

# Utjecaj dodatka antioksidansa na aromatski sastav vina Cabernet Sauvignon nakon 12 mjeseci starenja

---

Kovačević, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:223548>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Ana Kovačević

1260/PI

**UTJECAJ  
DODATKA  
ANTIOKSIDANSA NA  
AROMATSKI  
SASTAV VINA CABERNET  
SAUVIGNON NAKON  
12 MJESECI STARENJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić te uz pomoć doc. dr. sc. Marine Tomašević.

**Ovo istraživanje provedeno je u sklopu projekta „Novi enološki postupci kao alternativa sumporovom dioksidu u proizvodnji visokokvalitetnih vina“ (IP-09-2014-3796) financiranom od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).**

*Svoj diplomski rad prvenstveno posvećujem sebi kao nagradu za još jedno završeno poglavlje u mom životu. Veliko hvala mojim roditeljima, sestri i bratu koji su uvijek vjerovali u mene i moj uspjeh onda kad ni sama nisam. Hvala i svim mojim prijateljima i kolegama na velikoj podršci, motivaciji te pomoći u svim važnim trenucima mog studiranja. Hvala i mojemu dečku za svaku lijepu riječ, strpljenje i ogromnu potporu.*

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Marini Tomašević te Katarini Lukić, mag. ing. na velikoj pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela te pisanju diplomskog rada.*

*Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić na ukazanom povjerenju za izradu ovog diplomskog rada te svim stečenim znanjima tijekom studiranja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ DODATKA ANTIOKSIDANSA NA AROMATSKI SASTAV VINA CABERNET SAUVIGNON NAKON 12 MJESECI STARENJA

*Ana Kovačević, 1260/PI*

**Sažetak:** Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj dodatka antioksidansa na aromatski sastav crnog vina Cabernet Sauvignon nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Aromatske komponente i njihova koncentracija u vinu određeni su pomoću plinske kromatografije s masenom spektrometrijom uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS). Cabernet Sauvignon karakteriziraju sljedeći spojevi arome: hlapive masne kiseline, viši alkoholi, terpeni, acetatni i etilni esteri te norizoprenoidi. Smanjena koncentracija sumporovog dioksida rezultirala je smanjenjem koncentracije određenih aromatskih spojeva, dok je dodatkom glutaciona njihova koncentracija u vinu ostala očuvana.

**Ključne riječi:** *sumporov dioksid, glutation, starenje, aroma, vino*

**Rad sadrži:** 50 stranica, 19 slika, 1 tablica, 91 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić*

**Pomoć pri izradi:** *doc. dr. sc. Marina Tomašević*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. Draženka Komes
2. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić
3. Prof.dr.sc. Ksenija Marković
4. Prof.dr.sc. Mara Banović (zamjena)

**Datum obrane:** 22. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Process Engineering  
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Technology

### THE EFFECT OF ANTIOXIDANTS ADDITIONS ON AROMATIC COMPOSITION OF CABERNET SAUVIGNON WINE DURING AGING

*Ana Kovačević, 1260/PI*

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effect of antioxidants addition (sulfur dioxide and glutathione) on the aroma composition of Cabernet Sauvignon after 12 months of bottle ageing. Aromatic compounds and their concentration in wine were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction (SPME-GC/MS). Cabernet Sauvignon is characterized by aroma compounds: volatile fatty acids, higher alcohols, terpenes, acetate and ethyl esters and norisoprenoids. The reduced concentration of sulfur dioxide resulted in a decrease of aromatic compounds, while glutathione addition preserved their concentration in wine.

**Keywords:** *sulfur dioxide, glutathione, aging, aroma, wine*

**Thesis contains:** 50 pages, 19 figures, 1 tables, 91 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Marina Tomašević, Assistant professor*

#### Reviewers:

1. PhD. Draženka Komes, Full professor
2. PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor
3. PhD. Ksenija Marković, Full professor
4. PhD. Mara Banović, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** September 22<sup>nd</sup>, 2020



## Sadržaj:

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. AROMA VINA.....	2
2.1.1 Primarna aroma.....	2
2.1.2. Sekundarna aroma .....	4
2.1.3. Aroma fermentacije.....	4
2.1.4. Aroma starenja.....	6
2.2. STARENJE VINA .....	6
2.3. ANTIOKSIDANSI.....	10
2.3.1. Sumporov dioksid .....	10
2.3.2. Glutation.....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>14</b>
3.1. MATERIJAL .....	14
3.1.1. Uzorci vina .....	14
3.1.2 Kemikalije .....	14
3.1.3. Instrumenti i pomoćni pribor .....	14
3.2. METODA.....	15
3.2.1. Određivanje spojeva arome vina plinskom kromatografijom/masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS) .....	15
3.2.1.1. Priprema uzorka vina.....	15
3.2.1.2. Kromatografski uvjeti (GC/MS analiza).....	15
3.2.1.3. Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome.....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>17</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>43</b>

# 1.UVOD

Aroma vina jedan je od najvažnijih parametara kvalitete vina, a podrazumijeva impresiju mirisnih i okusnih komponenti vina. Čini ju više od tisuću spojeva koji mogu biti hlapive i nehlapive komponente vina. Na koncentraciju spojeva arome u finalnom proizvodu, uvelike utječe proces starenja vina. Tijekom tog perioda dolazi do smanjenja većine spojeva, kao što su acetatni i etilni esteri, terpeni i sortni tioli, dok se koncentracija hlapivih masnih kiselina i viših alkohola povećava ili ostaje nepromijenjena. Navedene promjene uglavnom su posljedica reakcija hidrolize i oksidacije, pri čemu se posebno ističe oksidacija kao jedan od glavnih faktora rizika za kvalitetu vina jer utječe, ne samo na aromu vina, nego i na boju i sveukupnu kvalitetu. Kao jedan od načina zaštite vina od negativnog utjecaja kisika ističe se dodatak nekoliko različitih antioksidansa.

Sumporov dioksid predstavlja najvažniji i gotovo nezamjenjivi aditiv tijekom proizvodnje vina upravo zbog svog antioksidacijskog i antimikrobnog djelovanja. S druge strane, u zadnjem desetljeću su istraživanja usmjerena na traženje adekvatne zamjene za ovaj aditiv zbog njegovog negativnog djelovanja na zdravlje (pseudoalergijska svojstva) manjeg broja populacije. Kao alternative ističu se brojne netoplinske tehnike (ultrazvuk visokih snaga, hladna plazma, visoki hidrostatski tlak, pulsirajuće električno polje itd.) ali i razni antioksidansi (glutation, askorbinska kiselina, fenolni spojevi i sl.).

Pritom je bitno istaknuti glutation, kao jednog od najboljih alternativa. Ovaj spoj je prirodan sastojak brojnih biljnih vrsta, a samim time i hrane proizvedene od istih. Karakterizira ga antioksidacijska aktivnost zbog prisutnosti tiolne grupe cisteina koja je odgovorna za sprečavanje oksidacije vina. Osim toga, utvrđeno je da djeluje zaštitno na mnoge poželjne arome vina i štiti samo vino od nastanka nepoželjnih mirisa.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj dodatka antioksidansa (glutationa i sumporovog dioksida) na aromatski profil crnog vina Cabernet Sauvignona, nakon 12 mjeseci starenja u bocama na tamnome mjestu. Rezultati ovog diplomskog rada pružiti će nove spoznaje o potencijalnoj primjeni i učinkovitosti antioksidansa u proizvodnji vina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. AROMA VINA

Aroma vina predstavlja jedan od najvažnijih parametara kvalitete vina te podrazumijeva impresiju mirisnih i okusnih komponenti vina. Nastaje kao posljedica interakcije između kemijskih spojeva koji su prisutni u vinu sa osjećajem okusa i mirisa koji se stvaraju kod konzumenta vina. Aromu vina formiraju više od tisuću spojeva koji mogu biti hlapive i nehlapive komponente. Hlapive spojeve čine viši alkoholi, terpeni, karbonilni spojevi, esteri, hlapivi tioli i spojevi sa sumporom. Ostali sastojci poput šećera, fenolnih spojeva, organskih kiselina te mineralnih komponenti, čine nehlapivi dio vina. Udio tih komponenti u vinu u rasponu je od nekoliko  $\text{ng L}^{-1}$  do nekoliko stotina  $\text{mg L}^{-1}$ , a to ovisi o samoj sorti grožđa, klimi, uvjetima pod kojim se provodi fermentacija kao i uvjetima starenja vina (Alves i sur., 2005).

S obzirom na fazu u kojem nastaje, ona se može podijeliti u 4 kategorije: primarna, sekundarna, fermentacijska i aroma starenja. Primarna aroma dolazi iz samog grožđa, dok se sekundarna razvija tijekom procesa primarne prerade grožđa (runjenje, muljanje, prešanje). Fermentacijska aroma nastaje kao posljedica alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije. Aroma starenja se formira procesom dozrijevanja i starenja vina koji se može odvijati u bocama ili drvenim bačvama, ovisno o stilu vina koju želimo proizvesti (Swiegers i Pretorius, 2005).

#### 2.1.1 Primarna aroma

Primarna aroma formira se u grožđu tijekom njegovog dozrijevanja, a procesom prerade se ekstrahira u mošt. Glavni predstavnici su terpeni, norizoprenoidi, metoksiparazini, hlapivi tioli i  $\text{C}_6$  spojevi (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Na njihovu koncentraciju veliki utjecaj imaju klimatski uvjeti (svjetlo, temperatura, padaline, vlaga), položaj vinograda i vrsta tla, sorta i stupanj zrelosti grožđa, koncentracija spojeva s dušikom te prinos grožđa.

Najvažnija skupina primarne arome su terpeni, kojih je preko 50 detektirano u grožđu, a puno manje u vinu. Muškati i Rizling predstavljaju vina sa visokom koncentracijom terpena koji tim vinima daju karakterističnu citrusnu i cvjetnu aromu (Rapp, 1998; Black i sur., 2015). U grožđu se mogu naći u dva oblika: monoterpeni (10 C atoma) ili seskviterpeni (14 C atoma). Monoterpene obilježava poželjna i ugodna aroma, a glavni predstavnici ove skupine su linalool, nerol, geraniol,

citronelol. Detektirani su u mesu i pokožici bobice grožđa u dva moguća oblika: slobodni i glikozidni. Karakterizira ih osjetljivost na niski pH, temperaturu i duže vrijeme skladištenja, te transformacija u druge spojeve koji mogu doprinijeti različitoj aromi i imati različite senzorske pragove osjetljivosti (Papadopoulou i Roussis, 2001; Roussis i sur., 2005). Važnost monoterpena u vinu je njihovo sinergističko djelovanje pri čemu utječu na ukupnu aromu u vinu (Ribéreau-Gayon i sur., 1975).

Norizoprenoidi čine primarnu aromu koja nastaje pod utjecajem svjetla, temperature i kisika, formiranjem iz pigmenta karotenoida. Spojevi koji karakteriziraju ovu skupinu su sljedeći:  $\beta$ -damaskenon (aroma tropskog voća, kuhane jabuke),  $\beta$ -ionon (miris ljubičice), TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen) (miris kerozina i petroleja) te vitispiran (miris krizanteme, voćni miris). Više sunčeve svjetlosti rezultira značajnijom razgradnjom karotenoida, odnosno značajnijom sintezom ovih spojeva, što je ujedno i jedan od razloga povećanja ovih spojeva tijekom dozrijevanja grožđa (Marais, 1992).

Metoksipirazini su također vrlo važni spojevi odgovorni za primarnu aromu, a nastaju metabolizmom aminokiselina. Primarno nastaju u bobici, ali se mogu pronaći u pokožici i sjemenci grožđa, a nositelji su karakterističnog mirisa na zeleno i travu. Nadalje, odgovorni su za miris na šparoge, papriku, krumpir i zemlju čije su note karakteristične za vino Sauvignon blanc. Na njihovu koncentraciju utječe sorta i stupanj zrelosti grožđa, temperatura i svjetlost kojoj je grožđe izloženo te ampelotehnički uvjeti (rezidba, bujnost, uklanjanje lišća oko grožđa). Grožđe koje još nije dovoljno zrelo sadrži visoki udio metoksipirazina kod sorti poput Cabernet Sauvignona, ali dozrijevanjem dolazi do njihovog smanjenja. Sorte grožđa koje se uzgajaju u hladnim područjima karakteriziraju puno veće koncentracije ovih spojeva u odnosu na ostala (Lacey i sur., 1991).

Hlapivi tioli predstavljaju aromatske spojeve odgovorne za poželjne mirise vina na tropsko voće, čiji su najvažniji predstavnici: 3-sulfanilheksan-1-ol (3SH) i 3-sulfanilheksil acetat (3SHA) koje karakterizira arome voća, grejpa i koprive; te 4-sulfanil-4-metilpentan-2-on (4MSP) koji je nositelj mirisa na drveće i šimšir (Swiegers i sur., 2009). Formiraju se tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem enzima kvasaca, odnosno cijepanjem nehlapivih prekursora koji se nalaze u grožđu. Značajni su za sorte Sauvignon blanc, Pinot, Rajnski Rizling i ostale. Starenjem vina njihova koncentracija se smanjuje za 50 % početne vrijednosti (Murat i sur., 2003).

C<sub>6</sub> spojevi nastaju u grožđu, ali se mogu pronaći i u lišću vinove loze, a čine ih heksanali i heksenali koji su nositelji karakterističnog mirisa po zelenom, drveću i travi (Makhotkina i sur., 2013). Procesom prerade prelaze u mošt, ali mogu nastati i enzimatskom oksidacijom masnih kiselina tijekom alkoholne fermentacije transformacijom aldehida. Djelovanjem kvasaca mogu se prevesti u alkohol 1-heksanol (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

### 2.1.2. Sekundarna aroma

Sekundarna aroma nastaje kao posljedica kemijskih i enzimatsko-biokemijskih reakcija koje se odvijaju primarnom obradom grožđa (ruljanje i muljanje, prešanje i maceracija). Vinu daje karakteristični cvjetni i tropski miris te miris po banani i breskvi (Swiegers i Pretorius, 2005).

