mogu postojati u niskim koncentracijama i u zdravoj biljci (Strack, 1997). Suprotno tome, toksini su konstitutivna jedinjenja prisutna u zdravim tkivima u

dovoljno visokim koncentracijama za odbranu biljke ili kao slobodni toksini ili u konjugovanim oblicima odakle se oslobađaju nakon "napada" (Strack, 1997). Pored fenolnih fitoaleksina i toksina, hidroksikumarini i hidroksicimetne kiseline, ali i flavonoidi igraju važnu ulogu u odbrani (Strack, 1997). Tanini su jako važni za otpornost biljke i ploda posebno na patogene mikroorganizme (Macheix *et al.*, 1990).

Fenolna jedinjenja su markeri fiziološkog stanja rasta i sazrijevanja ploda. Fenolna jedinjenja su takođe veoma dobri markeri kvaliteta, što im daje veliki praktični značaj. Pored toga, poznat je i hemotaksonomski značaj fenolnih jedinjenja (specifični profil antocijanina je karakterističan za različite vrste i kultivare) .

2.3.7. Značaj fenolnih jedinjenja za kvalitet ploda

Sazrijevanje ploda je okarakterisano kompleksnim nizom koordinisanih biohemijskih promjena koje vode do specifičnih osobina. Neke od osobina, kao što su boja, ukus i u malom stepenu aroma su povezane sa prisustvom fenolnih jedinjenja. To je od posebnog značaja u pogledu senzorske ocjene ploda od strane konzumenta (čovjeka i životinje). Fenolna jedinjenja od važnosti za boju grožđa su pored antocijanina i flavonol glikozidi, zbog efekta kopigmentacije (uticaj na intenzitet i stabilnost boje).

Gorki ukus može poticati od mnogih jedinjenja, kao što su: aminokiseline, peptidi, alkaloidi, terpeni i različiti fenoli. Poznato je da oligomerni proantocijanidini doprinose gorkom ukusu, ali i da odnos °Brix/kiselina može modifikovati gorčinu. Pored proantocijanidina, određeni derivati hidroksicimetne kiseline su takođe gorki. Sve fenolne frakcije iz sjemenki grožđa su i opore i gorke, a relativna oporost raste sa molekulskom masom (Macheix *et al.*, 1990). Generalno, afinitet za proteine i gorčina proantocijanidina raste sa stepenom polimerizacije i stepenom galoilacije. Studije su pokazale da su proantocijanidini više molekulske mase i rastvorljivi i više opori u odnosu na oligomerne proantocijanidine. Ukus proizvoda polifenolnih reakcija i uticaj na oporost uključivanjem jedinica antocijanina u strukturu tanina se još uvijek proučava (Cheynier, 2005).

Samo nekoliko prostih fenola pokazuju osobinu djelimične isparljivosti na sobnoj temperaturi, zatim rastvorljivosti u lipidima i vodi, tako da je njihov doprinos ukupnoj aromi mali (Macheix *et al.*, 1990).

2.3.8. Zdravstveni efekti fenolnih jedinjenja

Pored alkaloida, koji su od fundamentalnog značaja za medicinu, fenolna jedinjenja (naročito flavonoidi) imaju značajnu ulogu među prirodnim supstancama korišćenim u terapeutske svrhe. Medicinska i nutritivna vrijednost grožđa poznata je hiljadama godina. Filozofi antičke Grčke vjerovali su u iscjeljujuću moć grožđa najviše zbog djelotvornosti vina. Lišće vinove loze korišćeno je u zastavljanju krvarenja, bola, dijareje. Nezrelo grožđe je korišćeno u liječenju upale grla, suvo grožđe kod konstipacije i žeđi, a zrelo i slatko grožđe u tretiranju širokog ranga zdravstvenih problema kao što su: kancer, kolera, velike boginje, mučnina, infekcije oka, oboljenja kože, bubrega i jetre (Shi *et al.*, 2003).

Posljednjih nekoliko decenija se intenzivno proučavaju zdravstveni efekti fenolnih jedinjenja.

Klinička studija je pokazala da su procijanidin oligomeri iz sjemenki grožđa 20 i 50 puta veći antioksidansi u odnosu na vitamin C i E, respektivno (Uchida, 1980). Silva *et al.* (1991) su utvrdili da proantocijanidini iz sjemenki grožđa imaju sposobnost "hvatanja" superoksid i hidroksilnih radikala. *In vivo* studije sa miševima su pokazale jači protektivni efekat proantocijanidina ne samo u odnosu na vitamine C i E pojedinačno, već i u odnosu na smještu ova 2 vitamina, kao i β -karotena kod peroksidacije lipida i fragmentacije DNK (Bagchi *et al.*, 1998).

Koronarno oboljenje srca, u značajnom broju prisutno kod stanovništva razvijenih zemalja, obično je povezano sa visokim nivoom holesterola u krvi. Posebno visok nivo lipoproteina male gustine (LDL) u plazmi može inicirati aterosklerozu. S tim u vezi, glavnu ulogu u inhibiciji LDL oksidacije imaju polifenoli iz sjemenki grožđa zbog njihove antioksidativne aktivnosti i inhibicije agregacije trombocita (Manthey *et al.*, 2002). Resveratrol takođe inhibira agregaciju trombocita i LDL oksidaciju, štiteći jetru od peroksidacije lipida (Teissedre *et al.*, 1996).

Konзумacija soka od grožđa nudi dobru zaštitu protiv LDL oksidacije, što su pokazale *in vivo* studije sa psima, majmunima i ljudima, a što bi značilo da bi se na taj način mogao inhibirati začetak ateroskleroze (Folts, 2002). Sato *et al.* (1999) su pokazali da je kod životinja koje su konzumirale fenole iz sjemenki grožđa smanjena pojava miokardijalnog infarkta, zbog "hvatanja" slobodnih radikala stvorenih tokom ishemije i reperfuzije.

Studija sa pacovima oboljelim od dijabetesa je pokazala da procijanidini imaju antihiperглиkemijski efekat. Ova jedinjenja djeluju na insulin-osjetljive ćelije veoma slično insulinu (Pinent *et al.*, 2004).

Otkrivena je preventivna sposobnost procijanidina iz grožđa u pogledu rasta ćelija kancera (Ali *et al.*, 2010).

Eng *et al.* (2003) su otkrili da se procijanidini iz sjemenki grožđa mogu koristiti kao hemoprotektivni agensi protiv raka dojke (estrogen-zavisnog tumora), suzbijajući *in situ* sintezu estrogena. Ekstrakt sjemenki grožđa se pokazao efikasan i kod hormon-refraktornog raka prostate, što se može dovesti u vezu sa njegovim antiproliferativnim, proapoptičkim i antiangiogenim aktivnostima (Singh *et al.*, 2004).

Metilovani resveratrol se pokazao 100 puta aktivniji od resveratrola u pogledu inhibicije ćelijske linije kancera debelog crijeva kod čovjeka (Schneider *et al.*, 2003). *In vitro* studija je pokazala da metilovani resveratrol indukuje apoptozu humanih limfoblastoidnih ćelija (Ali *et al.*, 2010).

Polifenoli (procijanidini) su takođe sposobni da inhibiraju neke enzime koji katalizuju oslobađanje supstanci koje doprinose pojavi upala kao što su: histamin, serin, proteaza, prostaglandin i leukotrieni (Middleton & Drzewieki, 1983; Amella *et al.*, 1985; Pearce *et al.*, 1984). Procijanidini inhibiraju aktivaciju hijaluronidaze, što je povezano sa antihistaminskim efektom i njihovom sposobnošću da jačaju ćelijske membrane bazofila i mast ćelija, koje sadrže alergene, i na taj način sprečavaju hiperosjetljivost na polen i alergene iz hrane (Ali *et al.*, 2010).

Japanski istraživači su našli da su procijanidini zahvaljujući antioksidativnoj aktivnosti efikasni u sprečavanju katarakte (Yamakoshi *et al.*, 2002).

Saito *et al.* (1998) nalaze da katehin, procijanidin B3, dimerni i trimerni procijanidini ne pokazuju bilo kakvu odbrambenu aktivnost protiv čira, za razliku od tetramera, pentamera i heksamera. Autori pretpostavljaju da je to vjerovatno posljedica sposobnosti većih oligomernih procijanidina da se vezuju za mukoproteine sluzokože želuca.

Ekstrakt sjemenki grožđa, koji sadrži i resveratrol, može se upotrijebiti za tretiranje rana na koži i drugih kožnih poremećaja (Khanna *et al.*, 2001).

Korišćenje polimernih tanina u ishrani stimuliše fermentativnu aktivnost bez povećanja aktivnosti štetnih enzima (Ali *et al.*, 2010).

Da polifenoli iz sjemenki grožđa mogu inicirati manje unošenje hrane, pokazano je na primjeru životinja (Ali *et al.*, 2010). I pored svih prethodno navedenih pozitivnih efekata, naročito polifenola iz sjemenki grožđa, nađeno je da korišćenje velikih doza ekstrakta sjemenki može smanjiti nivo gvožđa u serumu (Wren *et al.*, 2002). Tanini inhibiraju digestiju proteina i brojne enzimske aktivnosti, što čak može dovesti do raznih fizioloških oboljenja u slučaju prevelike konzumacije.

2.4. Analitičke metode

Analiza fenolnih jedinjenja u sirovoj i prerađenoj hrani počinje sa ekstrakcijom. Procedura ekstrakcije zavisi od vrste hrane, fenolnih jedinjenja koja se žele ispitivati i analitičke procedure koja će se koristiti. Prvi korak je gnječenje, mljevenje, maceracija u cilju povećavanja specifične površine, što omogućava bolji kontakt između ekstrakcionog sredstva i uzorka. Pored toga, dobrom homogenizacijom se dobija reprezentativan uzorak. S obzirom da se mnoga fenolna jedinjenja javljaju kao glikozidi ili estri, priprema uzorka može uključiti alkalnu, kiselu ili enzimsku hidrolizu kako bi se oslobodila vezana fenolna jedinjenja. Međutim, ukoliko se žele analizirati derivati, u tom slučaju se izostavlja hidroliza (Hakkinen, 2000).

2.4.1. Ekstrakcija i tehnike hidrolize

Generalno, flavonoidi su stabilna jedinjenja i mogu se ekstrahovati iz samljevenog biljnog materijala u svježem ili suvom stanju. Pogodni rastvarači su vodene smjese koje sadrže etanol, metanol, aceton ili dimetilformamid. Za ekstrakciju fenolnih kiselina u biljnom materijalu koriste se još i etil-acetat i dietil etar (Hakkinen, 2000).

Ekstrakcija se može sprovoditi maceracijom svježeg uzorka u rastvaraču (Treutter *et al.*, 1988; Price *et al.*, 1999), korišćenjem odgovarajućeg alikvota homogenizovanog uzorka u svježem stanju (Amiot *et al.*, 1995; Heinonen *et al.*, 1998) ili liofiliziranog uzorka (Crozier *et al.*, 1997; Justesen *et al.*, 1998; Ewald *et al.*, 1999). Zbog nedostupnosti referentnih jedinjenja, kvantitativna analiza mnogih fenolnih jedinjenja se izvodi korišćenjem jedinjenja slične strukture.

Kisela ili bazna hidroliza se često primjenjuje kod određivanja fenolnih jedinjenja.

Ekstrakcija i hidroliza u smješi metanola sa vodom (vodenom metanolu) i HCl primjenjivana je u studijama flavonoidnih aglikona u voću i povrću (Justesen *et al.*, 1998; Ewald *et al.*, 1999). Ekstrakcija antocijanina se konvencionalno izvodi uz hlađenje, sa metanolom koji sadrži 1% HCl kako bi se dobio flavilijum jon, koji je stabilan i crvene je boje u jako kiselim uslovima. Zamjena HCl sa sirćetnom ili mravljom kiselinom omogućava izolovanje acilovanih antocijanina kao što su malonat-antocijanini (u cvijeću). Kod borovnica i grožđa se ekstrakcija antocijanina izvodi maceracijom u rastvoru metanola sa 2% ili 10% mravlje kiseline (Macheix *et al.*, 1990). Rommel *et al.* (1993a, b) su pored kisele (HCl) primjenjivali i alkalnu hidrolizu (NaOH) za proučavanje flavonola, flavan-3-ola, hidroksicimetnih i hidroksibenzoevih kiselina u soku crvene maline. Ovi autori su dobili veoma slične rezultate kod obje hidrolize, izuzev što je jedinjenje sa elaginskom kiselinom efikasnije hidrolizovalo u alkalnim u odnosu na kisele uslove. Studija Peleg *et al.* (1991) je pokazala da je efikasnost ekstrakcije ("recovery") hidroksicimetne kiseline iz voćnih sokova nakon alkalne hidrolize veoma niska (57–67%). Stepen kisele/bazne hidrolize glikozida zavisi od jačine kiseline/baze, prirode šećera i njegove pozicije u molekulu flavonoida. Tako su glukuronidi otporniji na kiselu hidrolizu od glukozida koji se brzo odvajaju (Robards & Antolovich, 1997).

Enzimaska hidroliza predstavlja brzu metodu za odvajanje specifičnih monosaharida od flavonoid *O*-glikozida. Kod analize fenolnih kiselina korišćene su β -glukozidaza (Kanes *et al.*, 1993) ili hidrocinaoil-hinat esteraze (Goupy *et al.*, 1990).

2.4.2. Hromatografske tehnike

Metode hromatografije na papiru za razdvajanje flavonoida razvijene su 50-ih i 60-ih godina XX vijeka, a 70-ih godina su zamijenjene sa tankoslojnom hromatografijom (TLC), kao jeftinijom i veoma korisnom tehnikom za simultanu analizu nekoliko uzoraka (Hakkinen, 2000).

Tankoslojna hromatografija se još uvijek često koristi za preparativne separacije i kao brza i jeftina "skrining" metoda za određivanje klasa flavonoida i fenolnih kiselina u plodovima (Hakkinen, 2000). U tom smislu prednost primjene TLC u odnosu na tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom (HPLC) ogleda se u detekciji kontaminata, koji se mogu adsorbirati na stacionarnoj fazi HPLC kolone, kao i određivanju uslova (rastvarača) neophodnih za uspješnu separaciju fenolnih jedinjenja (Fernández de Simón *et al.*, 1992).

Primjena gasne hromatografije (GC) je u analizi flavonoida ograničena zbog slabe isparljivosti. Ipak GC analiza sa masenom spektrometrijom (MS) je korišćena u analizi flavonola u crnom čaju (Finger *et al.*, 1991) i kupusu (Nielsen *et al.*, 1993). Prednosti GC analize uključuju poboljšanu separaciju bliskih izomera i jednostavnije povezivanje sa MS detektorima u odnosu na tečnu hromatografiju (Mouly *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1994).

HPLC je najviše korišćena hromatografska tehnika u analizi flavonoida tj. fenolnih jedinjenja tokom posljednjih 20 godina. Posebne prednosti u odnosu na druge hromatografske tehnike su poboljšana rezolucija i sposobnost dobijanja i kvalitativnih i kvantitativnih podataka, kao i velikoj brzini analize (Hakkinen, 2000).

Normalno-fazna HPLC je korišćena pri analizi flavonoida (flavoni, flavonoli i aglikoni flavanona) u soku od narandže (Galensa & Herrmann, 1980). Međutim, kod normalno-faznih sistema postoji mogućnost da se visoko polarni materijali mogu nepovratno zadržati u koloni, i da se separacione karakteristike mogu postepeno mijenjati (Hakkinen, 2000). Zbog toga se reversno-fazna hromatografija više primjenjuje u analizi

flavonoida tj. fenolnih jedinjenja u plodovima (Tabela 2-2). Koristi se C18-kolona (veličina čestica 3–5 μm) zajedno sa vodenim mobilnim fazama i metanolom ili acetonitrilom kao organskim modifikatorom. Male količine sirćetne kiseline, mravlje kiseline ili fosfatnog pufera se dodaju mobilnoj fazi u cilju poboljšanja separacije flavonoida i drugih fenolnih jedinjenja (omogućavaju povećanje rezolucije, ali i reproducibilnosti), jer suzbijaju jonizaciju fenolnih i karboksilnih grupa (Lamuela-Raventos & Waterhouse, 1994, Merken & Beecher, 2000).

Tabela 2-2 HPLC metode za analizu fenolnih jedinjenja u grožđu

Jedinjenja	Ekstrakcija	Kolona	Solventni sistem	Detekcija	Referenca
Antocijanini, flavonoli, stilbeni, hidroksicimetne kislone i flavan-3-oli	Metanol/voda 97:3 (v/v)	Licrochart RP- 18 (120 mm x 4 mm, 5 µm)	A: 5% vodeni rastvor mravlje kislone B:metanol 2% B na početku, 32% B u 30. min, 40% B u 40. min i 95% B u 50. min i izokratski za 5 min.	PDA 510; 360; 320 i 280 nm	Cantos <i>et al.</i> (2002)
Antocijanini	2% mravlje kislone u metanolu	C18 Kromasil 100 (250 mm x 4 mm, 4 µm)	A: acetonitril/mravlja kiselina/voda (45:10:45, v/v/v) B: 10% mravlja kiselina 25% A na početku, 35% A u 15. min, 50% A u 20. min, 55% A u 25. min, 65% A u 40. min i 65–25% A u 5 min	PDA 546 i 313 nm	Pomar <i>et al.</i> (2005)
Antocijanini, flavonoli,	96% etanol	Ultrasphere ODS (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	A: voda/mravlja kiselina (90:10, v/v) B: voda/ acetonitril/mravlja kiselina (60:30:10, v/v/v) 20% B na početku, 85% B u 70. min i 20% B u 75–80. min	PDA 520 i 360 nm	Pereira <i>et al.</i> (2006)

Jedinjenja	Ekstrakcija	Kolona	Solventni sistem	Detekcija	Referenca
Antocijanini, flavonoli, hidroksicimetne kiseline, stilbeni, hidroksibenzoeve kiseline, flavan-3-oli	80% metanol Metanol sa 0,1% HCl (v/v)	Spherisorb ODS2 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Za antocijanine A: voda/mravlja kiselina/acetoni- tril (87:10:3, v/v/v) B: voda/mravlja kiselina/acetoni- tril (40:10:50, v/v/v) 10–25% B u 10 min, 25–31% B u 5 min, 31– 40% B u 5 min, 40–50% B u 10 min, 50–100% B u 10 min, 100–10% u 5 min Za ostala fenolna jedinjenja A: 2% (v/v) vodeni rastvor sirćetne kiseline B: 0,5% vodeni rastvor sirćetne kiseline i acetoni- tril (50:50, v/v) 10–24% B u 20 min, 24–30% B u 20 min, 30– 55% B u 20 min, 55–70% B u 5 min, 70–80% u 5 min, 80–100% B u 5 min, 100% B izokratski za 5 min i 100–10% B u 2 min.	PDA 500; 350; 320 i 280 nm	Dopico- Garcia <i>et al.</i> (2008)
Hidroksibenzoeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, flavan-3-oli i flavanoli	Etanol/voda (1:9, v/v) sa 5 g/L vinske kiseline	Nova Pack C18 (300 mm x 3,9 mm, 4 µm)	A: voda/sirćetna kiselina (98:2, v/v) B: voda/acetoni- tril/sirćetna kiselina (78:20:2, v/v/v) 100–22% A 0–55. min, 20–10% A 55–77. min	PDA 280 nm	Obreque-Slier <i>et al.</i> (2010)

U analizi fenolnih jedinjenja mogu se primijeniti i drugi moderni separacioni sistemi, ali u ograničenom stepenu. Tako je kapilarna zonska elektroforeza bila primijenjena kod analize antocijanina u bobičastom voću (Bridle & Garcia –Viguera, 1997; Costa *et al.*, 1998) i polifenola u vinu (Prasongsidh & Skurray, 1998).

2.4.3. Detekcija i identifikacija fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja apsorbuju u UV oblasti (Tabela 2-3). Ne postoji pojedinačna talasna dužina idealna za praćenje svih klasa fenolnih jedinjenja.

Tabela 2-3 Spektralne osobine različitih fenolnih jedinjenja (λ_{max}) (Macheix *et al.*, 1990)

	Klasa jedinjenja	UV B	UV A	Vidljiva
1 ^a	Benzoeve kiseline	270–280		
	Hidroksicimetne kiseline	(290–300) ^b	305–330	
	Antocijanini	270–280	(315–325) ^c	500–550
	Flavonoli	250–270	(300) ^b 350–380	
	Flavan-3-oli	270–280		
2 ^a	Kumarini	220–230	310–350	
	Flavoni	250–270	330–350	
	Flavanoni, Flavanonoli	270–295	(300–330) ^b	
	Halkoni	220–270	(300–320) ^b 340–390	
	Auroni	240–270		370–430
	Izoflavoni	245–270	300–340	

Rastvarač je metanol, izuzev za antocijanine gdje je to kombinacija metanola i 0,01% HCl.

^a 1: Klase jedinjenja koje se često nalaze u plodovima; 2: Klase jedinjenja manje zastupljenih u plodovima, izuzev u posebnim slučajevima.

^b "shoulder"

^c U slučaju acilacije sa hidroksicimetnim kiselinama.

Hidroksicimetne kiseline apsorbuju u UV A i UV B oblasti, a na 320 nm, derivati cimetne kiseline mogu biti detektovani bez bilo kakve interferencije od strane derivata benzoeve kiseline. Međutim, detekcija na 280 nm je najbolja alternativa za određivanje obje klase pomenutih fenolnih jedinjenja (Pussayanawin & Wetzel, 1987). Apsorpcioni rang između 350 i 370 nm se koristi za flavonole, a 280 nm za flavan-3-ole i flavonol glikozide (Robards & Antolovich, 1997). Antocijanini apsorbuju u vidljivoj oblasti, i obično se detektuju na 520–530 nm.

Široka upotreba PDA detekcije u analizi fenolnih jedinjenja može se pripisati sposobnosti sakupljanja on-line spektara, što vodi do značajnog poboljšanja u HPLC analizi u pogledu identifikacije na osnovu apsorpcionog spektra.

Nedostatak UV detekcije je to što nije osjetljiva ili selektivna kao fluorescentna detekcija, i javlja se više interferirajućih pikova. Međutim, fluorescentna detekcija nije široko primijenjiva kod fenolnih jedinjenja (Hakkinen, 2000). Za analizu fenolnih jedinjenja u narandžinom soku primijenjena su oba vida detekcije, pri čemu je potvrđena glavna prednost fluorescentne nad UV detekcijom – veća selektivnost i osjetljivost (Rouseff *et al.*, 1992). Fluorescentna detekcija je takođe primjenjivana u analizi fenolnih kiselina u japanskoj jabuci (Gorinstein, 1994), elaginske kiseline u bobičastom i orašastom voću (Hollman & Venema, 1993), i flavonola u plazmi (Hollman *et al.*, 1996). Glavni polifenoli u vinovoj lozi i vinu – flavan-3-oli nemaju specifičnu apsorpciju i imaju maksimum oko 280 nm, ali njihova osobina da fluoresciraju predstavlja glavni razlog zbog čega se preporučuje fluorescentna detekcija (Vinas *et al.*, 2000).

Elektrohemijska detekcija (EC) je veoma osjetljiva za jedinjenja koja se mogu oksidovati ili redukovati na potencijalu niske voltaže. Ovaj način detekcije se primjenjuje u određivanju veoma malih količina fenola, zbog povećane osjetljivosti i selektivnosti u odnosu na UV detekciju (van Sumere, 1989; Akasbi *et al.*, 1993). EC je korišćena kod detekcije flavonola i fenolnih kiselina u povrću (Chiavari *et al.*, 1988) i napicima (Lunte, 1987).

HPLC-MS je brz i pozdan metod za stukturne analize neisparljivih fenolnih jedinjenja. Pietta *et al.* (1994) su pokazali da je HPLC-MS sa termosprej jonizacijom odlična tehnika za analizu flavonol glikozida u ljekovitom bilju. Flavan-3-oli (Lin *et al.*,

1993) i različite grupe polifenola, uključujući flavonol glikozide (Kiehne *et al.*, 1996) u čaju, proučavani su korišćenjem LC-MS sa termosprej jonizacijom.

MS sa bombardovanjem brzim atomima i MS/MS (tandem MS) se koriste u proučavanju glikozidnih veza u diglikozil flavonoidima (Li & Claeys, 1994). Elektrosprej (ESI) i nekoliko varijacija ove jonizacione tehnike su relativno skorija dostignuća u jonizaciji pod atmosferskim pritiskom (Robards & Antolovich, 1997). HPLC-ESI-MS nudi prednosti u vezi osjetljivosti i kapaciteta za analizu velikih, termički labilnih i visoko polarnih jedinjenja (Robards & Antolovich, 1997; Careri *et al.*, 1998). HPLC-ESI-MS je korišćena u analizi flavonoida u čaju (Poon, 1998), paradajzu i plazmi (Mauri *et al.*, 1999). Jonizacija pod atmosferskim pritiskom (API)-MS je tehnika korišćena za analizu flavonoida u voću i povrću (Justesen *et al.*, 1998).

2.5. Uloga i značaj hranljivih elemenata

Elementi neophodni za pravilan rast i razvoj vinove loze su: azot, fosfor, kalijum, kalcijum, magnezijum, gvožđe, mangan, cink, bakar, bor i molibden. Pomenuti hranljivi elementi značajno utiču na proces fotosinteze direktno ili preko katalitičkih reakcija. Njihov uticaj je veoma složen, jer je uslovljen specifičnostima sorte, koncentracijama i međusobnim odnosima koncentracija, zatim fazama u razviću loze i ekološkim činiocima. Zbog toga rezultati istraživanja mogu biti protivurječni. U narednom tekstu dat je kratak osvrt na ulogu i značaj ovih elemenata.

Azot ulazi u sastav mnogih organskih jedinjenja: hlorofila, proteina, aminokiselina, enzima, koenzima, nukleinskih kiselina. Preko korijena vinova loza usvaja NO_3^- i NH_4^+ oblik azota, dok preko lista može usvajati i neka organska jedinjenja azota. Generalno, nitratni oblik N je dostupan za neposredno usvajanje, dok se amonijačni usvaja sporije i prevodi se nitrifikacijom u NO_3^- . Najveće potrebe za azotom vinova loza ispoljava na početku vegetacionog perioda i tokom intenzivnog rastenja lastara. U vrijeme usporenog rastenja do početka sazrijevanja grožđa opadaju potrebe za azotom, a tokom sazrijevanja ponovo rastu. Đubrenje azotom obično se sprovodi na početku vegetacionog perioda

(kretanje pupoljaka), poslije cvjetanja i poslije berbe. Istraživanja su pokazala da 60% rezervi N u čokotu na početku vegetacionog perioda potiče od đubrenja nakon berbe (Conradie, 1992). Najviše ga ima u listu, a potom u sjemenkama.

Fosfor je sastavni dio estara fosforne kiseline, fosfolipida i nukleinskih kiselina. Učestvuje u sintezi proteina, nukleotida i veoma značajnih koenzima tipa ADP, ATP, NAD, NADP itd. Biljka usvaja H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} , mada je monovalentni jon primarni oblik P, koji biljka usvaja (Salisbury & Ross, 1992). Conradie (1981) je proučavao usvajanje P i drugih nutrijenata tokom vegetacionog perioda u cilju određivanja najboljeg vremena za primjenu đubriva. Njegov eksperiment je pokazao da sorta 'Chenin Blanc' na podlozi 99R aktivno usvaja fosfor 22 dana nakon kretanja pupoljaka (znatne količine fosfora dopijevaju iz korijena), i u periodu šarka (manje količine potiču od rezervi P iz korijena). Velike količine P koje se nalaze u sjemenkama i floemu, predstavljaju mobilizacione centre za obezbjeđivanje potrebne energije. U vegetacionom periodu sadržaj fosfora se postepeno smanjuje.

Kalijum nije konstitutivni element, ali se bez K ne mogu sintetisati ni ugljeni hidrati, ni proteini, ali ni obaviti brojne druge sinteze. Kalijum omogućava veliki broj enzimskih reakcija, među kojima je najvažnija fosforilacija – sinteza ATP-a i obezbjeđivanje energije za procese sinteze proteina, vitamina itd. iz primarnih proizvoda fotosinteze–šećera. Usvaja se u obliku K^+ . Najveće potrebe za kalijumom vinova loza ispoljava 20–35 dana nakon cvjetanja i za vrijeme sazrijevanja grožđa. Proučavanje usvajanja K od strane sorte 'Chenin Blanc' na podlozi 99R je pokazalo da u periodu od kraja cvjetanja do šarka loza akumulira skoro polovinu svojih godišnjih potreba (Conradie, 1981). Kalijum podstiče prelazak organskih supstanci iz lista u plodove, time što povećava propustljivost ćelijskih zidova – prvenstveno u peteljkama lista i grebenu grozda.

Magnezijum ima najveći značaj u sintezi hlorofila. U hlorofil je ugrađeno 15–20% ukupnog Mg, a ostalo je u obliku soli i slobodnih ili vezanih jona u ćelijskim zidovima i enzimima značajnim za procese fosforilacije, fotosinteze, disanja, metabolizma azotnih jedinjenja, usvajanja i transporta P i u sintezi ugljenih hidrata, proteina i masnih kiselina. Za usvajanje magnezijuma povoljniji su uslovi vlažne klime. Biljka ga usvaja kao Mg^{2+} .

Apsorpcija magnezijuma intenzivno raste od perioda oko cvjetanja do šarka (Conradie, 1981).

Kalcijum utiče na diobu ćelija i rast, posebno korijena. Ima naročito značajnu ulogu u izgradnji ćelijske strukture i regulisanja propustljivosti ćelijskih membrana. Mnoge organske kiseline se vezivanjem za kalcijum prevode u fiziološki aktivna stanja. Uloga Ca u aktiviranju enzima je neznatna. Vinova loza ga usvaja u jonskom obliku Ca^{2+} . Skoro polovinu od ukupnih godišnjih potreba loza usvaja u periodu između cvjetanja i šarka (Conradie, 1981). Proučavanje akumulacije i redistribucije Ca tokom razvoja bobice grožđa više sorti (Cabanne & Doneche, 2003) pokazalo je da sadržaj Ca raste u bobici od cvjetanja do šarka. Nakon šarka, Ca prethodno "ugrađen" u meso i pokožicu bobice koristi se za razvoj sjemenke i pokožice.

Sumpor ima važnu ulogu u sintezi izvjesnih aminokiselina, proteina i vitamina, i pri dobroj obezbijedenosti kalijumom doprinosi povišenju sadržaja šećera u grožđu. Vinova loza usvaja sumpor najviše preko korijena u obliku SO_4^{2-} , a preko lista iz vazduha (u obliku SO_2) i sredstava za zaštitu.

Gvožđe je od posebnog značaja za sintezu hlorofila; aktiviranje enzima – katalaze, peroksidaze, citohroma kao i za regulisanje neophodnih sadržaja azota i ugljenih hidrata u tkivima vinove loze. Vinova loza ga usvaja iz zemljišnog rastvora u obliku Fe^{2+} , Fe^{3+} ili kao helatni kompleks. Usvajanje gvožđa je često otežano u uslovima visoke vrijednosti pH kao i uticaja konkurentnih makro i mikroelemenata, zbog čega se može pojaviti hloroza.