### 2.1.3. Aroma fermentacije

Aroma fermentacije formira se procesom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije kao rezultat metabolizma kvasaca i bakterija. Spojevi koji nastaju tijekom fermentacije su esteri, viši alkoholi, hlapive masne kiseline te karbonilni spojevi. Soj kvasaca, metode vinifikacije, temperatura fermentacije, duljina kontakta sa pokožicom, dodatak sumporovog dioksida i koncentracija kisika utječu na formiranje ovih spojeva i njihovu koncentraciju u konačnom proizvodu (Lambrechts i Pretorius, 2000). Proces fermentacije dovodi do brojnih poželjnih procesa kao što su lakše izdvajanje tvari iz čvrstih dijelova grožđa, povećanja kvašćevih metabolita te aromatske i kemijske kompleksnosti vina, ali nastaju i potpuno novi spojevi transformacijom već postojećih (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Esteri se formiraju reakcijom između organskih kiselina i alkohola bez enzima ali i esterifikacijom aktiviranih masnih kiselina s etanolom (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Najvećim dijelom nastaju tijekom alkoholne fermentacije te predstavljaju najznačajniju skupinu spojeva koji utječu na aromu vina. U vinu je identificirano više od 160 estera od kojih je većina prisutna samo u tragovima. Esteri se prema strukturi mogu podijeliti u dvije skupine: alifatske (ravnolančane) i cikličke (fenolne) estere. Ciklički esteri nemaju veliki utjecaj na aromu zbog svoje slabe hlapivosti te prisutnosti u koncentracijama nižim od senzorskog praga osjetljivosti. Najvažniju skupinu predstavljaju alifatski esteri koji se mogu podijeliti na acetatne i etilne. Acetatni esteri nastaju reakcijom esterifikacije octene kiseline i etanola ili viših alkohola i nositelji su cvjetne i voćne arome vina. Etilni esteri nastaju reakcijom između etanola i acetyl-CoA uz djelovanje enzima

aciltransferaze (Lambrechts i Pretorius, 2000) i u vinu se nalaze u većoj koncentraciji u odnosu na acetatne (Campo i sur., 2005). Općenito, njihova koncentracija u vinu ovisi o nekoliko čimbenika: vrsta kvasaca koja je inokulirana ili koja se nalazi na grožđu, zrelost grožđa, alkoholna i jabučno-mliječna fermentacija i njezina temperatura, proces vinifikacije i ostalo (Lambrechts i Pretorius, 2000).

Viši alkoholi smatraju se alkoholima sa više od dva atoma ugljika koji imaju veću molekulsku masu i vrelište od etanola (Jackson, 2008). Ovi spojevi predstavljaju najznačajnije tvari arome koji nastaju tijekom fermentacije i čine 50 % aromatičnih spojeva u vinu. Postoje dva moguća načina njihovog nastajanja. Prvi je anabolički put iz ugljikohidrata i acetyl-CoA kao prekursora, pri čemu nastaje 35 % viših alkohola; a drugi je katabolički put, tzv. Ehrichov mehanizam, gdje se formiraju iz aminokiselina koji se nalaze u mediju (Zhang i sur., 2019). Međutim, postoji iznimka: heksanol, koji je jedini viši alkohol koji nastaje enzimskom oksidacijom linoleinske i linolne kiseline (Nykänen, 1986). Glavni predstavnici viših alkohola su: propanol, izobutil-alkohol, aktivni-amil alkohol, izoamil-alkohol, heksanol te 2-feniletil etanol. Svi spojevi vinu daju vrlo jaku i snažnu aromu, dok feniletil alkohol karakterizira cvjetna nota na ljiljan i ruže (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Hlapive masne kiseline predstavljaju organske masne kiseline koje su u vinu prisutne u rasponu od 500 do 1000 mg L<sup>-1</sup>, od čega 90 % čini octena kiselina čija je povišena koncentracija povezana sa bakterijskim kvarenjem (Coetzee, 2013). Veće koncentracije masnih kiselina detektirane su u vinu bez dodanog sumporovog dioksida zbog rasta bakterija octene kiseline uz prisutnost kisika (Vaimakis i Roussis, 1996). Kratkolančane masne kiseline, poput kapronske, kaprilne i kaprinske, nastaju kao međuprodukti djelovanja kvasaca u biosintezi dugolančanih masnih kiselina tijekom alkoholne fermentacije. Niže koncentracije doprinose svježem okusu vina i najčešće se nalaze ispod senzorskog praga osjetljivosti (Jackson, 2008). Međutim, ako se nalaze u većoj koncentraciji, vinu daju karakterističan miris na „kuhano“, „ocat“ i „sir“ (Lambrechts i Pretorius, 2000) te mogu inhibirati ili usporiti fermentaciju, jer djeluju toksično na stanice kvasca (Bardi i sur., 1999). Dugolančane masne kiseline, poput oleinske i linolne kiseline pozitivno djeluju na proces fermentacije, ali ne nastaju djelovanjem kvasaca nego potječu od voštanih kutikula pokožice grožđa. Bitni su prekursori za stvaranje lipidnih spojeva koji se nalaze u kvascu (Lambrechts i Pretorius, 2000).

Karbonilne spojeve vina čine diacetil i acetaldehid. Acetaldehid nastaje kao sekundarni produkt alkoholne fermentacije djelovanjem kvasaca ili oksidacijom etanola pomoću bakterija octene kiseline, ali se formira i tijekom dozrijevanja vina. Na njegovu koncentraciju utječe dodatak SO<sub>2</sub>, kisik i temperatura (Jackson, 2008). U bijelim vinima njegova koncentracija može biti i do 300 mg L<sup>-1</sup>, dok se u crnim vinima nalazi u znatno manjoj koncentraciji. Kada se nalazi u većim koncentracija, vinu daje specifičan miris i okus na oksidirano i ishlapljeno (Ebeler i Spalding, 1999). Općenito, on čini 90 % ukupnih karbonilnih spojeva detektiranih u vinu.

Diacetil je diketon koji se u vinu formira djelovanjem bakterija mliječne kiseline tijekom jabučno-mliječne fermentacije, daje karakterističan miris po maslacu, orahu i dvopeku ako je prisutan u niskim koncentracijama, dok u visokim koncentracijama daje miris po karameli (Jackson, 2008). Općenito, jabučno-mliječna fermentacija najčešće se provodi poslije alkoholne fermentacije, te je iznimno važna za ona vina koja sadrže visoku koncentraciju kiselina. Tijekom ovog procesa, jaka i opora jabučna kiselina se pretvara u ugodniju mliječnu kiselinu i ugljikov dioksid, što rezultira smanjenjem ukupne kiselosti vina. Osim toga, rezultat ovog procesa je i povećanje koncentracija određenih spojeva arome, kao što su diacetil, etil laktat, acetaldehid i acetoin. Navedeni spojevi odgovorni su za aromu vina na vrhnje i maslac (Lambrechts i Pretorius, 2000).

#### 2.1.4. Aroma starenja

Aroma starenja nastaje kao posljedica procesa dozrijevanja i skladištenja vina pri čemu se odvijaju brojni fizikalni i enzimatski procesi u boci ili drvu (Lambrechts i Pretorius, 2000). Oksidacija primarne i sekundarne arome te ekstrakcija velikog broja komponenata iz drveta zaslužna je za formiranje arome starenja (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

## 2.2. STARENJE VINA

Prije samog puštanja u promet, vino obavezno mora proći kroz fazu starenja. Taj proces ovisi o brojnim faktorima poput položaja vinograda, vinogradarske prakse, sorte grožđa i uvjeta berbe. Koliko će dugo trajati starenje vina ovisi o osobnim preferencijama. Ako potrošač „preferira“ vina sa izraženim voćnim i sortnim karakterom, tada se proces starenja provodi puno kraće i vino treba konzumirati u roku nekoliko mjeseci/par godina od punjenja u boce. S druge strane, ako su zahtjevi potrošača za „kompleksnijim“ vinom tada ono treba puno duži period

starenja pri čemu gubi karakterističnu sortnu aromu (Escudero i sur., 2002). Poznate su dvije vrste starenja: oksidativno i reduktivno starenje. Oksidativna faza odnosno dozrijevanje vina odvija se uz prisutnost kisika, najčešće u hrastovim („barrique“) bačvama. Reduktivna faza je starenje bez kisika i ono slijedi nakon punjenja vina u boce (Jackson, 1994). Tijekom starenja vino prolazi kroz 3 faze. Tijekom prve faze, poznate kao dozrijevanje, povećava se stabilnost, aroma i okus vina, smanjuje se gorčina vina kao i miris po kvascu nastalog tijekom fermentacije. U drugoj fazi dolazi do formiranja svih poželjnih karakteristika i aroma vina, dok treću fazu treba zaustaviti jer uzrokuje narušavanje kvalitete vina, smanjenje poželjnih voćnih mirisa te razvoj oksidiranih neugodnih aroma (van Wyk i Silva, 2019).

Tijekom procesa starenja dolazi do brojnih promjena vina, a jedna od najočitijih je njegova boja. Crna vina nakon fermentacije imaju tamniju boju, ali nakon toga intenzitet boje se smanjuje i ono postaje svjetlije. To je posljedica povezivanja i kopigmentacije antocijana u komplekse, stvaranje novih pigmenata (piranoantocijana) i formiranje kompleksa tanin-tanin i antocijan-tanin. Polimerizacija započinje već tijekom alkoholne fermentacije, a nastavlja se nakon nje. Pogoduje joj peroksidacija dihidroksifenola (prvenstveno *o*-difenola) u dikinone. Oni se polako polimeriziraju u bezbojne, zatim žućkaste dimere do krajnjih smeđih produkata. Osim što dolazi do promjene boje, starenjem vina mijenja se i njegova aroma. Esteri koji nastaju tijekom fermentacije, vinu daju voćni, cvjetni karakter ali imaju tendenciju da „izblijede“ tijekom vremena zbog hidrolize u odgovarajuće kiseline i alkohole. Takav trend pokazali su etil butirat, *i*-amil acetat i 2-feniletal acetat čija se koncentracija smanjivala procesom starenja vina. S druge strane dietil sukcinat, ostaje prisutan iznad senzorskog praga osjetljivosti i do nekoliko godina te se njegova koncentracija starenjem povećava (Marić i Bača, 2003). Hidroliza estera odvija se sporije pri višim pH i pri nižoj temperaturi, ali i uz prisutnost antioksidansa poput SO<sub>2</sub> i raznih fenolnih kiselina (kafeinska i galna) (Roussis i Lambropoulos, 2007). Druga važna skupina koja se također mijenja starenjem vina su terpeni. Njihovom oksidacijom tijekom starenja dolazi do velikog gubitka sorte arome, posebno kod vina Muškat. Tijekom starenja dolazi i do promjene norizoprenoidea, pri čemu se smanjuje koncentracija  $\beta$ -damaskenona a povećava koncentracija TDN-a (Jackson, 2008).

Najpoznatiji način starenja vina, koji se koristi još od davnina, provodi se u hrastovim bačvama. Crna vina u većini slučajeva odležavaju u bačvama minimalno 6 mjeseci pri čemu se formiraju svi poželjni mirisi i okusi vina (Smith, 2013). Dokazano je kako i određene vrste bijelih



vina (Chardonnay, Rizling, i Sauvignon blanc) pokazuju pozitivne senzorske karakteristike nakon starenja u bačvama (Jacksonu, 2008). Procesi koji se odvijaju u bačvama su vrlo spori i složeni i nastaju kao posljedica kontinuirane i polagane difuzije kisika kroz pore bačve, a doprinose poželjnim senzorskim karakteristike vina. Kisik otopljen u vinu, utječe na njegov sastav uzrokujući reakcije oksidacije. To su spore kemijske reakcije koje uzrokuju oksidaciju polifenola i hidroksifenolnih spojeva, kao i produkata koji nastaju njihovom razgradnjom. Oksidacijom dolazi do posmeđivanja vina i formiranja oksidativnog mirisa. U tim reakcijama sudjeluju i elagitanini (sastojci drva), koji reakcijom sa kisikom dovode do stvaranja vodikovog peroksida. Konačni produkt koji nastaje oksidacijom etanola je acetaldehid, ali osim njega nastaju i 2-nonenal, eugenol, benzaldehid i furfural, spojevi koji su odgovorni za aromu starih, oksidiranih vina (Escudero i sur., 2002). Dodatni čimbenici koji utječu na proces oksidacije su pH, udio tanina, bakra, željeza i drugi. Vina različito reagiraju na taj proces, ovisno o koncentraciji fenola u vinu kao i dodatku antioksidansa, odnosno SO<sub>2</sub> koji se dodaje kao zaštita od oksidativnog posmeđivanja, posebice kod bijelih vina, kao i askorbinska kiselina koja do sada nije pokazala u potpunosti zadovoljavajuća svojstva (Karbowski i sur., 2010).

Osim oksidacije vina tijekom njegovog dozrijevanja u bačvama dolazi i do ekstrakcije brojnih spojeva iz drveta koji se mogu podijeliti u dvije skupine spojeva. Hlapive komponente koje čine laktone (aroma kokosa), fenolni aldehidi (aroma vanilije) i furanski spojevi (furfural) te fenolne komponente koje najvećim dijelom čine elagitanini (Jourdes i sur., 2011). Na stupanj ekstrakcije ovih spojeva utječe kemijski sastav vina. Istraživanje Garde-Cerdán i sur. (2004) pokazalo je pozitivan učinak većih koncentracija etanola u vinu na izdvajanje pojedinih hlapivih spojeva, dok su Ancín i sur. (2004) ukazali na utjecaj SO<sub>2</sub> koji svojim prisustvom može odgoditi oslobađanje pojedinih furanskih spojeva te hlapivih fenola. Spojevi koji se ekstrahiraju utječu na strukturu fenolnih spojeva, formiranje „arome starenja“ ali i na boju i bistroću vina. Kod formiranja „boqueta“ tijekom procesa starenja, osim ekstrakcije iz drveta, dolazi i do reakcija između šećera i aminokiselina u vinu pri čemu nastaju melanoidi i furfurali (viši aldehidi) koji su odgovorni za voćnu aromu (Perez-Coello i Diaz-Maroto, 2009). Aldehidi nastali ovim reakcija dalje mogu reagirati s alkoholima i formirati acetale, hlapive spojeve vrlo finog mirisa (Jackson, 2008). Takva vina odlikuju se povećanom koncentracijom laktone, 4-etil fenola, 4-etil i 4-vinil gvajakola. Vina koja su čuvana u hrastovim bačvama gube svoju svježinu i voćnost, a karakterizira ih miris na dim, drvo, vaniliju, začine i prepečenac (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Proces starenja proveden u hrastovim bačvama pokazao je i određene nedostatke. Dugotrajnost procesa starenja predstavlja najveći problem, jer kod nekih vina može trajati i do nekoliko godina. Osim toga, potrebna je stalna kontrola kako bi se u konačnici postiglo pitko, skladno i harmonično vino (Jourdes i sur., 2011). Vrlo visoka cijena također predstavlja jedan od problema, a osim toga potrebno je puno prostora u vinariji te je moguća i kontaminacija kvascima i bakterijama što dovodi do potrebe za novim bačvama. Zbog svih navedenih nedostataka, pokušavaju se pronaći načini kojim bi se skratilo vrijeme starenja vina, a da pritom kvaliteta vina bude očuvana (García Martín i Sun, 2013). Postupci mikrooksigenacije (Perez-Magarino i sur., 2007) te neke nove fizikalne metode (ultrazvuk visokih snaga, električno polje, gama zračenje i sl.) (Tao i sur., 2014) sve se više proučavaju kako bi se omogućila njihova primjena u budućnosti.

Vrlo često se u vinarijama velikog kapaciteta proces starenja provodi u tankovima od nehrđajućeg čelika kako bi se ubrzao proces starenja i spriječile moguće kontaminacije. Takav proces provodi se bez kisika ali uz konstantno mjerenje i regulaciju temperature. U takve tankove moguće je dodati hrastov „čips“ ili „letve“ koji predstavljaju imitaciju starenja vina u bačvama jer dolazi do ekstrakcije tanina i polifenola, ali i ostalih poželjnih aromatskih spojeva drva koji u konačnici pozitivno utječu na aromu i kompleksnost vina (Jourdes i sur., 2011). Alamo Sanza i Nevares Dominguez (2006) su svojim istraživanjem potvrdili kako starenjem vina u boci sa hrastovim „čipsom“ i „štapićima“ dolazi do bržeg procesa polimerizacije, smanjenja koncentracije antocijana, te cjelokupnog procesa starenja vina, u odnosu na vino koje je odležavalo u bačvama. Bilo koji način starenja vina, ili u boci ili u hrastovim bačvama, dovodi do promjene arome vina jer ono gubi svoju primarnu aromu i aromu fermentacije, a dovodi do formiranja nekih potpuno novih i kompleksnih aroma starenja vina koje u konačnici dovode do kvalitetnog i jedinstvenog proizvoda (Styger i sur., 2011).

Jedna od novih mogućnosti starenja vina je mikrooksigenacija koja se počela sve češće primjenjivati. Provodi se u tankovima od nehrđajućeg čelika u koje se dovode male, kontinuirane i kontrolirane doze kisika preko poroznih difuzora pri čemu je glavna ideja da se imitiraju uvjeti tijekom procesa starenja u bačvama (Perez-Magarino i sur., 2007). Takav način starenja vina zaslužan je za formiranje pozitivnih i poželjnih karakteristika jer polifenoli troše uneseni kisik, a pritom ne stvaraju negativne karakteristike, dok sam proces traje puno kraće (Anli i Cavuldak, 2012).

## 2.3. ANTIOKSIDANSI

### 2.3.1. Sumporov dioksid

Sumporov dioksid ( $\text{SO}_2$ ) jedan je od prirodnih sastojaka vina. U vrlo niskim koncentracijama ( $< 10 \text{ mg L}^{-1}$ ) nastaje djelovanjem kvasaca tijekom alkoholne fermentacije, a njegove više koncentracije u vinu nastaju zbog dodavanja tijekom procesa proizvodnje vina. Njegova upotreba u vinarstvu datira još od 18. stoljeća zbog niza pozitivnih djelovanja u proizvodnji i čuvanju vina (Jackson, 2008).

Slobodni i vezani oblik sumporovog dioksida dvije su forme ovog antioksidansa u vinu. Vezani oblik je prisutan u velikoj koncentraciji u vinu, a nastaje kao posljedica interakcije sa karbonilnim spojevima (najčešće acetaldehid) i drugim reaktivnim tvarima. Slobodni oblik može biti u formi bisulfitnog iona ( $\text{HSO}_3^-$ ) ili kao molekularni  $\text{SO}_2$  te se nalazi u puno manjoj koncentraciji (Badea i Antoce, 2015). Količine slobodnog i vezanog  $\text{SO}_2$  u vinu se nalaze u stanju dinamičke ravnoteže. Na odnose među pojedinim oblicima  $\text{SO}_2$  veliki utjecaj ima pH (pri nižem pH veći je udio molekularnog oblika) i koncentracija određenih tvari koje se direktno vežu na dodani  $\text{SO}_2$  (Ribéreau Gayon i sur., 2006).

Upravo zbog svojeg pozitivnog djelovanja na vino  $\text{SO}_2$  je aditiv koji je praktički nezamjenjiv i neophodan u proizvodnji vina. Njegova dva najvažnija svojstva su antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje. Dodatkom prije alkoholne fermentacije osigurava inhibiciju mikroorganizama (autohtonih kvasaca, bakterija mliječne i octene kiseline) koji su prirodno prisutni na grožđu, na raznom posuđu u vinariji ili nastaju procesima prerade prije fermentacije (Santos i sur., 2012).  $\text{SO}_2$ , dodan u vino, veže se na otopljeni kisik i tako štiti vino od moguće oksidacije fenolnih spojeva i ostalih komponenti arome (Ribéreau-Gayon i sur., 2006); osim toga svojom reakcijom sa karbonilnim spojeva sprečava gubitak određenih komponenti arome vina (Badea i Antoce, 2015); tijekom starenja vina pozitivno djeluje na određene spojeve poput alkohola, estera te masnih kiselina (Roussis i sur., 2013). Utječe i na boju vina, pri čemu uzrokuje formiranje svjetlije nijanse vina (Jackson, 2008), te djeluje kao sredstvo za dezinfekciju tijekom čišćenja posuđa i opreme u vinarijama (Jackson, 2008).

S druge strane,  $\text{SO}_2$  pokazuje i negativno djelovanje na kvalitetu vina i njegova organoleptička svojstva, ako se u vinu nalazi u većoj koncentraciji od dozvoljene (Santos i sur.,

2012). Dokazano je kako visoke koncentracije mogu dovesti do potpunog gubitka poželjne arome te formiranja neugodne arome koja daje miris na vlažnu vunu te uzrokuje stvaranje osjećaja iritacije i pečenja (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Osim na promjene vina, negativno djeluje i na zdravlje ljudi, onih osjetljivih na sulfite, koji negativno reagiraju na koncentraciju ovog aditiva već u rasponu od 20 do 50 mg L<sup>-1</sup>. Nakon što se vino konzumira, sumpor se, umjesto na kisik, veže na hemoglobin, što dovodi do nedostatka kisika mozgu i mogućih glavobolja. Uzrokuje i alergije, mučnine, probleme s disanjem pa čak i pojavu astme (Santos i sur., 2011). Prema Direktivi EC/2003/89, sulfiti u koncentracijama većim od 10 mg L<sup>-1</sup> izraženi kao SO<sub>2</sub>, moraju se naznačiti na deklaraciji proizvoda. Stoga su potrošači sve više orijentirani na „zdrave“ proizvode bez kemijskih konzervansa (Kojić, 2019). Prema Uredbi Komisije 606/2009 koncentracija SO<sub>2</sub> u vinima, osim kod pjenušavih i likerskih vina, koja će biti namijenjena za ljudsku potrošnju ne smije prelaziti 150 mg L<sup>-1</sup> za crna vina te 200 mg L<sup>-1</sup> za bijela i ružičasta vina, i to vrijedi za sve članice Europske unije (Zakon o vinu, 2019).

Zdravlje potrošača najvažniji je razlog pokušaja pronalaska alternative za SO<sub>2</sub> koji se zbog svojih brojnih prednosti smatra nezamjenjivim (Badea i Antoce, 2013). Jedan od potencijalnih „zamjena“ je glutation, kao i smjesa antioksidansa (galna i kafeinska kiselina) (Roussis i sur., 2013). Razmatrali su se spojevi poput DMDC (dimetil dikarbonat), bakteriocina, fenolnih spojeva i lizozima koji su pokazali veliki potencijal za korištenje u različitim fazama proizvodnje vina (Santos i sur., 2011). Fizikalne metode (ultrazvuk visokih snaga, pulsirajuće električno polje, visoki hidrostatski tlak) također su pokazale pozitivno djelovanje na određene korake u proizvodnji; smanjenje vremena maceracije, povećavanje ekstrakcije fenolnih spojeva i ubrzanje procesa starenja vina. Dosadašnja istraživanja pokazuju da se SO<sub>2</sub> ne može u potpunosti zamijeniti tijekom proizvodnje vina, ali je moguće smanjiti njegovu koncentraciju (Santos i sur., 2011).

Roussis i sur. (2013) u svojem istraživanju ispitivali su utjecaj antioksidansa (SO<sub>2</sub>, glutationa, kafeinske i galne kiseline) na koncentraciju hlapivih aromatskih spojeva crnih vina Merlot i Cabernet Sauvignon tijekom 18 i 36 mjeseci starenja u bocama. Nakon 18 mjeseci pokazalo se da svi uzorci imaju približno jednaku koncentraciju hlapivih spojeva u vinu. Nakon 36 mjeseci starenja utvrđeno je kako uzorci sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> imaju niže koncentracije određenih hlapivih spojeva, dok uzorci sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub> i oni sa

dodatkom drugih antioksidansa pokazuju očuvanje koncentracije tih istih spojeva. Dokazano je kako SO<sub>2</sub> usporava gubitak sortnih tiola, poput 3-merkaptotioheksan-1-ola (Blanchard i sur., 2004). Ova dosadašnja saznanja pokazuju kako je moguće smanjiti upotrebu SO<sub>2</sub> ali je potrebno provesti još istraživanja da bi se to moglo primijeniti u praksi. Kao potencijalna zamjena pokazale su se aminokiseline i peptidi koji sadrže sulfhidrilnu (SH) skupinu, posebno glutation koji je prirodni tripeptid i *N*-acetil-cistein koji predstavlja izvrstan prehrambeni izvor cisteina za ljude (Friedman, 1994). Osim njih, pozitivno djelovanje pokazalo se upotrebom glutaciona zajedno sa fenolnim kiselinama (galna i kafeinska kiselina) (Roussis i sur., 2008) ili sa nekim drugim spojevima sa sumporom (Roussis i sur., 2005). Istražuje se i mogućnost upotrebe inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutationom, čime se povećava njegova koncentracija u moštu i vinu. Smatra se da to dovodi do očuvanja arome i boje vina tijekom njegovog skladištenja (Rodríguez-Bencomo i sur., 2014).

### 2.3.2. Glutation

Glutation je prirodno prisutan tripeptid u biljkama i brojnoj hrani, kojeg izgrađuje glutaminska kiselina, cistein i glicin. Analizom bobica i mošta dobivenih iz 28 različitih sorti grožđa *Vitis Vinifera*, prvi puta je identificiran 1989. godine, te je njegova koncentracija varirala između 17-114 mg L<sup>-1</sup>, ovisno o sorti. Navedene varijacije u koncentraciji posljedica su, ne samo različitih sorti, već i lokacije vinograda, termina berbe grožđa kao i tehnološkog procesa proizvodnje (Cheynier i sur., 1989). Glutation se u stanicama najčešće može pronaći u reduciranom obliku (GSH), dok oksidirani oblik (GSSG) nastaje njegovom oksidacijom koji se, uz NADPH, može vratiti natrag u reducirani oblik uz djelovanje enzima glutation-reduktaze (Carmel-Harel i Storz, 2000).

Dodani glutation u vino pomaže sumporovom dioksidu u njegovoj antioksidacijskoj ulozi pri čemu se u vinu zadržava više slobodnog SO<sub>2</sub> (Roussis i Sergianitis, 2008). Drugim riječima, glutation je primarni supstrat za kemijske reakcije u odnosu na SO<sub>2</sub>, a provedeno istraživanje ukazuje i na njihov sinergistički učinak (Fracassetti i sur., 2013).