Bor ima veliki uticaj na rasteenje, cvjetanje, oplodnju i visinu prinosa grožđa. Usvaja se u obliku borne kiseline. U nedostatku bora usporen je transport proizvoda fotosinteze, što dovodi do njihovog nagomilavanja u listu i usporavanja novih sinteza.

Cink je uključen u sintezu i aktiviranje enzima koji učestvuju u sintezi nukleinskih kiselina i proteina, kao i mnogih hormona rasta. Nedostatak cinka u ishrani vinove loze je najčešće uslovljen uticajem povišenog sadržaja fosfora. Biljka ga usvaja kao Zn^{2+} . U vinogradima se više preporučuje primjena cinka folijarno (efektivnije je usvajanje helatiranog Zn), u odnosu na fertirigaciju ili preko zemljišta. Christensen (1980) smatra da je najbolje primijeniti Zn dvije sedmice prije punog cvjetanja, kako bi se obezbijedile dovoljne količine tokom cvjetanja.

Mangan aktivira brojne enzime u procesima fosforilacije i potpomaže nakupljanje ugljenih hidrata i proteina. Zajedno sa gvožđem je važan za sintezu hlorofila. Usvaja se kao Mn^{2+} . Ako je jonski odnos Fe i Mn u korist mangana, u tkivima se smanjuje udio Fe, bilo da mangan zamjenjuje Fe, ili pospješuje oksidaciju fiziološki aktivnijeg oblika Fe^{2+} , što dovodi do poremećaja enzimske aktivnosti i pojave simptoma hloroze.

Bakar doprinosi stabilnosti strukture hloroplasta, usporava starenje listova, učestvuje u procesima fotosinteze i u prometu materija preko učešća u građi enzima – posebno Cu-oksidade. Usvaja se i kao Cu^{+} (u zabarenim zemljištima u anaerobnim uslovima) i kao Cu^{2+} . Najviše ga ima u korijenu vinove loze i u hloroplastima. Uključen je u procese lignifikacije.

Molibden učestvuje u građi mnogih enzima od kojih je najznačajniji nitrat-reduktaza koja ima značajnu ulogu u metabolizmu azota. Srijeće se u malim količinama i pretežno u korijenu. Vinova loza ga usvaja u obliku MoO_4^{2-} (Milosavljević, 1998).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

3.1. Preliminarna istraživanja i plan rada

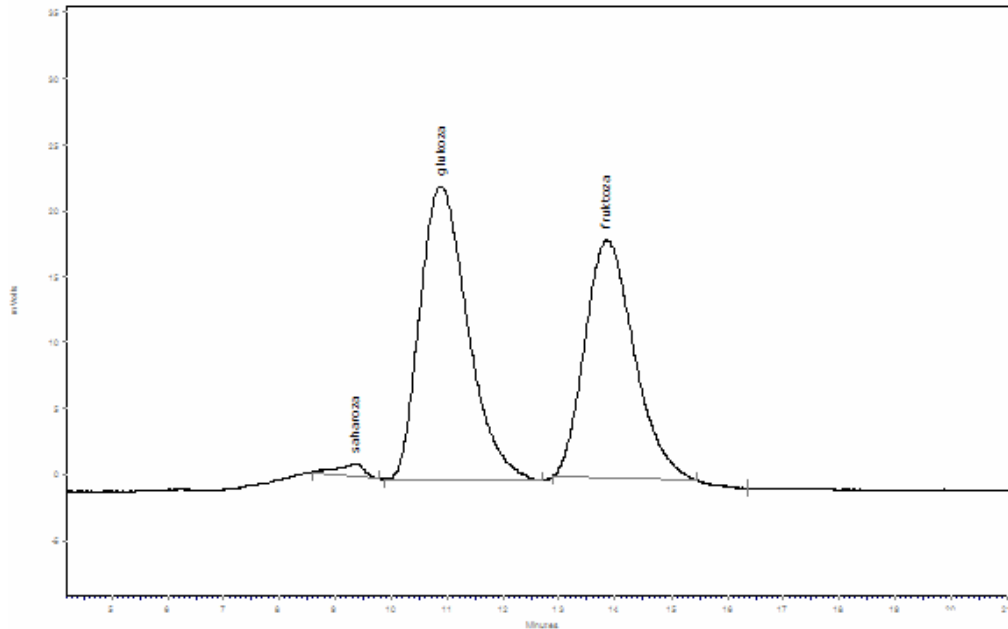
Postavljanju ogleda sa folijarnim prihranjivanjem vinove loze sorte 'Kardinal' prethodila su preliminarna istraživanja sa manjim brojem uzoraka uzetih sa vinove loze na podlozi Paulsen 1103. Rezultati dobijeni tom prilikom bili su smjernica za dalji rad. Tokom jula 2007. godine u četiri navrata su uzeti uzorci grožđa i analizirani na sadržaj šećera, organskih kiselina i nekih fenolnih jedinjenja po metodologiji prikazanoj u poglavlju Eksperimentalni dio. Identifikacija fenolnih jedinjenja je obavljena upoređivanjem retencionih vremena i spektara standardne (čiste) supstance, jer nije postojala mogućnost snimanja MS spektara. Klimatski uslovi tokom perioda sazrijevanja grožđa za 2007. godinu bili su znatno drugačiji u odnosu na naredne dvije godine, što se odrazilo na primarni i sekundarni metabolizam. Naime, šarak je primijećen oko 9–10 dana ranije (16. juna). U narednom tekstu data su samo osnovna zapažanja.

Kao što nalaže uobičajena vinogradarska praksa, praćena je promjena sadržaja šećera i organskih kiselina. Sadržaj šećera je rastao od 13,1 °Brix do 19,4 °Brix, dok je sadržaj ukupnih kiselina opadao od 6,8 do 2,0 g TAE/l tokom posmatranog perioda. Krajem jula odnos između °Brix i ukupnih kiselina dostigao je maksimalnu vrijednost čak 91,9 (Topalović & Mikulič-Petkovšek, 2010).

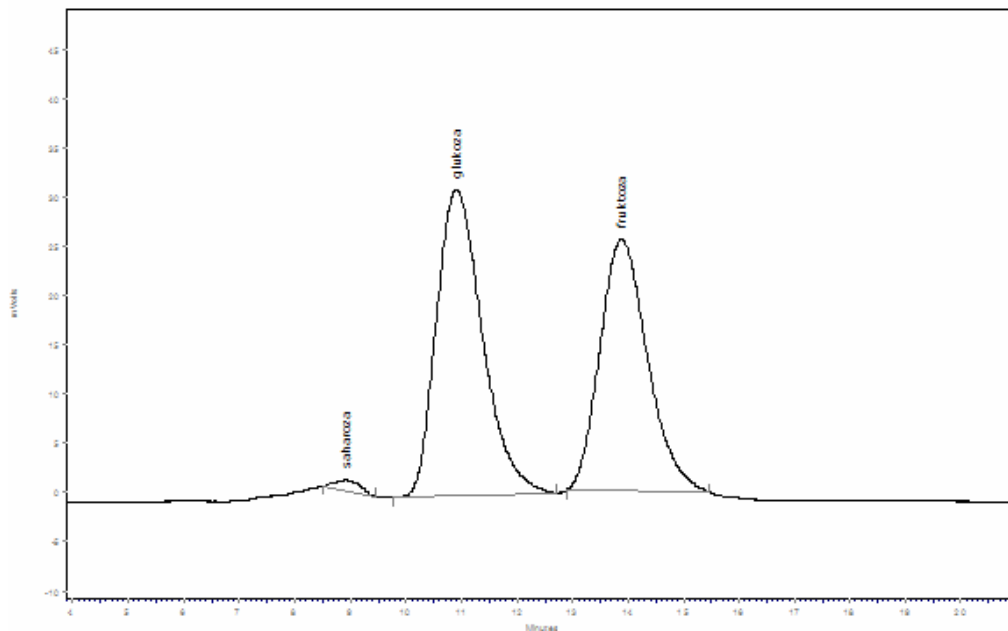
Glukoza i fruktoza su ispitivane zbog potencijalne veze sa metaboličkim promjenama u grožđu. Inače, ovi šećeri čine oko 99% ukupnih ugljenih hidrata u grožđu (Winkler *et al.*, 1974), a njihov odnos se mijenja sa sazrijevanjem.

Zanimljivo je primijetiti da je tokom jula 2007. sadržaj glukoze bio konstantno viši u odnosu na fruktozu i da je odnos glukoze i fruktoze bio između 1,35 i 1,39 (Topalović &

Mikulič-Petkovšek, 2010). Na Slikama 3-1 i 3-2 su dati hromatogrami za uzorke uzete na početku i na kraju posmatranog perioda.

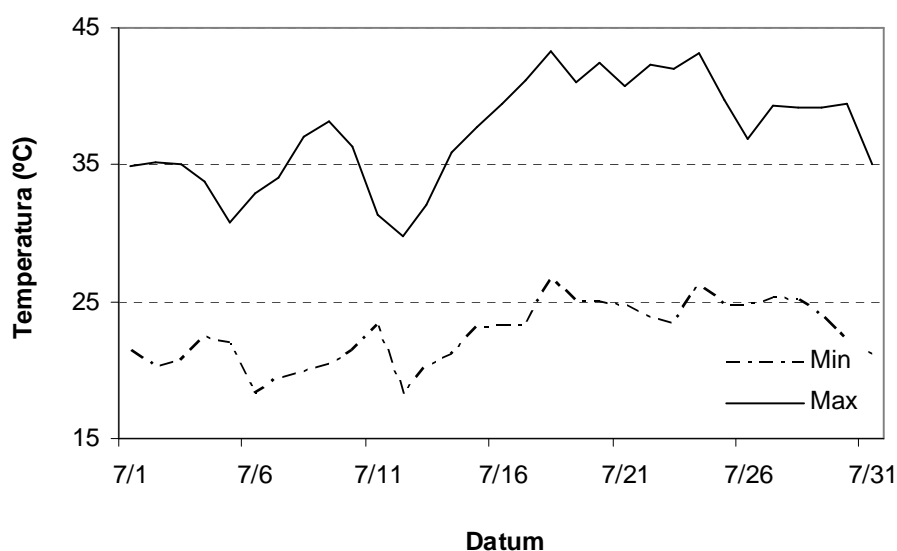


Slika 3-1 Hromatogram za uzorak grožđa od 9. jula 2007. g. (preliminarna istraživanja)



Slika 3-2 Hromatogram za uzorak grožđa od 31. jula 2007. g. (preliminarna istraživanja)

Literaturni podaci za razne sorte grožđa govore da je odnos glukoze i fruktoze u fazi šarka oko 1,5 (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006), da bi kasnije opadao i u stanju zrelosti dostigao vrijednost oko 1 ili ispod 1 – kada je fruktoza u višku (Kliewer, 1966; Jackson, 2000; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Međutim, postoje sorte stonog grožđa kao na primjer 'Razaki' sa glukoza/fruktoza odnosom 1,95 na početku rasta, a 1,55 na kraju sazrijevanja (čak i kad je prezrelo) (Soulis & Avgerinos, 1984). Pitanje je zbog čega je u grožđu 'Kardinala' odnos glukoze i fruktoze ostao relativno visok i pored toga što sadržaj šećera i ukupnih kiselina ukazuju na stanje zrelosti. Uzimajući u obzir da su tokom 2007. godine temperature bile izuzetno visoke (Slika 3-3), čak u periodu od 17. do 24. jula preko 40 °C, može se pretpostaviti da je došlo do toplotnog stresa, a samim tim do značajnih promjena u metabolizmu. Srednja minimalna vrijednost temperature u periodu praćenja promjena metabolita (9–30. jul) iznosila je 23,4 °C, dok je srednja maksimalna iznosila 38,7 °C.



Slika 3-3 Minimalne i maksimalne dnevne temperature tokom jula 2007.

Ispitivanje uticaja toplotnog stresa na neke parametre u grožđu 'Napa Gamay', koje je pokazalo da odnos glukoza/fruktoza nije opadao (Matsui *et al.*, 1986), navelo je na

pretpostavku da je upravo toplotni stres bio glavni uzrok relativno visoke vrijednosti pomenutog odnosa u grožđu 'Kardinala' tokom jula 2007. godine. Postoji mogućnost da je nakon posmatranog perioda došlo do smanjenja odnosa između glukoze i fruktoze.

Iako su sadržaj šećera i kiselost glavni kriterijumi za procjenjivanje zrelosti, u crvenom grožđu posebno, postoji i treći kriterijum, a to je fenolna zrelost. Osim u pokožici, određena je koncentracija nekih fenolnih jedinjenja i u pulpi.

Generalno, primijećen je trend rasta fenolnih jedinjenja u pokožici sa sazrijevanjem, a na kraju nije bilo statistički značajne razlike. U poređenju sa pokožicom, pulpa je, kao što se moglo pretpostaviti, bila veoma siromašna fenolnim jedinjenjima, i sadržala je 1,3–3% vrijednosti ukupnih fenola u pokožici. Pored toga, nije ustanovljen trend u promjenama koncentracije fenolnih jedinjenja u pulpi. S obzirom na poteškoće vezane za pripremu uzorka pulpe (zbog gubitka vode prilikom odvajanja od pokožice i sjemenki), ali i na jako niske koncentracije fenolnih jedinjenja, iz dalje analize je isključena pulpa.

Odlučeno je da se ogled postavi na čokotima 'Kardinala' na podlozi SO4 (Selection Oppenheim 4), zbog prilično ravnomjernijeg obojavanja bobica u odnosu na Paulsen 1103. Istraživanja na drugim sortama grožđa su pokazala da vrijeme berbe može zavistiti od podloge, i da podloga može uticati na fenolni sastav, jer je genotip podloge u vezi sa statusom izmjene vazduha i vode, bujnošću i prinosom (Candolfi-Vasconcelos *et al.*, 1994; Koundouras *et al.*, 2008; Ezzahouani *et al.*, 2005; Koundouras *et al.*, 2009).

Iako je fenolni sastav genetski određen, sadržaj fenolnih jedinjenja umnogome zavisi od primijenjenih agrotehničkih mjera, ali i uslova životne sredine. Od posebnog značaja su istraživanja vezana za mogućnost uticaja na akumulaciju fenolnih jedinjenja. Planirano je praćenje promjena sadržaja pomenutih jedinjenja tokom sazrijevanja (zadnjih oko 30 dana), kao i poređenje sastava grožđa uzetog sa čokota netretiranih i tretiranih sa folijarnim đubrivom koje sadrži kalijum i fosfor. Izabrano je prihranjivanje sa kalijumom i fosforom zato što:

- kalijum igra značajnu ulogu u brojnim fiziološkim funkcijama uključujući fotosintezu, zatim u enzimskoj aktivaciji, osmoregulaciji, protoku nutrijenata i distribuciji primarnih metabolita, a

- fosfor ima važnu ulogu u transferu energije (Pirie & Mullins, 1977; Štampar *et al.*, 1999; Wiesler, 2012).

Imajući u vidu značaj pomenutih elemenata za fotosintezu, očekivan je pozitivan efekat na akumulaciju primarnih, a indirektno i sekundarnih metabolita.

Zbog boljeg definisanja agroekoloških uslova, odlučeno je da se uradi analiza zemljišta, i da se obezbijede podaci o srednjoj dnevnoj temperaturi, padavinama i broju sunčanih sati (Hidrometeorološki zavod Crne Gore). Pored toga, planirana je i analiza lista zbog procjene statusa hranljivih elemenata u vinovoj lozi, praćenja efekta folijarnog prihranjivanja na njihov sadržaj, ali i proučavanja veza između sadržaja hranljivih elemenata, šećera, kiselina i fenolnih jedinjenja.

3.2. Fizičke i hemijske karakteristike zemljišta

Istraživanje je sprovedeno na lokalitetu Tuzi, gdje je zastupljeno smeđe eutrično zemljište, koje pripada grupi skeletnih zemljišta sa vrlo skromnim adsorptivnim kapacitetom. To znači da je sposobnost vezivanja i zadržavanja vode i biljnih asimilativa vrlo ograničena u odnosu na zemljišta normalnog mehaničkog sastava. U sloju do 60 cm prosječni udio skeletnog materijala iznosi oko 75%, a sitnog zemljišta samo 25%. U skeletnom materijalu najviše su zastupljene čestice sa prečnikom 0,5–2 cm i 2–3 cm (Fušić & Đuretić, 2000).

U granulometrijskom sastavu sitnog zemljišta (< 2 mm) površinskog sloja (0–30 cm) relativno je ujednačen udio frakcija sitnog pijeska i gline, a u donjem sloju (30–60 cm) dominantna je frakcija krupnog pijeska.

Generalno, analiza zemljišta je manje pouzdana u procjeni snabdjevenosti vinove loze hranljivim elementima u odnosu na analizu lista, prije svega zbog razlika u usvajanju i zahtjevima različitih varijeteta i podloga. Međutim, u cilju definisanja agroekoloških uslova tj. procjene plodnosti zemljišta pod oglednim čokotima, važno je poznavati hemijske osobine zemljišta. U Tabeli 3-1 date su vrijednosti pojedinih parametara za slojeve 0–30 cm i 30–60 cm.

Zemljište pod oglednim čokotima je alkalne reakcije, sa velikom količinom ukupnih karbonata (% CaCO₃), koja je znatno veća u donjem sloju. Nasuprot ukupnim karbonatima, koncentracija aktivnih karbonata (IDG), parametra važnog za procjenu hlorozirajuće sposobnosti zemljišta, nije visoka. Sadržaj humusa u gornjem sloju je na donjoj granici optimalne vrijednosti, dok je donji sloj slabo humozan.

Prema koncentraciji pristupačnog fosfora zemljište oba sloja je siromašno obezbijedeno. Međutim, prethodna praksa vezana za praćenje sadržaja P u listu vinove loze i u zemljištu je pokazala da primijenjena metoda, odnosno predložene granične vrijednosti ne odgovaraju snabdjevenosti vinove loze ovim elementom. Ipak, mogućnost da sadržaj P u pojedinim organima vinove loze gajene na krečnjačkim zemljištima bude nizak (Bavaresco & Poni, 2003), bila je još jedan od razloga zbog kojeg je odlučeno da se sprovede prihrana preko lista sa đubrivom koje u svom sastavu sadrži i fosfor.

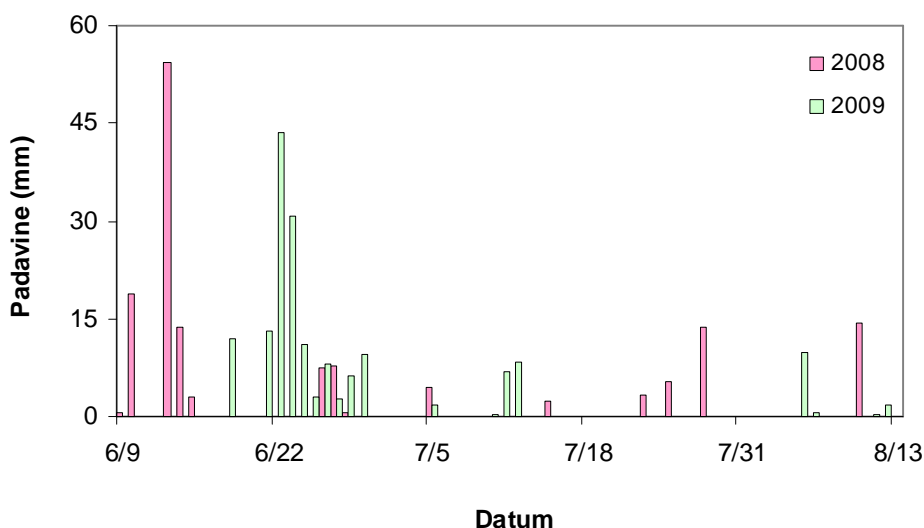
Tabela 3-1 Hemijski parametri zemljišta pod oglednim čokotima

Godina	Dubina (cm)	pH	CaCO ₃	IDG	Humus	P ₂ O ₅	K ₂ O	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
			%			mg/100 g			mg/kg			
2008	0-30	7,84	23,1	2,7	2,7	2,1	21,6	18,93	5,60	15,88	6,47	1,34
	30-60	8,05	63,0	4,0	1,2	2,0	5,9	14,80	3,54	7,38	2,41	0,24
2009	0-30	7,93	21,0	1,5	3,2	2,3	23,3	20,71	5,40	18,08	5,70	1,11
	30-60	8,10	80,6	7,0	1,2	2,0	4,7	13,74	2,49	6,04	1,17	0,17

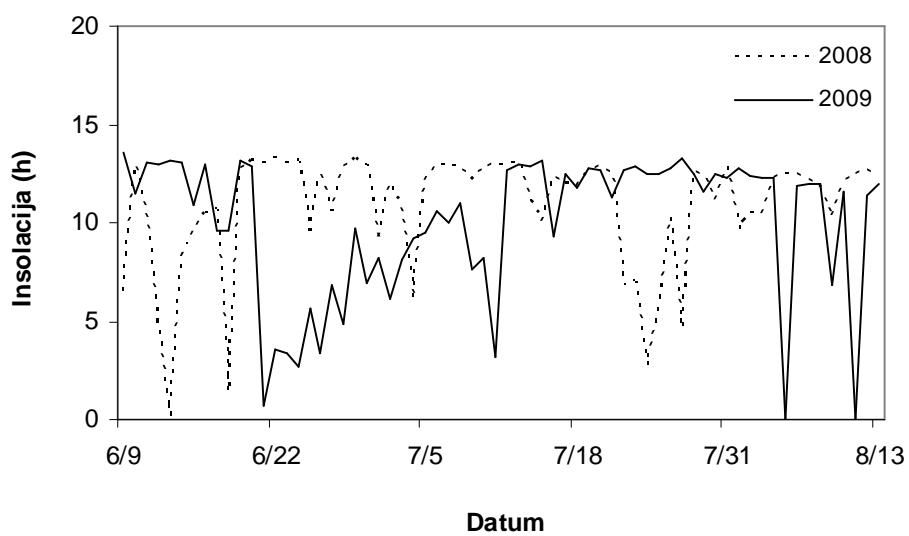
Generalno gledano, zemljište gornjeg sloja ima ili visok ili optimalan nivo pristupačne frakcije K, Mg, Mn, Cu i Zn, dok donji sloj ima nizak nivo pomenutih elemenata izuzev Cu. Naime, sadržaj pristupačnog Cu je relativno visok zbog primjene preparata na bazi Cu u zaštiti vinove loze, što je uobičajeno za vinogradarska zemljišta. Međutim, zemljište oba sloja je siromašno snabdjeveno gvožđem (Large & Ankerman, 1995).

3.3. Klimatske karakteristike tokom trajanja ogleda

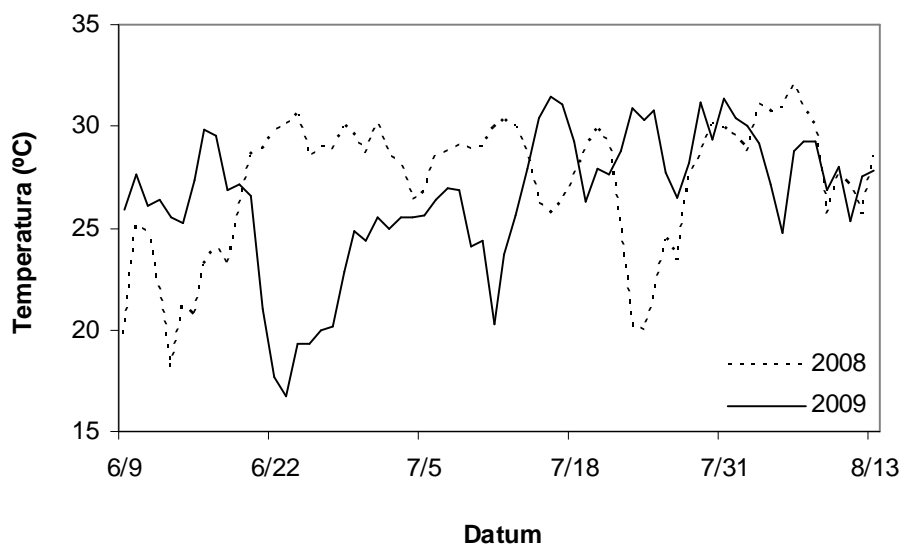
Pristupačnost vode, svjetlost i temperatura imaju glavnu ulogu u dinamici sazrijevanja grožđa. Od početka aprila do kraja avgusta (na hidrometeorološkoj stanici najbližoj vinogradu gdje je postavljen ogled) suma padavina iznosila je 325,3 mm za 2008. i 330,5 mm za 2009, kada je suma sunčanih sati iznosila 1406,7 h odnosno 1393,7 h, a prosječna temperatura 23,5 °C i 23,8 °C, respektivno. Dnevne vrijednosti padavina, insolacije i prosječne dnevne temperature tokom trajanja ogleda su prikazane na Slikama 3-4, 3-5 i 3-6.



Slika 3-4 Dnevne vrijednosti padavina tokom trajanja ogleda



Slika 3-5 Dnevne vrijednosti insolacije tokom trajanja oglada



Slika 3-6 Srednje dnevne temperature tokom trajanja oglada

3.4. Promjena sadržaja hranljivih elemenata u listu vinove loze

Hranljivi elementi mogu na različite načine, direktno i indirektno, uticati na fotosintezu. Magnezijum i kalijum su direktno uključeni u fotosintezu. Pored toga, nutrijenti su neophodni za biosintezu fotosintetskog aparata, ili kao kofaktori enzima uključenih u biosintetske puteve (npr. Fe za sintezu hlorofila), ili kao integralne komponente fotosintetskog aparata. Nedostatak nutrijenata koji su uključeni u sintezu proteina ili pigmenata hloroplasta ili elektronskog transfera imaju za rezultat formiranje hloroplasta sa nižom fotosintetskom efikasnošću i promjenu u finoj strukturi hloroplasta (Engels *et al.*, 2012).

U novije vrijeme sve češće se radi analiza lista, umjesto analize zemljišta, zbog pouzdanije procjene snabdjevenosti gajene kulture nutrijentima. Analiza lista vinove loze koristi se često kao dijagnostičko sredstvo kod izrade programa đubrenja.

Poznato je da sadržaj hranljivih elemenata u listu vinove loze zavisi od varijeteta i ekohemijskih karakteristika zemljišta. U Tabeli 3-2 su prikazani rezultati analize lista vinove loze sorte 'Kardinal' za dva termina – neposredno prije početka primjene folijarnog đubriva i sedam dana nakon završetka. Pošto nije evidentiran uticaj folijarne primjene PK đubriva na sadržaj P i K u listu vinove loze, date su prosječne vrijednosti po terminima.

Tabela 3-2 Sadržaj hranljivih elemenata u listi vinove loze (prosječna vrijednost ± standardna greška)

Datum	9. jun 2008.	9. jun 2009	16. jul 2008.	16. jul 2009.
N (%)	2,99 ± 0,04	2,66 ± 0,03	2,52 ± 0,05*	2,37 ± 0,06*
S (%)	0,52 ± 0,05	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,29 ± 0,00
K (%)	1,20 ± 0,03	0,77 ± 0,01	0,73 ± 0,03	0,61 ± 0,02
P (%)	0,23 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,18 ± 0,00*	0,18 ± 0,00*
Mg (%)	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,31 ± 0,01
Ca (%)	3,19 ± 0,11*	3,13 ± 0,08*	4,70 ± 0,09	4,05 ± 0,09
Fe (mg/kg)	94,46 ± 1,30	72,36 ± 1,91	99,95 ± 3,67	80,11 ± 2,19
Mn (mg/kg)	67,50 ± 1,16	84,70 ± 3,25	85,90 ± 1,40	101,38 ± 2,97
Zn (mg/kg)	11,76 ± 0,23	15,46 ± 0,87	13,87 ± 0,39*	16,30 ± 1,21*
Cu (mg/kg)	8,08 ± 0,37*	8,19 ± 0,29*	4,64 ± 0,22	43,53 ± 6,38
B (mg/kg)	49,29 ± 0,75*	49,13 ± 2,10*	36,23 ± 0,57	39,80 ± 0,74

* označava da ne postoje značajne razlike između prosječnih vrijednosti za $p > 0,05$.

Slično dobijenim rezultatima, Knoll *et al.* (2006) su ustanovili da nema značajnih promjena u sadržaju K u listu vinove loze, nakon folijarnog prihranjivanja. Naime, vinova loza brzo apsorbuje hranljive elemente, tako da povišenje njihove koncentracije često nije detektovano preko folijarne analize, zbog brzog kretanja u druge organe (Fregoni & Vercesi, 1995). Pored toga, Delgado *et al.* (2004) su utvrdili da se đubrenjem preko zemljišta u količini od 60 g K₂O po čokotu ne povećava značajno koncentracija u listu u poređenju sa kontrolom (neđubrenom varijantom).

Rezultati prikazani u Tabeli 3-2 pokazuju optimalnu snabdjevenost vinove loze hranljivim elementima prema kriterijumima ustanovljenim od strane Fregonija (1998).

Sadržaj hranljivih elemenata u listu nije konstantan, već se mijenja tokom vegetacionog perioda. Tokom posmatranog perioda za obje godine, sadržaj N, S, K, P i B opada, dok sadržaj Mg, Ca, Mn raste. Za 2008. godinu nije nađena statistički značajna razlika u sadržaju Fe, a za 2009. u sadržaju Zn. Ovakav trend za hranljive elemente je nađen i kod drugih sorti vinove loze (Perović, 2003; Peuke, 2009; Navarro, 2008). U slučaju Cu, za 2008. godinu je evidentiran pad koncentracije, a 2009. porast, zbog toga što je za zaštitu korišćen preparat na bazi bakra.

Opadanje koncentracije makroelemenata u listu je posljedica njihove translokacije u plod. Pored toga, povišenje sadržaja gradivnih i negradivnih jedinjenja, tokom razvoja lista, takođe doprinosi efektu "razblaženja" i smanjenja koncentracije makroelemenata. Uprkos tome, koncentracije pojedinih elemenata (kao Ca) rastu zbog niske mobilnosti u floemu (Navarro, 2008).

Rezultati ANOVA pokazuju znatne razlike između sezona za gotovo sve hranljive elemente. Tako je sadržaj N, S, K, P i Fe niži, a Mg, Mn i Zn viši u listu prvog termina 2009. godine u odnosu na 2008, dok je u drugom terminu 2009. evidentiran niži sadržaj S, K, Ca i Fe, a viši Mg, Mn, Cu i B. U prvom terminu tj. prije primjene folijarnog đubriva, nije nađena statistički značajna razlika za Ca, Cu i B u listu vinove loze za obje godine, dok je u drugom terminu odnosno nakon završetka primjene folijarnog đubriva prosječan sadržaj P bio na istom nivou, a sadržaj N i Zn, iako relativno različit, ipak nije na nivou statističke značajnosti ($p = 0,070$ za N i $p = 0,077$ za Zn).