Glutation zbog prisutnosti tiolne grupe aminokiseline cisteina pokazuje antioksidacijska svojstva (Lavigne i sur., 2007). Sprječava procese oksidacije koji dovode do posmeđivanja vina (Li i sur., 2008) zbog formiranja kinona, čijom polimerizacijom dolazi do formiranja tamnih

polimera (Kritzinger i sur., 2012). Dodatkom 10 mg L<sup>-1</sup> glutationa u vino Sauvignon blanc tijekom punjenja u boce, dolazi do zaštite njegove žute boje tijekom 3 godine starenja, u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Dubourdieu i Lavigne, 2004). Njegov pozitivan utjecaj utvrđen je i na aromu vina, jer štiti vino od gubitka poželjnih aroma, a sprečava nastanak onih negativnih (Kritzinger i sur., 2013). Papadopoulou i Roussis (2008) su u svojem istraživanju dodatkom glutationa i *N*-acetil-cisteina usporili smanjenje određenih hlapivih estera i terpena u bijelim vinima. Nadalje, dodatak glutationa u koncentraciji 20 mg L<sup>-1</sup> u suho vino Muškat rezultiralo je usporavanjem gubitka linaloola i  $\alpha$ -terpeniola tijekom skladištenja vina (Papadopoulou i Roussis, 2001). Prema Roussis i sur. (2007), dodatak 35 mg L<sup>-1</sup> SO<sub>2</sub> i 25 mg L<sup>-1</sup> glutationa u vino rezultiralo je puno boljom zaštitom estera i linaloola, nakon 36 mjeseci skladištenja, u usporedbi sa vinom standardne koncentracije SO<sub>2</sub> od 50 mg L<sup>-1</sup>. Dubourdieu i Lavigne (2004) uočili su pozitivan efekt dodatka glutationa na hlapive tiole koji su prisutni u vinu. Dodatak glutationa (10 mg L<sup>-1</sup>) u vino Sauvignon blanc u fazi punjenja u boce, rezultiralo je značajno višom koncentracijom tiola 3-merkaptohexan-1-ola tijekom trogodišnjeg skladištenja u odnosu na kontrolni uzorak. Ugliano i sur. (2011) potvrdili su prethodno istraživanje, pri čemu je dodatak glutationa u koncentraciji 20 mg L<sup>-1</sup> prije punjenja u boce rezultirao očuvanjem tiola tijekom 6 mjeseci skladištenja.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJAL

#### 3.1.1. Uzorci vina

Uzorci vina koji su korišteni u svrhu ovog istraživanja je crno vino sorte Cabernet Sauvignon, proizvedeno 2017. godine u vinariji Erdutski vinogradi d.o.o (Erdut, Republika Hrvatska). Svi uzorci tretirani su ultrazvučnom sondom (25 mm, amplituda 25 %, 6 min trajanje tretmana) (Lukić i sur., 2019). Prije tretmana, uzorci su pripremljeni na sljedeći način:

- UZORAK 1: vino standardne koncentracijom SO<sub>2</sub> (25 mg L<sup>-1</sup>)
- UZORAK 2: vino snižene koncentracije SO<sub>2</sub> (10 mg L<sup>-1</sup>)
- UZORAK 3: vino snižene koncentracije SO<sub>2</sub> (10 mg L<sup>-1</sup>) i dodanim glutationom (20 mg L<sup>-1</sup>)

Nakon ultrazvučnog tretmana, vina su punjena u boce od 750 mL te stavljena na starenje na tamnom mjestu konstantne temperature od 12 °C. Laboratorijske analize provedene su nakon 12 mjeseci starenja. Tretiranje uzoraka provedeno je u duplikatu.

#### 3.1.2 Kemikalije

Prilikom analiziranja uzorka plinskom kromatografijom korištene su sljedeće kemikalije:

- n-amil alkohol, čistoća 98 % (Merck, Darmstadt, Germany)
- NaCl p.a., čistoća 99 % (Gram-mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska)

#### 3.1.3. Instrumenti i pomoćni pribor

Za određivanje spojeva arome vina, korišteni su sljedeći instrumenti i pribor:

- Termoblok sa magnetskom mješalicom (Pierce, Reacti-Therm, Heating/Stirring module, Rockford, IL, SAD)
- SPME vlakno: 100 µm PDMS, 23 Ga (Supelco, Bellefonte, PA, SAD)
- Plinski kromatograf (GC) Agilent Technologist 6890 Network GC System, (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

- Maseni spektrometar Agilent Technologist 5973 Inert Mass Selective Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- Kolona BP20 (50  $\mu\text{m}$   $\times$  220  $\mu\text{m}$   $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ) (SGE Analytical Science, Victoria, Australija)
- Analitička vaga  $\pm 0,0001\text{g}$  (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD)
- Tikvica od 50 mL
- Mikropipeta 100  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Viale od 20 mL
- Čepovi za vialo PTFE N20 (Macherey-Nagel, Dueren, Germany)
- Magnet

### 3.2. METODA

3.2.1. Određivanje spojeva arome vina plinskom kromatografijom/masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS)

#### Princip metode

##### 3.2.1.1. Priprema uzorka vina

U tikvicu od 50 mL otpipetirati dio uzorka vina te dodati *n*-amil alkohol (interni standard) u koncentraciji od 20 mg L<sup>-1</sup>, te tikvicu nadopuniti do oznake uzorkom. U vialu odvagati 2 g NaCl te dodati 10 mL pripremljenog uzorka s internim standardom, dodati magnet te zatvoriti čepom. Vialu postaviti u termoblok sa magnetskom miješalicom te SPME vlakno staviti na adsorpciju kroz 30 minuta pri temperaturi od 40 °C uz konstantno miješanje. Nakon 30 minuta vlakno prenijeti u injektor plinskog kromatografa gdje se odvija desorpcija u trajanju od 5 minuta.

##### 3.2.1.2. Kromatografski uvjeti (GC/MS analiza)

Kolona korištena za analizu: BP20 (50  $\mu\text{m}$   $\times$  220  $\mu\text{m}$   $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ) (SGE Analytical Science, Victoria, Australia)

Uvjeti rada plinskog kromatografa (GC/MS):

- Temperatura injektora: 250 °C



- „Splitless mode“ injektiranja
- Temperaturni program: 40 °C, 5 min → 200 °C, 3 °C min<sup>-1</sup> → 240 °C, 30 °C min<sup>-1</sup>
- Plin nosioc: Helij (He)
- Protok plina nosioca: 1,2 mL min<sup>-1</sup>
- Temperatura „transfer line“: 280 °C
- Temperatura ionskog izvora: 250 °C
- Temperatura kvadropola: 150 °C
- Rad masenog detektora: SCAN mode (35-300 *m/z*)

### *3.2.1.3. Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome*

Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome provedena je kompjuterskom obradom podataka, odnosno dobivenog kromatograma, u programu Enhanced Chemstation (Agilent Technologies) dok je analiza rezultata provedena u programu Microsoft Excel (Office 2010). Spojevi arome identificirani su usporedbom retencijskih vremena (vrijeme između injektiranja i izlaska određenog spoja iz kolone) sa onima dobivenim analizom standarada. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dvije paralele te je izračunata standardna devijacija za svaki detektirani spoj u vinu, rezultati su izraženi u mg L<sup>-1</sup> a neki spojeve arome u µg L<sup>-1</sup>.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Utjecaj sumporovog dioksida kao najvažnijeg aditiva korištenog u proizvodnji vina te glutaciona kao njegove potencijalne zamjene, ispitan je na crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 12 mjeseci starenja u bocama, koje su čuvane na adekvatnom tamnom i hladnom mjestu. Analizirala su se 3 uzorka vina u 3 paralele. Prvi uzorak predstavljao je vino sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida od  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , drugom uzorku je smanjena koncentracija sumporovog dioksida na  $10 \text{ mg L}^{-1}$  te dodan glutaciona koncentracije  $20 \text{ mg L}^{-1}$  dok posljednji uzorak karakterizira smanjena koncentracija sumporovog dioksida koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$  bez dodatka drugog antioksidansa. Sve oznake koje su se koristile u daljnjim prikazima vidljive su u tablici 1.

Pomoću plinske kromatografije s masenom spektrometrijom uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi detektirani su spojevi arome vina, nakon čega im je određena koncentracija u svim analiziranim uzorcima, a temeljem dobivenih vrijednosti izrađeni su grafovi za svaki pojedini detektirani spoj arome (Slika 1-19).

Analizom je utvrđena prisutnost hlapivih masnih kiselina, viših alkohola, terpena, norizoprenoida te acetatnih i etilnih estera. Skupinu hlapivih masnih kiselina čine kapronska, kaprilna te kaprinska kiselina. Viši alkoholi koji su detektirani su sljedeći: 2-fenil etanol, *i*-amil alkohol, *cis*-3-heksen-1-ol i 1-heksanol. Terpenima pripadaju linalool i  $\alpha$ -terpineol koji se nalaze u vrlo niskim koncentracijama. TDN i  $\beta$ -damaskenon čine skupinu norizoprenoida te su kao i terpeni zabilježeni u niskim koncentracijama. Estere pronađene u ovim uzorcima vina čine acetatni i etilni esteri. Etilne estere čine etil butirac, etil dekanac, etil heksanoac i etil oktanoac. Acetatnim esterim pripadaju etil acetac, *i*-amil acetac te 2-feniletil acetac.

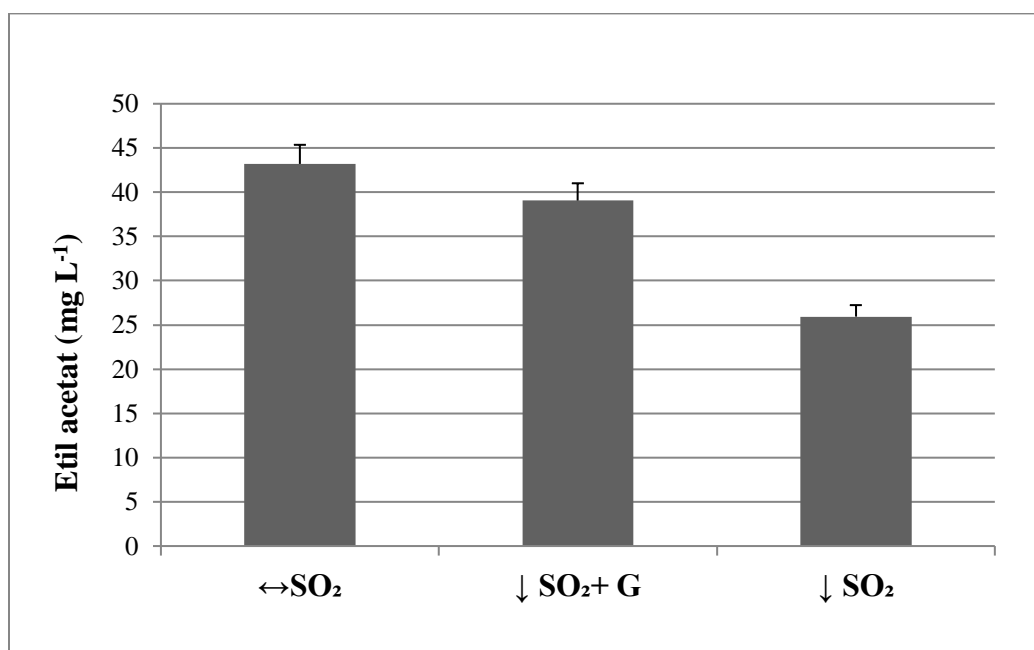
Tablica 1. Analizirani uzorci i njihove oznake u grafičkim prikazima

UZORAK	OBJAŠNENJE	OZNAKA
1	vino standardne koncentracije SO <sub>2</sub> (25 mg L <sup>-1</sup> )	↔ SO <sub>2</sub>
2	vino snižene koncentracije SO <sub>2</sub> (10 mg L <sup>-1</sup> ) i dodanim glutationom (20 mg L <sup>-1</sup> )	↓ SO <sub>2</sub> + G
3	vino snižene koncentracije SO <sub>2</sub> (10 mg L <sup>-1</sup> )	↓ SO <sub>2</sub>

Esteri pripadaju jednim od najvažnijih ali i najvećih hlapivih spojeva koji se mogu pronaći u vinu s pozitivnim efektom na aromu i okus. Većina estera koji su detektirani u vinu, produkti su enzimatske esterifikacije nastalih uz pomoć kvasaca koji su aktivni tijekom procesa alkoholne fermentacije. Manje koncentracije estera nastaju kemijskom esterifikacijom tijekom procesa starenja vina. Taj proces se odvija sporo i u konačnici dovodi do promjene arome. Tijekom starenja vina dolazi do hidrolize acetatnih i etilnih estera čime se gubi njihova voćnost i svježina (Perez-Prieto i sur., 2003). Reakcije hidrolize podrazumijevaju djelovanje enzima esteraza i lipaza. Esteraze pokazuju specifičnost prema supstratima sa 2-6 C atoma, dok lipaze za supstrate sa više od 10 C atoma (Sumbly i sur., 2010). Dokazano je kako etilni esteri sporije hidroliziraju od acetatnih, iako s porastom molekulske mase hidroliziraju puno brže (Ramney i Ough, 1980).

Acetatni esteri koji predstavljaju veliku skupinu estera mogu se vrlo često pronaći u mladim vinima pri čemu utječu na formiranje njihove pozitivne i poželjne arome na voće i cvijeće, aromu banane, jabuke i ruže koji nastaje u njemu tijekom fermentacije. Nastaju reakcijom esterifikacije između octene kiseline i etanola ili viših alkohola. Ovoj skupini pripadaju etil acetat, *i*-butil acetat, *i*-amil acetat, 2-feniletal acetat i heksil acetat. Njihove koncentracije u vinu variraju i nalaze se u dosta niskim koncentracijama. Jedini izuzetak kojeg je moguće detektirati u puno većoj koncentraciji je etil acetat, što je vidljivo i u analiziranim uzorcima ovog rada. Iako je njegova koncentracija puno viša od ostalih acetatnih estera, dokazano je kako koncentracije između 150 i 200 mg L<sup>-1</sup> rezultiraju razvojem nepoželjne arome na otapalo te vrlo često i kvarenjem vina (Lambrechts i Pretorius, 2000).