3.5. Parametri kvaliteta grožđa

3.5.1. Promjena osnovnih parametra kvaliteta grožđa

Senzorska ispitivanja se danas mnogo cijene u svijetu, i postala su ravnopravna sa fizičkim i hemijskim ispitivanjima. Generalno, kupovina i potrošnja neke namirnice uslovljena je čulnom percepcijom potrošača (preko čula vida, dodira, mirisa i ukusa). Kod grožđa, boja je primarni faktor izgleda i značajna je naročito za stone sorte. Promjena u teksturi je u vezi sa stepenom zrelosti i odnosi se na interakciju komponenti koje doprinose taktilnoj senzaciji. Aroma je od primarnog značaja kod muskatnih sorti grožđa. Doživljaj ukusa je definisan kao kompleksna reakcija između stvarnog ukusa i senzorskih nadražaja čula ukusa. Tako, na slatkost (može se detektovati pri nivou većem od 1% (w/v) ukupnih šećera) utiču i drugi sastojci kao što su kiseline i tanini.

U cilju opšte procjene kvaliteta grožđa, a prema uobičajenoj vinogradarskoj praksi za određivanje vremena berbe, izmjeren je sadržaj suve materije (uglavnom šećeri) i ukupnih kiselina u grožđanom soku. Istraživanja od prije nekoliko decenija su pokazala

visoko značajnu korelaciju između °Brix/kiseline i ukusa grožđa. Smatra se da je za procjenjivanje ukusa grožđa mnogo bolje uzeti u obzir odnos između °Brix i ukupnih kiselina nego samo °Brix. Ipak, najbolje je uzeti u obzir oba parametra (°Brix/kiseline i °Brix), iako se ne može tačno utvrditi koja kombinacija njihovih vrijednosti je najpogodnija. Ovo posebno važi za 'Kardinal', sortu koju karakteriše znatno širok rang sadržaja kiselina.

U studiji o vezi između odnosa °Balling²/kiseline i ukusa grožđa 'Kardinal', Nelson *et al.* (1963) navode da:

- za 17,7 °Balling i pri vrijednosti 34 za °Balling/kiseline, 24,4% učesnika³ u ocjenjivanju ukusa se izjasnilo da im se malo dopada, 39% umjereno, a izuzetno 28,3% na petostepenoj hedonističkoj skali⁴;
- za 17,7 °Balling i pri odnosu °Balling/kiseline 42,1, procentualna zastupljenost ocjena za prethodno navedene kategorije je iznosila: 27,8%; 34,6 i 16,6%;
- za 18,3 °Balling i pri 34,5 vrijednosti odnosa °Balling/kiseline, raspodjela ocjena je izgledala: 26,8% za kategoriju "malo se dopada", 36,6% za "umjereno se dopada" i 29,8% za "izuzetno se dopada" i
- za 18,3 °Balling i pri odnosu °Balling/kiseline 46,9 – 21,2%, 37,9% i 24,1%.

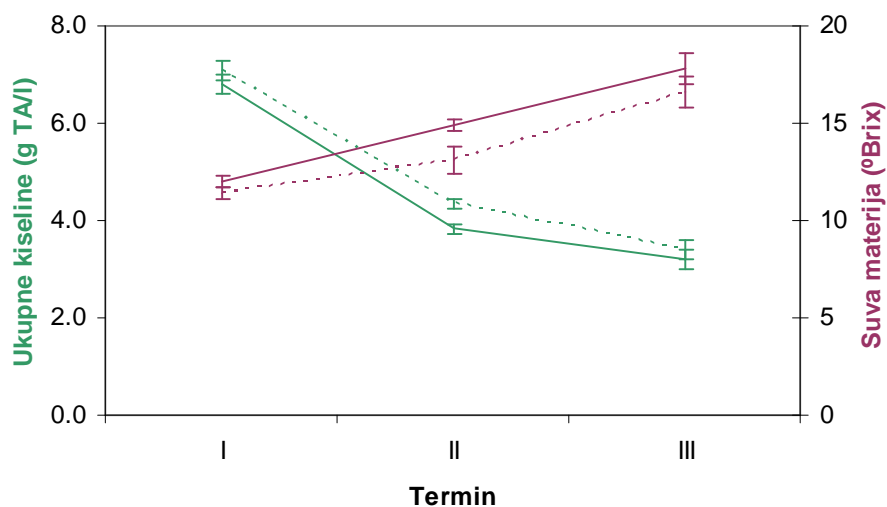
To bi značilo da pri većim odnosima između šećera i kiselina, kada je sadržaj šećera visok slabi prihvatljivost za konzumaciju. Pored toga, treba napomenuti da generalno postoji razlika u pogledu izbora voća između zapadnih i istočnih naroda. Liu *et al.* (2006) navodi da dok azijski narodi preferiraju voće sa većim odnosom između šećera i kiselina, zapadnim narodima više odgovara umjereni odnos.

² Balling skala je gotovo identična sa Brix skalom. Razlike u odnosu na specifičnu težinu se javljaju na petoj ili šestoj decimali.

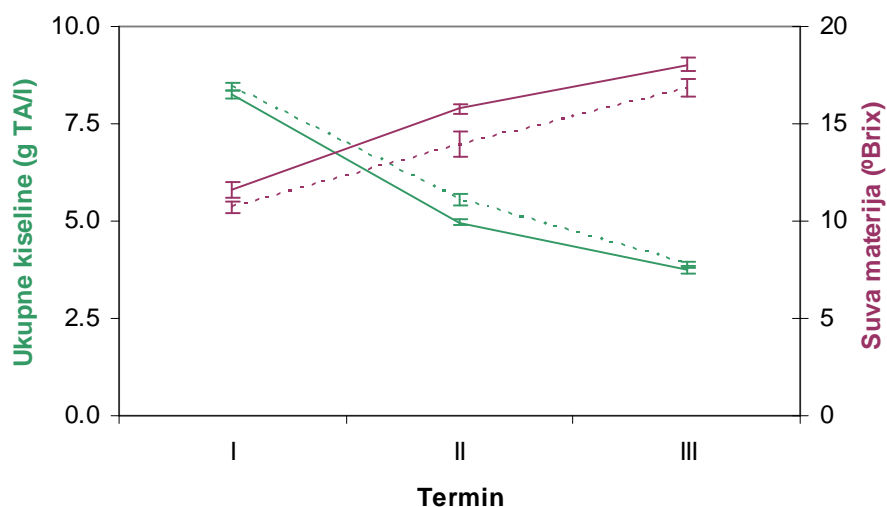
³ Panel za senzorna ispitivanja se sastojao od univerzitetskih radnika i njihovih supružnika – 80% su bili muškarci, a 20% žene starosti od 20 do 65 godina. Najviše troje panelista su imali prethodno iskustvo u ocjenjivanju ukusa stonog grožđa i svi su bili kratko upoznati za postupkom ocjenjivanja.

⁴ Ne dopada se, niti se dopada/niti se ne dopada (neutralno), malo se dopada, umjereno se dopada i izuzetno se dopada.

Kao što je bilo očekivano, sadržaj šećera u grožđu 'Kardinala' je rastao, a ukupnih kiselina opadao tokom sazrijevanja (Slike 3-7 i 3-8). Statistički značajne razlike između kontrolne varijante i varijante sa folijarnim đubrenjem nađene su samo u drugom terminu tj. na sredini zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa za obje godine. Odnos između °Brix i ukupnih kiselina, po terminima, bio je 16,0; 30,2 i 48,8 za kontrolu, a 17,6; 39,0 i 55,6 za varijantu sa folijarnim prihranjivanjem 2008. godine, dok je sljedeće godine pomenuti odnos iznosio 12,7; 25,1 i 43,4 odnosno 14,1; 31,8 i 48,4, respektivno. U trećem terminu 2008. godine, prosječni sadržaj suve materije je iznosio 16,6 °Brix u kontrolnom uzorku grožđa, a 17,8 °Brix u uzorku varijante sa folijarnom prihranom, dok je sljedeće godine izmjereno 16,9 °Brix i 18,1 °Brix. Imajući u vidu rezultate istraživanja Nelson *et al.* (1963), grožđe u periodu od drugog do trećeg termina 2009. ima povoljniji odnos između °Brix i ukupnih kiselina u odnosu na 2008. godinu.



Slika 3-7 Sadržaj ukupnih kiselina i suve materije u grožđu za 2008. godinu (·· kontrola, – varijanta sa folijarnim prihranjivanjem)



Slika 3-8 Sadržaj ukupnih kiselina i suve materije u grožđu za 2009. godinu (... kontrola, – varijanta sa folijarnim prihranjivanjem)

3.5.2. Promjene sadržaja šećera i organskih kiselina

Kao što se može vidjeti u Tabelama 3-3 i 3-4, sadržaj fruktoze i glukoze u grožđu raste tokom sazrijevanja. Koncentracija fruktoze bila je oko 1,8 i 1,4 puta viša na kraju u odnosu na početno stanje 2008. i 2009. godine, respektivno. Kod glukoze je zabilježen porast koncentracije za 1,7 i 1,3 puta. Odnos između fruktoze i glukoze kretao se u rangu 1,04–1,16, odnosno 1,05–1,21, u toku zadnjeg mjeseca sazrijevanja za date godine. Sadržaj saharoze je opadao kao posljedica hidrolize, a bio je oko 1,3 odnosno 1,7 puta niži na kraju u odnosu na početak. Generalno, uticaj folijarne prihrane na sadržaj pojedinih šećera je primijećen na polovini zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa za obje godine, kada je suma šećera bila statistički značajno veća u grožđu uzetom sa čokota varijante sa folijarnim prihranjivanjem u odnosu na kontrolnu varijantu (Slika 3-9). Odavno je utvrđeno da kalijum povećava brzinu transporta saharoze u floemu, i da znatan dio šećera sintetisan u lišću, za vrijeme sazrijevanja grožđa, prenosi se u plodove u obliku saharoze (transportni oblik šećera) i tu se nakuplja u obliku glukoze i fruktoze (Milosavljević, 1984b).

Organske kiseline u grožđu i pored nižeg sadržaja u odnosu na šećere, imaju značajan uticaj na organoleptičke osobine odnosno kvalitet grožđa. Poznato je da je u početnim fazama razvića plodova sinteza vinske kiseline po svom intenzitetu slična sintezi jabučne kiseline. Sa razvojem plodova, sinteza vinske kiseline brzo opada i na početku faze zrenja se potpuno zaustavlja. U zreloom grožđu nije otkrivena sinteza jabučne kiseline. (Milosavljević, 1984b)

Sadržaj organskih kiselina opada sa sazrijevanjem i veoma je osjetljiv na klimatske promjene, posebno u slučaju jabučne kiseline (Jackson, 2000; Liu *et al.*, 2006). Naime, klimatski uslovi nemaju tako izražen uticaj na vinsku kiselinu u grožđu koliko utiču na jabučnu i limunsku kiselinu, kao što navodi Son *et al.* (2009). Opadanje koncentracije vinske kiseline je uglavnom uzrokovano nastajanjem soli, kao i efektom razblaživanja sa povećanjem mase bobica, dok se jabučna kiselina gubi prvenstveno radi procesa disanja, u kojem kao glavni izvor energije zamjenjuje glukozu (Jackson, 2000).

Opadanje u sadržaju vinske i jabučne kiseline detektovano je u grožđu 'Kardinala' tokom zadnjeg mjeseca sazrijevanja (Tabele 3-3 i 3-4). Odnos između vinske i jabučne kiseline mijenjao se znatno tokom 2008. i iznosio je 7,4–22,1, dok je 2009. bio u opsegu 2,1–2,6. Veoma visoka vrijednost u 2008. bila je posljedica veoma male količine jabučne kiseline, što se može objasniti ubrzanim gubitkom jabučne kiseline izazavane relativno visokim temperaturama (Hepner & Bravdo, 1985).

Kao što se vidi na Slici 3-6, od 21. juna do 13. jula 2008. temperatura je bila znatno viša nego u istom periodu 2009. U tom periodu prosječna temperatura je bila čak 29,1 °C za prvu sezonu, a 23,1 °C za drugu. Zbog nižeg sadržaja vinske kiseline u grožđu varijante sa folijarnim đubrenjem u poređenju sa kontrolom dobijena je razlika u sumi organskih kiselina za drugi termin kod obje godine (Slika 3-10). Uzrok je vjerovatno pojačana migracija K⁺ u bobice (Fregoni & Vercesi, 1995), jer kao što navode Delgado *et al.* (2004) usljed đubrenja kalijumom dolazi do pada ukupne kiselosti grožđa sorte 'Tempranilo'. Pored toga, niža vrijednost sume organskih kiselina u grožđu varijante sa folijarnim prihranjivanjem, može biti i posljedica efekta razblaživanja (veće bobice).

U vezi sa prethodno navedenim promjenama proizilazi da odnos šećera i kiselina raste tokom ispitivanog perioda (Slika 3-11). Za 2008. godinu, kretao se od 19,30 do 53,86,

dok je za 2009. zbog veće količine organskih kiselina pomenuti odnos bio 13,43–22,64. U okviru preliminarnih istraživanja, tokom jula 2007. kada su temperature bile izuzetno visoke, u grožđu 'Kardinala' na podlozi Paulsen 1103 odnos šećeri/kiseline bio je u opsegu 26,09–62,56, pri čemu se odnos između °Brix i ukupnih kiselina kretao od 19,4 do 91,9.

Da bi se odredila suštinska varijacija u podacima za obje godine primijenjena je analiza principalne komponente sa varimaks rotacijom. Ova metoda multivarijantne statističke analize je veoma korisna, u slučaju većeg broja podataka, za "identifikaciju" jedinjenja koja najviše doprinose razlikovanju između grupa uzoraka za ispitivani period. Naime, vrijednosti saturacije pojedinih varijabli unutar principalnih komponenti predstavljaju njihov "doprinos" u razlikovanju između grupa. S tim u vezi, pomoću analize principalne komponente, od svih varijabli (koncentracije ispitivanih jedinjenja) izdvajaju se one sa najvećim vrijednostima saturacije koje najviše doprinose pomenutom razlikovanju.

Tabela 3-3 Sadržaj analiziranih jedinjenja (prosječna vrijednost \pm standardna greška) u grožđu u mg/kg svježe mase za fenolna jedinjenja i g/kg svježe mase za šećere i organske kiseline u 2008. godini^a

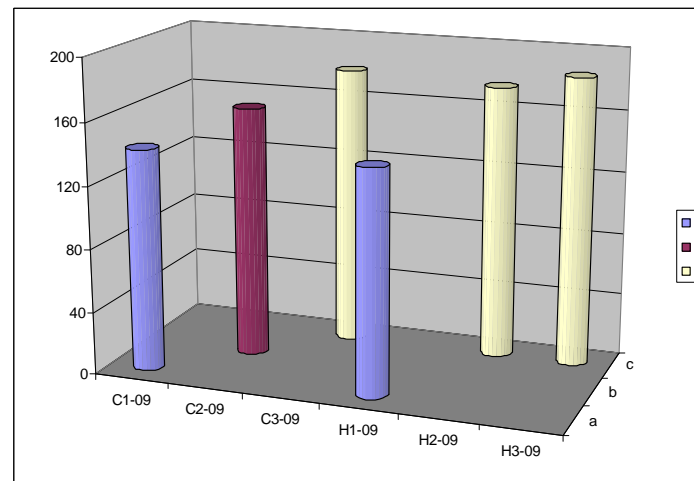
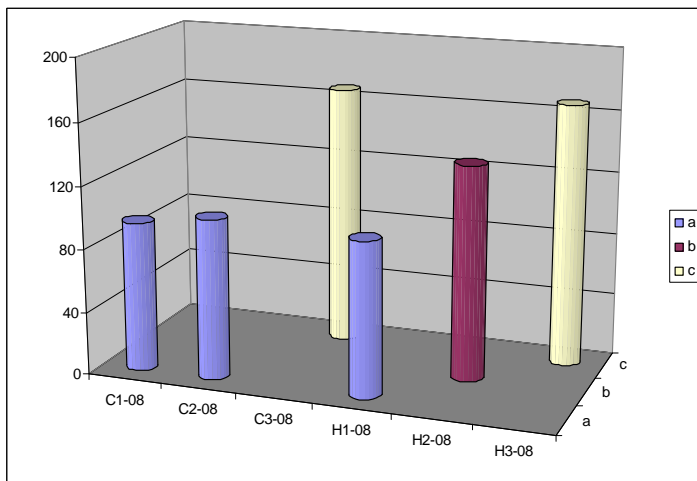
Varijanta	C1-08	C2-08	C3-08	H1-08	H2-08	H3-08
Saharoza	5,09 \pm 0,17b	4,22 \pm 0,30a	4,90 \pm 0,13b	5,83 \pm 0,14c	4,72 \pm 0,11b	4,62 \pm 0,05ab
Glukoza	44,45 \pm 2,12a	45,58 \pm 1,70a	76,20 \pm 1,58c	44,88 \pm 1,70a	62,63 \pm 2,49b	76,92 \pm 1,24c
Fruktoza	46,22 \pm 2,23a	52,82 \pm 2,11b	85,99 \pm 1,70d	48,15 \pm 1,84ab	69,88 \pm 3,01c	86,40 \pm 1,42d
Vinska kiselina	4,48 \pm 0,21b	4,09 \pm 0,15b	3,43 \pm 0,21a	4,28 \pm 0,16b	3,32 \pm 0,30a	3,09 \pm 0,17a
Jabučna kiselina	0,53 \pm 0,03c	0,27 \pm 0,02b	0,17 \pm 0,01a	0,58 \pm 0,02c	0,22 \pm 0,02b	0,14 \pm 0,01a
Delfinidin 3- <i>O</i> -glukozid	14,72 \pm 1,54a	50,17 \pm 3,98b	55,37 \pm 5,96bc	19,15 \pm 2,19a	62,73 \pm 3,43c	46,34 \pm 3,61b
Cijanidin 3- <i>O</i> -glukozid	21,62 \pm 2,05a	75,14 \pm 7,05b	75,08 \pm 10,73b	28,78 \pm 3,38a	100,63 \pm 7,49c	67,00 \pm 6,50b
Petunidin 3- <i>O</i> -glukozid	29,99 \pm 1,81a	79,89 \pm 6,80b	82,60 \pm 9,30b	34,10 \pm 2,92a	104,62 \pm 6,32c	77,89 \pm 6,44b
Peonidin 3- <i>O</i> -glukozid	182,12 \pm 11,43a	684,66 \pm 60,15b	802,38 \pm 99,52b	250,09 \pm 27,10a	872,33 \pm 60,31b	822,92 \pm 72,23b
Malvidin 3- <i>O</i> -glukozid	125,23 \pm 7,16a	394,93 \pm 30,81b	457,77 \pm 33,41b	144,59 \pm 14,12a	449,13 \pm 30,14b	463,31 \pm 34,84b
Miricetin heksozid 1	2,35 \pm 0,14a	6,90 \pm 0,54b	8,74 \pm 1,14b	3,30 \pm 0,29a	7,80 \pm 0,54b	8,82 \pm 0,90b
Miricetin heksozid 2	3,29 \pm 0,34a	8,11 \pm 1,01b	14,32 \pm 1,84c	2,77 \pm 0,37a	9,06 \pm 0,69b	12,50 \pm 1,55c
Rutin	9,90 \pm 1,19a	17,59 \pm 2,16b	12,42 \pm 1,55a	8,83 \pm 0,99a	11,60 \pm 0,90a	12,78 \pm 1,86a
Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid	4,92 \pm 0,69a	18,15 \pm 2,56b	34,95 \pm 5,60c	3,85 \pm 0,71a	23,65 \pm 1,75b	34,32 \pm 4,54c
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid	162,50 \pm 21,37a	617,62 \pm 74,71b	1029,79 \pm 147,61c	140,04 \pm 22,59a	722,65 \pm 47,87b	1033,69 \pm 131,22c
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukuronid	518,30 \pm 45,44a	841,07 \pm 85,28b	677,42 \pm 63,61ab	518,01 \pm 70,31a	689,32 \pm 51,11ab	626,36 \pm 63,42a
Kempferol heksozid	93,81 \pm 16,06a	323,91 \pm 47,21b	577,09 \pm 116,58c	74,29 \pm 14,92a	392,11 \pm 39,35bc	583,60 \pm 87,33c
Proantocijanidin dimer 1	110,90 \pm 10,49b	76,27 \pm 15,68a	89,70 \pm 12,79ab	113,22 \pm 10,24b	85,85 \pm 6,10ab	68,86 \pm 7,23a
Proantocijanidin dimer 2	49,18 \pm 2,95a	62,29 \pm 3,84c	58,13 \pm 4,66abc	50,56 \pm 3,85ab	61,36 \pm 2,95bc	55,07 \pm 2,81abc
Katehin	60,47 \pm 7,90cd	69,82 \pm 9,13d	28,57 \pm 4,06ab	55,56 \pm 5,71cd	44,36 \pm 4,14bc	25,54 \pm 1,78a
Proantocijanidin trimer	38,38 \pm 4,14a	154,72 \pm 21,64b	162,62 \pm 28,00b	55,21 \pm 7,48a	221,15 \pm 21,89c	147,66 \pm 17,19b
Epikatehin	351,91 \pm 31,80a	510,84 \pm 50,95b	438,55 \pm 59,92ab	410,07 \pm 45,34ab	526,59 \pm 44,27b	411,96 \pm 42,50ab
Proantocijanidin dimer 3	12,73 \pm 4,51	17,83 \pm 4,52	7,90 \pm 0,60	7,18 \pm 2,82	18,04 \pm 6,56	13,50 \pm 2,90

^aRazličita slova u svakom redu označavaju značajne razlike između prosječnih vrijednosti za $p < 0,05$. C1-08, C2-08, C3-08, H1-08, H2-08, H3-08 označavaju datume uzimanja uzoraka grožđa kontrolne varijante i varijante sa folijarnim đubrenjem, respektivno (objašnjeno u Eksperimentalnom dijelu).

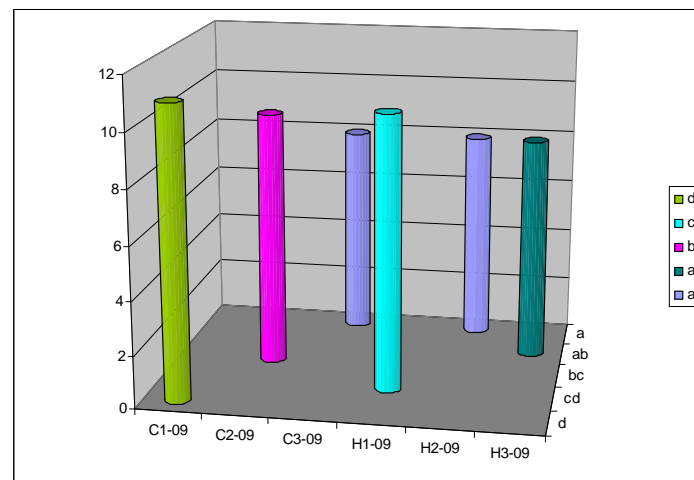
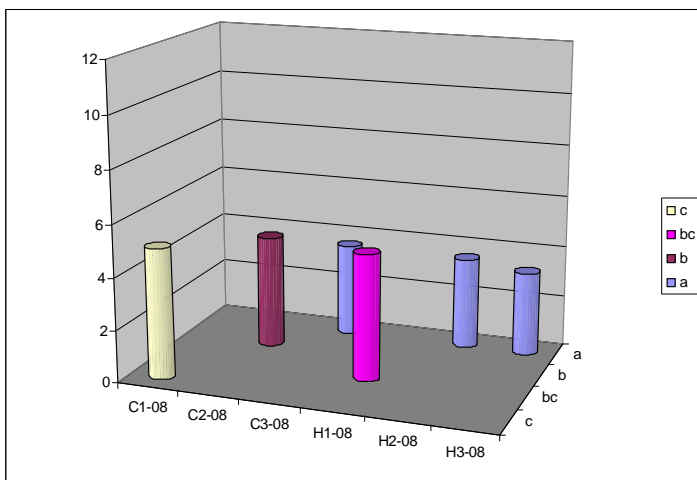
Tabela 3-4 Sadržaj analiziranih jedinjenja (prosječna vrijednost \pm standardna greška) u grožđu u mg/kg svježe mase za fenolna jedinjenja i g/kg svježe mase za šećere i organske kiseline u 2009. godini^a

Varijanta	C1-09	C2-09	C3-09	H1-09	H2-09	H3-09
Saharoza	13,60 \pm 0,23d	10,99 \pm 0,22c	8,28 \pm 0,12a	13,30 \pm 0,29d	9,77 \pm 0,20b	7,76 \pm 0,13a
Glukoza	60,10 \pm 3,74a	69,91 \pm 2,32b	76,36 \pm 2,92bc	62,40 \pm 2,62a	77,42 \pm 1,86bc	80,65 \pm 1,75c
Fruktoza	63,27 \pm 3,73a	80,19 \pm 2,71b	89,70 \pm 3,40c	67,59 \pm 2,68a	88,23 \pm 2,20c	97,94 \pm 1,92d
Vinska kiselina	7,89 \pm 0,26c	6,61 \pm 0,33b	5,35 \pm 0,24a	7,11 \pm 0,32b	5,34 \pm 0,16a	5,87 \pm 0,16a
Jabučna kiselina	3,03 \pm 0,22ab	2,99 \pm 0,25ab	2,44 \pm 0,19a	3,20 \pm 0,22b	2,58 \pm 0,15a	2,55 \pm 0,15a
Delfinidin 3- <i>O</i> -glukozid	36,17 \pm 4,13a	43,38 \pm 3,60ab	53,21 \pm 3,65bc	38,10 \pm 1,96a	56,62 \pm 4,94c	52,99 \pm 2,27bc
Cijanidin 3- <i>O</i> -glukozid	64,91 \pm 9,58a	68,63 \pm 7,87ab	89,07 \pm 8,11ab	86,60 \pm 10,05ab	92,00 \pm 5,57b	88,04 \pm 6,08ab
Petunidin 3- <i>O</i> -glukozid	80,78 \pm 7,85a	77,26 \pm 6,05a	80,56 \pm 6,14a	123,59 \pm 11,34b	100,08 \pm 6,59a	90,69 \pm 5,03a
Peonidin 3- <i>O</i> -glukozid	471,23 \pm 41,51a	758,51 \pm 64,44b	1065,41 \pm 94,14c	610,07 \pm 59,80ab	1073,33 \pm 74,35c	1166,94 \pm 64,28c
Malvidin 3- <i>O</i> -glukozid	158,05 \pm 12,85a	386,21 \pm 19,46b	460,77 \pm 26,68c	184,54 \pm 13,63a	508,82 \pm 36,82c	520,64 \pm 26,46c
Miricetin heksozid 1	4,11 \pm 0,35a	7,05 \pm 0,69b	10,39 \pm 0,98cd	5,98 \pm 0,64ab	9,89 \pm 0,72c	12,20 \pm 0,71d
Miricetin heksozid 2	7,17 \pm 0,57a	14,33 \pm 1,03b	19,85 \pm 1,61c	7,46 \pm 0,66a	17,37 \pm 1,48bc	18,12 \pm 1,17c
Rutin	20,41 \pm 1,52c	17,25 \pm 1,92abc	14,69 \pm 1,69ab	18,33 \pm 1,16bc	13,23 \pm 0,92a	13,17 \pm 0,98a
Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid	9,83 \pm 0,89a	14,92 \pm 2,04ab	25,40 \pm 3,48c	9,43 \pm 0,77a	20,24 \pm 3,19bc	19,97 \pm 2,21bc
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid	245,83 \pm 26,03a	479,57 \pm 63,67b	894,55 \pm 115,29c	256,35 \pm 25,73a	707,88 \pm 103,08c	696,11 \pm 75,26bc
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukuronid	860,96 \pm 53,85c	747,14 \pm 66,80abc	671,87 \pm 46,42ab	814,62 \pm 48,09bc	638,43 \pm 40,03a	596,29 \pm 38,76a
Kempferol heksozid	158,69 \pm 25,78a	321,18 \pm 59,68ab	618,01 \pm 99,08c	186,83 \pm 32,09ab	556,39 \pm 138,39c	405,48 \pm 54,35bc
Proantocijanidin dimer 1	237,46 \pm 17,80d	131,65 \pm 21,97a	180,90 \pm 10,60bc	199,10 \pm 10,49cd	155,91 \pm 10,57ab	139,46 \pm 4,98ab
Proantocijanidin dimer 2	55,34 \pm 1,90a	54,21 \pm 2,75a	81,93 \pm 5,13b	86,46 \pm 6,29b	67,09 \pm 6,02a	88,84 \pm 2,60b
Katehin	188,66 \pm 15,02c	106,63 \pm 10,79ab	148,98 \pm 21,91bc	296,37 \pm 25,17d	81,14 \pm 4,85a	162,51 \pm 12,97c
Proantocijanidin trimer	39,02 \pm 6,31a	79,89 \pm 15,66bc	114,92 \pm 18,01c	98,70 \pm 13,45c	156,41 \pm 11,44d	52,12 \pm 2,87ab
Epikatehin	1045,66 \pm 61,54b	787,01 \pm 78,68a	687,49 \pm 51,29a	599,30 \pm 113,08a	699,09 \pm 41,20a	706,92 \pm 47,43a
Proantocijanidin dimer 3	5,50 \pm 1,03a	13,01 \pm 1,67bc	11,48 \pm 1,52bc	8,27 \pm 1,10ab	7,76 \pm 2,30ab	14,80 \pm 2,15c

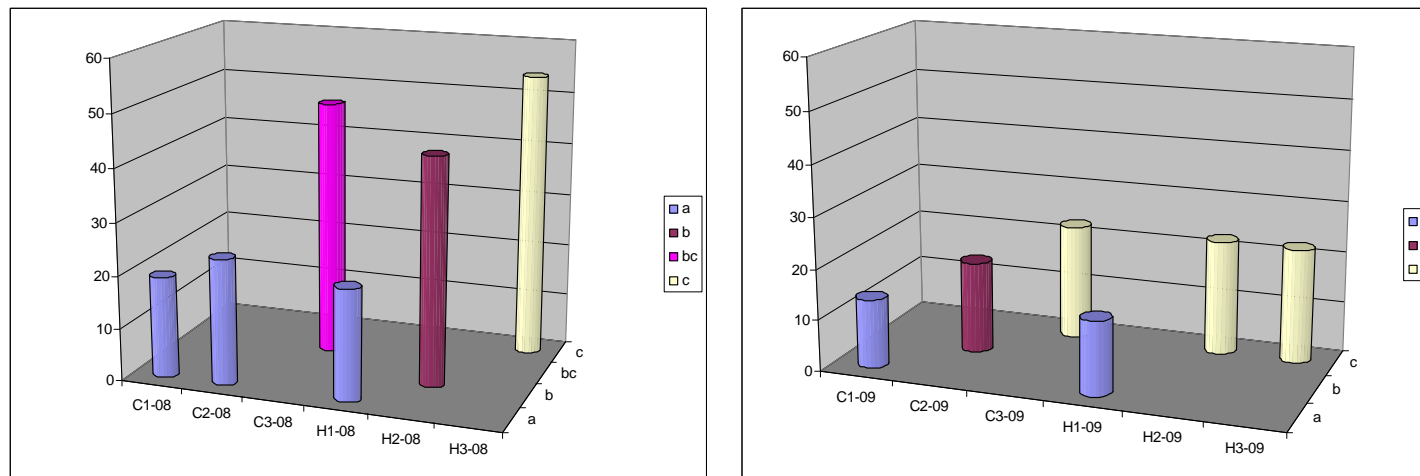
^aRazličita slova u svakom redu označavaju značajne razlike između prosječnih vrijednosti za $p < 0,05$. C1-09, C2-09, C3-09, H1-09, H2-09, H3-09 označavaju datume uzimanja uzoraka grožđa kontrolne varijante i varijante sa folijarnim đubrenjem, respektivno (objašnjeno u Eksperimentalnom dijelu).