Na slici 1 prikazane su koncentracije etil acetata u analiziranim uzorcima vina nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Etil acetat karakterizira aroma na lak za nokte, voće kao što je ananas, sa senzorskim pragom osjetljivosti od  $12,3 \text{ mg L}^{-1}$ . U uzorcima vina detektirane su veće vrijednosti koncentracije, iz čega je vidljivo da formira i utječe na ukupni aromatski profil vina (Francis i Newton, 2005). Iz rezultata se može uočiti puno veća koncentracija etil acetata u uzorku sa sniženom koncentracijom  $\text{SO}_2$  uz dodatak glutaciona, u odnosu na uzorak bez dodanog glutaciona. Koncentracija ovog spoja je blago snižena u uzorku sa kombinacijom antioksidansa (snižena koncentracija  $\text{SO}_2$  i dodatak glutation) u odnosu na kontrolni uzorak, pri čemu se može zaključiti kako glutation štiti etil acetat u vinu.

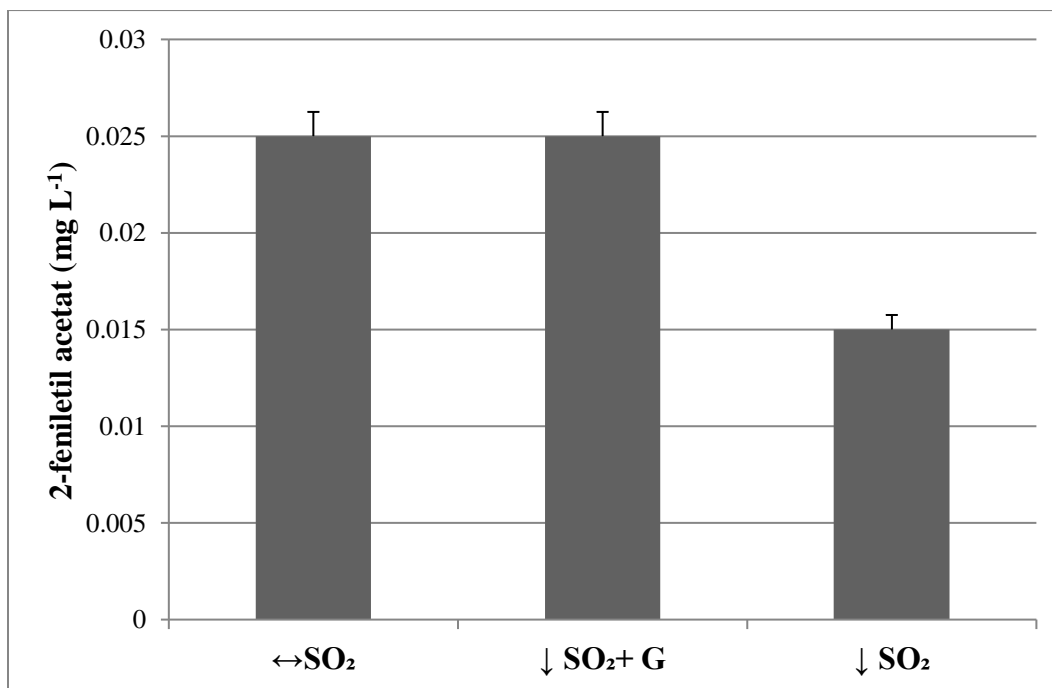


Slika 1. Ovisnost koncentracije etil acetata o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

U istraživanju Roussis i sur. (2013) dobiveni su isti rezultati ispitivanjem utjecaja antioksidansa ( $\text{SO}_2$ , glutaciona, kafeinske i galne kiseline) na aromatske spojeve crnog vina Cabernet Sauvignon i Merlot, nakon 18 i 36 mjeseci starenja. Spomenuti autori analizirali su 3 uzorka; prvi je sadržavao standardnu koncentraciju  $\text{SO}_2$  ( $35 \text{ mg L}^{-1}$ ), drugi je karakterizirala smanjena koncentracija  $\text{SO}_2$  ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ), dok je trećem uzorku uz smanjenu koncentraciju  $\text{SO}_2$  dodana smjesa antioksidansa različitih koncentracija (kafeinska kiselina  $60 \text{ mg L}^{-1}$ , galna kiselina

20 mg L<sup>-1</sup> i glutation 20 mg L<sup>-1</sup>). Nakon 18 mjeseci starenja uzorak u kojem je smanjena koncentracija SO<sub>2</sub> te uzorak sa dodatak kombinacije antioksidansa pokazali su slične koncentracije etil acetata u vinu. Nakon 36 mjeseci starenja u bocama, koncentracija etil acetata smanjila se u uzorku sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> dok je uzorak sa dodatkom antioksidansa pokazivao najveću koncentraciju ovog spoja. To su potvrdili još jednim istraživanjem na Muškat bijelom i Xinomavro crnom vinu, u kojem su dokazali zaštitni efekt glutaciona na etil acetat u vinu nakon 5 odnosno 6 dana skladištenja vina u bocama (Roussis i sur., 2009).

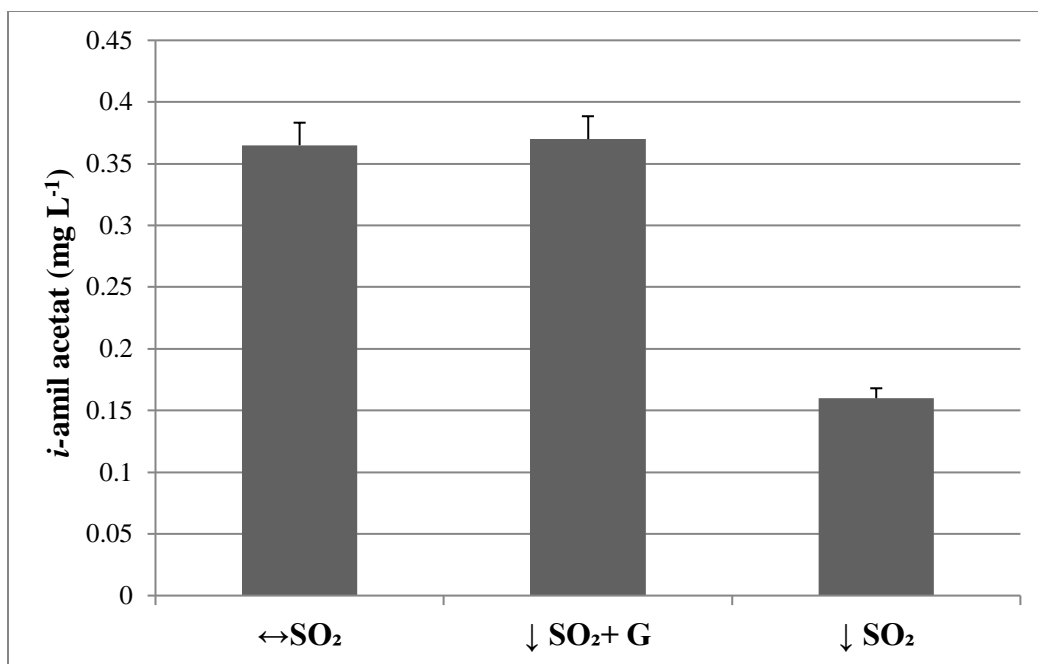
Koncentracije 2-feniletil acetata u analiziranim uzorcima vina, prikazane su na slici 2, nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Kombinacija snižene koncentracije SO<sub>2</sub> i glutaciona rezultirala je istim koncentracijama kao i kontrolni uzorak, dok je snižena koncentracija SO<sub>2</sub> bez glutaciona dovela do pada koncentracije ovog spoja. 2-feniletil acetat karakterizira cvjetna aroma mirisa na ruže, sa senzorskim pragom osjetljivosti od 0,25 mg L<sup>-1</sup>. Koncentracija koja je dobivena u ovom radu puno je niža od ove vrijednosti, te ne doprinosi ukupnoj aromi vina (Makhotkina, 2011).



Slika 2. Ovisnost koncentracije 2-feniletil acetata o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Andújar-Ortiz i sur., (2014) su dodatkom inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutationom u rosé vina, utvrdili veće koncentracije ovog spoja tijekom 9 mjeseci starenja. Coetzee i sur. (2013) pratili su uzorke vina sa smanjenom koncentracijom SO<sub>2</sub> tijekom 22 dana starenja vina, nakon čega su zaključili kako dolazi do smanjenje koncentracije ovog spoja u vinu tijekom vremena. Također, Roussis i sur. (2013) su svojim istraživanjem dokazali pozitivan utjecaj smjese antioksidansa (glutation, kafeinske i galne kiseline) na ovaj spoj tijekom skladištenja vina. Koncentracija 2-fenil acetata smanjila se u uzorku vinu sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub> (35 mg L<sup>-1</sup>) nakon 36 mjeseci skladištenja, u odnosu na vino sa dodanom smjesom antioksidansa. Osim toga, dokazano je kako se dodatkom glutaciona u Muškat bijelo vino očuva njegova koncentracija nakon 6 dana skladištenja u bocama (Roussis i sur., 2009). Takvi rezultati doveli su do zaključka kako antioksidansi pozitivno utječu na prisutnost ovog spoja i na njegovo očuvanje.

Slika 3 prikazuje dobivene vrijednosti *i*-amil acetata u uzorcima vina nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Naime, iste koncentracije ovog spoja vidljive su kod uzoraka sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub> te sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> uz dodatak glutaciona, dok je kod uzorka sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> bez glutaciona vidljiva niža koncentracija analiziranog spoja. Poznato je da *i*-amil acetat predstavlja poželjnu voćnu aromu sa senzorski pragom osjetljivosti od 0,03 do 0,16 mg L<sup>-1</sup>, te s obzirom na dobivenu koncentraciju utječe na aromu analiziranih uzoraka vina (Peinado i sur., 2004).



Slika 3. Ovisnost koncentracije *i*-amil acetata o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

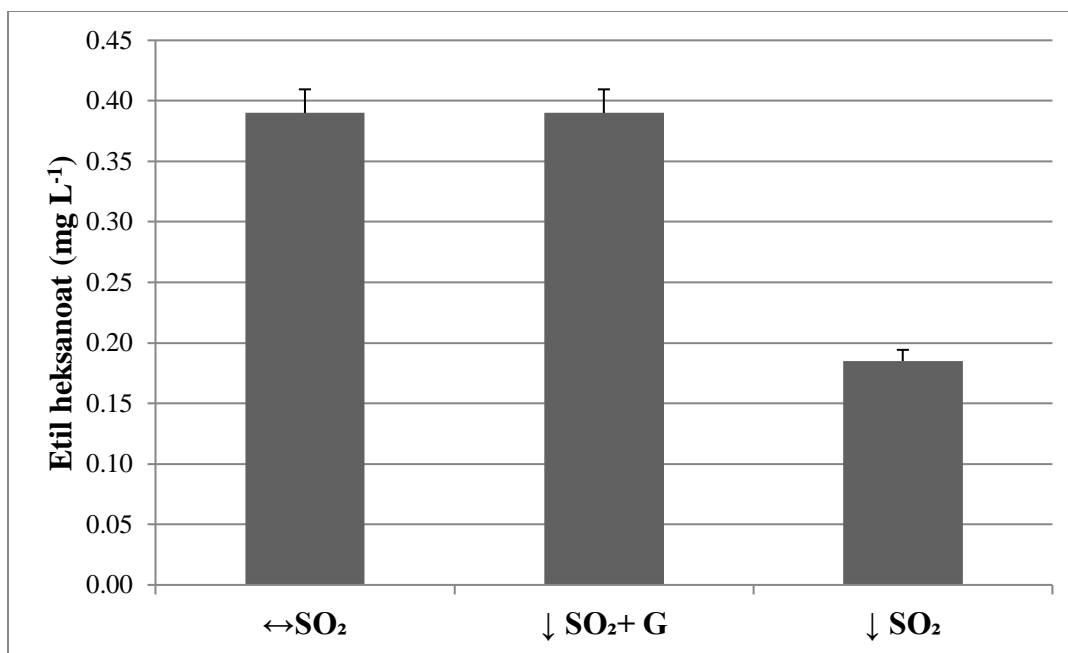
Roussis i sur. (2013) ispitivali su utjecaj antioksidansa (SO<sub>2</sub>, glutationa, kafeinske i galne kiseline) na aromatske spojeve crnog vina Merlot i Cabernet Sauvignon. Kako je već prethodno navedeno, ovi autori su u svom istraživanju analizirali 3 uzorka vina koja su se razlikovala ovisno o koncentraciji korištenih antioksidansa (SO<sub>2</sub>, glutation, kafeinska i galna kiselina). Uzorak sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> (25 mg L<sup>-1</sup>) te uzorak sa dodatkom kombinacije antioksidansa (SO<sub>2</sub> 25 mg L<sup>-1</sup>, glutation 20 mg L<sup>-1</sup>, kafeinska kiselina 60 mg L<sup>-1</sup>, galna kiselina 20 mg L<sup>-1</sup>) pokazali su slične koncentracije *i*-amil acetata u vinu nakon 18 mjeseci starenja vina, dok je nakon 36 mjeseci starenja u bocama, uzorak sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> sadržavao najmanje koncentracije *i*-amil acetat. Prema nekim istraživanjima dokazalo se kako koncentracija SO<sub>2</sub> utječe na ovaj aromatski spoj jer se smanjenjem koncentracije ili potpunim izostankom SO<sub>2</sub> dovodi do gubitka *i*-amil acetata (Coetzee i sur., 2013). Kritzinger i sur. (2012) također su dokazali pozitivno djelovanje glutationa na *i*-amil acetat, jer se njegova koncentracija nije promijenila tijekom starenja vina. Dodatak inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutationom, uzrokovalo je veću koncentraciju *i*-amil acetata u sva tri analizirana rosé vina, u odnosu na kontrolni uzorak, nakon 9 mjeseci starenja (Andújar-Ortiz i sur., 2010). Dodatak glutationa u Muškat bijelo vino rezultiralo

je nešto višom koncentracijom *i*-amil acetata u odnosu na kontrolni uzorak, nakon 6 dana skladištenja u bocama (Roussis i sur., 2009). Nadalje, Papadopoulou i Roussis (2008) su dokazali da se dodatkom glutaciona i *N*-acetil-cisteina u vino, očuva koncentracija *i*-amil acetata tijekom starenja vina. Peinado i sur. (2004) su analizom pjenušavih vina uz glutacione koncentracije 20 mg L<sup>-1</sup>, očuvali koncentraciju *i*-amil acetata.