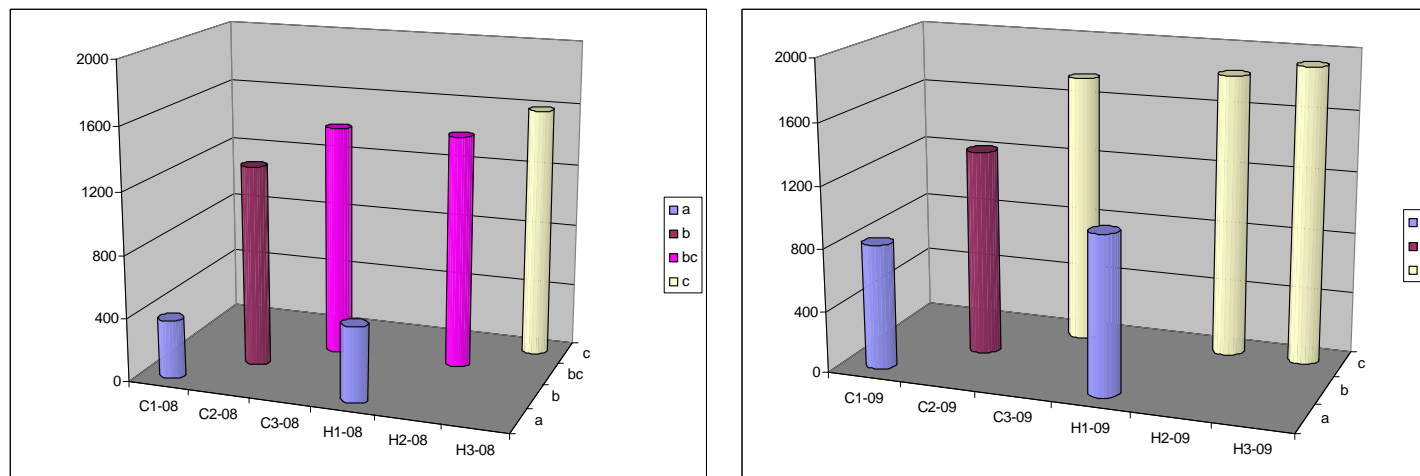
Slika 3-9 Suma šećera (g/kg) za 2008. i 2009. godinu



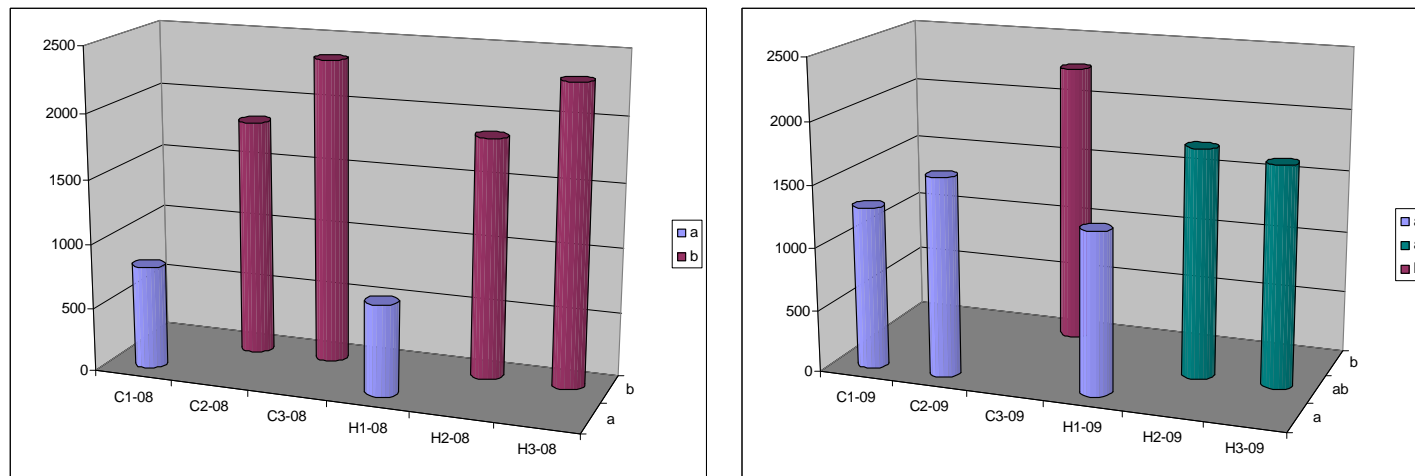
Slika 3-10 Suma organskih kiselina (g/kg) za 2008. i 2009. godinu



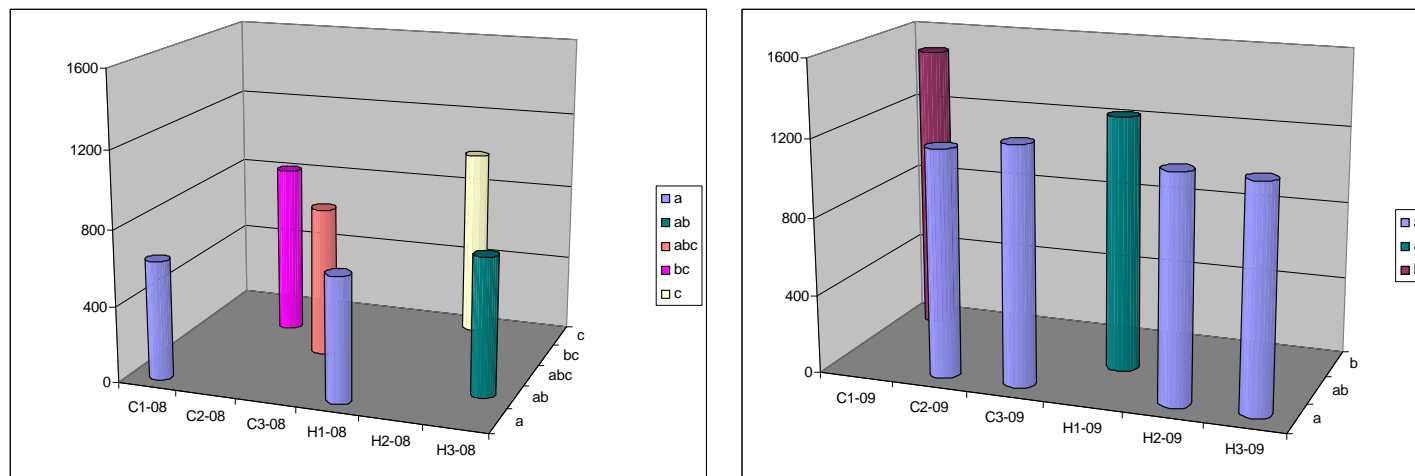
Slika 3-11 Odnos između šećera i kiselina za 2008. i 2009. godinu



Slika 3-12 Suma antocijanina (mg/kg) za 2008. i 2009. godinu



Slika 3-13 Suma flavonola (mg/kg) za 2008. i 2009. godinu



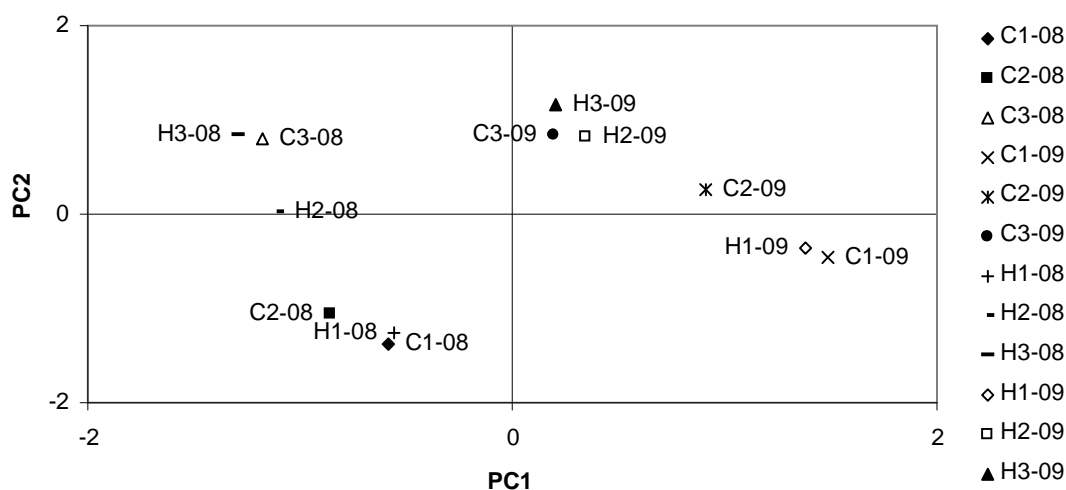
Slika 3-14 Suma flavan-3-ola (mg/kg) za 2008. i 2009. godinu

Analiza principalne komponente nakon varimaks rotacije (Tabela 3-5) pokazuje da dvije komponente (izdvojene na osnovu kriterijuma jedinstvene vrijednosti > 1) objašnjavaju čak 93,6% varijacije šećera i organskih kiselina.

Prva komponenta, PC1, u pozitivnoj je korelaciji sa vinskom i jabučnom kiselinom, kao i saharozom. Druga komponenta, PC2, korelira sa monosaharidima, fruktozom i glukozom. Na grafiku PC1 vs. PC2 (Slika 3-15) su prikazane prosječne vrijednosti skorova glavnih komponenti.

Tabela 3-5 PCA nakon varimaks rotacije za šećere i organske kiseline

	PC1	PC2	Komunalna
Jedinstvena vrijednost	2,66	2,02	varijansa
Kumul. (%)	59,28	93,60	
Vinska kiselina	0,957	-0,014	0,916
Jabučna kiselina	0,930	0,232	0,918
Saharoza	0,922	0,124	0,865
Fruktoza	0,096	0,991	0,991
Glukoza	0,127	0,986	0,989



Slika 3-15 PC1 vs. PC2 skorovi (nakon rotacije) za šećere i organske kiseline u grožđu

Preko PC1 jasno se može uočiti podjela po godinama, jer je sadržaj organskih kiselina i saharoze viši u grožđu iz 2009. u odnosu na 2008. Ovo je u skladu sa istraživanjima koja su pokazala da kiselost opada u većem stepenu na visokim temperaturama u odnosu na niske (Buttrose *et al.*, 1971; Poudel *et al.*, 2009) i da grožđe ima niži sadržaj vinske i jabučne kiseline tokom toplijih sezona (Liu *et al.*, 2006).

Generalno, efekat tretmana sa folijarnim đubrivom se može uočiti preko PC1, a posebno PC2, za drugi termin koji se odnosi na grožđe uzeto polovinom zadnjeg mjeseca sazrijevanja.

3.5.3. Promjene sadržaja flavonoida

Akumulacija fenolnih jedinjenja tokom sazrijevanja grožđa je predmet znatnih fluktuacija i usko je vezana za fiziološke i biohemijske promjene, a rezultat je ravnoteže između biosinteze, daljeg preobražaja i katabolizma (Fernandez de Simon *et al.*, 1992).

U pokožici grožđa, peonidin 3-*O*-glukozid imao je najvišu koncentraciju, potom malvidin 3-*O*-glukozid, a delfinidin 3-*O*-glukozid najnižu koncentraciju (Tabele 3-3 i 3-4), što je u skladu sa studijom Carreno *et al.* (1997). Sadržaji pojedinih antocijanina bili su relativno slični vrijednostima u crvenim sortama stonog grožđa kao što su: 'Red Globe', 'Flame seedless', 'Crimson seedless', izuzev za petunidin 3-*O*-glukozid (Cantos *et al.*, 2002). Naime, sadržaj ovog antocijanina bio je samo u pokožici 'Flame seedless' preko 2 puta viši u poređenju sa 'Kardinalom', dok su druge sorte imale znatno nižu koncentraciju petunidin 3-*O*-glukozida (čak 9-10 puta u pokožici 'Crimson seedless').

Jednosmjerna analiza varijanse je pokazala da između grožđa kontrole i varijante sa folijarnim đubrenjem ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju antocijanina (izuzev kod petunidin 3-*O*-glukozida za 2009.) na početku i na kraju zadnjeg mjeseca sazrijevanja. Međutim, u drugom terminu količine delfinidin 3-*O*-glukozida, cijanidin 3-*O*-glukozida i petunidin 3-*O*-glukozida bile su značajno veće u pokožici grožđa varijante sa folijarnim đubrenjem u odnosu na kontrolu 2008, dok su se za 2009. izdvojili delfinidin 3-*O*-glukozid, peonidin 3-*O*-glukozid i malvidin 3-*O*-glukozid.

Tokom zadnjeg mjeseca sazrijevanja, suma antocijanina povećavala se od prvog do drugog datuma, a potom je bila skoro konstantna (bez statistički značajne razlike) za 2008. kod kontrole, a kod varijante sa đubrenjem ovakav trend je uočen za obje godine (Slika 3-12). Međutim, kod kontrolne varijante za 2009, kontinualno je rasla suma antocijanina (Slika 3-12). Poznato je da je sazrijevanje ploda praćeno povećanjem brzine sinteze proteina i aktivnosti brojnih enzima. Aktivnost fenilalanin amonijum liaze raste u plodu u kojem se akumuliraju antocijanini (Macheix *et al.*, 1990).

Uopšte gledano, grožđe sa čokota folijarno prihranjivanih sa PK đubrivom je imalo više "ukupnih" antocijanina (suma glukozida delfinidina, cijanidina, petunidina, peonidina i malvidina) u pokožici sredinom zadnjeg mjeseca sazrijevanja u poređenju sa grožđem sa kontrolnih čokota za obje proučavane godine (Slika 3-12). Dakle, dobijeni rezultati ukazuju na pozitivan efekat upotrebe PK folijarnog đubriva na akumulaciju antocijanina, baš kao i šećera. Ovakav rezultat je očekivan, zbog krucijalnog značaja fosfora i kalijuma za sintezu ugljenih hidrata i transport asimilata do skladišnih organa, i zbog toga što faktori koji utiču na sadržaj šećera takođe utiču i na boju grožđa, koja zavisi od antocijanina (Champagnol, 1984). He *et al.* (2010) navode dva različita mišljenja o vezi između antocijanina i šećera. Prema prvom, šećeri u pokožici imaju ulogu regulatora u biosintezi antocijanina; dok su prema drugom mišljenju važni samo kao supstrati za nastanak antocijanina.

Među flavonolima, kvercetin 3-*O*-glukozid je imao najvišu koncentraciju na kraju, a zatim kvercetin 3-*O*-glukuronid koji je bio najviše zastupljen u pokožici na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja. Najnižu koncentraciju je imao miricetin heksozid 1 (Tabele 3-3 i 3-4).

U prethodno navedenim crvenim sortama stonog grožđa sa područja Španije, proučavanim od strane Cantos *et al.* (2002), sadržaj kvercetin 3-*O*-glukuronida kretao se od 5,0 do 34,2 mg/kg svježe mase grožđa (pokožica i pulpa zajedno), a suma kvercetin 3-*O*-glukozida i kvercetin 3-*O*-rutinozida između 7,8 i 37,3 mg/kg, dok su kempferol 3-galaktozid i kempferol 3-glukozid nađeni u tragovima. Pena-Neira *et al.* (2007) je odredio visoku koncentraciju kvercetin 3-*O*-glukozida (675,34 mg/kg) u pokožici grožđa sorte 'Syrah' u vrijeme berbe. Uzimajući u obzir navedene vrijednosti, pokožica 'Kardinala' je veoma bogata ovim jedinjenjima.

Kao što je dato u Tabelama 3-3 i 3-4 ANOVA pokazuje da ne postoji razlika između kontrolne varijante i varijante sa folijarnom prihranom u sadržaju ispitivanih flavonola u pokožici tokom zadnjeg mjeseca sazrijevanja. Izuzetak predstavljaju miricetin heksozid 1, kvercetin 3-*O*-glukozid i kempferol heksozid čiji je sadržaj bio viši kod varijante folijarno prihranjivane sa PK đubrivom u odnosu na kontrolu za 2009. godinu. U pogledu sume flavonola ne postoji razlika između ogleda gdje je izvedena folijarna prihrana u odnosu na kontrolnu varijantu (Slika 3-13). Trend sume flavonola za 2008. godinu bio je isti kao i kod antocijanina, dok je za 2009. kod kontrole suma flavonola rasla od drugog do trećeg termina, a kod folijarno đubrene varijante nije bilo statistički značajnih razlika tokom zadnjeg mjeseca sazrijevanja.

Sadržaj epikatehina bio je najviši od analiziranih flavan-3-ola, a proantocijanidin dimera 3 najniži (Tabele 3-3 i 3-4).

Generalno, suma flavan-3-ola dostigla je najveću vrijednost sredinom ispitivanog perioda u 2008. godini, a 2009. na početku. Što se tiče sume flavan-3-ola, nije postojala razlika između kontrole i varijante sa folijarnom prihranom po terminima za obje godine. Međutim, razlike su uočljive za proantocijanidin dimer 2, katehin i epikatehin na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja 2008, za katehin i proantocijanidin trimer na polovini, i za proantocijanidin dimer 1 na kraju perioda sazrijevanja. Za proantocijanidin trimer utvrđena je razlika za čitav ispitivani period 2009. godine.

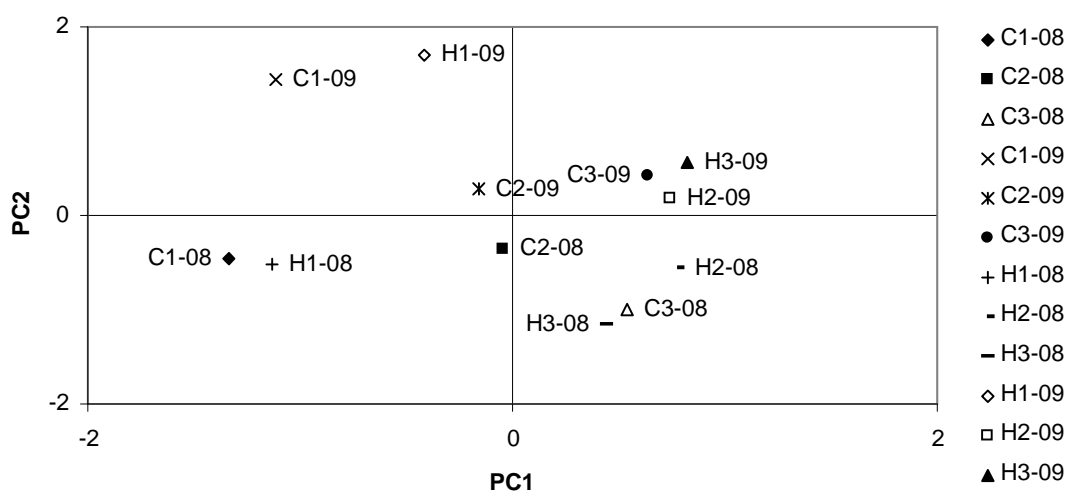
PCA nakon varimaks rotacije (Tabela 3-6) izdvaja 3 glavne komponente, koje objašnjavaju 73,7% varijacije u podacima za flavonoide. PC1 je u pozitivnoj korelaciji sa peonidin 3-*O*-glukozidom, miricetin heksozidom 1, delfinidin 3-*O*-glukozidom, cijanidin 3-*O*-glukozidom, malvidin 3-*O*-glukozidom, petunidin 3-*O*-glukozidom, miricetin heksozidom 2, kvercetin 3-*O*-glukozidom i proantocijanidin trimerom, a ima visoke vrijednosti saturacije za proantocijanidin dimer 2, kempferol heksozid i kvercetin 3-*O*-galaktozid. PC2 je opisana uglavnom sa flavan-3-olima: proantocijanidin dimerom 1, katehinom, epikatehinom i proantocijanidin dimerom 2, a ima relativno visoku vrijednost saturacije za petunidin 3-*O*-glukozid, kvercetin 3-*O*-glukuronid i rutin. PC3 je u pozitivnoj korelaciji sa flavanolima: kvercetin 3-*O*-glukuronidom, rutinom, kempferol heksozidom i

kvercetin 3-*O*-galaktozidom, ima i visoku vrijednost saturacije sa kvercetin 3-*O*-glukozidom, a relativno visoku sa miricetin heksozidom 2.

Na grafiku PC1 vs. PC2 sa prosječnim skorovima (Slika 3-16) se uočava veoma dobra diferencijacija između grožđa različitih sezona po drugoj komponenti. Gornji dio grafika odnosi se na uzorke grožđa u kojima je sadržaj uglavnom flavan-3-ola viši, a to su uzorci iz 2009. godine. Pored toga, visok sadržaj flavan-3-ola u pokožici na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja 2009. (Tabela 3-4) odvajaju C1-09 i H1-09 od drugih iz te godine i svih uzoraka iz 2008. (Tabela 3-3).

Tabela 3-6 PCA nakon varimaks rotacije za fenolna jedinjenja u pokožici

	PC1	PC2	PC3	Komunalna varijansa
Jedinstvena vrijednost	6,93	3,28	3,07	
Kumul. (%)	47,10	63,24	73,73	
Peonidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,930	0,243	0,024	0,925
Miricetin heksozid 1	0,912	0,204	0,090	0,881
Delfinidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,900	0,113	0,190	0,859
Cijanidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,833	0,332	0,122	0,819
Malvidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,817	-0,103	0,231	0,731
Petunidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,755	0,446	0,067	0,773
Miricetin heksozid 2	0,704	0,138	0,435	0,704
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid	0,680	-0,199	0,653	0,929
Proantocijanidin trimer	0,670	-0,140	0,147	0,490
Proantocijanidin dimer 3	0,158	0,043	0,095	0,036
Proantocijanidin dimer 1	-0,060	0,847	0,168	0,749
Katehin	0,028	0,838	-0,055	0,706
Epikatehin	0,304	0,719	0,135	0,627
Proantocijanidin dimer 2	0,525	0,585	0,103	0,629
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukuronid	0,056	0,411	0,815	0,837
Rutin	-0,010	0,503	0,777	0,856
Kempferol heksozid	0,565	-0,138	0,709	0,842
Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid	0,600	-0,214	0,688	0,879



Slika 3-16 PC1 vs. PC2 skorovi (nakon rotacije) za fenolna jedinjenja u pokožici

S druge strane, efekat folijarnog prihranjivanja vinove loze može se uočiti preko PC1. Skorovi za prvu komponentu predstavljaju znatnu razliku između kontrole i varijante sa folijarnim đubrenjem u drugom terminu tj. na sredini zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa za obje godine, a relativno blisku poziciju za početni datum 2008. i krajnji za obje godine. Međutim, postoji relativno veliko rastojanje između H1-09 i C1-09, zbog značajnih razlika u sadržaju petunidin 3-*O*-glukozida, proantocijanidin dimera 2 i proantocijanidin trimera, kao što je prethodno navedeno, koji imaju visoku vrijednost saturacije u prvoj komponenti (PC1). Tako, imajući u vidu znatno manje rastojanje između H1-08 i C1-08 (Slika 3-16), nije jasno da li je upotreba folijarnog đubriva imala efikasniji uticaj na ova fenolna jedinjenja tokom 2009. u poređenju sa 2008. godinom ili je u pitanju posljedica dejstva drugog faktora.

Gledajući po sezonama, iako je koncentracija pojedinih antocijanina varirala znatno na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja i bila niža 2008. u poređenju sa 2009. godinom, na kraju zadnjeg mjeseca sazrijevanja je dostignuta vrijednost koja se nije statistički značajno razlikovala za delfinidin 3-*O*-glukozid, cijanidin 3-*O*-glukozid, petunidin 3-*O*-glukozid i malvidin 3-*O*-glukozid (rezultati analize varijanse nisu prikazani). Sadržaj peonidin 3-*O*-

glukozida bio je značajno niži tokom zadnjeg mjeseca sazrijevanja u 2008. godini (za svaki datum) u odnosu na 2009. S hemotaksonomske tačke gledišta Macheix *et al.* (1990) izdvajaju koncentraciju malvidin monoglukozida kao i odnos između malvidin 3-*O*-glukozida i peonidin 3-*O*-glukozida za karakterizaciju sorte (kultivara). Međutim, rezultati ove studije pokazuju da među odnosima analiziranih antocijanina, odnos malvidin 3-*O*-glukozid: petunidin 3-*O*-glukozid je imao slične vrijednosti (5,5–5,9) na kraju ispitivanog perioda bez obzira na sezonu i tretman sa folijarnim đubrivom.

3.5.4. Generalna procjena razlika u kvalitetu grožđa

Više vrijednosti sume šećera, antocijanina i flavan-3-ola u 2009. u odnosu na 2008, i flavonola početkom zadnjeg mjeseca sazrijevanja (Tabela 3-7) moglo je biti uzrokovano pogodnijim klimatskim uslovima. Naime, dnevne temperature su bile konstantno iznad 26,4 °C tokom 23 dana poslije 21. juna 2008. godine (već naglašeno kod organskih kiselina u odjeljku 3.5.2.). Huglin & Schneider (1998) navode da na temperaturama iznad 25 °C fotosintetska aktivnost opada čak i na konstantnoj izloženosti suncu. He *et al.* (2010) naglašava da je na nižim temperaturama, kao na primjer 25 °C, favorizovana biosinteza antocijanina. Visoke temperature mogu dovesti do stimulacije sinteze inhibitora fenilalanin amonijum liaze prije nego što će direktno negativno uticati na aktivnost PAL. Inaktivacija PAL se ne javlja ili je zastupljena u manjem stepenu na niskim u odnosu na više temperature (konstantno 25 °C) (Macheix *et al.*, 1990).

Tabela 3-7 (a, b i c) Jednosmjerna ANOVA sa Dankanovim testom $p < 0,05$ za sume odgovarajućih jedinjenja. Različita slova u koloni označavaju statistički različite prosječne vrijednosti.

a) Prvi termin

	Šećeri	Kiseline	Šećeri: Kiseline	Antocijanini	Flavonoli	Flavan-3-oli
C1-08	a	a	b	a	a	a
H1-08	a	a	b	a	a	a
C1-09	b	b	a	b	b	b
H1-09	b	b	a	c	b	b

b) Drugi termin

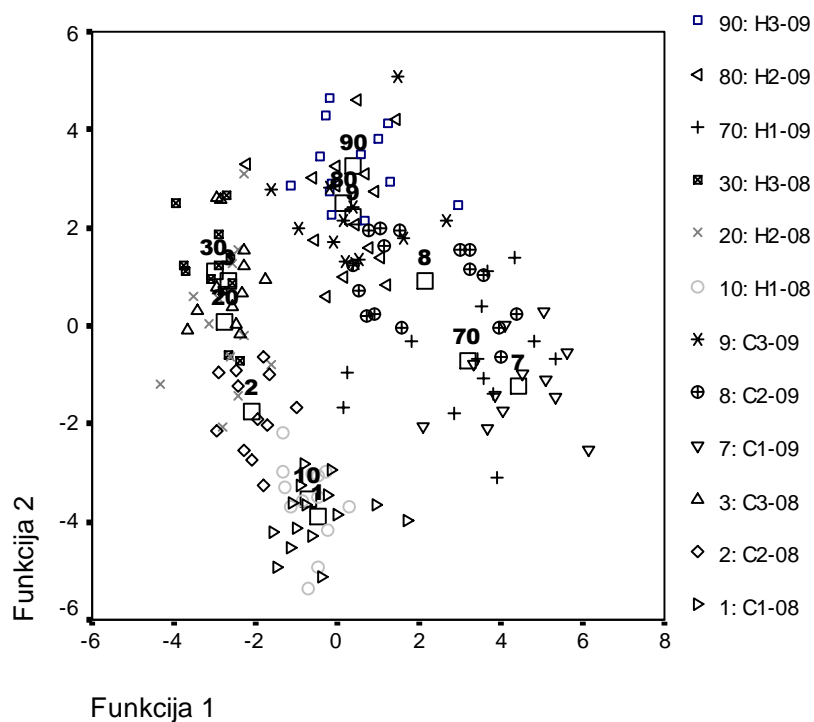
	Šećeri	Kiseline	Šećeri: Kiseline	Antocijanini	Flavonoli	Flavan-3-oli
C2-08	a	a	a	a	a	a
H2-08	b	a	b	bc	a	ab
C2-09	c	c	a	ab	a	b
H2-09	d	b	a	c	a	b

c) Treći termin

	Šećeri	Kiseline	Šećeri: Kiseline	Antocijanini	Flavonoli	Flavan-3-oli
C3-08	a	a	b	a	a	a
H3-08	a	a	b	a	a	a
C3-09	b	b	a	ab	a	b
H3-09	b	b	a	b	a	b

Uzimajući u obzir da sume flavonola nisu bile različite u drugom i trećem terminu za obje ispitivane godine (Tabela 3-7), uticaj nekih drugih faktora je "ujednačio" početne razlike. To bi se moglo pripisati izloženosti sunčevoj svjetlosti (Pereira *et al.*, 2006). Detaljno proučavanje uticaja izloženosti sunčevoj svjetlosti na sadržaje glikozida kvercetina, miricetina i kempferola u grožđu sorte 'Merlo' je otkrilo da bobice grozdova izloženih suncu mogu imati i deset puta višu vrijednost u odnosu na bobice zasjenjenih grozdova (Spayd *et al.*, 2002).

U cilju konačne procjene razlika u kvalitetu grožđa, primjenjena je diskriminantna analiza na sume šećera, organskih kiselina, antocijanina, flavonola i flavan-3-ola.



Slika 3-17 Diskriminantna analiza za sume šećera, organskih kiselina, antocijanina i flavan-3-ola (isključujući flavonole) za 2008. i 2009. godinu

Od početnih pet parametara isključena je suma flavonola zbog najmanjeg udjela (učesća) u pogledu razlikovanja (diskriminacije) između grupa. Prve dvije kanoničke varijable (ili kanoničke diskriminantne funkcije) objašnjavaju oko 95,0% ukupne disperzije podataka; od čega na prvu otpada 48,4%, a na drugu 46,6%.

Statističke vrijednosti F i p , koje ukazuju na sličnost i različitost u kvalitetu grožđa za obje godine, date su u Tabeli 3-8. Kao što se vidi, ne postoje razlike u kvalitetu grožđa na početku i kraju zadnjeg mjeseca sazrijevanja bilo da se radi o kontroli ili varijanti gdje je primijenjeno folijarno prihranjivanje vinove loze sa PK đubrivom. Na prvi pogled, nivo

značajnosti za C1-09 vs. H1-09 od 0,009 ukazuje na razliku u kvalitetu grožđa. Međutim, uzimajući u obzir ukupan broj poređenja (66), generalno nema razlika u kvalitetu grožđa kontrolne varijante i varijantne folijarno prihranjivane sa PK đubrivom na početku ispitivanog perioda u 2009. godini.

Tabela 3-8 Poređenja između varijanti (F i *p* vrijednosti)

		C1-08	C2-08	C3-08	C1-09	C2-09	C3-09	H1-08	H2-08	H3-08	H1-09	H2-09
C2-08	F	15,49										
	<i>p</i>	0,000										
C3-08	F	46,98	19,63									
	<i>p</i>	0,000	0,000									
C1-09	F	52,75	65,52	81,59								
	<i>p</i>	0,000	0,000	0,000								
C2-09	F	57,04	43,18	41,05	18,47							
	<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,000							
C3-09	F	62,85	32,84	18,93	42,48	8,251						
	<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000						
H1-08	F	0,324	10,82	35,82	48,10	46,95	50,72					
	<i>p</i>	0,861	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					
H2-08	F	37,44	6,834	7,288	79,60	44,24	22,61	27,83				
	<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000				
H3-08	F	52,31	19,96	0,496	89,10	46,36	20,61	40,10	5,788			
	<i>p</i>	0,000	0,000	0,739	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
H1-09	F	41,07	44,96	58,72	3,540	7,041	25,15	36,04	55,89	64,99		
	<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
H2-09	F	73,60	36,47	20,08	52,21	11,89	0,234	58,91	24,25	21,50	32,14	
	<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,919	0,000	0,000	0,000	0,000	
H3-09	F	88,42	47,77	25,54	57,17	14,78	1,792	72,09	33,16	27,14	37,57	1,185
	<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,134	0,000	0,000	0,000	0,000	0,320

3.6. Veze između parametara grožđa i lista

Kao što je prethodno navedeno, primjena folijarnog prihranjivanja sa fosforom i kalijumom ubrzala je akumulaciju šećera i antocijanina u grožđu 'Kardinala', što je utvrđeno za obje godine. Mimo toga, razlike u vrijednostima ispitivanih parametara u grožđu iz 2008. godine u odnosu na 2009. bile su posljedica sezonskih razlika, prije svega

temperature (odjeljak 3.4.4.). U vezi sa tim, postoji mogućnost da su se i razlike u snabdjevenosti vinove loze hranljivim elementima (na šta ukazuju evidentirane razlike u sadržaju hranljivih elemenata u listu vinove loze) odrazile na primarni i sekundarni metabolizam u vinovoj lozi. U cilju razumijevanja međusobnih veza primarnih i sekundarnih metabolita sa hranljivim elementima urađena je analiza principalne komponente sa podacima za obje ispitivane godine. U prvu statističku analizu su uključeni parametri određeni u listu vinove loze i odgovarajućem grožđu istovremeno uzetim u prvom terminu (na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja). Imajući u vidu da je u trećem terminu (kraj sazrijevanja) dostignut najviši nivo šećera, urađena je i druga statistička analiza sa parametrima u listu iz prvog termina i parametrima u grožđu iz trećeg termina. Sadržaj sumpora je isključen iz pomenute obrade, s obzirom da je u većem broju uzoraka lista iz 2009. godine bio ispod granice detekcije.

PCA nakon varimaks rotacije izdvaja šest komponenti koje objašnjavaju 92,26% varijanse podataka (Tabela 3-9). Među primarnim metabolitima najbolje je objašnjena varijabilnost sadržaja saharoze sa 98,8%, dok vinska kiselina ima najnižu vrijednost komunalne varijanse 89,5%; od sekundarnih metabolita miricetin heksozid ima maksimalnih 99,6%, a malvidin 3-*O*-glukozid minimalnih 86,4%; a u slučaju hranljivih elemenata navedenih šest komponenti objašnjavaju između 77,4% varijanse za B i 94,7% za Zn.

Generalno gledano, u prvoj komponenti visoke i relativno visoke pozitivne vrijednosti saturacije imaju primarni i sekundarni metaboliti, izuzev proantocijanidin trimera, miricetin heksozida 1, miricetin heksozida 1, malvidin 3-*O*-glukozida, proantocijanidin dimera 2 i 3 i epikatehina. Visoke vrijednosti saturacije imaju: kvercetin 3-*O*-galaktozid, rutin, jabučna kiselina, kvercetin 3-*O*-glukozid, kvercetin 3-*O*-glukuronid, vinska kiselina, saharoza, kempferol heksozid, proantocijanidin dimer 1, katehin i miricetin heksozid 2. Od nutrijenata izdvajaju se Cu, B i Zn, i djelimično Mg sa pozitivnom vrijednošću saturacije, dok Ca pokazuje obrnuto proporcionalnu vezu sa PC1, a N ima relativno visoku negativnu vrijednost saturacije.

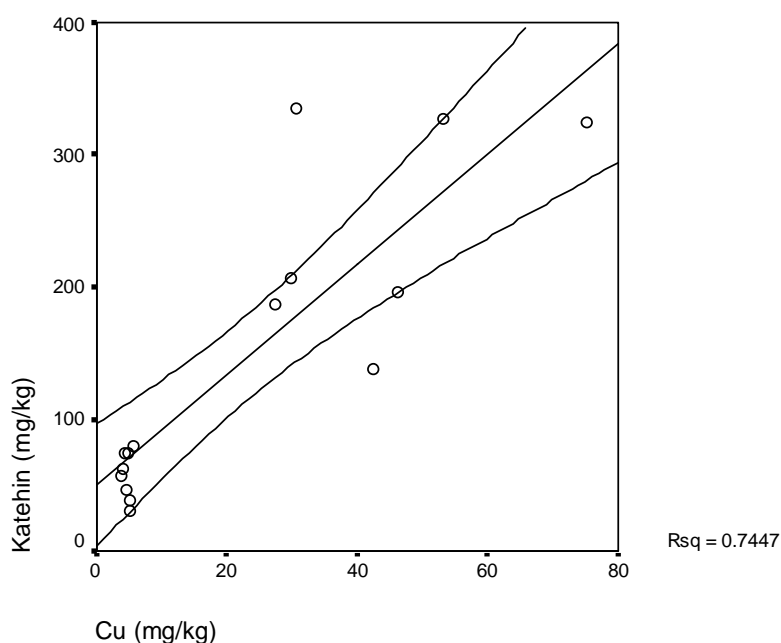
REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 3-9 PCA nakon varimaks rotacije za list i grožđe na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	Komun. varijansa
Jedinstvena vrijednost	11,35	7,64	4,74	2,82	2,14	1,75	
Kumul. (%)	34,40	57,55	71,93	80,48	86,96	92,26	
Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid	0,876	0,304	0,219	0,149	0,169	-0,103	0,969
Rutin	0,861	0,177	0,360	0,226	0,158	-0,062	0,982
Jabučna kiselina	0,838	0,380	0,316	0,099	0,103	0,072	0,972
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid	0,821	0,424	0,123	0,183	-0,006	-0,160	0,929
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukuronid	0,815	0,095	0,423	0,224	-0,085	-0,050	0,913
Vinska kiselina	0,792	0,242	0,308	0,200	0,270	-0,040	0,895
Cu	0,768	0,388	0,211	-0,125	0,203	0,170	0,871
Saharoza	0,761	0,443	0,313	0,122	0,310	-0,061	0,988
Kempferol heksozid	0,752	0,559	0,039	0,196	-0,088	-0,079	0,933
Ca	-0,745	-0,014	-0,332	0,116	-0,264	0,197	0,787
Proantocijanidin dimer 1	0,715	0,377	0,331	0,393	0,189	0,098	0,962
B	0,647	0,266	-0,002	0,320	0,313	0,290	0,774
Katehin	0,638	0,441	0,473	-0,175	0,149	0,206	0,921
Miricetin heksozid 2	0,631	0,304	0,616	0,121	0,251	-0,086	0,955
Zn	0,598	0,152	0,052	0,493	-0,424	0,374	0,947
Proantocijanidin trimer	-0,094	0,957	0,125	-0,156	0,065	0,133	0,986
Miricetin heksozid 1	0,211	0,942	0,097	0,161	0,069	-0,155	0,996
Peonidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,421	0,869	0,130	0,106	0,141	-0,084	0,987
Cijanidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,533	0,779	0,079	0,103	0,010	0,018	0,908
Petunidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,532	0,732	0,380	-0,072	0,118	0,027	0,983
Delfinidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,571	0,686	0,363	0,073	0,140	-0,018	0,953
Fruktoza	0,485	0,660	0,240	0,074	0,458	-0,018	0,944
Glukoza	0,490	0,633	0,196	0,126	0,493	-0,018	0,938
Fe	-0,382	-0,510	-0,507	-0,465	-0,108	-0,127	0,908
Mg	0,433	0,053	0,839	-0,023	0,104	-0,193	0,943
Malvidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,130	0,312	0,836	-0,122	0,134	-0,133	0,864
K	-0,399	-0,139	-0,586	-0,228	-0,492	-0,088	0,823
N	-0,470	-0,003	-0,568	-0,466	0,021	-0,362	0,892
Proantocijanidin dimer 2	0,391	0,493	0,495	-0,289	-0,102	0,455	0,942
P	-0,069	0,100	0,049	-0,915	0,062	0,023	0,859
Epikatehin	0,390	0,445	-0,052	0,673	0,301	-0,208	0,939
Mn	0,352	0,310	0,431	-0,108	0,690	-0,077	0,899
Proantocijanidin dimer 3	-0,166	-0,095	-0,161	-0,015	-0,021	0,906	0,884

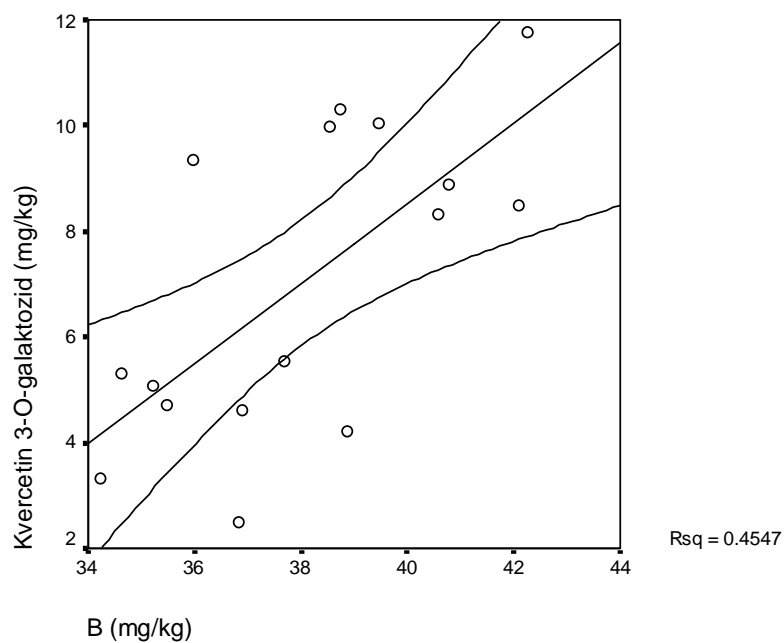
Ovi rezultati ukazuju da bi u opsegu optimalne snabdjevenosti veoma bitno bilo da sadržaj Mg, Cu, Zn i B (elemenata sa pozitivnom saturacijom) bude relativno viši, jer bi se

time pozitivno uticalo na kvalitet grožđa. U odjeljku 2.5. je opisan značaj i uloga ovih elemenata u fiziološkim procesima vinove loze. Naime, poznata je uloga hlorofila u fotosintetskoj aktivnosti, odnosno značaj Cu i Zn u proizvodnji hlorofila, i Mg kao hlorofilne komponente. Pored toga, treba uzeti u obzir i mogućnost povećane sinteze pojedinih sekundarnih metabolita nakon primjene preparata na bazi bakra u zaštiti vinove loze, što je bio slučaj 2009. godine (Tabela 3-2, Slika 3-18). Istraživanja sa drugim biljnim vrstama su pokazala da je kao posljedica folijarne primjene Cu^{2+} nađena viša koncentracija kumarina (Kovačik *et al.*, 2007).

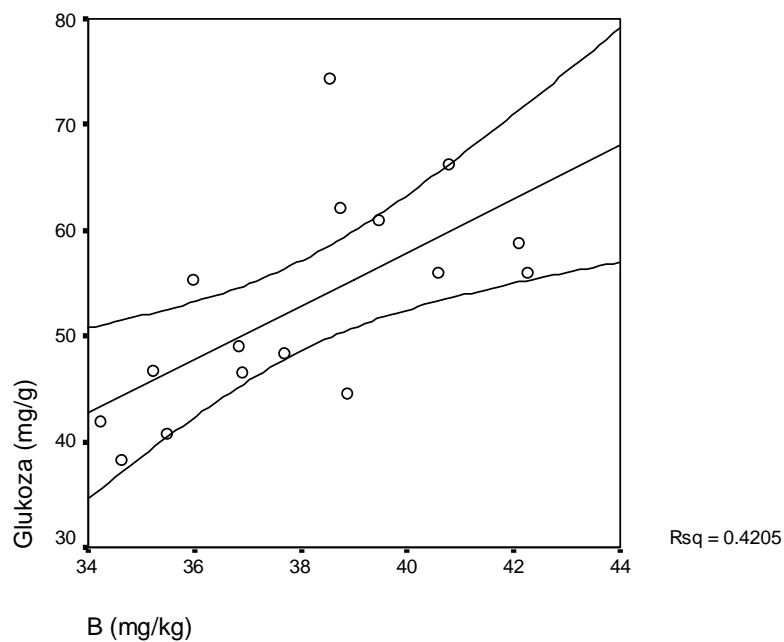


Slika 3-18 Korelacioni dijagram za pokožicu i list: katehin vs. Cu (prvi termin)

U cilju objašnjenja dobijenih pozitivnih korelacija između B i većine ispitivanih jedinjenja (Slike 3-19 i 3-20), važno je istaći njegovu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata i sintezi proteina. Generalno, bor utiče na fotosintetski kapacitet biljke, a u nedostatku B usporen je transport proizvoda fotosinteze, što dovodi do nagomilavanja u listu i usporavanja novih sinteza.



Slika 3-19 Korelacioni dijagram za pokožicu i list: kvercetin 3-*O*-galaktozid vs. B (prvi termin)



Slika 3-20 Korelacioni dijagram za grožđe i list: glukoza vs. B (prvi termin)

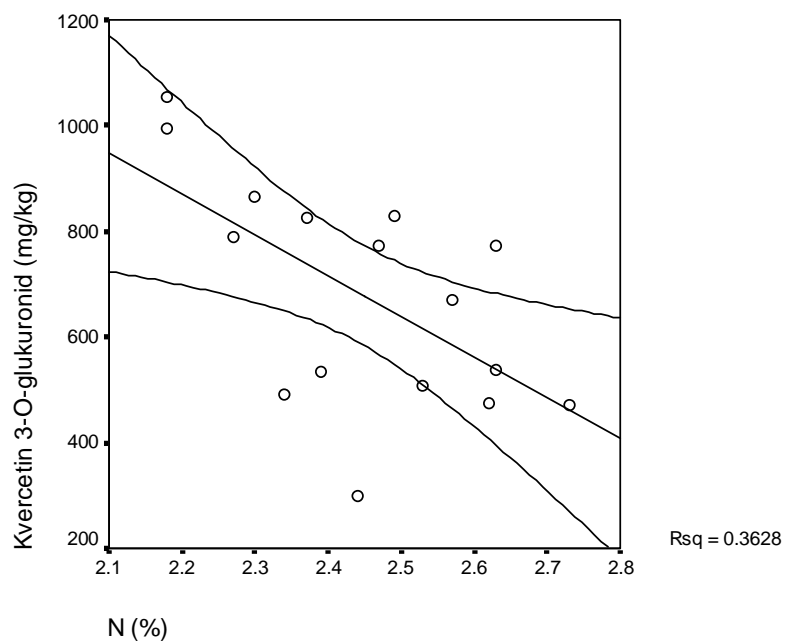
Pozitivna veza između bora i saharoze u listu primijećena je kod sadnica agruma (Han *et al.*, 2008). U ovoj studiji utvrđena je visoko značajna pozitivna korelacija sadržaja bora u listu sa sadržajem saharoze, glukoze (Slika 3-20) i fruktoze u grožđu.

I pored toga što su količine primijenjenih đubriva bile odgovarajuće, na šta ukazuje i optimalan sadržaj N u listu, ipak su utvrđene negativne korelacije – statistički značajne u slučaju većine flavonola (Slika 3-21), kao i vinske kiseline (Slika 3-22) i jabučne, a sa relativno visokim stepenom značajnosti u slučaju proantocijanidin dimera 1 i 2, ali i saharoze kao transportnog oblika šećera iz lista u plod.

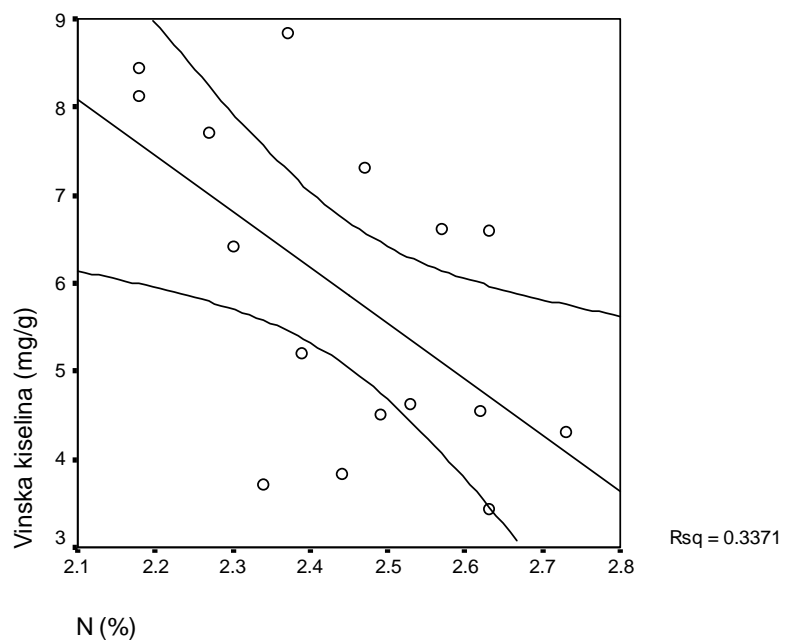
Istraživanja zasnovana na praćenju uticaja primjene azotnih đubriva na kvalitet grožđa su pokazala da se kod većih količina N smanjuje sadržaj čvrstih rastvorljivih supstanci (Lović, 1984; Matin *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2004; Conradie, 2001; Christensen *et al.*, 1994; Ahlawat, 1988; Ruhl *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 1998). S druge strane, u uslovima smanjene pristupačnosti azota može rasti aktivnost fenilalanin liaze, inicijalnog enzima u fenilpropanoidnoj sintezi, a time i sadržaj fenolnih jedinjenja zbog smanjene potrošnje proteina uključenih u rast. Amonijum jon oslobođen aktivnošću PAL može biti efikasno asimilovan kako bi se proizvodio arogenat, fenilalanin i tirozin, a ugljenični skelet *trans*-cinamata može biti uključen u različite fenilpropanoidne puteve (Kovačik *et al.*, 2007). To je konzistentno sa rezultatima koji se tiču različitih puteva fenilpropanoidnog metabolizma u uslovima nedostatka N, kao u slučaju flavonola (Stewart *et al.*, 2001).

Ipak, treba imati u vidu da pomenuti efekti nedostatka N se mogu različito odraziti na enzime uključene u puteve biostinteze flavonoida kod različitih biljnih vrsta.

Druga komponenta, PC2, je uglavnom opisana sa antocijaninima izuzev malvidin 3-*O*-glukozida, proantocijanidin trimerom, glukozom i fruktozom, djelimično sa proantocijanidin dimerom 2, epikatehinom, kvercetin 3-*O*-glukozidom, saharozom i kempferol heksozidom (Tabela 3-9). Gvožđe ima relativno visoku negativnu vrijednost saturacije.



Slika 3-21 Korelacioni dijagram za pokožicu i list: kvercetin 3-*O*-glukuronid vs. N (prvi termin)

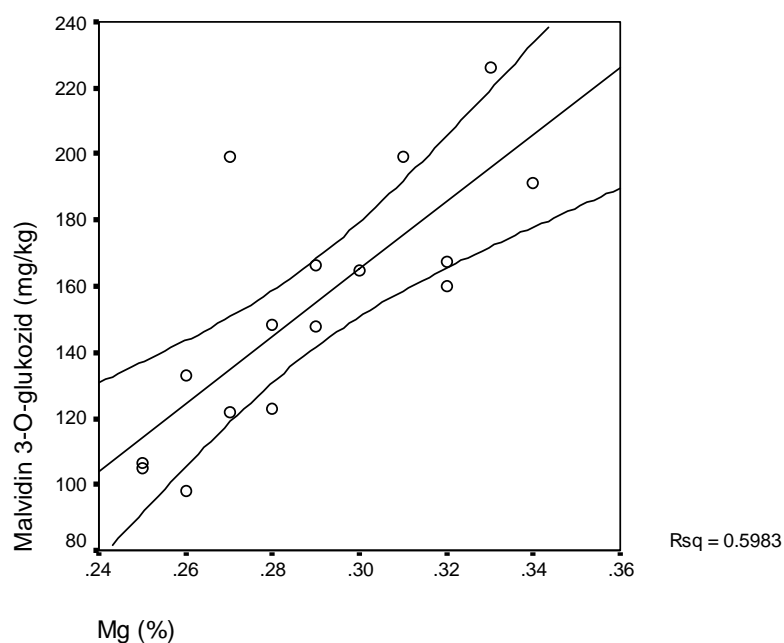


Slika 3-22 Korelacioni dijagram za grožđe i list: vinska kiselina vs. N (prvi termin)

Rezultati prostih korelacija između Fe i ispitivanih fenolnih jedinjenja (izuzev proantocijanidin dimera 3), organskih kiselina i šećera pokazuju statistički značajnu obrnuto proporcionalnu vezu. Imajući u vidu da u biosintezi antocijanina Fe ima ulogu kofaktora nekih enzima (He *et al.*, 2010), očekivana je pozitivna korelacija. Međutim, treba uzeti u obzir da ukupni sadržaj gvožđa u listu često ne oslikava stanje obezbijedenosti biljke i da je u tu svrhu bolje određivati sadržaj Fe^{2+} u svježem biljnom materijalu. He *et al.* (2010) navode da katalizom antocijanidin sintaze, uz pomoć Fe^{2+} , bezbojni leukoantocijanidini mogu biti oksidovani do obojenih antocijanina.

Dobijena negativna zavisnost može biti i posljedica međusobne negativne korelacije između sadržaja Fe i Zn u listu. Esparza *et al.* (2004) su dobili negativnu korelaciju između sadržaja Fe i ukupnih polifenola i antocijanina u vinu. Što se tiče glukozyda jasne su veze antocijanina sa glukozom, koja je s druge strane u pozitivnoj korelaciji sa fruktozom. Poznata je veza između šećera i antocijanina, bilo da igraju ulogu induktora gena uključenih u biosintezu antocijanina ili da su važni samo kao supstrati za nastanak antocijanina (He *et al.*, 2010).

U PC3 se grupišu malvidin 3-*O*-glukozid i miricetin heksozid 2, kao i djelimično kvercetin 3-*O*-glukuronid i katehin sa pozitivnim vrijednostima saturacije (Tabela 3-9). Od hranljivih elemenata visoku pozitivnu vrijednost saturacije ima Mg i djelimično Mn, dok Fe, K i N imaju relativno visoku negativnu saturaciju. Ovi rezultati ukazuju na pozitivni uticaj Mg u stvaranju pomenutog antocijanina (Slika 3-23).



Slika 3-23 Korelacioni dijagram za pokožicu i list: malvidin 3-*O*-glukozid vs. Mg (prvi termin)

Rezultati istraživanja koja pokazuju negativan uticaj prekomjernog đubrenja sa N i K na obojenost grožđa (Delgado *et al.*, 2004) se ne mogu dovesti u vezu sa primijećenim negativnim trendom između malvidin 3-*O*-glukozida i N i K, jer su koncentracije pomenutih nutrijenata bile na optimalnom nivou.

Uzimajući u obzir rezultate prostih korelacija može se reći da epikatehin i cink pokazuju direktno proporcionalnu vezu, dok je veza sa P negativna ali ne i statistički značajna. Pomenuti parametri opisuju četvrtu komponentu, u kojoj relativno visoke negativne vrijednosti saturacije imaju i N i Fe.

Peta i šesta komponenta u poređenju sa prethodnim komponentama u malom stepenu doprinose objašnjavanju varijanse podataka.

Generalno, imajući u vidu bitan uticaj klimatskih uslova na primarni i sekundarni metabolizam, ali i da klimatski uslovi mogu uticati na usvajanje hranljivih elemenata, promjene u vrijednostima ispitivanih parametara grožđa je opravdano smatrati za posljedicu

njihovog uzajamnog uticaja. Naročito jer je tokom 2008. godine u već navedenom periodu temperatura bila znatno viša u odnosu na isti period 2009. godine. Ipak, pomenute veze izdvajaju i ukazuju na mogući uticaj pojedinih elemenata na metabolizam šećera, kiselina i flavonoida u datim agroekološkim uslovima.

U cilju daljeg proučavanja veza između hranljivih elemenata u listu vinove loze na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja i parametara kvaliteta grožđa u zreлом stanju (sa najvišim sadržajem šećera), ponovo je urađena PCA (Tabela 3-10).

PCA nakon varimaks rotacije izdvaja sedam komponenti koje objašnjavaju 92,21% varijanse podataka. Varijabilnost primarnih metabolita je objašnjena sa preko 94%, a sekundarnih metabolita sa maksimalnih 99,2% kod proantocijanidin dimera 2 i minimalnih 82,1% kod malvidin 3-*O*-glukozida. Od hranljivih elemenata najbolje je objašnjena varijabilnost Mn sa 97,9%, dok kod Ca navedenih sedam komponenti objašnjavaju svega 79,6% varijanse.

Prva komponenta je opisana sa sljedećim metabolitima: saharozom, jabučnom kiselinom, katehinom, vinskom kiselinom, miricetin heksozidom 2, proantocijanidin dimerom 1, a djelimično i sa proantocijanidin dimerom 2 i epikatehinom. Od hranljivih elemenata, PC1 je u pozitivnoj korelaciji sa Mn, Mg i Cu, i B ima relativno visoku vrijednost saturacije, a negativnoj sa K, Ca i Fe, kao i u znatnoj mjeri sa N.

Tabela 3-10 PCA nakon varimaks rotacije za list na početku i grožđe na kraju sazrijevanja

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	Komun. varijansa
Jedinstvena vrijednost	8,00	7,14	5,03	3,28	3,23	2,06	1,69	
Kumul. (%)	24,23	45,86	61,10	71,05	80,84	87,08	92,21	
K	-0,887	-0,064	-0,073	-0,172	0,058	-0,061	0,006	0,834
Mn	0,887	0,152	-0,183	-0,201	-0,081	0,093	-0,283	0,979
Mg	0,860	0,001	0,045	-0,028	0,001	0,103	0,385	0,901
Saharoza	0,773	0,195	-0,466	0,266	0,124	-0,008	0,016	0,940
Ca	-0,680	-0,230	0,361	-0,016	-0,030	0,356	-0,152	0,796
Jabučna kiselina	0,679	0,261	-0,547	0,260	0,200	0,118	0,062	0,954
Katehin	0,670	0,342	-0,457	0,362	0,214	0,022	0,115	0,966
Vinska kiselina	0,669	0,137	-0,546	0,216	0,298	0,134	0,190	0,954
Fe	-0,645	-0,181	0,135	-0,525	-0,037	-0,247	-0,232	0,859
Miricetin heksozid 2	0,645	0,576	0,070	0,085	0,357	0,000	-0,245	0,947
Proantocijanidin dimer 1	0,632	0,363	-0,134	0,239	0,506	-0,205	0,025	0,905
Cu	0,616	0,317	-0,559	0,188	0,013	-0,235	0,196	0,922
Petunidin 3- <i>O</i> -glukozid	-0,009	0,946	0,155	0,093	-0,062	0,193	0,111	0,980
Delfinidin 3- <i>O</i> -glukozid	-0,027	0,910	0,250	0,099	0,014	0,135	-0,073	0,925
Miricetin heksozid 1	0,280	0,898	-0,071	0,192	0,064	0,108	0,135	0,960
Peonidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,339	0,863	-0,129	0,269	0,017	0,055	0,075	0,958
Cijanidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,219	0,797	0,085	0,477	-0,018	0,144	0,095	0,947
Malvidin 3- <i>O</i> -glukozid	0,120	0,780	-0,002	-0,424	0,116	-0,028	0,064	0,821
Epikatehin	0,463	0,705	-0,115	0,283	0,300	0,206	0,153	0,959
Proantocijanidin dimer 2	0,586	0,628	-0,318	0,234	0,273	0,081	0,134	0,992
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid	-0,143	0,164	0,867	0,018	0,371	-0,121	0,075	0,958
Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid	-0,256	0,034	0,862	-0,030	0,352	-0,096	0,074	0,950
Kempferol heksozid	0,130	0,025	0,851	0,097	0,385	-0,175	0,088	0,939
Proantocijanidin trimer	-0,344	0,269	0,766	-0,050	-0,263	-0,038	-0,107	0,862
Zn	0,038	0,421	-0,197	0,745	0,075	0,127	0,315	0,894
P	-0,031	-0,081	-0,323	-0,687	-0,397	-0,057	0,370	0,882
N	-0,514	-0,146	0,018	-0,685	0,206	-0,051	-0,148	0,821
B	0,461	0,392	-0,245	0,556	0,029	-0,281	-0,076	0,821
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukuronid	-0,037	0,010	0,281	-0,026	0,930	-0,083	0,019	0,953
Rutin	0,162	0,089	0,158	0,047	0,914	0,027	0,207	0,941
Glukoza	-0,031	0,292	-0,144	0,064	-0,074	0,914	-0,015	0,951
Fruktoza	0,280	0,431	-0,327	0,108	-0,017	0,762	0,101	0,973
Proantocijanidin dimer 3	0,178	0,270	0,074	0,123	0,256	0,024	0,889	0,981

Značajnom ulogom Mg kao primarne komponente hlorofila, koji je samim tim aktivno uključen u fotosintezu, kao i Mn i Cu neophodnih za sintezu hlorofila, može se na indirektan način objasniti veza između ovih nutrijenata i pomenutih sekundarnih metabolita

(uglavnom flavan-3-ola). S druge strane, dobijene negativne korelacije između K i kiselina potvrđuju rezultate mnogih istraživanja koja su pokazala negativan uticaj kalijuma na kiselost uopšte (kojoj u najvećoj mjeri doprinose vinska i jabučna kiselina). Ipak, kao što je već napomenuto, u slučaju organskih kiselina ne smije se zaboraviti posebno jak uticaj klimatskih uslova na njihov metabolizam, a naročito jabučne kiseline (Jackson, 2000; Liu *et al.*, 2006).