Sljedeća skupina estera su etilni esteri koji predstavljaju važne spojeve arome za mlada bijela vina kojima daju voćnu aromu. Njihova koncentracija u vina je vrlo niska ili u tragovima, s iznimkom dietil sukcinata koji se u vinu može naći do 60 mg L<sup>-1</sup> (Sumbly i sur., 2010). Nastaju reakcijom između etanola i acetil-Coa uz djelovanje aciltransferaze (Lambrechts i Pretorius, 2000).

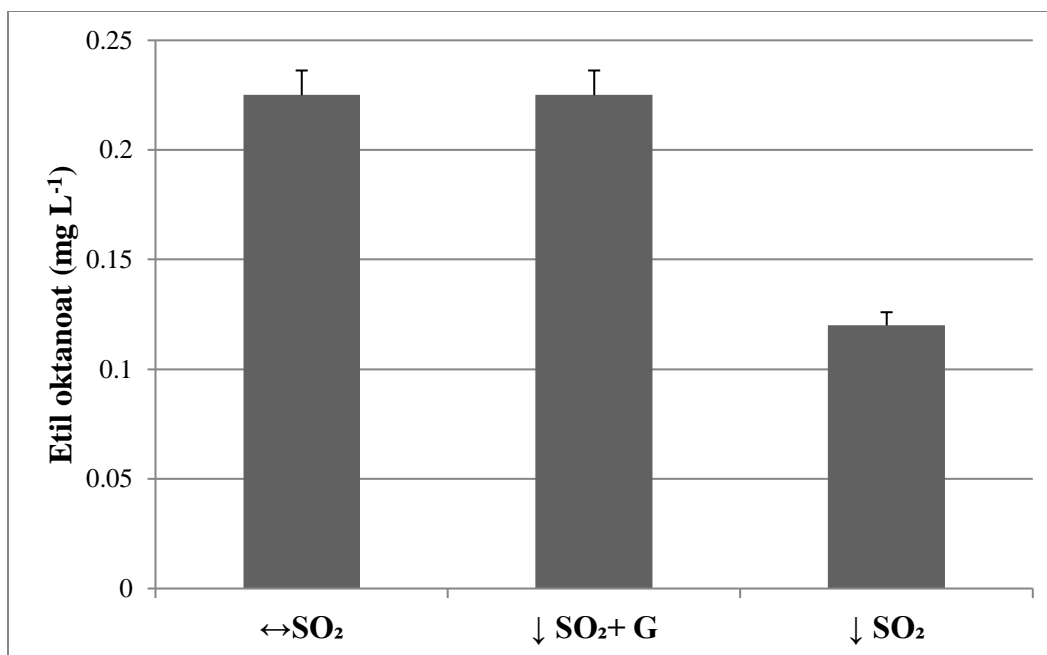
Na slici 4 prikazani su rezultati koncentracija etil heksanoata u analiziranim uzorcima vina nakon 12 starenja u bocama. Kao i u slučaju dva prethodna spoja, uzorak sa smanjenom koncentracijom SO<sub>2</sub> bez dodatka glutaciona pokazuje puno manje vrijednosti koncentracije etil heksanoata nego uzorak sa dodanim glutationom. Coetzee i sur. (2013) pokazali su kako se smanjenjem koncentracije SO<sub>2</sub> smanjuje i koncentracija etil heksanoata u vinu. Prema već spomenutom istraživanju Roussis i sur. (2013), uzorak sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> uz dodatak antioksidansa, nakon 36 mjeseci starenja, pokazao je veće vrijednosti ovog spoja u odnosu na uzorak sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub>. To dovodi do zaključka kako su ovi antioksidansi očuvali koncentraciju etil heksanoata u vinu tijekom starenja. Roussis i sur. (2009) su dodatkom glutaciona u Muškat bijelo vino, doveli do njegove povećane koncentracije nakon 6 dana skladištenja u bocama. Iste rezultate, pokazali su Papadopoulou i Roussis (2008) koji su dodatkom glutaciona u vino, zbog njegove sulhidrilne grupe, očuvali koncentraciju etil heksanoata. Osim navedenog istraživanja su dokazali kako dodatak glutaciona i *N*-acetil-cisteina u vino, čuva koncentraciju etil heksanoata tijekom starenja vina.





Slika 4. Ovisnost koncentracije etil heksanoata o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Iz dobivenih rezultata za etil oktanoat, prikazanih na slici 5, može se uočiti kako uzorak sa smanjenom koncentracijom SO<sub>2</sub> uz dodatak glutaciona pokazuje puno veću vrijednost koncentracije ovog spoja nego uzorak sa smanjenom koncentracijom SO<sub>2</sub>. Prema Webber i sur. (2014) uzorak pjenušavog vina sa dodatkom glutaciona (20 mg L<sup>-1</sup>) pokazao je jednaku koncentraciju ovog spoja kao i uzorak bez dodatka glutaciona, dok je dodatak glutaciona u mošt rezultiralo smanjenjem koncentracije etil oktanoata. Roussis i sur. (2013) utvrdili su da vina sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> te vina sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> uz dodatak kombinacije antioksidansa (glutacion, kafeinska i galna kiselina) imaju slične koncentracije etil oktanoata nakon 18 mjeseci starenja. Nakon 36 mjeseci starenja u bocama, uzorci sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> sadržavali su niže koncentracije etil oktanoata, u odnosu na uzorke sa dodatkom antioksidansa.

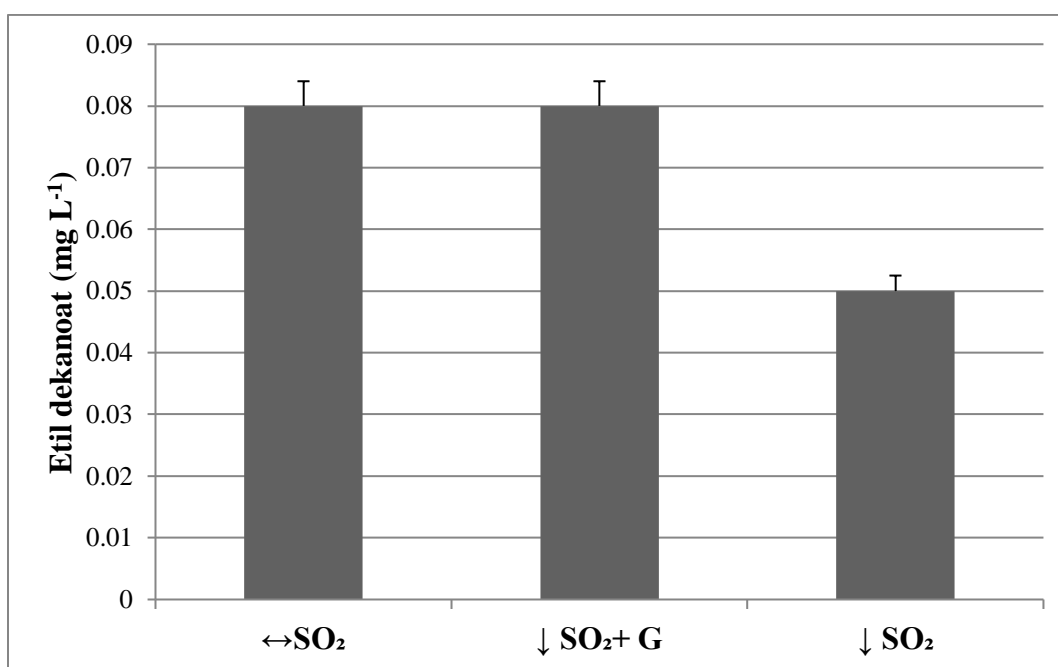


Slika 5. Ovisnost koncentracije etil oktanoata o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Analizirajući crno vino, Roussis i sur. (2009) također su utvrdili da se dodatkom glutaciona povećala koncentracija etil oktanoata u vinu. Iste rezultate dobili su i sa uzorkom vina u koji su dodali *N*-acetil-cistein, koji je također očuvao njegovu koncentraciju. Nadalje, Papadopoulou i Roussis (2008) su također dokazali kako dodatak glutaciona i *N*-acetil-cisteina u vino može očuvati koncentraciju etil oktanoata tijekom starenja vina.

Isti trend kao i u prethodno analiziranim etilnim esterima, dobiven je i za spoj etil dekanat, čiji su rezultati prikazani na slici 6. Naime, i u ovom slučaju dodatak glutaciona rezultirao je očuvanjem koncentracije ovog spoja u vinu nakon 12 mjeseci starenja, obzirom da je određena veća koncentracija u uzorku 2 u odnosu na uzorak 3. Gabrielli i sur. (2017) ispitali su utjecaj glutaciona i inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutationom na aromu vina, dodatkom u mošt Souvignon blanc, nakon 3 mjeseci starenja u bocama. Istoimeni autori kao rezultat dobili su najveću koncentraciju etil dekanata u uzorku sa inaktiviranim kvascem obogaćenim glutationom (80 mg L<sup>-1</sup>) te najnižu u uzorku samo s dodatkom glutaciona koncentracije 80 mg L<sup>-1</sup>. Kod pjenušavog vina, pokazalo se kako dodatak glutaciona u vino ili mošt dovodi do smanjenja koncentracije ovog spoja (Webber i sur., 2014). Coetzee i sur. (2013) su pokazali kako smanjena

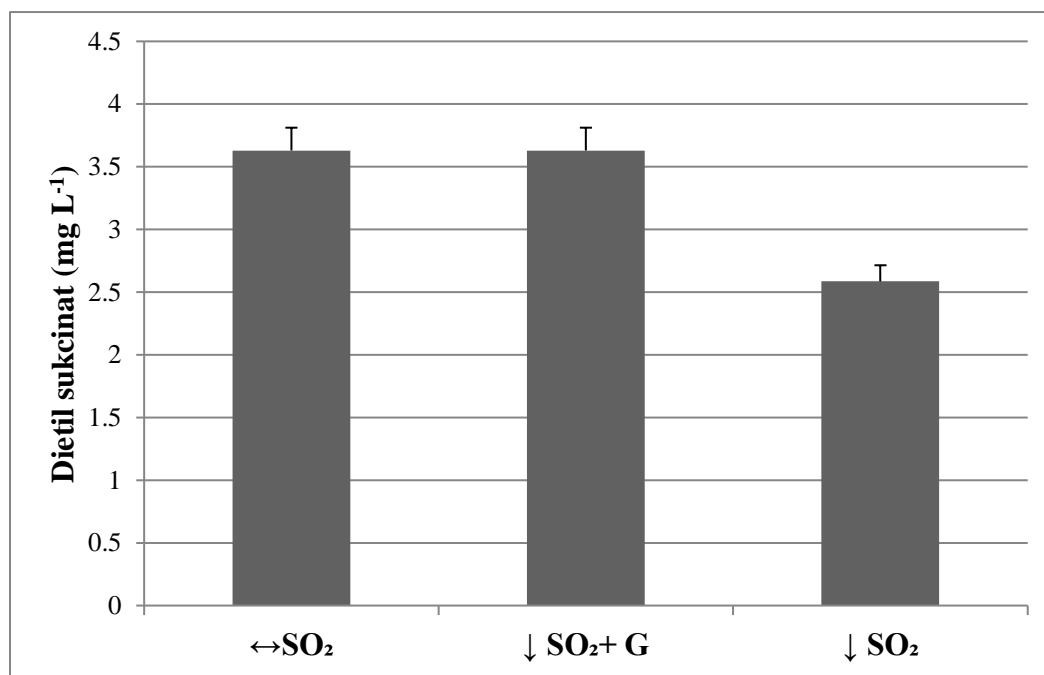
koncentracija  $\text{SO}_2$  ima negativan utjecaj na etil dekanooat u vinu, odnosno da se njegova koncentracija u vinu smanjuje. Također, Roussis i sur. (2013) došli su do zaključka da nakon 36 mjeseci starenja, uzorak vina sa sniženom koncentracijom  $\text{SO}_2$  sadržava niže koncentracije etil dekanooata, u odnosu na uzorak sa dodatkom različitih antioksidansa. Roussis i sur. (2009) su u svome istraživanju dokazali zaštitni efekt glutaciona na etil dekanooat, čija se koncentracija očuvala u vinu tijekom skladištenja. Osim toga, pokazali su da se dodatkom *N*-acetil-cisteina također očuva njegova koncentracija, odnosno dolazi do njegovog povećanja tijekom skladištenja vina.