Drugu komponentu opisuju svi analizirani antocijanini, miricetin heksozid 1, epikatehin i proantocijanidin dimer 2, a djelimično i miricetin heksozid 2, kao i fruktoza. Među hranljivim elementima uočava se relativno visoka vrijednost saturacije za Zn. Ipak, nije nađena statistički značajna korelacija između ovih fenolnih jedinjenja i Zn, iako najvišu vrijednost Pirsonovog koeficijenta ima veza sa epikatehinom i cijanidin 3-*O*-glukozidom. Esparza *et al.* (2004) nalaze statistički značajnu korelaciju Zn i Cu sa cijanidin 3-*O*-glukozidom u vinu, što objašnjavaju njegovom hemijskom strukturom. Naime, cijanidin 3-*O*-glukozid ima 2 hidroksilne grupe u *orto*- položaju koje omogućavaju lakše formiranje kompleksa.

Treća komponenta korelira sa kvercetin 3-*O*-glukozidom, kvercetin 3-*O*-galaktozidom, kempferol heksozidom i proantocijanidin trimerom, dok su relativno visoke negativne vrijednosti saturacije utvrđene za jabučnu i vinsku kiselinu, katehin i saharozu, kao i Cu. Smatra se da je uspostavljena obrnuto proporcionalna veza pomenutih flavonola i proantocijanidin trimera sa bakrom posljedica njihove korelacije sa organskim kiselinama, katehinom i saharozom. Prethodno su u slučaju PC1 objašnjene pomenute veze.

Vrijednosti saturacije u četvrtoj komponenti ukazuju na obrnuto proporcionalne veze između Zn sa makronutrijentima N i P, i u znatno visokom stepenu B sa Fe. Od metabolita relativno visoku vrijednost imaju antocijanini: cijanidin 3-*O*-glukozid pozitivnu i malvidin 3-*O*-glukozid negativnu. Rezultati Pirsonove korelacije pokazuju pozitivnu vezu cijanidin 3-*O*-glukozida sa B (statistički značajnu) i Zn i Cu, a negativnu sa Fe (statistički značajnu), dok malvidin 3-*O*-glukozid nije u vezi sa bilo kojim hranljivim elementom. O vezi cijanidin 3-*O*-glukozida sa Zn i Cu već je prethodno diskutovano.

Kao što se vidi iz Tabele 3-10, preostale tri komponente nemaju visoke vrijednosti saturacije za bilo koji od ispitivanih hranljivih elemenata, već su opisane sa sekundarnim i primarnim metabolitima, i to:

- PC5 sa kvercetin 3-*O*-glukuronidom i rutinom i djelimično proantocijanidin dimerom 1,
- PC6 sa glukozom i fruktozom i
- PC7 sa proantocijanidin dimerom 3.

Navedeni rezultati upućuju na dalje istraživanje uticaja elemenata značajnih za sintezu hlorofila, odnosno veze između sadržaja hlorofila u listu vinove loze i fenolnih jedinjenja u grožđu. Naročito treba obratiti pažnju na proučavanje uticaja Fe na sadržaj antocijanina odnosno fenolnih jedinjenja uopšte.

3.7. Dopunska ispitivanja

3.7.1. Promjene sadržaja fenolnih jedinjenja u sjemenkama

Globalno, kada je u pitanju stono grožđe, zahtjevi potrošača su uglavnom okrenuti ka besjemenim sortama. Međutim, ostaje diskutabilno da li su besjemene sorte grožđa jednako zdrave za organizam u odnosu na sorte sa sjemenkama. Sjemenke grožđa su bogate flavan-3-olima, kao najvažnijim antioksidansima u grožđu, koji pokazuju i antimikrobna, antikarcinogena, antiinflamatorna svojstva (Kalin *et al.*, 2002; Eng *et al.*, 2003; Jayaprakasha *et al.*, 2003; Stanković *et al.*, 2008). Novije studije su pokazale da redovno korišćenje suplemenata na bazi katehina u dnevnoj količini od 7,5 mg je povezana sa tendencijom od 20% smanjenja rizika od smrti usljed ishemičnog oboljenja srca (Arts *et al.*, 2001). Pored flavan-3-ola monomera (Bell *et al.*, 2000), postoji evidencija da se i proantocijanidini apsorbuju u krvotok (Holt *et al.*, 2002). Grožđe koje sadrži sjemenke može biti posebno upotrebljivo u pripremi soka, zbog mogućnosti "obogaćivanja" flavan-3-olima iz sjemenki tokom postupka gnječenja (Cantos, 2002). Drugu veoma značajnu mogućnost predstavlja upotreba u pripremi dijetetskih suplemenata na bazi ekstrakta sjemenki (Jayaprakasha *et al.*, 2001).

S obzirom na cilj ovog istraživanja, a imajući u vidu prethodno navedene benefite urađena je analiza sjemenki 'Kardinala'. Rezultati jednosmjerne analize varijanse su pokazali da ne postoji razlika između kontrole i varijante sa folijarnom prihranom u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja u sjemenkama, što je bio dovoljan razlog da se podaci objedine i obrade po terminima. Koncentracije analiziranih fenolnih jedinjenja su predstavljene u Tabeli 3-11. U sjemenkama 'Kardinala' najviše koncentracije imali su: galna kiselina, metil-galat i monomerni flavan-3-oli. Razlike u koncentraciji fenolnih jedinjenja u sjemenkama tokom zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa su evidentne. Sadržaji katehina, proantocijanidin dimera 2, proantocijanidin trimera, epikatehina, proantocijanidin dimer monogalata i epikatehin galata opadali su od prvog do drugog termina, a potom se statistički značajno nisu mijenjali, dok su za metil-galat i proantocijanidin dimere 1 i 3 bili

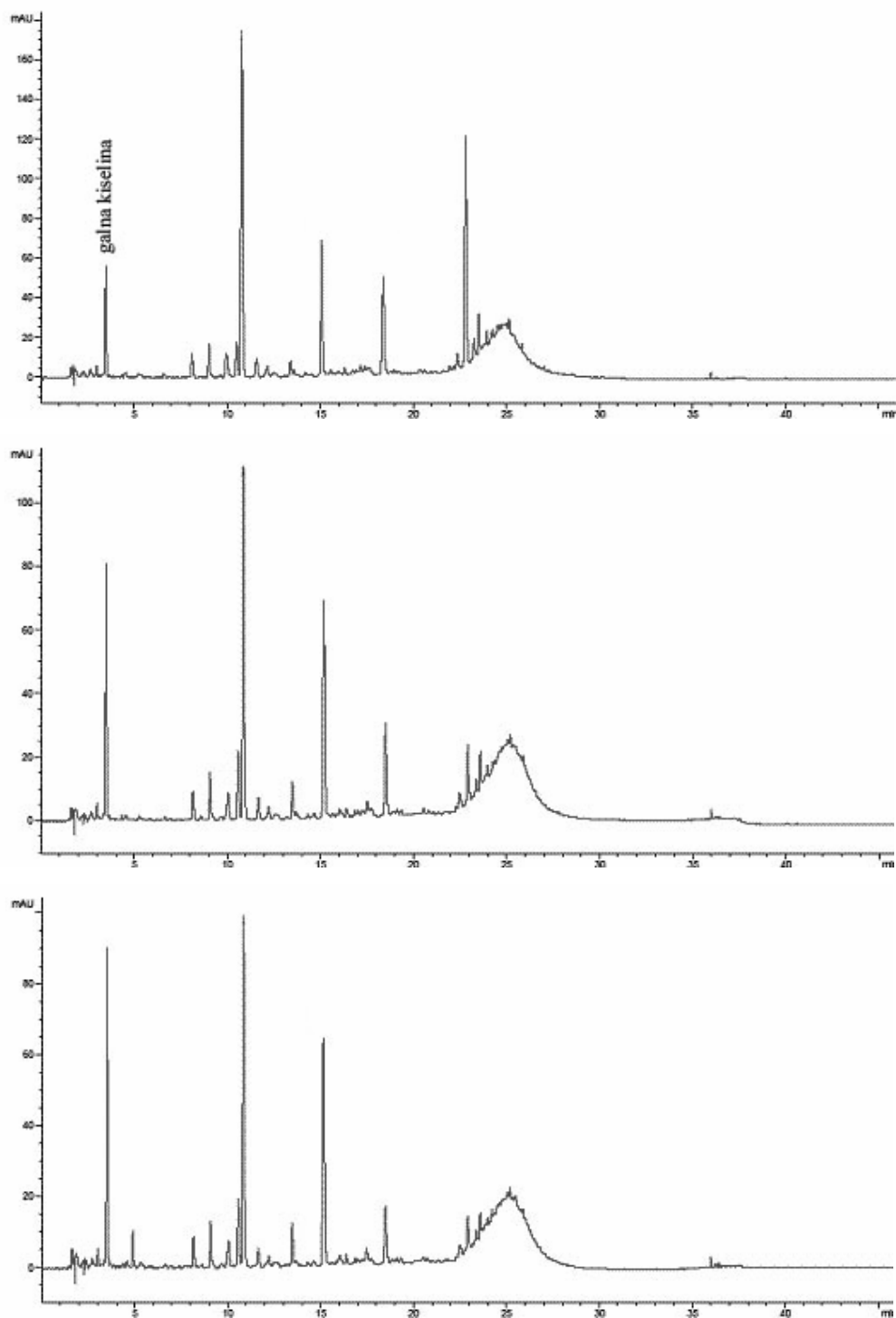
na istom nivou tokom posmatranog perioda. S druge strane, koncentracija galne kiseline značajno je rasla od početka do kraja zadnjeg mjeseca sazrijevanja (Slika 3-24).

Tabela 3-11 Sadržaj fenolnih jedinjenja u sjemenkama u mg/kg suve mase

Datum	16. jul 2008.	30. jul 2008.	13. avgust 2008.
Galna kiselina	1532,5 ± 90,8a	1842,5 ± 180,2ab	2080,0 ± 139,6b
Proantocijanidin dimer 1	203,8 ± 13,5a	153,8 ± 19,5a	138,8 ± 32,3a
Proantocijanidin dimer 2	197,4 ± 21,0b	126,1 ± 14,9a	151,8 ± 7,8ab
Metil-galat	930,0 ± 79,3a	792,5 ± 77,5a	902,5 ± 48,5a
Katehin	1426,3 ± 144,6b	901,3 ± 114,9a	780,0 ± 70,7a
Proantocijanidin trimer	147,5 ± 11,0b	102,5 ± 17,5a	120,0 ± 12,8ab
Proantocijanidin dimer 3	111,3 ± 8,1a	113,8 ± 10,8a	136,3 ± 8,4a
Epikatehin	801,3 ± 59,8b	593,8 ± 76,5a	632,5 ± 33,7ab
Proantocijanidin dimer monogalat	501,3 ± 50,4b	241,3 ± 37,2a	152,5 ± 18,3a
Epikatehin galat	955,0 ± 128,3b	182,5 ± 40,3a	165,0 ± 15,7a

Različita slova u svakom redu označavaju značajne razlike između prosječnih vrijednosti za $p < 0,05$.

Istraživanja sjemenki grožđa su pokazala da sadržaj ekstraktabilnih monomera flavan-3-ola (Mr: 290–442) i tanina male molekulske mase (Mr: <900) opada tokom sazrijevanja (Kennedy *et al.*, 2000; Braidot *et al.*, 2008; Obreque-Slier *et al.* 2010). Odnos između katehina i epikatehina (koji zavisi od sorte) je u sjemenkama 'Kardinala' opadao od 1,8 do 1,2 tokom zadnjeg mjeseca sazrijevanja. Slično tome, Gođevac *et al.* (2010) su u sjemenkama nekih sorti grožđa utvrdili vrijednost odnosa katehin/epikatehin između 1 i 2. Za 'Muskat Hamburg' kao najrasprostranjeniju stonu sortu u Srbiji, pomenuti odnos iznosio je 1,25. Sa stanovišta relativnog udjela flavanolnih monomera, utvrđene su relativno velike promjene naročito između prvog i drugog termina, ali ne i između drugog i trećeg. Naime, tokom zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa udio (%) katehin: epikatehin: epikatehin galat je bio sljedeći – 45: 25: 30; zatim 54: 35: 11 i 50: 40: 10. Kennedy *et al.* (2000) smatraju da su razlike u relativnom udjelu monomernih flavan-3-ola dosljedne i u jakoj vezi sa varijetetom i vremenom sazrijevanja.



Slika 3-24 Hromatogrami ($\lambda=280$ nm) ekstrakata sjemenki iz prvog, drugog i trećeg termina

U poređenju sa sjemenkama 'Kardinala' na kraju sazrijevanja, sjemenke 'Muskat Hamburga' (Gođevac *et al.*, 2010) imale su znatno nižu koncentraciju galne kiseline, metilgalata i epikatehin galata, ali višu koncentraciju katehina i epikatehina. Fuleki & Ricardo da Silva (1997) su izmjerili slične koncentracije za katehin u sjemenkama vinskih sorti 'Merlo' i 'Rizling', kao i za epikatehin u 'Kaberne Sovinjonu' i 'Rizlingu'.

3.7.2. Veze između parametara sjemenke i lista

Umjesto analize principalne komponente zbog relativno malog broja podataka o sadržaju fenolnih jedinjenja u sjemenci, urađena je prosta korelaciona analiza sa sadržajem hranljivih elemenata u listu (Tabela 3-12). Na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa dobijena je pozitivna korelacija između sadržaja kalijuma u listu vinove loze i svih fenolnih jedinjenja, među kojima je statistički značajna sa galnom kiselinom (Slika 3-25), metilgalatom, katehinom, proantocijanidin trimerom, proantocijanidin dimerom 3 i epikatehinom (Slika 3-26). Nije ustanovljena korelacija sa proantocijanidin dimerom 2. Pored toga, pozitivna korelacija P sa katehinom (Slika 3-27) i epikatehin galatom je statistički značajna, a nađene su i relativno visoke pozitivne vrijednosti korelacionog koeficijenta sa galnom kiselinom, proantocijanidin trimerom i epikatehinom. Negativne korelacije naročito Ca, ali i B sa fenolnim jedinjenjima u sjemenci su posljedica međusobne obrnuto proporcionalne veze između ovih elemenata i K. Inače je poznat antagonizam između K i Ca.

Dobijene pozitivne veze sa fenolnim jedinjenjima mogu se objasniti značajem K i P za brojne fiziološke funkcije uključujući fotosintezu, zatim u enzimskoj aktivaciji, osmoregulaciji, protoku nutrijenata i distribuciji primarnih metabolita, te transferu energije. Kalijum aktivira preko 50 enzima među kojima i enzime koji učestvuju u pentozofosfatnom ciklusu i Krebsovom ciklusu u kojima nastaju prekursori sekundarnih metabolita, a među njima i fenolna jedinjenja.

Korelaciona analiza za sjemenku na kraju zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa (Tabela 3-13) je pokazala da sadržaj nekih fenolnih jedinjenja raste sa porastom sadržaja

Zn u listu na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja. Naime, korelacija je statistički značajna za katehin (Slika 3-28), proantocijanidin trimer i proantocijanidin dimer 3 (Slika 3-29), dok relativno visoku pozitivnu vrijednost korelacionog koeficijenta imaju proantocijanidin dimer 2, epikatehin i epikatehin galat. Cink je neophodan za stvaranje hlorofila i ugljenih hidrata, hormona rasta i enzimskih sistema, i generalno ima važnu ulogu u formiranju sjemena (Milosavljević, 1998; Salisbury & Ross, 1992). Esparza *et al.* (2004) su utvrdili dvostruko veću količinu Zn u sjemenci u odnosu na pokožicu grožđa sorte 'Tempranillo'. Negativna korelacija između Fe i pomenutih jedinjenja je vjerovatno posljedica obrnuto proporcionalne veze između Fe i Zn u listu vinove loze.

REZULTATI I DISKUSIJA

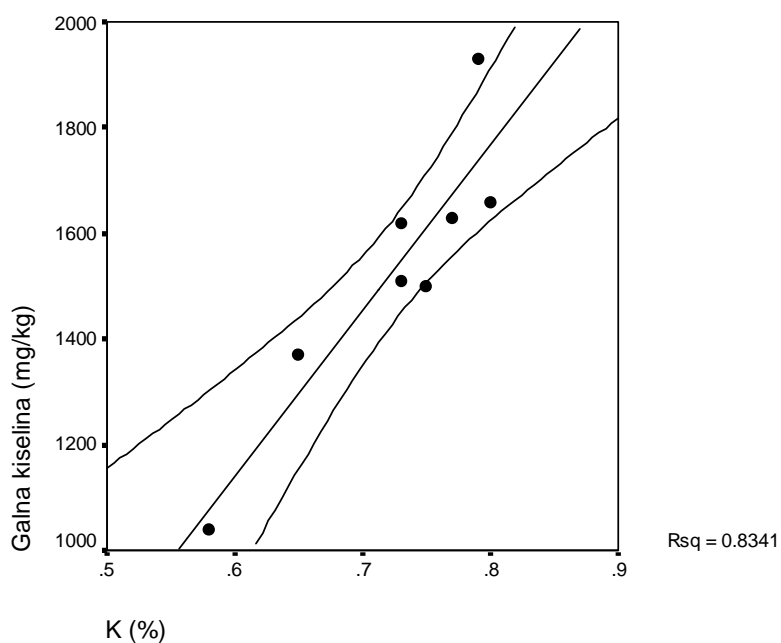
Tabela 3-12 Korelaciona matrica za hranljive elemente u listu i fenolna jedinjenja u sjemenci na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja

	GA	MG	PAD 1	PAD 2	Katehin	PAT	PAD 3	Epikatehin	PADMG	EKG	N	S	K	P	Mg	Ca	Fe	Mn	Zn	Cu	
GA																					
MG	0,942**																				
	0,000																				
PAD 1	0,382	0,487																			
	0,350	0,220																			
PAD 2	-0,108	-0,009	0,788*																		
	0,799	0,983	0,020																		
Katehin	0,660	0,564	0,542	0,277																	
	0,075	0,145	0,165	0,506																	
PAT	0,749*	0,695	0,817**	0,448	0,839**																
	0,032	0,056	0,013	0,266	0,009																
PAD 3	0,610	0,622	0,712**	0,463	0,679	0,827**															
	0,108	0,100	0,048	0,247	0,064	0,011															
Epikatehin	0,892**	0,811*	0,391	0,041	0,767*	0,776*	0,813*														
	0,003	0,014	0,338	0,923	0,026	0,024	0,014														
PADMG	0,466	0,387	0,621	0,560	0,891**	0,800*	0,811*	0,725*													
	0,245	0,344	0,100	0,149	0,003	0,017	0,015	0,042													
EKG	0,509	0,370	0,513	0,291	0,961**	0,798*	0,558	0,612	0,849**												
	0,197	0,366	0,193	0,485	0,000	0,018	0,151	0,107	0,008												
N	0,620	0,392	-0,391	-0,678	0,277	0,157	-0,076	0,475	-0,002	0,248											
	0,101	0,337	0,338	0,064	0,506	0,710	0,859	0,234	0,997	0,553											
S	0,204	0,128	0,267	0,173	0,453	0,437	0,375	0,429	0,526	0,500	0,091										
	0,628	0,762	0,522	0,682	0,260	0,280	0,36	0,289	0,181	0,207	0,831										
K	0,913**	0,848**	0,503	0,124	0,771**	0,836**	0,711**	0,936**	0,686	0,647	0,482	0,539									
	0,002	0,008	0,204	0,769	0,025	0,01	0,048	0,001	0,060	0,083	0,227	0,169									
P	0,681	0,460	0,053	-0,235	0,752*	0,545	0,193	0,598	0,472	0,759*	0,788*	0,234	0,646								
	0,063	0,252	0,901	0,575	0,032	0,162	0,647	0,117	0,238	0,029	0,020	0,577	0,083								
Mg	-0,378	-0,227	-0,419	-0,049	-0,311	-0,600	-0,215	-0,226	-0,175	-0,450	-0,312	-0,360	-0,385	-0,427							
	0,356	0,589	0,301	0,908	0,454	0,116	0,610	0,590	0,679	0,263	0,452	0,381	0,347	0,291							
Ca	-0,782*	-0,794*	-0,312	-0,044	-0,730*	-0,600	-0,706*	-0,909**	-0,677	-0,526	-0,335	-0,372	-0,843**	-0,487	-0,121						
	0,022	0,019	0,451	0,918	0,040	0,116	0,050	0,002	0,065	0,181	0,417	0,364	0,009	0,221	0,776						
Fe	0,455	0,208	-0,216	-0,374	0,128	0,229	0,053	0,436	0,076	0,156	0,775*	0,447	0,500	0,511	-0,522	-0,169					
	0,258	0,621	0,608	0,362	0,763	0,585	0,901	0,281	0,859	0,712	0,024	0,267	0,207	0,195	0,184	0,690					
Mn	-0,366	-0,484	-0,288	-0,304	-0,451	-0,244	-0,221	-0,323	-0,379	-0,279	0,016	0,238	-0,341	-0,281	-0,457	0,581	0,389				
	0,373	0,224	0,489	0,464	0,262	0,560	0,599	0,435	0,354	0,503	0,969	0,570	0,409	0,501	0,254	0,131	0,341				
Zn	-0,66	-0,575	0,148	0,486	-0,077	-0,195	0,019	-0,462	0,127	0,006	-0,778*	-0,272	-0,599	-0,463	0,343	0,361	-0,782*	-0,034			
	0,075	0,136	0,727	0,222	0,856	0,644	0,965	0,250	0,765	0,990	0,023	0,514	0,117	0,248	0,405	0,380	0,022	0,937			
Cu	-0,388	-0,433	0,133	0,457	-0,152	-0,078	-0,405	-0,446	-0,049	0,010	-0,201	0,190	-0,179	-0,045	-0,231	0,483	0,113	0,063	0,038		
	0,343	0,284	0,754	0,255	0,718	0,855	0,319	0,268	0,908	0,982	0,634	0,652	0,672	0,915	0,582	0,226	0,790	0,883	0,929		
B	-0,758*	-0,736*	-0,199	-0,017	-0,616	-0,461	-0,325	-0,674	-0,453	-0,441	-0,506	0,012	-0,710*	-0,666	-0,115	0,773*	-0,177	0,821*	0,459	0,141	
	0,029	0,037	0,637	0,968	0,104	0,250	0,432	0,067	0,259	0,274	0,201	0,977	0,048	0,071	0,787	0,024	0,675	0,012	0,253	0,739	

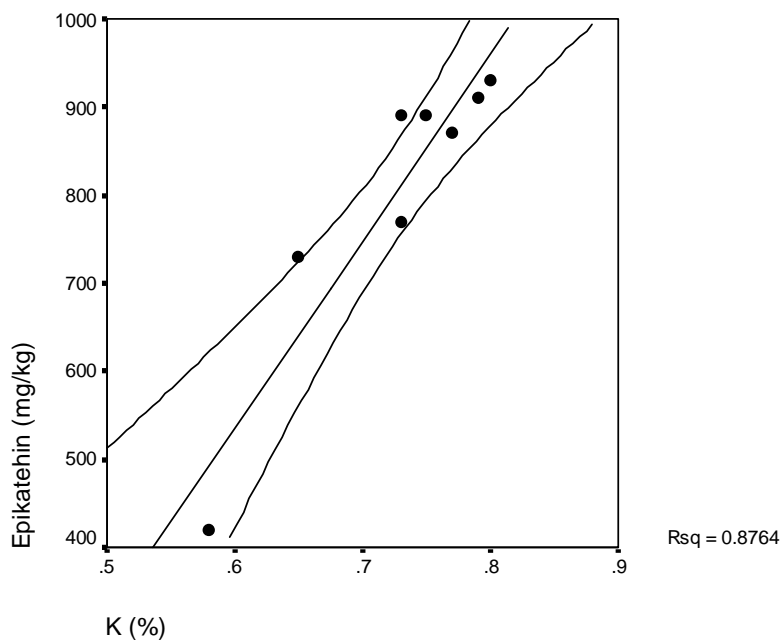
REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 3-13 Korelaciona matrica za hranjive elemente u listu na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja i fenolna jedinjenja u sjemenci na kraju zadnjeg mjeseca sazrijevanja

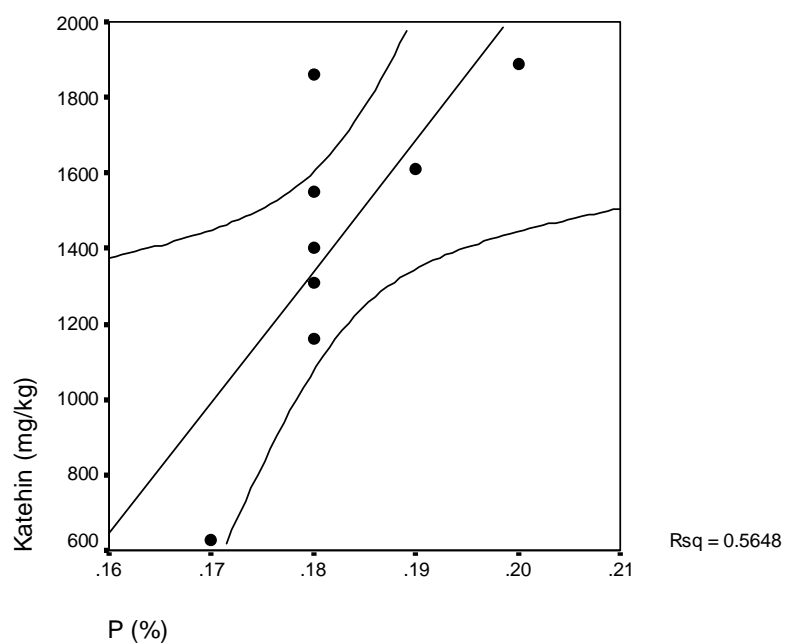
	GA	MG	PAD 1	PAD 2	Katehin	PAT	PAD 3	Epikatehin	PADMG	EKG	N	S	K	P	Mg	Ca	Fe	Mn	Zn	Cu
GA																				
	0,808*																			
MG	0,015																			
	-0,417	-0,139																		
PAD 1	0,304	0,743																		
	-0,287	0,084	0,571																	
PAD 2	0,491	0,844	0,140																	
	0,347	0,492	0,637	0,381																
Katehin	0,399	0,215	0,090	0,352																
	-0,109	0,282	0,517	0,700	0,672															
PAT	0,798	0,499	0,189	0,053	0,068															
	0,399	0,540	0,135	0,435	0,659	0,776														
PAD 3	0,328	0,167	0,750	0,282	0,076	0,024														
	0,604	0,688	0,429	0,249	0,891**	0,405	0,544													
Epikatehin	0,113	0,059	0,288	0,552	0,003	0,320	0,163													
	0,447	0,414	0,137	0,068	0,709*	0,518	0,541	0,522												
PADMG	0,267	0,308	0,747	0,873	0,049	0,189	0,166	0,184												
	0,403	0,415	0,178	0,191	0,768*	0,692	0,748*	0,566	0,945**											
EKG	0,323	0,306	0,674	0,651	0,026	0,057	0,033	0,143	0,000											
	-0,545	-0,389	-0,053	-0,094	-0,602	-0,393	-0,839	-0,570	-0,444	-0,620										
N	0,163	0,341	0,901	0,824	0,114	0,336	0,009	0,140	0,270	0,101										
	-0,146	-0,459	0,312	-0,007	-0,046	-0,499	-0,468	-0,004	-0,224	-0,358	0,091									
S	0,730	0,253	0,452	0,987	0,913	0,209	0,242	0,993	0,594	0,385	0,831									
	-0,016	-0,202	0,124	-0,185	0,016	-0,363	-0,588	0,004	0,295	0,009	0,482	0,539								
K	0,970	0,632	0,769	0,661	0,970	0,376	0,125	0,992	0,478	0,984	0,227	0,169								
	-0,261	-0,018	0,216	0,288	-0,153	-0,133	-0,557	-0,110	-0,109	-0,327	0,788*	0,234	0,646							
P	0,532	0,967	0,607	0,488	0,717	0,753	0,151	0,796	0,797	0,430	0,020	0,577	0,083							
	-0,131	0,065	0,313	-0,137	0,334	0,418	0,365	0,062	0,231	0,307	-0,312	-0,360	-0,385	-0,427						
Mg	0,758	0,878	0,451	0,747	0,419	0,303	0,374	0,884	0,581	0,459	0,452	0,381	0,347	0,291						
	0,075	0,108	-0,436	0,205	-0,325	0,096	0,406	-0,201	-0,430	-0,188	-0,335	-0,372	-0,843	-0,487	-0,121					
Ca	0,859	0,799	0,280	0,626	0,432	0,82	0,319	0,632	0,287	0,656	0,417	0,364	0,009	0,221	0,776					
	-0,618	-0,770*	-0,153	-0,098	-0,734*	-0,542	-0,824*	-0,750*	-0,486	-0,622	0,775*	0,447	0,500	0,511	-0,522	-0,169				
Fe	0,103	0,025	0,718	0,817	0,038	0,165	0,012	0,032	0,222	0,099	0,024	0,267	0,207	0,195	0,184	0,690				
	-0,318	-0,505	-0,145	0,055	-0,447	-0,292	-0,194	-0,295	-0,680	-0,503	0,016	0,238	-0,341	-0,281	-0,457	0,581	0,389			
Mn	0,443	0,202	0,732	0,897	0,267	0,483	0,645	0,478	0,064	0,204	0,969	0,570	0,409	0,501	0,254	0,131	0,341			
	0,215	0,435	0,445	0,605	0,742*	0,797*	0,915**	0,647	0,344	0,582	-0,778*	-0,272	-0,599	-0,463	0,343	0,361	-0,782*	-0,034		
Zn	0,609	0,282	0,270	0,112	0,035	0,018	0,001	0,083	0,404	0,130	0,023	0,514	0,117	0,248	0,405	0,380	0,022	0,937		
	0,148	0,020	-0,381	0,222	-0,322	-0,129	0,177	-0,320	-0,128	-0,141	-0,201	0,190	-0,179	-0,045	-0,231	0,483	0,113	0,063	0,038	
Cu	0,726	0,963	0,352	0,597	0,436	0,761	0,675	0,440	0,762	0,738	0,634	0,652	0,672	0,915	0,582	0,226	0,790	0,883	0,929	
	-0,001	-0,131	-0,081	0,140	-0,068	0,033	0,337	0,055	-0,428	-0,152	-0,506	0,012	-0,710	-0,666	-0,115	0,773*	-0,177	0,821*	0,459	0,141
B	0,998	0,757	0,849	0,740	0,873	0,939	0,415	0,897	0,290	0,719	0,201	0,977	0,048	0,071	0,787	0,024	0,675	0,012	0,253	0,739



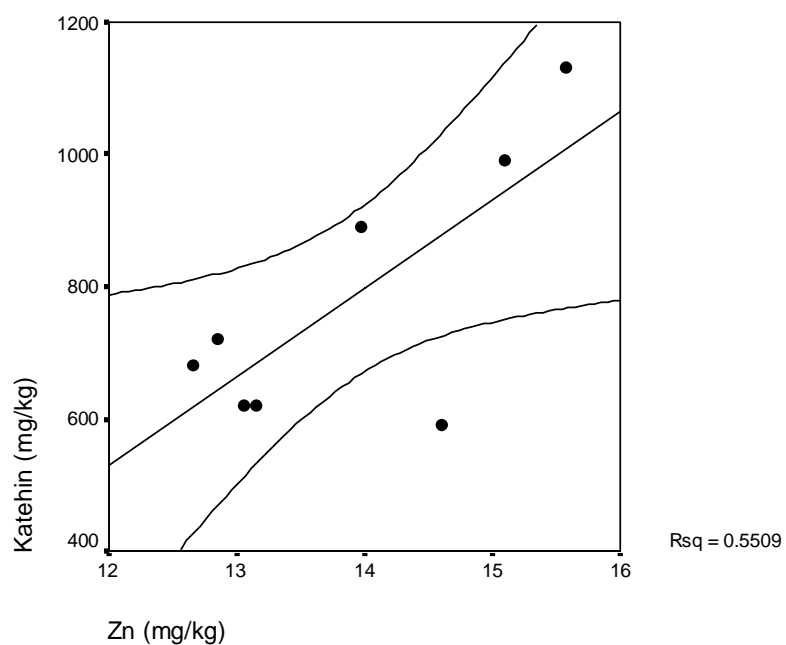
Slika 3-25 Korelacioni dijagram za sjemenku i list na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa: galna kiselina vs. K



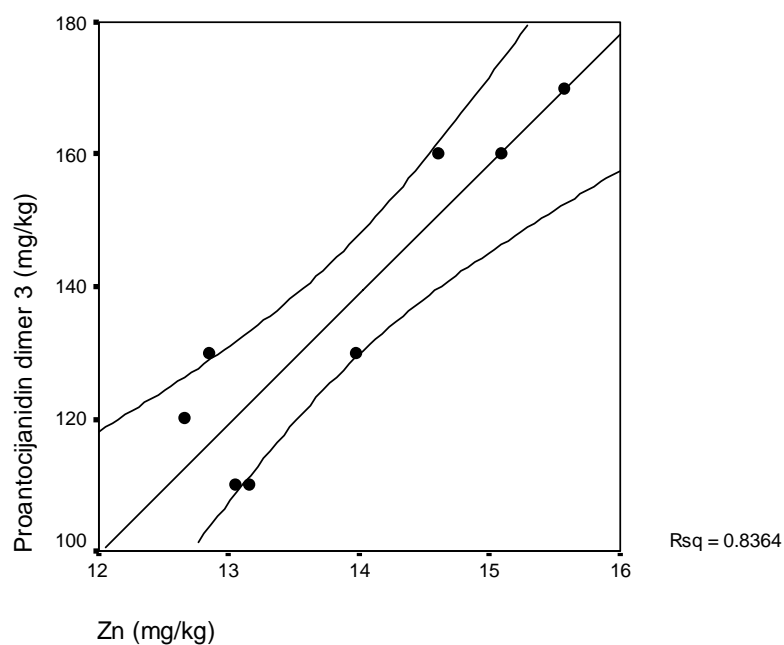
Slika 3-26 Korelacioni dijagram za sjemenku i list na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa: epikatehin vs. K



Slika 3-27 Korelacioni dijagram za sjemenku i list na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa: katehin vs. P



Slika 3-28 Korelacioni dijagram za sjemenku na kraju sazrijevanja grožđa i list na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa: katehin vs. Zn



Slika 3-29 Korelacioni dijagram za sjemenku na kraju sazrijevanja grožđa i list na početku zadnjeg mjeseca sazrijevanja grožđa: proantocijanidin dimer 3 vs. Zn

Uprkos činjenici da folijarno prihranjivanje vinove loze sa fosforom i kalijumom nije dalo statistički značajne razlike u sadržaju ispitivanih fenolnih jedinjenja u poređenju sa kontrolnom varijantom, ipak dobijene korelacije ukazuju na mogući pozitivni uticaj ovih elemenata kao i Zn u stvaranju fenolnih jedinjenja u sjemenci grožđa. Svakako, treba uzeti u obzir i specifičnosti agroekoloških uslova (zemljište, klima itd.), ali i vrijeme primjene i doze đubriva.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

Ekperimentalni dio ovog istraživanja je urađen u laboratorijama:

- Biotehničkog fakulteta u Podgorici (analiza zemljišta, lista vinove loze i grožđa);
- Odjeljenja za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu (određivanje sadržaja azota i sumpora u listu i hromatografsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja u sjemenkama grožđa) i
- Katedre za voćarstvo Biotehničkog fakulteta u Ljubljani (hromatografsko određivanje sadržaja šećera, organskih kiselina i fenolnih jedinjenja u grožđu).

4.1. Reagensi i pribor

Tokom ispitivanja šećera, organskih kiselina i fenolnih jedinjenja korišćeni su reagensi proizvođača:

- Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka) za glukozu, fruktozu, saharozu, vinsku i jabučnu kiselinu, rutin (kvercetin 3-*O*-rutinozid), miricetin, kempferol, delfinidin, cijanidin 3-*O*-glukozid, peonidin i malvidin 3-*O*-glukozid;
- Fluka Chemie (Buchs, Švajcarska) za (–)-epikatehin, kvercetin 3-*O*-galaktozid, kvercetin 3-*O*-glukozid i procijanidin B2;
- Roth (Karlsruhe, Njemačka) za (+)-katehin.

Metanol korišćen za ekstrakciju fenolnih jedinjenja, i 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (BHT) koji je kao antioksidans dodat ekstrakcionom sredstvu, bili su od proizvođača Sigma-Aldrich. Za mobilnu fazu upotrijebljeni su acetonitril i mravlja kiselina Fluka Chemie. Voda korišćena za pripremu svih rastvora i kao mobilna faza bila je dvostruko destilovana i prečišćena kroz Milli-Q sistem (Millipore, Bedford, MA, SAD).

Za filtraciju ekstrakata za određivanje koncentracije šećera i organskih kiselina korišćen je filter sastavljen od celuloze i miješanih estara, a za fenolna jedinjenja filter od poliamida, oba poroznosti 0,45 μm , proizvođača Macherey Nagel (Düren, Njemačka).

4.2. Dizajn ogleda

Istraživanja su započela izborom oglednih čokota u zasadu stone sorte 'Kardinal' (*Vitis vinifera* L.) na lokalitetu Tuzi u kompaniji "13. jul Plantaže". Zasad je podignut 1997. godine sa rastojanjem između redova od 2,6 m, a između čokota 1,2 m. Izabrano je ukupno 40 čokota na podlozi SO4 (Selection Oppenheim Nr. 4). Ogledni čokoti nalazili su se u 74. redu, na tabli T-7 istočno, zaštićenom s lijeve i desne strane tzv. izolacionim redovima. Ogled je obuhvatao 4 ponavljanja sa po 5 čokota za varijantu sa folijarnim prihranjivanjem, kao i za kontrolu (varijantu bez folijarnog prihranjivanja). Orezivanje, đubrenje, zaštitu, navodnjavanje i druge agrotehničke mjere sprovodilo je stručno osoblje "Plantaža".



Slika 4-1 Vinograd u Tuzima (bojom izdvojena površina označava mjesto izvođenja ogleda)

Folijarna prihrana đubrivom Hascon M 10 (Green Has Italia S.p.A.) urađena je prema uputstvu proizvođača u 3 navrata svakih 14–15 dana, pomoću ručnih rasprskivača, u ranim jutarnjim satima u terminima prikazanim u Tabeli 4-1. Primijenjeno je po 2 litra rastvora đubriva koncentracije 0,6% (v/v) na 5 čokota, što odgovara nivou od 8 l/ha. Prvo tretiranje je obavljeno oko 15 dana prije šarka. »Hascon M10« je tečno mineralno đubrivo formulacije – 15% P₂O₅, 20% K₂O sa 0,1% B, 0,1% Mn i 0,01% Mo (% w/w, ekvivalentno w/v na 20 °C).

Tabela 4-1 Datumi folijarne primjene folijarnog đubriva, uzimanja uzoraka listova i grožđa

Godina	Folijarna prihrana	Uzimanje uzoraka lista	Uzimanje uzoraka grožđa
2008.	10. jun	9. jun	16. jul
	25. jun	16. jul	30. jul
	9. jul		13. avgust
2009.	10. jun	9. jun	17. jul
	25. jun	16. jul	31. jul
	9. jul		14. avgust

4.3. Analiza lista vinove loze

4.3.1. Uzimanje uzoraka listova vinove loze

U cilju provjere snabdjevenosti vinove loze hranljivim elementima, ali i efekta folijarne prihrane na njihov sadržaj, sprovedeno je uzimanje uzoraka lista, neposredno prije prvog prskanja folijarnim đubrivom i prije prvog uzimanja uzoraka grožđa (datumi su dati u Tabeli 4-1), prema metodologiji koja se koristi u folijarnoj dijagnostici. Naime, uzima se

list naspram grozda sa sredine lastara⁵. Odmah po uzimanju liske su odvojene od peteljki, zbog sprečavanja transfera hranljivih elemenata. Za analizu je odabrana liska, zato što ukazuje na krajnji status svih nutrijenata uključujući i manje mobilne odnosno elemente niske mobilnosti kakvi su Ca, Fe, Mn, Zn, Cu i B, dok je peteljka osjetljiva na mobilne nutrijente – N, P, K i Mg.

4.3.2. Priprema uzoraka liski za analizu

Uzorci liski vinove loze su pripremljeni za analizu na sljedeći način: odmah po dolasku u laboratoriju oprani su česmenskom vodom, zatim isprani dejonizovanom vodom i ostavljeni da se vazdušno prosuše. Nakon toga uzorci su sušeni 24 časa na 65–70 °C i usitnjeni u porcelanskom avanu sa tučkom. Sadržaj vlage određen je sušenjem na 105 °C.

4.3.3. Suvo spaljivanje uzoraka liski i obrada sa rastvorom HCl

Kod pripreme uzorka za određivanje koncentracije bora odvagano je 1,0000 g uzorka suvog biljnog materijala u porcelanski lončić (zapremine 20 ml) visokog oblika i žareno na 485 °C 10–12 časova (Munter & Grande, 1984). Pepeo je preliven sa 5 ml 20% HCl i ostavljen da odstoji na sobnoj temperaturi pola sata. Potom je dodato 5 ml dejonizovane vode i filtrirano kroz filter papir "plava traka". Kao kontrolna proba korišćen je odgovarajući rastvor HCl, koji je takođe filtriran kao i uzorak.

4.3.4. Obrada uzoraka liski sa koncentrovanim kiselinama (HNO₃ + HClO₄)

U skladu sa metodom preporučenom od strane Ryan *et al.* (2002) za određivanje sadržaja makro- i mikroelemenata u biljnom materijalu (P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu i Zn), količina od 1,0000 g je prelivena sa 10 ml smješe HNO₃ i HClO₄ (2:1) i ostavljena preko

⁵ Srednje lišće na lastaru ispoljava intenzivniju fotosintezu u odnosu na vršno i bazalno lišće i najznačajnije je za obrazovanje prinosa. Interesantan je nalaz da u grozd znatno više asimilata dolazi iz lista na suprotnoj strani grozda, nego iz onog sa iste strane (Milosavljević, 1984a).

noći da odstoji, kako bi se burna reakcija stišala. Nakon početnog razaranja temperatura je povećana na 150 °C i nastavilo se sa zagrijavanjem na laboratorijskoj ploči oko 1 čas. Zatim je postepeno povećana temperatura do 235 °C sve dok se mrke pare azotne kiseline nisu izgubile. Kada su se pojavile bijele guste pare nastavljeno je sa razaranjem još 30 minuta. Suspenzija je ohlađena, razblažena sa dejonizovanom vodom i prenesena u normalni sud od 100 ml, nakon čega je filtrirana kroz filter papir "plava traka".

Postupak razaranja je izveden u čaši visokog oblika od 150 ml, koja je bila poklopljena sahatnim staklom. Istovremeno je postavljena kontrolna proba sa istim reagensima, koja je obrađena po navedenom postupku.

4.3.5. Određivanje sadržaja makro- i mikroelemenata

Sadržaj N i S je određen sagorijevanjem usitnjenog uzorka liski u struji kiseonika na CHNS elementalnom analajzeru Vario EL III (Elementar, Njemačka)

P je određen kolorimetrijski na instrumentu Spectroquant Nova 60 (Merck, Njemačka) korišćenjem amonijum-vanadomolibdatnog reagensa, K i Ca plamenofotometrijski na PFP7 (Jenway, Velika Britanija), a Mg, Fe, Mn, Cu i Zn plamenom atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom na instrumentu AA-6800 (Shimadzu, Japan).

B je određen primjenom indukovano spregnute-plazma-optičke emisije spektrometrije na emisionoj liniji 181,837 nm na aparatu Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Velika Britanija).

4.4. Analiza grožđa

4.4.1. Uzimanje uzoraka grožđa

Prosječan uzorak grožđa (oko 2,5 kg) uzet je sa obje strane kontrolnih čokota, kao i čokota tretiranih sa folijarnim đubrivom, tri puta tokom zadnjeg mjeseca sazrijevanja (Tabela 4-1). Grozdovi za prosječan uzorak izabrani su na osnovu sadržaja suve materije, određenog pomoću ručnog refraktometra u nekoliko bobica. Nakon dopremanja u

laboratoriju, bobice su odvojene od peteljke pomoću makazica i uzorak je odmah zamrznut i čuvan na -20 °C do pripreme za analizu. Svaki uzorak je analiziran u 4 ponavljanja. Kao opšti parametri, važni za procjenu stanja zrelosti, pored suve materije (°Brix) u groždanom soku je određen i sadržaj ukupnih kiselina.



4.4.2. Određivanje osnovnih parametara kvaliteta grožđa (°Brix i ukupne kiseline)

Iz količine od oko 500 g prosječnog uzorka je iscijeđen sok, ručnim gnječenjem i presovanjem bobica kroz dvoslojnu gazu. U dobijenom groždanom soku određeni su sadržaj rastvorljivih suvih materija (šećeri, soli, kiseline) u °Brix pomoću ručnog refraktometra RHB-32 ATC (Xiamen Ming Xin Instrument Company, Kina) i ukupne kiseline titracijom sa 0,1M NaOH uz prisustvo indikatora bromtimol plavog.

4.4.3. Ekstrakcija šećera i organskih kiselina

Ekstrakcija šećera i organskih kiselina je odrađena prema metodi opisanoj u radu Mikulič-Petkovšek (2007). Količina od 10,000 g homogeniziranog uzorka bobica je obrađena sa 50 ml bidestilovane vode na sobnoj temperaturi. Nakon tridesetominutne ekstrakcije, dobijene suspenzije su centrifugirane pri 10000 o/min u trajanju od 7 minuta na

5 °C. Dekantovani rastvori su filtrirani kroz odgovarajuće filtere, preneseni u vijale i ostavljeni na -20 °C do analize na HPLC-u.

4.4.4. Ekstrakcija fenolnih jedinjenja

Uzorak od 1,000 g pokožice je obrađen sa 10 ml metanolnog rastvora BHT-a koncentracije 1% (w/v) koji sadrži i mravlju kiselinu u koncentraciji 3% (v/v). Ekstrakcija je trajala 1 čas u ultrazvučnom kupatilu koje je hladeno dodatkom leda. Nakon ekstrakcije, uzorak je centrifugiran pri 10000 o/min u trajanju od 7 minuta na 0 °C. Supernatanti su filtrirani kroz odgovarajuće filtere, preneseni u vijale i ostavljeni na -20 °C do analize na HPLC-u.

4.4.5. Određivanje koncentracije šećera i organskih kiselina

HPLC analiza vodenog ekstrakta na šećere je izvršena na Thermo Finnigan Spectra HPLC sistemu (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) sa detektorom indeksa loma (RID). Korišćena je Rezex RCM-monosaccharide kolona (300 x 7,8 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) na temperaturi 65° C. Uzorci su eluirani u izokratskim uslovima prema metodi Sturm *et al.* (2003). Kao mobilna faza je korišćena dvostruko destilovana voda sa protokom 0,6 ml/min.

Organske kiseline su analizirane na Thermo Finnigan Spectra HPLC sistemu (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) sa UV detektorom na 210 nm, u skladu sa metodom Sturm *et al.* (2003). Korišćena je Rezex ROA-organic acid kolona (300 x 7,8 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) na temperaturi 65 °C. Mobilna faza je bila 4 mM H₂SO₄, a protok eluiranja 0,6 ml/min. Koncentracije šećera i organskih kiselina su određene pomoću odgovarajućih spoljašnjih standarda.

4.4.6. Određivanje koncentracije fenolnih jedinjenja

HPLC analiza metanolnog ekstrakata je izvršena na Thermo Finnigan Surveyor HPLC sistemu (San Jose, CA, SAD) opremljenim sa DAD. Korišćena je kolona Gemini

C18 (150 x 4,6 mm; 3 µm; Phenomenex, Torrance, SAD) sa predkolonom Phenomenex na temperaturi 25 °C. Mobilna faza A bila je 1% mravlja kiselina, a mobilna faza B acetonitril. Protok eluiranja je bio 1 ml/min sa gradijentnim programom opisanom od strane Marks *et al.* (2007): 0–5 min 3–9% B, 5–15 min 9–16% B, 15–45 min 16–50% B, 45–50 min 50% B izokratski. Nakon toga, urađeno je ispiranje i rekondicioniranje kolone. Flavan-3-oli su analizirani na 280 nm, flavonoli na 350 nm i antocijanini na 530 nm. Injektirano je 20 µl ekstrakta. Identifikacija fenolnih jedinjenja je postignuta poređenjem retencionih vremena i njihovih UV-Vis spektara od 200 do 600 nm, kao i dodatkom spoljašnjeg standarda.

Maseni spektri su dobijeni na aparatu LCQ Deca XP MAX (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) sa negativnom elektrosprej jonizacijom (ESI). Analize su urađene korišćenjem MS² skeniranja za opseg masa od 115 do 2000 *m/z*. Podaci o hromatografskom određivanju fenolnih jedinjenja sumarno su prikazani u Tabeli 4-2.

Koncentracije fenolnih jedinjenja su izračunate preko površina pikova uzorka i odgovarajućih standarda. U nedostatku autentičnih supstanci kvantifikacija pojedinih flavonoida je urađena pomoću jedinjenja sličnih struktura.

Tabela 4-2 Talasna dužina (λ), retenciono vrijeme (t_R), $[M-H]^-$ kvazimolekulski jon i MS^2 podaci analiziranih fenolnih jedinjenja u pokožici.

λ (nm)	t_R (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	MS^2 (m/z)	Naziv jedinjenja	Izraženo kao
280	11,8	577	425, 407, 289	Proantocijanidin dimer 1	Procijanidin B2
	12,7	577	425, 407, 289	Proantocijanidin dimer 2	Procijanidin B2
	13,8	289	245	Katehin	Katehin
	14,3	867	577, 289	Proantocijanidin trimer	Procijanidin B2
	16	289	245	Epikatehin	Epikatehin
	18,5	577	425, 407, 289	Proantocijanidin dimer 3	Procijanidin B2
350	20,3	479	316	Miricetin heksozid 1	Miricetin
	21,5	479	316	Miricetin heksozid 2	Miricetin
	23,12	609	301	Rutin	Rutin
	23,6	463	301	Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid	Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid
	23,9	463	301	Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid	Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid
	24,3	477	301, 179, 151	Kvercetin 3- <i>O</i> -glukuronid	Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid
	25,8	447	285, 284	Kempferol heksozid	Kempferol
530	11,8	465	303	Delfinidin 3- <i>O</i> -glukozid	Delfinidin
	13,3	449	287	Cijanidin 3- <i>O</i> -glukozid	Cijanidin 3- <i>O</i> -glukozid
	14,4	479	317	Petunidin 3- <i>O</i> -glukozid	Peonidin
	15,1	463	301	Peonidin 3- <i>O</i> -glukozid	Peonidin
	16,5	493	331	Malvidin 3- <i>O</i> -glukozid	Malvidin 3- <i>O</i> -glukozid

4.5. Dopunska ispitivanja

4.5.1. Određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja u sjemenkama

4.5.1.1. Ekstrakcija fenolnih jedinjenja

Tokom pripreme uzorka za potrebe određivanja fenolnih jedinjenja u pokožici, sjemenke grožđa su ručno odvojene od pulpe i osušene filter papirom. Na vazduhu osušene cijele sjemenke (oko 2,4 g) su potopljene u 30 ml 50% metanola i ostavljene u ultrazvučnom kupatilu tokom 12 časova (Gođevac *et al.*, 2010). Nakon toga, ekstrakt je profiltriran kroz 0,45 µm celulozni filter i prenesen u vijale.

4.5.1.2. Hromatografsko određivanje koncentracije fenolnih jedinjenja

U studiji o polifenolnom sastavu sjemenki grožđa sa područja Srbije (Gođevac *et al.*, 2010) opisano je hromatografsko određivanje koncentracije fenolnih jedinjenja, koje je i ovdje primijenjeno. Naime, HPLC analiza ekstrakta je izvršena na Agilent 1200 instrumentu sa DAD model G1315B, binarnom pumpom G1312A, autosemplerom G1313A i kolonom RR Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm; 1,8 µm). Mobilna faza A je bila 0,2% mravlja kiselina u vodi, a mobilna faza B acetonitril. Protok eluiranja je bio 0,95 ml/min sa gradijentnim programom: 0–20 min 5–16% B, 20–28 min 16–40% B, 28–32 min 40–70% B, 32–36 min 70–99% B, 36–45 min 99% B, 45–46 min 99–5% B. UV-Vis detekcija je praćena na 230, 280 i 360 nm.

LC/MS analiza ekstrakata je izvršena na Agilent MSD TOF instrumentu, povezanim sa Agilent 1200 HPLC, korišćenjem iste kolone i gradijentnog programa kao i za HPLC/DAD analizu. Maseni spektri su dobijeni na Agilent ESI-MSD TOF uređaju. Protok sušećeg gasa (N₂) je bio 12 l/min, pritisak raspršivača 45 psig, temperatura sušećeg gasa 350 °C. Za ESI, uslovi su bili sljedeći: napon kapilare 4000 V, skimer 60 V, Oct RF V 250 V, opseg masa od 100 do 2000 *m/z*.

Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu karakterističnog izgleda UV spektra i molekulske formule izračunate iz preciznih masa kvazimolekulskih jona u ESI masenom spektru. Retenciono vrijeme za pojedina jedinjenja je poređeno sa retencionim vremenima komercijalnih supstanci. Zbog nedostupnosti autentičnih supstanci, proantocijanidin dimeri i proantocijanidin trimer su uslovno identifikovani, bez određivanja konfiguracije pojedinih monomernih jedinica (na osnovu UV/MS podataka nije bilo moguće utvrditi stereochemiju).

Retenciona vremena bila su: 3,3 min za galnu kiselinu; 8,9 min za proantocijanidin dimer (označen sa 1); 9,8 min za proantocijanidin dimer (označen sa 2); 10,2 min za metil-galat; 10,6 min za katehin; 11,4 min za proantocijanidin trimer; 13,2 min za proantocijanidin dimer (označen sa 3); 14,9 min za epikatehin; 18,3 min za proantocijanidin monogalat i 22,7 min za epikatehin galat.

Koncentracija metil-galata je izražena kao ekvivalent galne kiseline, a ostalih fenolnih jedinjenja kao ekvivalent katehina.

4.6. Statistička obrada podataka

Podaci su statistički obrađeni korišćenjem kompjuterskog programa SPSS 10.0. Iz obrade su isključeni podaci čija vrijednost je bila van intervala \pm tri standardne devijacije. U vezi sa tim za date replikate uzoraka (kojima je nedostajala i jedna vrijednost) nije izračunata suma za pojedine klase jedinjenja. Dakle, obrada sa sumama (ANOVA i DA) se odnosila isključivo na uzorke sa kompletnim setom podataka. Isto se odnosi i na analizu principalne komponente.

Deskriptivnom statističkom analizom su određene prosječne vrijednosti parametara i standardna greška po datumima uzimanja uzoraka za kontrolnu varijantu i varijantu sa đubrenjem.

Prosječne vrijednosti ispitivanih parametara u grožđu kontrolne varijante i varijante sa đubrenjem su upoređene primjenom jednosmjerne ANOVA i Dankanovog testa pri $p < 0,05$ odvojeno po godinama.

Da bi se odredila suštinska varijacija u podacima za obje godine primijenjena je analiza principalne komponente sa varimaks rotacijom. U radu su date dvije odvojene obrade za:

1. šećere i organske kiseline kao primarne metabolite i
2. fenolna jedinjenja kao sekundarne metabolite.

U cilju generalne procjene razlika između pojedinih datuma i tretmana, tokom dvije uzastopne godine, primijenjena je i metoda diskriminantne analize ("korak po korak" – stepwise). S tim u vezi, u obradu su uzete sume šećera, organskih kiselina, antocijanina, flavonola i flavan-3-ola.

Veze između parametara određenih u grožđu i listu su prikazane preko vrijednosti saturacije (PCA nakon varimaks rotacije) u okviru odgovarajućih komponenti i/ili vrijednosti Pirsonovih korelacionih koeficijenata i stepena značajnosti ("2-tailed"). Pojedine veze sa najvećom vrijednošću korelacionog koeficijenta prikazane su grafički.

4.7. Skraćenice

U radu su korišćene sljedeće skraćenice:

ANOVA, jednosmjerna analiza varijanse;

PCA, analiza principalne komponente;

DA, diskriminantna analiza;

F, odnos varijansi tj. odnos kvadratnih vrijednosti standardne devijacije;

p, nivo značajnosti;

C, grožđe uzeto sa kontrolnih čokota;

H, grožđe uzeto sa čokota tretiranih sa folijarnim đubrivom Hascon;

C1-08 i H1-08, grožđe uzeto 16. jula 2008. sa C i H čokota, respektivno;

C2-08 i H2-08, grožđe uzeto 30. jula 2008. sa C i H čokota, respektivno;

C3-08 i H3-08, grožđe uzeto 13. avgusta 2008. sa C i H čokota, respektivno;

C1-09 i H1-09, grožđe uzeto 17. jula 2009. sa C i H čokota, respektivno;
C2-09 i H2-09, grožđe uzeto 31. jula 2009. sa C i H čokota, respektivno;
C3-09 i H3-09, grožđe uzeto 14. avgusta 2008. sa C i H čokota, respektivno.

U korelacionoj matrici za sjemenku:

GA – galna kiselina, MG – metil-galat, PAD 1 – proantocijanidin dimer određen na retencionom vremenu 8,9 min, PAD 2 – proantocijanidin dimer određen na retencionom vremenu 9,8 min, PAD 3 – proantocijanidin dimer određen na retencionom vremenu 13,2 min, PAT – proantocijanidin trimer, PADMG – proantocijanidin dimer monogalat i EKG – epikatehin galat.

5. ZAKLJUČAK

Grožđe i proizvodi od grožđa su predmet mnogih istraživanja zbog sekundarnih metabolita kao biološki aktivnih supstanci. Fenolna jedinjenja kao sekundarni metaboliti su na trećem mestu po zastupljenosti u grožđu, poslije ugljenih hidrata i voćnih kiselina. Među stonim sortama, čije grožđe je namijenjeno za konzumiranje u svježem stanju, posebnu pažnju zaslužuju sorte veoma ranog perioda sazrijevanja, jer su vrlo profitabilne i za njih vlada veliko interesovanje, kako na domaćem tako i na inostranom tržištu. Za razliku od vinskih sorti, stone sorte su veoma malo istraživane, a generalno postoji mali broj istraživanja koje se odnose na praćenje promjena fenolnih jedinjenja sa đubrenjem.

Istraživanje je sprovedeno na sorti 'Kardinal' tokom sazrijevanja u tri termina. Folijarno je primjenjivano PK đubrivo (sa veoma malim količinama B, Mn i Mo) u tri navrata svakih 14–15 dana. Prvo tretiranje obavljeno je 15 dana prije početka šarka.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu, može da se zaključi sljedeće:

Tokom sazrijevanja sadržaj ukupnih rastvorljivih supstanci ($^{\circ}$ Brix), kao i glukoze i fruktoze u grožđu raste, a ukupnih kiselina, odnosno vinske i jabučne kiseline, opada.

Odnos između fruktoze i glukoze kreće se u rangu 1,04–1,21. Sadržaj saharoze opada kao posljedica hidrolize.

Sadržaj organskih kiselina, koje i pored nižeg sadržaja u odnosu na šećere, imaju značajan uticaj na organoleptičke osobine, odnosno kvalitet grožđa, veoma je osjetljiv na klimatske promjene. Klimatske promjene posebno utiču na jabučnu kiselinu, koja se gubi prvenstveno radi procesa disanja, u kojem kao glavni izvor energije zamjenjuje glukozu. Ubrzani gubitak jabučne kiseline izazvan je relativno visokim temperaturama.

Grožđe uzeto sa čokota folijarno prihranjivanih sa PK đubrivom ima statistički značajno viši sadržaj suve materije, kao i sumu šećera (glukoza, fruktoza i saharoza), a niži

sadržaj ukupnih kiselina i vinske kiseline u odnosu na grožđe sa kontrolnih čokota (bez folijarne prihrane) u drugom terminu.

Tokom sazrijevanja, suma antocijanina se uglavnom povećavala od prvog do drugog termina, a potom je bila skoro konstantna (bez statistički značajne razlike). Suma flavonola takođe je rasla tokom sazrijevanja, dok je u slučaju sume flavan-3-ola trend bio različit – rastući, opadajući ili nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Folijarno prihranjivanje čokota sa PK đubrivom ima pozitivan efekat na akumulaciju antocijanina, ali ne i flavonola i flavan-3-ola.

Gledajući po sezonama, koncentracija pojedinih antocijanina može da varira znatno na početku sazrijevanja, dok se na kraju sazrijevanja dostiže vrijednost koja se statistički značajno ne razlikuje za delfinidin 3-*O*-glukozid, cijanidin 3-*O*-glukozid, petunidin 3-*O*-glukozid i malvidin 3-*O*-glukozid, ali ne i peonidin 3-*O*-glukozid, kao najviše zastupljen antocijanin u pokožici grožđa ispitivane sorte.

Imajući u vidu da se sa hemotaksonomske tačke gledišta obično uzima odnos između malvidin 3-*O*-glukozida i peonidin 3-*O*-glukozida za karakterizaciju sorte (kultivara), rezultati ove studije pokazuju da odnos malvidin 3-*O*-glukozida i petunidin 3-*O*-glukozida ima slične vrijednosti (5,5–5,9) na kraju sazrijevanja, bez obzira na sezonu i tretman sa folijarnim đubrivom.

Proučavani metaboliti na početku sazrijevanja ukazuju da pri temperaturama iznad 25 °C fotosintetska aktivnost opada, odnosno da je na relativno nižim temperaturama, kao na primjer 25 °C, favorizovana biosinteza antocijanina.