Slika 6. Ovisnost koncentracije etil dekanooata o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

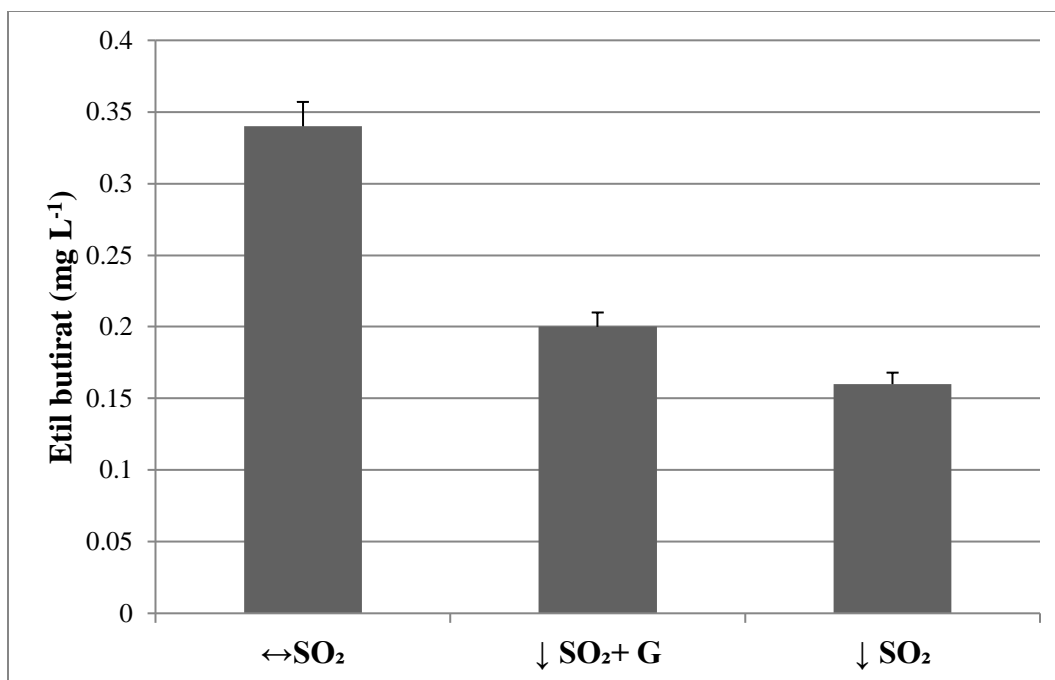
Sljedeći analizirani spoj dietil sukcinat karakterizira poželjna voćna aroma na dinju, sa senzorskim pragom osjetljivosti  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$  (Lambrechts i Pretorius, 2000). U uzorku sa smanjenom koncentracijom  $\text{SO}_2$  uz dodatak glutaciona vidljiva je veća koncentracija ovog spoja u odnosu na uzorak sa smanjenom koncentracijom  $\text{SO}_2$  (Slika 7). U već spomenutom istraživanju Gabrielli i sur. (2017) koji su ispitivali utjecaj glutaciona i inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutationom na aromu vina, dodatkom u mošt Sauvignon blanc, nakon 3 mjeseci starenja u

bocama, koncentracija dietil sukcinata bila je gotovo jednaka u svim analiziranim uzorcima. Nadalje, koncentracija ovog spoja u vinu povezana je sa provedenom jabučno-mliječnom fermentacijom kod pjenušavih vina, te dodani glutatation tijekom njegove proizvodnje rezultira povećanim razmnožavanjem bakterija mliječne kiseline i većom koncentracijom dietil sukcinata u tim vinima (Knoll i sur., 2012). Također, Garde-Cerdán i Ancín-Azpilicueta (2007) dokazali su pozitivan efekt dodatka  $\text{SO}_2$  na koncentraciju dietil sukcinata u odnosu na vino bez njega, nakon 6 mjeseci starenja vina u bocama.



Slika 7. Ovisnost koncentracije dietil sukcinata o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutatation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Rezultati za posljednji analizirani spoj iz skupine etilnih estera, etil butirata, u uzorcima vina nakon 12 mjeseci starenja prikazani su na slici 8. Uzorak sa smanjenom koncentracijom  $\text{SO}_2$  uz dodatak glutatationa pokazuje skoro jednaku koncentraciju kao uzorak koji ne sadrži glutatation te se može zaključiti kako glutatation nije uspio očuvati njegovu aromu u vinu. S obzirom na koncentraciju ovog spoja koja je unutar njegovog praga osjetljivosti (0,07-0,53 mg L<sup>-1</sup>), može se uočiti kako on utječe na ukupnu aromu vina, te doprinosi cvjetnim, voćnim i slatkim notama vina (Sumbly i sur., 2010).

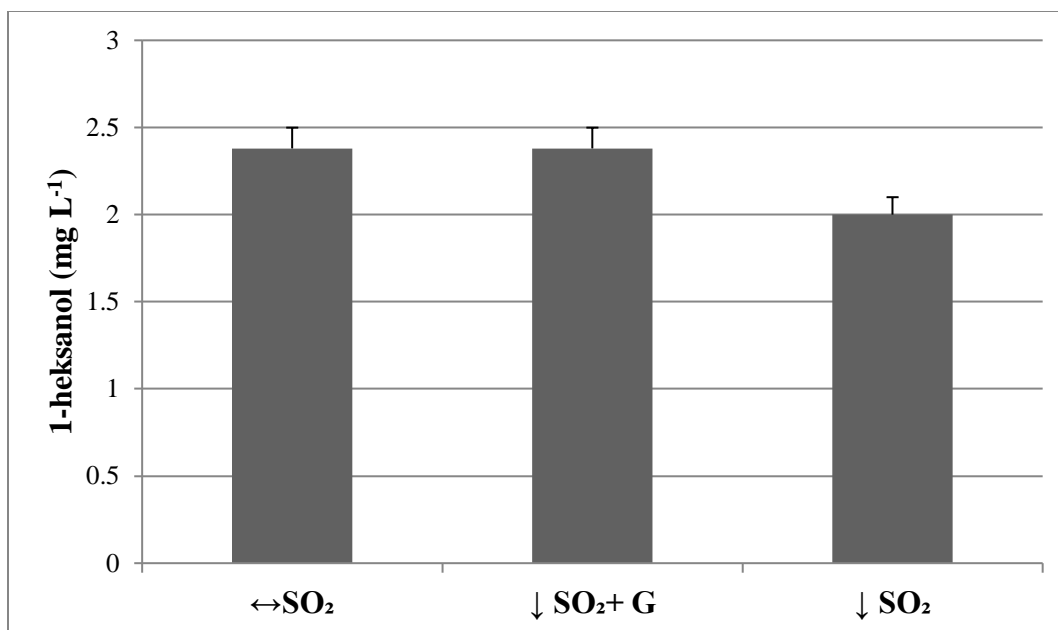


Slika 8. Ovisnost koncentracije etil butirata o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Gabrielli i sur. (2017) ispitivali su utjecaj glutaciona i inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutationom na aromu vina, dodatkom u mošt Sauvignon blanc, nakon 3 mjeseci starenja u bocama. Najveće koncentracije etil butirata detektirali su u uzorku sa dodanim glutationom koncentracije 5,5 mg L<sup>-1</sup> te dodatkom inaktiviranog kvasca obogaćenog glutationom. Webber i sur. (2014) su pokazali kako dodatkom glutaciona u vino ili mošt (koncentracije 10 ili 20 mg L<sup>-1</sup>) tijekom proizvodnje pjenušavih vina, ne dolazi do značajne promjene etil butirata u tim uzorcima. Roussis i sur. (2013) su došli do rezultata kako uzorak sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> uz dodatak antioksidansa (glutacion, kafeinska i galna kiselina), nakon 36 mjeseci starenja, ima veće vrijednosti etil butirata od uzorka sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub>, te su zaključili kako korišteni antioksidansi mogu očuvati koncentraciju ovog spoja u vinu tijekom starenja. Prema Fragasso i sur. (2010) dodatkom glutaciona (50 mg L<sup>-1</sup>) u bijelo vino Trebbiano, dolazi do očuvanja koncentracije etil butirata u vinu, dok se kod vina Bombino Bianco pokazao suprotan efekt. Dodatak inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutationom rezultirali su većom koncentracijom etil butirata u analiziranim rosé vinima u odnosu na kontrolni uzorak, nakon 9 mjeseci starenja (Andújar-Ortiz i sur., 2010).

Viši alkoholi potječu iz grožđa, ali se ne nalaze u značajnim koncentracijama koje utječu na ukupnu aromu vina. Izuzetak je 1-heksanol koji doprinosi aromi svojim biljnim notama. Koncentracija viših alkohola u vinima se može detektirati od 100 do 500 mg L<sup>-1</sup> pri čemu ih je u bijelim vinima manje nego u crnim (Lambrechts i Pretorius, 2000). U koncentracijama ispod 300 mg L<sup>-1</sup> imaju pozitivan utjecaj na aromu vina i njezinu kompleksnost, no ukoliko se nalaze u koncentracijama iznad 400 mg L<sup>-1</sup> loše utječu na aromu vina (Rapp i Mandery, 1986), jer uklanjaju voćnost i svježinu vina (García Martín i Sun, 2013). Čimbenici koji utječu na njihov nastanak u vinima su sljedeći: sorta, zrelost bobica, soj kvasca, pH i temperatura fermentacije, te prozračivanje. Tijekom starenja alkoholi mogu oksidirati u aldehide (Marais i Pool, 1980) pri čemu dolazi do smanjenja njihove koncentracije. Međutim, mnoga istraživanja navode njihove koncentracije stabilnim tijekom starenja vina, pri čemu koncentracija heksanola raste zbog oksidacije linoleinske i linolenske masne kiseline (Oliveira i sur., 2006).

Koncentracije 1-heksanola u uzorcima vina, prikazane su na slici 9, nakon 12 mjeseci starenja u bocama. 1-heksanol je viši alkohol kojeg karakterizira vrlo niska koncentracija u vinu, miris trave te senzorski prag osjetljivosti od 1,1 mg L<sup>-1</sup>, ali i doprinos ukupnoj aromi analiziranih uzoraka vina (Peinado i sur., 2004). Snižena koncentracija SO<sub>2</sub> ne dovodi do velikog gubitka ovog spoja, te se može zaključiti kako dodatak glutaciona ne utječe na njegovu koncentraciju u vinu. Boroski i sur. (2017) su pokazali kako vino Chardonnay sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> pokazuje jednake vrijednosti 1-heksanola kao i ono sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub>. Prema istraživanju Webber i sur. (2017) na pjenušavim vinima, koncentracija 1-heksanola se ne mijenja dodatkom glutaciona jer on pripada skupini spojeva koji potječu iz grožđa.

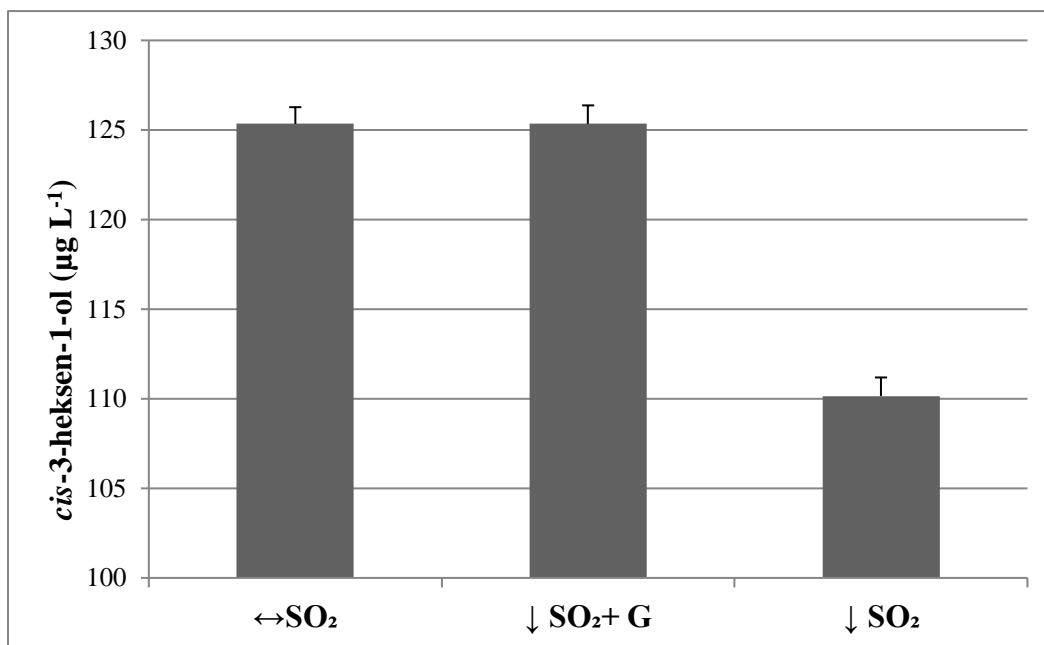


Slika 9. Ovisnost koncentracije 1-heksanola o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Nadalje, Andújar-Ortiz i sur. (2014) su dodatkom inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutationom, potvrdili kako glutation ne utječe na njegovu koncentraciju nakon 9 mjeseci starenja vina. Roussis i sur. (2013) ispitivali su utjecaj antioksidansa (SO<sub>2</sub>, glutationa, kafeinske i galne kiseline) na aromatske spojeve crnog vina Merlot i Cabernet Sauvignon. Kao rezultat dobili su da nakon 36 mjeseci starenja vina, uzorak sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> i onaj sa dodatkom antioksidansa pokazuju približno jednake koncentracije 1-heksanola u vinu, te se može zaključiti da glutation ne utječe značajno na njegovo očuvanje u vinu.