Analiza principalne komponente i Pirsonova korelaciona analiza ($p < 0,05$) izdvajaju Mg, Cu, Zn i Mn kao elemente koji mogu pozitivno da utiču na stvaranje ispitivanih metabolita (uglavnom flavonola i pojedinih flavan-3-ola). Dobijene su pozitivne korelacije između B i saharoze, glukoze i fruktoze, ali i većine fenolnih jedinjenja. To se objašnjava značajnom ulogom bora u metabolizmu ugljenih hidrata i sintezi proteina, što indirektno ukazuje na pozitivni uticaj na sintezu fenolnih jedinjenja.

I pored optimalnog sadržaja N u listu, ipak su utvrđene negativne korelacije između N i ispitivanih metabolita (statistički značajne za većinu flavonola, kao i vinsku i jabučnu

kiselinu, a sa relativno visokim stepenom značajnosti u slučaju proantocijanidin dimera i saharoze kao transportnog oblika šećera iz lista u plod).

U sjemenkama najviše koncentracije imali su: galna kiselina, metil-galat i monomerni flavan-3-oli.

Sadržaj monomera flavan-3-ola i tanina male molekulske mase u sjemenkama uglavnom opada, a galne kiseline raste tokom sazrijevanja grožđa. Odnos između katehina i epikatehina takođe opada (od 1,8 do 1,2).

Na početku ispitivanog perioda sazrijevanja grožđa, dobijena je pozitivna korelacija između sadržaja kalijuma u listu i galne kiseline, metil-galata, katehina, proantocijanidin trimera, proantocijanidin dimera 3 i epikatehina u sjemenci. Pored toga, utvrđena je pozitivna korelacija P sa katehinom i epikatehin galatom. Ipak, uticaj folijarnog prihranjivanja vinove loze sa PK đubrivom nije statistički značajno uticao na sadržaj fenolnih jedinjenja u sjemenkama.

Evidentirana je pozitivna korelacija između sadržaja Zn u listu vinove loze i katehina, proantocijanidin trimera i proantocijanidin dimera 3 u sjemenkama zrelog grožđa.

Generalno, imajući u vidu bitan uticaj klimatskih uslova na primarni i sekundarni metabolizam, ali i da klimatski uslovi mogu uticati na usvajanje hranljivih elemenata, promjene u vrijednostima ispitivanih parametara grožđa je opravdano smatrati kao posljedicu njihovog uzajamnog uticaja. Ipak, pomenute veze izdvajaju i ukazuju na mogućí uticaj pojedinih elemenata na metabolizam šećera, kiselina i flavonoida u datim agroekološkim uslovima.

6. LITERATURA

- Ahlawat V.P., Yamdagni R., Effects of various levels of nitrogen and potassium application on berry set, berry drop and quality of grapes cultivar Perlette. *Progressive Horticulture* (1988) 20 (1-2), 53–57.
- Akasbi M., Shoeman D.W., Csallany A.S., High performance liquid chromatography of selected phenolic compounds in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* (1993) 70, 367–370.
- Ali K., Maltese F., Choi Y.H., Verpoorte R., Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews* (2010) 9(3), 357–378.
- Amella A.L., Bronner C., Briancon F., Haag M., Anton R., Landry Y., Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and bioflavonoids. *Planta Medica* (1985) 51, 16–21.
- Amiot M.J., Tacchini M., Aubert S.Y., Oleszek W., Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1995) 43, 1132–1137.
- Amrani-Joutei K., Glories Y., Mercier M., Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis* (1994) 33, 133–138.
- Arts I.C.W., Hollman P.C.H., Feskens E.J.M., Bueno de Mesquita H.B., Kromhout D., Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischaemic heart disease: the Zutphen Eldery Study. *American Journal of Clinical Nutrition* (2001) 74, 227–232.
- Bagchi D., Garg A., Krohn R., Bagchi M., Bagchi D.J., Balmoori J., Stohs S.J., Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidant against TPA induced

- hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *General Pharmacology* (1998) 30, 771–776.
- Bavaresco L., Poni S., Effect of calcareous soil on photosynthesis rate, mineral nutrition, and source-sink ratio of table grape. *Journal of Plant Nutrition* (2003) 26, 2123–2135.
- Bell J.R., Donovan J.L., Wong R., Waterhouse A.L., German J.B., Walzem R.L., Kasim-Karakas S.E., (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *American Journal of Clinical Nutrition* (2000) 71, 103–108.
- Boss P.K., Davies C., Robinson S.P., Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology* (1996a) 111, 1059–1066.
- Boss P.K., Davies C., Robinson S.P., Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology* (1996b) 32, 565–569.
- Braidot E., Zancani M., Petruzza E., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Macri F., Vianello A., Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling & Behavior* (2008) 3(9), 626–632.
- Bridle P., Garcíá-Viguera C., Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chemistry* (1997) 59, 299–304.
- Britsch L., Grisebach H., Improved preparation and assay of chalcone synthase. *Phytochemistry* (1985) 24, 1975–1976.
- Burić, D., Fiziološko biohemijski procesi tokom ontogeneze bobica. U: *Fiziologija vinove loze*, M. Sarić, (1984) SANU, Beograd, 233–259.
- Buttrose M.S., Hale C.R., Kliwer W.M., Effect of temperature on the composition of ‘Cabernet Sauvignon’ berries. *American Journal of Enology and Viticulture* (1971) 22, 71–75.
- Cabanne C., Doneche B., Calcium accumulation and redistribution during the development of grape berry. *Vitis* (2003) 42 (1), 19–21.
- Cadot Y., Minana-Castello M.T., Chevalier M., Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006) 54, 9206–9215.

- Calderon A.A., Pedreno M.A., Munoz R., Ros Barcelo A., Evidence for the non-vacuolar localization of anthocyanoplasts (anthocyanin-containing vesicles) in suspension cultured grapevine cells. *Phyton* (1993) 54, 91–98.
- Candolfi-Vasconcelos M.C., Koblet W., Howell G.S., Zweifel W. Influence of defoliation, rootstock, training system and leaf position on gas exchange of Pinot noir grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* (1994) 45, 173–180.
- Cantos E., Espin J.C., Tomas-Barberan F.A., Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MSMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002) 50, 5691–5696.
- Careri M., Mangia M., Musci M., Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: Naturally occurring substances in food. *Journal of Chromatography A* (1998) 794, 263–297.
- Carreno J., Almela L., Martinez A., Fernandez-Lopez J.A., Chemotaxonomical classification of red table grapes based on anthocyanin profile and external color. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* (1997) 30, 259–265.
- Champagnol F., Elements de physiologie de la vigne et de viticulture generale. *Rev. Agron.* (1984) 327, 124–145.
- Cheyrier, V., Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition* (2005) 81, 223S–229S.
- Chiavari G., Concialini V., Galletti G.C., Electrochemical detection in the high-performance liquid chromatographic analysis of plant phenolics. *Analyst* (1988) 113, 91–94.
- Christensen P.L., Bianchi M.L., Peacock W.L., Hirschfeld D.J., Effects of nitrogen fertilizer timing and rate of inorganic nitrogen status, fruit composition, and yield of grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* (1994) 45 (4), 377–387.
- Christensen P.L., Timing of zinc foliar sprays: I. Effects of application intervals preceding and during the bloom and fruit-set stage; II. Effects of day vs night application. *American Journal of Enology and Viticulture* (1980) 31 (1), 53–59.
- Cindrić P., Korać N., Kovač V., *Sorte vinove loze – metode i rezultati ispitivanja*, III izdanje, (2000) Poljoprivredni fakultet i Prometej, Novi Sad, 329–331.

- Colapietra M., Alexander A., Effect of foliar fertilization on yield and quality of table grapes. *Acta Horticulturae (ISHS)* (2006) 721, 213–218.
- Conradie W.J., Seasonal uptake of nutrients by Chenin blanc in sand culture: II. Phosphorous, potassium, calcium and magnesium. *South African Journal of Enology and Viticulture* (1981) 2 (1), 7–13.
- Conradie W.J., Partitioning of nitrogen in grapevines during autumn and the seasonal utilisation of nitrogen reserves during the following growing season. *South African Journal of Enology and Viticulture* (1992) 13 (1), 45–51.
- Conradie W.J., Timing of nitrogen fertilisation and the effects of poultry manure on the performance of grapevines on sandy soils: II. Leaf analysis, juice analysis and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture* (2001) 22 (2), 60–68.
- Costa C.T., Nelson B.C., Margolis S.A., Horton D., Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* (1998) 799, 321–327.
- Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N.G., Natural products (secondary metabolites). U: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. (2000) American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 1250–1318.
- Crozier A., Lean M.E.J., McDonald M.S., Black C., Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1997) 45, 590–595.
- Delgado R., Martin P., del Alamo M., Gonzales M.R., Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2004) 84, 623–630.
- Dixon R.A., Paiva N.L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* (1995) 7, 1085–1097.
- Downey M.O., Dokoozlian N.K., Krstic M.P., Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture* (2006) 57, 257–268.

- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P., Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* (2003) 9, 15–27.
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P., The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* (2004) 10, 55–73.
- Eng E.T., Ye J., Williams D., Phung S., Moore R.E., Young M.K., Gruntmanis U., Braunstein G., Chen S., Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidin dimers in red wine and grape seeds. *Cancer Research* (2003) 63(23), 8516–8522.
- Engels C., Kirkby E., White P., Mineral nutrition, yield and source-sink relationships. U: *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Third Edition, P. Marschner, Ed. (2012) Elsevier, 85–133.
- Esparza I., Salinasa I., Caballerob I., Santamariaa C., Calvob I., Garcia-Minac J.M., Fernandez J.M., Evolution of metal and polyphenol content over a 1-year period of vinification: sample fractionation and correlation between metals and anthocyanins. *Analytica Chimica Acta* (2004) 524, 215–224.
- Ewald C., Fjelkner-Modig S., Johansson K., Sjöholm I., Akesson B., Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry* (1999) 64, 231–235.
- Ezzahouani A., Williams L.E. Performance of Dattier de Beyrouth and Alphonse Lavallée grapevines on eight rootstocks under dryland conditions. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* (2005) 39, 91–94.
- Fernandez de Simon B., Hernandez T., Estrella I., Relationship between chemical structure and biosynthesis and accumulation of certain phenolic compounds in grape skins during ripening. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1992) 195, 124–128.
- Finger A., Engelhardt U.H., Wray V., Flavonol glycosides in tea - kaempferol and quercetin rhamnoglucosides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (1991) 55, 313–321.

- Folts J.D., Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2002) 505, 95–111.
- Fregoni M., Vercesi A., Relationships between mineral status of Pinot noir grapevines and must acidity. *Acta Horticulturae* (1995) 383, 229–232.
- Fregoni M., *Viticultura di Qualita* (1998) Grafiche Lama: Piacenza, Italy.
- Fuleki T., Ricardo da Silva J.M., Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1997) 45, 1156–1160.
- Fuštić B., Đuretić G., *Zemljišta Crne Gore* (2000) Univerzitet Crne Gore i Biotehnički fakultet, Podgorica, 297–302.
- Gagne S., Saucier C., Geny L., Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006) 54, 9465–9471.
- Galensa R., Herrmann K., Analysis of flavonoids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* (1980) 189, 217–224.
- Geny L., Saucier C., Bracco S., Daviaud F., Glories Y., Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003) 51, 8051–8054.
- Gođevac D., Tešević V., Veličković M., Vujisić Lj., Vajs V., Milosavljević S., Polyphenolic compounds in seeds from some grape cultivars grown in Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society* (2010) 75(12), 1641–1652.
- Gorinstein S., Zemser M., Weisz M. *et al.* Fluorometric analysis of phenolics in persimmons. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (1994) 58, 1087–1092.
- Goupy P.M., Varoquaux P.J.A., Nicolas J.J., Macheix J.J., Identification and localization of hydroxycinnamoyl and flavonol derivatives from endive (*Cichorium endivia* L. cv. Geante Maraichere) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1990) 38, 2116–2121.
- Haddock E.A., Gupta R.K., Al-Shafi S.M.K., Layden K., Haslam E., Magnolato D., The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations. *Phytochemistry* (1982) 21, 1049–1062.

- Hakkinen S., *Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products*. Doctoral dissertation (2000), Faculty of Medicine of the University of Kuopio.
- Han S., Chen L.S., Jiang H.X., Smith B.R., Yang L.T., Xie C.Y., Boron deficiency decreases growth and photosynthesis, and increases starch and hexoses in leaves of citrus seedlings. *Journal of Plant Physiology* (2008) 165, 1331–1341.
- Harborne J.B., Simmonds. N.W. U: *Biochemistry of Phenolic Compounds* J.B. Harborne, Ed. (1964) Academic Press, London, 101.
- He F., Mu L., Yan G.L., Liang N.N., Pan Q.H., Wang J., Reeves M.J., Duan C.Q., Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* (2010) 15, 9057–9091.
- Heinonen I.M., Meyer A.S., Frankel E.N., Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1998) 46, 4107–4112.
- Hepner Y., Bravdo B.A.. Effect of crop level and drip irrigation scheduling on the potassium status of Cabernet Sauvignon and Carignane vines and its influence on must and wine composition and quality. *American Journal of Enology and Viticulture* (1985) 36, 140–147.
- Hollman P.C.H., van Trijp J.M.P., Buysman N.C.P., Fluorescence detection of flavonols in HPLC by postcolumn chelation with aluminium. *Analytical Chemistry* (1996) 68, 3511–3515.
- Hollman P.C.H., Venema D.P., The content of the potentially anticarcinogenic ellagic acid in plant foods. U: *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects* K.W. Waldron, I.T. Johnson, G.R. Fenwick, Eds. (1993) Royal Society of Chemistry, Cambridge, 203–208.
- Holt R.R., Lazarus S.A., Sullards M.C., Zhu Q.Y., Schramm D.D., Hammerstone J.F., Fraga C.G., Schmitz H.H., Keen C.L., Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *American Journal of Clinical Nutrition* (2002) 76, 798–804.
- Holton T.A., Cornish E.C., Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* (1995) 7, 1071–1083.

- Huglin P., Schneider C., *Biologie et Ecologie de la Vigne* (1998) Tec & Doc Lavoisier, Cachan (Paris), France.
- Jackson D.I., Lombard P.B., Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality—A review. *American Journal of Enology and Viticulture* (1993) 44, 409–430.
- Jackson R.S., Chemical constituents of grapes and wine. U: *Wine Science, Principles, Practice, Perception* 2nd edition (2000) Academic Press, San Diego, California, 178–215.
- Jayaprakasha G.K., Singh R.P., Sakariah K.K., Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry* (2001) 73, 285–290.
- Jayaprakasha J.K., Selvi T., Sakariah K.K., Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International* (2003) 36: 117–122.
- Jin Z.M., He J.J., Bi H.Q., Cui X.Y., Duan C.Q., Phenolic compound profiles in berry skins from nine red wine grape cultivars in northwest China. *Molecules* (2009) 14, 4922–4935.
- Justesen U., Knuthsen P., Leth T., Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* (1998) 799, 101–110.
- Kalin R., Righi A., Del Rosso A., Bagchi D., Generini S., Cerinic M.M., Das D.K., Activin, a grape seed-derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) in systemic sclerosis. *Free Radical Research* (2002) 36(8), 819–825.
- Kanes K., Tisserat B., Berhow M., Vandercook C., Phenolic composition in various tissues of Rutaceae species. *Phytochemistry* (1993) 32, 967–974.
- Keller M., Arnink K.J., Hrazdina G., Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison: I. Effects in grapevine growth, fruit development, and ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* (1998) 49 (3), 333–340.
- Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse A.L., Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* (2000) 55, 77–85.

- Khanna S., Roy S., Bagchi D., Bagchi M., Ken C.K., Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radical Biology and Medicine* (2001) 31, 38–42.
- Kiehne A., Engelhardt U.H., Thermospray-LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1996) 202, 48–54.
- Kliwer W.M., Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology* (1966) 41, 923–931.
- Knoll M., Achleitner D., Redl H., Response of Zweigelt Grapevine to foliar application of potassium fertilizer: Effects on gas exchange, leaf potassium content, and incidence of Traubenwelke, *Journal of Plant Nutrition* (2006) 29, 1805–1817.
- Koundouras S., Hatzidimitriou E., Karamolegkou M., Dimopoulou E., Kallithraka S., Tsialtas J.T., Zioziou E., Nikolaou N., Kotseridis Y., Irrigation and rootstock effects on the phenolic concentration and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009) 57 (17), 7805–7813.
- Koundouras S., Tsialtas J.T., Zioziou E., Nikolaou N., Rootstock effects on the adaptive strategies of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) under contrasting water status: Leaf physiological and structural responses. *Agriculture, Ecosystems and Environment* (2008) 128, 86–96.
- Kovačik J., Klejdus B., Bačkor M., Repčák M., Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science* (2007) 172, 393–399.
- Lamuela-Raventos R.M., Waterhouse A.L., A direct HPLC separation of wine phenolics. *American Journal of Enology and Viticulture* (1994) 45, 1–5.
- Large R., Ankerman D., Soil and Plant Analysis: Agronomy handbook (1995) A&L Agricultural Laboratories, London, Ontario, Canada.
- Li Q.M., Claeys M., Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* (1994) 23, 406–416.

- Lin Y.Y., Ng K.J., Yang S., Characterization of flavonoids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* (1993) 629, 389–393.
- Liu H.F., Wu B.H., Fan P.G., Li S.H., Li L.S., Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2006) 86, 1526–1536.
- Lović R., Uticaj mineralne ishrane na rodnost, količinu i kvalitet prinosa. U: *Fiziologija vinove loze*, M. Sarić, (1984) SANU, Beograd, 121–144.
- Lunte S.M., Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultraviolet-visible and electrochemical detection. *Journal of Chromatography* (1987) 384, 371–382.
- Maas J.L., Galletta G.J., Stoner G.D., Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: A review. *HortScience* (1991) 26, 10–14.
- Macheix J.J., Fleuriet A. Billot J., *Fruit Phenolics* (1990) CRC Press, Florida, Boca Raton.
- Manthey J.A., Buslig B.S., Baker M.E. Flavonoids in cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2002) 505, 1–7.
- Marks S.C., Mullen W., Crozier A., Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2007) 87, 719–728.
- Matin P., Delgado R., Gonzalez M.R., Gallegos J.I. Colour of ‘Tempranillo’ grapes as affected by different nitrogen and potassium fertilization rates. *Acta Horticulturae* (2004) 652, 153–159.
- Matsui S., Ryugo K., Kliewer W.M., Effects of heat stress and plant hormone treatments on growth of young Napa Gamay (*Vitis vinifera* L.) berries. *Research Bulletin of the Faculty of Agriculture – Gifu University* (1986) 51, 327–334.
- Mauri P.L., Iemoli L., Gardana C. *et al.*, Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of flavonol glycosides in tomato extracts and human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (1999) 13, 924–931.
- Merken H.M., Beecher G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2000) 48, 577–599.

- Middleton E., Drzewieki G. Flavonoid inhibition of human basophile histamine release stimulated by various agents. *Biochemical Pharmacology* (1983) 33, 3333–3338.
- Mikulič-Petkovšek M., Štampar F., Veberič R., Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae* (2007) 114, 37–44.
- Milosavljević M., *Biotehnika vinove loze* (1998) Institut za istraživanja u poljoprivredi Srbija i IK Draganić, Beograd, 252.
- Milosavljević M., Uticaj biotskih i abiotskih činilaca na produktivnost fotosinteze. U: *Fiziologija vinove loze*, M. Sarić, (1984a) SANU, Beograd, 53–84.
- Milosavljević M., Usvajanje i metabolizam ugljenika u vinove loze. U: *Fiziologija vinove loze*, M. Sarić, (1984b) SANU, Beograd, 25–50.
- Mirošević N., Karoglan-Kontić J., *Vinogradarstvo* (2008) Nakladni zavod Globus, Zagreb, 95.
- Mouly P., Gaydou E.M., Estienne J., Column liquid chromatographic determination of flavanone in Citrus. *Journal of Chromatography* (1993) 634, 129–134.
- Munter R.C., Halverson T.L., Anderson R.D., Quality assurance for plant tissue analysis by ICP-AES. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* (1984) 15(15), 1285–1322.
- Navarro S., Leon M., Roca-Perez L., Boluda R., Garcia-Ferriz L., Perez-Bermudez P., Gavidia I. Characterisation of Bobal and Crujidera grape cultivars, in comparison with Tempranillo and Cabernet Sauvignon: Evolution of leaf macronutrients and berry composition during grape ripening. *Food Chemistry* (2008) 108, 182–190.
- Nelson K.E., Baker G.A., Winkler A.J., Amerine M.A., Richardson H.B., Jones F.R., Chemical and sensory variability in table grapes. *Hilgardia* (1963) 34 (1), 1–42.
- Nielsen J.K., Olsen C.E., Petersen M.K., Acylated flavonol glycosides from cabbage leaves. *Phytochemistry* (1993) 34, 539–544.
- Obreque-Slier E., Pena-Neira A., Lopez-Solis R., Zamora-Marin F., Ricardo-da-Silva J.M., Laureano O., Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carmenere and Cabernet-Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2010) 58(6), 3591–3599.

- Pearce F., Befus A.D., Bienenstock J., Mucosal mast cells, effects of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1984) 73, 819–823.
- Peleg H., Naim M., Roussef R.L., Zehavi U., Distribution of bound and free phenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* (1991) 57, 417–426.
- Pena-Neira A., Caceres A., Pastenes C., Low molecular weight phenolic and anthocianin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of clusters thinning and vineyard yield. *Food Science and Technology International* (2007) 13, 153–158.
- Pereira G.E., Gaudillere J.P., Pieri P., Hilbert G., Maucourt M., Deborde C., Moing A., Rolin D., Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006) 54(18), 6765–6775.
- Perović N., Dinamika sadržaja nutrijenata vinove loze u toku vegetacije. *Poljoprivreda i šumarstvo* (2003) 49(1-2), 5–15.
- Peuke A.D., Nutrient composition of leaves and fruit juice of grapevine as affected by soil and nitrogen fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* (2009) 172, 557–564.
- Pietta P., Facino R.M., Carini M., Mauri P., Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of flavonol glycosides from medicinal plants. *Journal of Chromatography A* (1994) 661, 121–126.
- Pinelo M., Arnous A., Meyer A.S., Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* (2006) 17, 579–590.
- Pinent M., Blay M., Blade M.C., Salvado M.J., Arola L., Ardevol A., Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology* (2004) 145(11), 4985–4990.

- Pirie A.J.G., Mullins M.G., Interrelationships of sugars, anthocyanins, total polyphenols and dry weight in the skin of grape berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* (1977) 28, 204–209.
- Poon G.K., Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography* (1998) 794, 63–74.
- Poudel P.R., Mochioka R., Beppu K., Kataoka I., Influence of temperature on berry composition of interspecific hybrid wine grape 'Kadainou R-1' (*Vitis ficifolia* var. Ganebu × *Vitis vinifera* 'Muscat of Alexandria'). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* (2009) 78, 169–174.
- Prasongsidh B.C., Skurray G.R., Capillary electrophoresis analysis of *trans*- and *cis*-resveratrol, quercetin, catechin and gallic acid in wine. *Food Chemistry* (1998) 62, 355–358.
- Price K.R., Prosser T., Richetin A.M.F., Rhodes M.J.C., A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chemistry* (1999) 66, 489–494.
- Pussayanawin V., Wetzel D.L., High-performance liquid chromatographic determination of ferulic acid in wheat milling fractions as a measure of bran contamination. *Journal of Chromatography* (1987) 391, 243–255.
- Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., *Handbook of Enology (vol. 2): The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments* 2nd edition. (2006) John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, England.
- Robards K., Antolovich M., Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. *Analyst* (1997) 122, 11R–34R.
- Rommel A., Wrolstad R.E., Influence of acid and base hydrolysis on the phenolic composition of red raspberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1993a) 41, 1237–1241.
- Rommel A., Wrolstad R.E., Composition of flavonols in red raspberry juice as influenced by cultivar, processing, and environmental factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1993b) 41, 1941–1950.

- Rouseff R.L., Dettweiler G.R., Swaine R.M., Solid-phase extraction and HPLC determination of 4-vinyl guaiacol and its precursor, ferulic acid, in orange juice. *Journal of Chromatographic Science* (1992) 30, 383–387.
- Ruhl E.H., Fuba A.P., Treeby M.T., Effects of potassium, magnesium and nitrogen supply on grape juice composition of Riesling, Chardonnay and Cabernet Sauvignon vines. *Australian Journal of Experimental Agriculture* (1992) 32, 645–649.
- Ryan J., Estefan G., Rashid A., *Soil and Plant Analysis Laboratory Manual* Second Edition (2002), ICARDA and NARC, Islamabad, Pakistan, 139–140.
- Saito M., Hosoyama H., Ariga T., Kataoka S., Yamaji N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1998) 46, 1460–1464.
- Salisbury F.B., Ross C.W., *Plant Physiology* 4th Edition (1992) Wadsworth Publishing Company, USA.
- Sato M., Maulik G., Ray P.S., Bagchi D., Das D.K., Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (1999) 31, 1289–1297.
- Schmidt T.J., Merfort I., Willuhn G., Gas chromatography-mass spectrometry of flavonoid aglycones II. Structure-retention relationships and a possibility of differentiation between isomeric 6- and 8- methoxyflavones. *Journal of Chromatography A* (1994) 669, 236–240.
- Schneider Y., Chabert P., Stutzmann J., Coelho D., Fougerousse A., Gosse F., Launay J.F., Brouillard R., Raul F., Resveratrol analog (Z)-3, 5, 4'-tri-methoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization. *International Journal of Cancer* (2003) 107, 189–196.
- Shi J., Yu J., Pohorly J.E., Kakuda Y., Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food* (2003) 6, 291–299.
- Silva R.C., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S., Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1991) 39, 1549–1552.

- Singh R.P. *et al.*, Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3, *International Journal of Cancer* (2004) 108(5),733–740.
- Son H.S., Hwang G.S., Kim K.M., Ahn H.J., Park W.M., Van Den Berg F., Hong Y.S., Lee C., Metabolomic Studies on Geographical Grapes and Their Wines Using ¹H NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009) 57, 1481–1490.
- Soulis T.P., Avgerinos A.S., Changes in the glucose: fructose ratio during the growth period of the Razaki grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1984) 35, 527–530.
- Souquet J.M., Cheynier V., Brossaud F., Moutounet M., Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* (1996) 43, 509–512.
- Spayd S.E., Tarara J.M., Mee D.L., Ferguson J.C., Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture* (2002) 53, 171–182.
- Stanković M., Tešević V., Vajs V.E., Todorović N., Milosavljević S.M., Gođevac D.M., Antioxidant properties of grape seed extract on human lymphocyte oxidative defence. *Planta Medica* (2008) 74, 730–735.
- Stewart A.J., Chapman W., Jenkins G.I., Graham I., Martin T., Crozier A., The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissue. *Plant, Cell and Environment* (2001) 24, 1189–1197.
- Strack D., Phenolic metabolism. U: *Plant Biochemistry*, P.M. Dey, J.B. Harborne, Eds. (1997) Academic Press, London, 387–416.
- Sturm K., Koron D., Stampar F., The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. *Food Chemistry* (2003) 83, 417–422.
- Štampar F., Hudina M., Dolenc K., Usenik V., Influence of foliar fertilization on yield quantity and quality of apple (*Malus domestica* Borkh.). U: *Improved Crop Quality by Nutrient Management*, D. Anac, P. Martin-Prevel, Eds. (1999) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 91–94.

- Teissedre P.L., Frankel E.N., Waterhouse A.L., Peleg H., German J.B., Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (1996) 70, 55–61.
- Topalović A., Mikulič-Petkovšek M., Changes in sugars, organic acids and phenolics of grape berries of cultivar 'Cardinal' during ripening. *Journal of Food Agriculture and Environment* (2010) 8, 223–227.
- Treutter D., Separation of naturally occurring mixtures of phenolic compounds from various *Prunus* tissues by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* (1988) 436, 490–496.
- Tulyathan V., Boulton R.B., Singleton V.L., Oxygen uptake by gallic acid as a model for similar reactions in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1989) 37, 844–849.
- Uchida S., Condensed tannins scavenging active oxygen radicals. *Medical Science Research* (1980) 15, 831–832.
- Veberič R., *Bioactive Compounds in Fruit Plants* (2010) Biotehniška fakulteta, Ljubljana.
- Vian M.A., Tomao V., Coulomb P.O., Lacombe J.M., Dangles O., Comparison of the anthocyanin composition during ripening of Syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006) 54, 5230–5235.
- Vinas P., Lopez-Erroz C., Marin-Hernandez J.J., Hernandez-Cordoba M., Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* (2000) 871, 85–93.
- Wiesler F., Nutrition and quality. U: *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Third Edition, P. Marschner, Ed. (2012) Elsevier, 271–282.
- Winkler A.J., Cook J.A., Kliewer W.M., Lider L.A., *General Viticulture* (1974) University of California Press, Berkeley and Los Angeles, CA.
- Wren A.F., Cleary M., Frantz C., Melton S., Norris L., 90-day oral toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002) 50(7), 2180–2192.

- Yamakoshi J. Saito M., Kataoka S., Tokutake S., Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR/f) rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002) 50(17), 4983–4988.
- Zhang H., Wang L., Deroles S., Bennett R., Davies K., New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biology* (2006) 6, 29–43.
- Zhang W., Conn S., Franco C., Characterisation of anthocyanin transport and storage in *Vitis vinifera* L. cv Gamay Freaux cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology* (2007) 131S, S196–S210.

BIOGRAFIJA

Ana (Toma) Topalović je rođena 23. avgusta 1975. godine u Beranama (Crna Gora). Osnovnu i srednju školu je završila u Podgorici. Studije tehnologije upisala je 1994. godine na Metalurško-tehnološkom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici, a diplomirala je 2000. godine. Iste godine je upisala poslijediplomske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smjer Analitička hemija. Magistarski rad pod naslovom "Hemijska specijacija fosfata u krečnjačkom zemljištu" odbranila je 2006. godine.

Od 15. juna 2000. godine Ana Topalović je zapošljena na Biotehničkom fakultetu Univerziteta Crne Gore. Od 2006. godine je angažovana kao saradnik u nastavi. U zvanje viši istraživač izabrana je 2010. godine.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Ana Topalović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

UTICAJ FOLIJARNOG PRIHRANJIVANJA NA HEMIJSKI SASTAV NEKIH
SEKUNDARNIH METABOLITA GROŽĐA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Podgorici, 02.10.2012. g.

Ana Topalović

Prilog 2.

Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ana Topalović

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada UTICAJ FOLIJARNOG PRIHRANJIVANJA NA HEMIJSKI SASTAV
NEKIH SEKUNDARNIH METABOLITA GROŽĐA

Mentor Dr Vlatka Vajs, redovni profesor Hemijskog fakulteta

Komentor Dr Vele Tešević, vanredni profesor Hemijskog fakulteta

Potpisana Ana Topalović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

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

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

Potpis doktoranda

U Podgorici, 02.10.2012. g.

Ana Topalović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

UTICAJ FOLIJARNOG PRIHRANJIVANJA NA HEMIJSKI SASTAV NEKIH SEKUNDARNIH METABOLITA GROŽĐA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
- ③ Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Podgorici, 02.10.2012. g.

Aua Topalović