Jedan od predstavnika viših alkohola koji se u vinu nalazi u izrazito niskim koncentracijama je *cis*-3-heksen-1-ol. Iz rezultata se može vidjeti kako ovaj spoj ne doprinosi ukupnoj aromi vina zbog detektirane niže koncentracije u odnosu na senzorski prag osjetljivosti koji iznosi 0,4 mg L<sup>-1</sup> (Makhotkina, 2011) (Slika 10). Također je vidljivo da uzorak 1 i 2 pokazuju iste koncentracije ovog spoja, dok je snižena koncentracija SO<sub>2</sub> bez glutationa (uzorak 3) uzrokovala nižu koncentraciju ovog spoja. Istraživanja koja su provedena na pjenušavim vinima sa dodanim glutationom, rezultirala su nepromijenjenom koncentracijom ovog spoja u njima

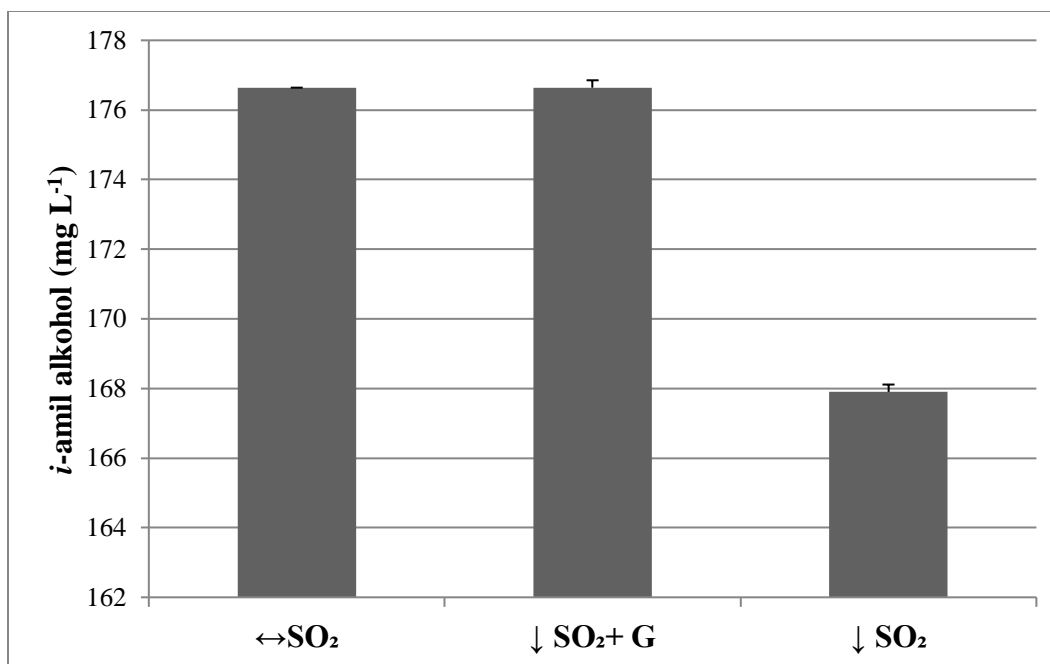
(Webber i sur., 2014). Prema Andújar-Ortiz i sur. (2014) dodatkom inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutatomom, dolazi do očuvanja koncentracije ovog spoja tijekom 9 mjeseci starenja.



Slika 10. Ovisnost koncentracije *cis*-3-heksen-1-ol-a o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

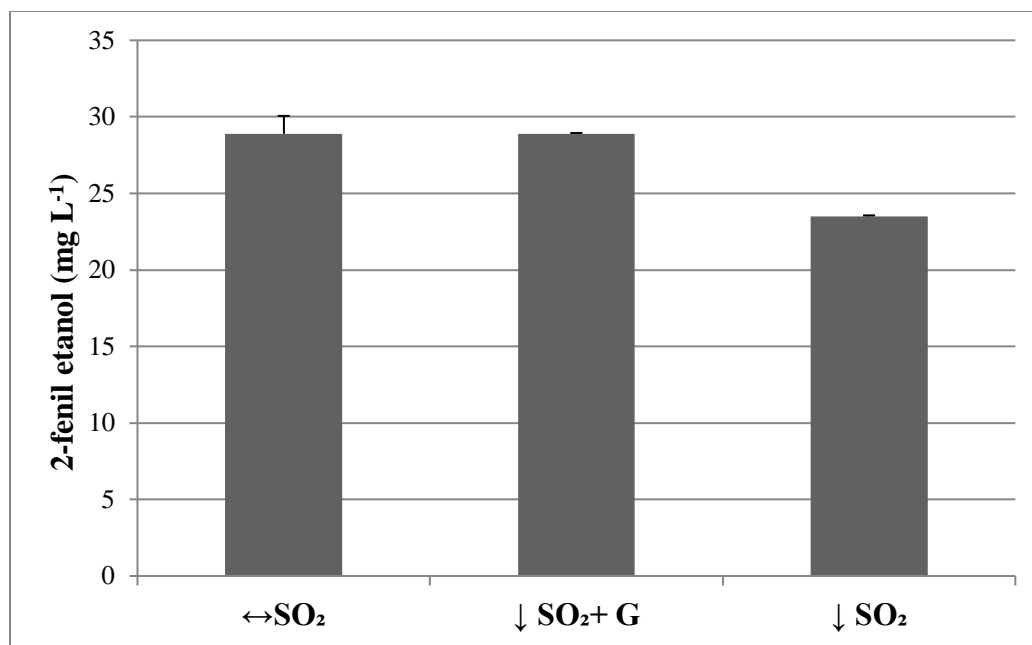
Na sljedećoj slici 11 prikazani su rezultati za koncentracije *i*-amil alkohola u uzorcima vina, nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da se *i*-amil alkohol u vinu nalazi u jako visokim koncentracijama, iznad senzorskog praga osjetljivosti od 30  $\text{mg L}^{-1}$ , te doprinosi ukupnoj aromi analiziranih uzoraka vina (Makhotkina, 2011). Kombinacija snižene koncentracije  $\text{SO}_2$  i glutationa rezultirala je istim koncentracijama kao i u kontrolnom uzorku, dok je snižena koncentracija  $\text{SO}_2$  bez glutationa rezultirala vidljivo nižom koncentracijom ovog spoja. Najveću koncentraciju *i*-amil alkohola u uzorku sa glutatomom (5,5  $\text{mg L}^{-1}$ ), i sa inaktiviranim kvascem obogaćenim glutatomom bilježe Gabrielli i sur. (2017), dok je visoka koncentracija glutationa (80  $\text{mg L}^{-1}$ ) u istom istraživanju dovela do smanjenja njegove koncentracije. Isti rezultati su dobiveni analizom pjenušavih vina u kojima je dodatak glutationa u mošt očuvao koncentraciju ovog spoja (Webber i sur., 2014).





Slika 11. Ovisnost koncentracije *i*-amil alkohola o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Rezultati za spoj 2-fenil etanol prikazani su na slici 12. Uzorak 2, vino sa dodanim glutationom uz sniženu koncentraciju SO<sub>2</sub> pokazuju iste rezultate kao i uzorak 1 sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub>. Nešto niža koncentracija vidljiva je u uzorku 3 sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub>. Naime, 2-fenil etanol je najvažniji viši alkohol koji se može detektirati u vinu, čija je aroma na ruže izrazito ugodna i poželjna. S obzirom na senzorski prag osjetljivosti od 14 mg L<sup>-1</sup>, ovaj spoj uvelike utječe na ukupnu aromu analiziranih uzoraka (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Boroski i sur. (2017) su također dobili slične rezultate analizirajući vina Chardonnay i Pinot sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub>, koji su pokazivali skoro jednake vrijednosti 2-fenil etanola u odnosu na vino sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub>. U već spomenutom istraživanju Gabrielli i sur. (2017), najviše koncentracije ovog spoja detektirane su u uzorcima sa dodatkom inaktiviranih kvasaca, dok je dodatak glutaciona od 80 mg L<sup>-1</sup> pokazao jednaku koncentraciju kao i kontrolni uzorak. Webber i sur. (2014) su pokazali kako se dodatkom glutaciona u mošt za proizvodnju pjenušavih vina, očuvala koncentracija 2-fenil etanola, u odnosu na kontrolni uzorak bez glutaciona. Santos i sur. (2004) su analizom pjenušavih vina u koja nije dodan glutacion detektirali nižu koncentraciju 2-fenil etanola od njegovog senzorskog praga osjetljivosti.

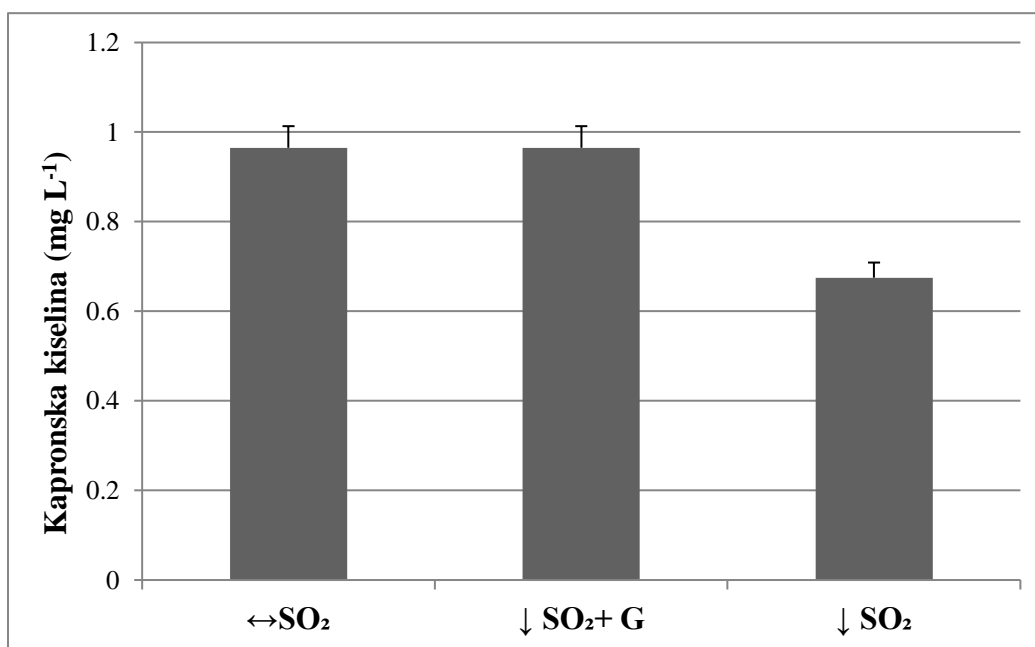


Slika 12. Ovisnost koncentracije 2-fenil etanola o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Hlapive masne kiseline u vinu nastaju tijekom alkoholne fermentacije, djelovanjem kvasaca. Vrlo često se u vinu detektiraju u niskim koncentracijama i tako pozitivno djeluju na svježinu vina (npr. Cabernet Sauvignona), dok u visokim koncentracijama negativno utječu na ukupnu aromu vina (Rousiss i sur., 2013; Makhotkina, 2011). Tijekom starenja vina, zbog hidrolize etilnih estera, može doći do povećanja nekih hlapivih masnih kiselina. Međutim, porast njihove koncentracije nije uvijek zamijećen, jer se pokazalo kako se neki spojevi smanjuju, dok se drugi povećavaju (Rousiss i sur., 2005). Prema Peinado i sur. (2004) dodatkom glutaciona, tijekom starenja vina, došlo je do smanjenja koncentracije određenih masnih kiselina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Najznačajniji predstavnici su kaprinska, kaprilna te kapronska masna kiselina. Kaprinska i kaprilna kiselina daju miris na ulje, sapun i užeglost sa pragom osjetljivosti od 7 do 15 mg L<sup>-1</sup> čija se koncentracija tijekom starenja smanjuje (Santos i sur., 2004).

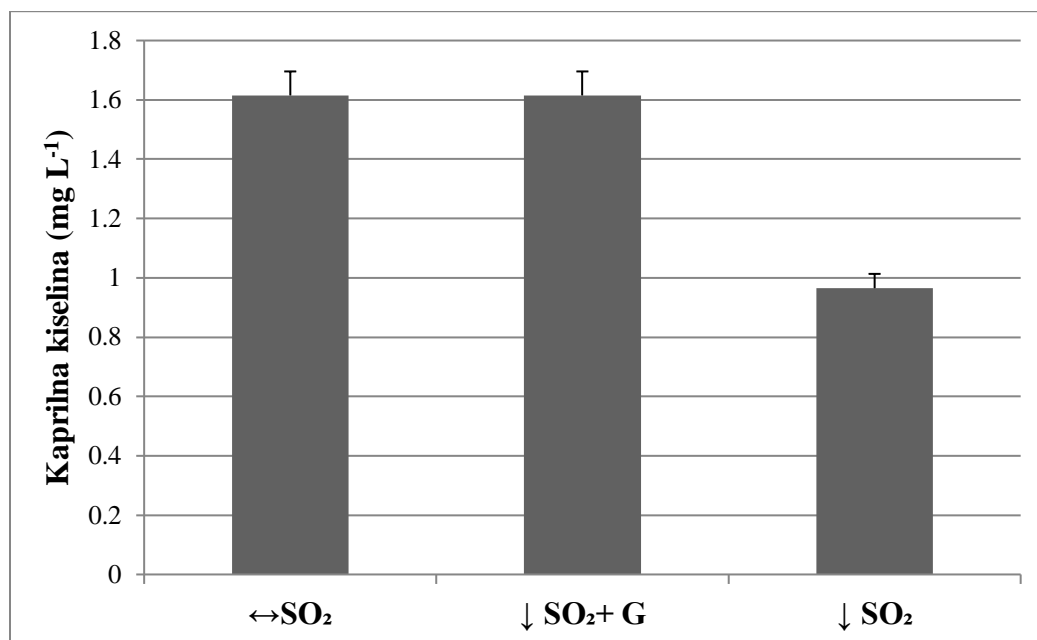
Na slici 13 prikazane su koncentracije kapronske kiseline u analiziranim uzorcima vina, nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Ovaj spoj ne pridonosi aromi analiziranih uzoraka vina s obzirom na prag osjetljivosti od 3 mg L<sup>-1</sup> (Ferreira, 2010). Nadalje, uzorak sa smanjenom koncentracijom SO<sub>2</sub> uz glutation pokazuje više koncentracije ovog spoja u odnosu na uzorak bez

glutaciona. To je potvrđeno i u istraživanju u kojem se tijekom skladištenja povećava koncentracija kapronske kiseline u uzorcima vina s dodatkom glutaciona (Andújar-Ortiz i sur., 2014). Pozitivan efekt dodanih antioksidansa dokazan je na njegovu koncentraciju u vinu, s obzirom na uzorke u koje antioksidansi nisu dodani (Coetzee i sur., 2013). S druge strane, prema Webber i sur. (2014) pokazano je kako se kapronska kiselina ne mijenja dodatkom glutaciona u pjenušavim vinima.



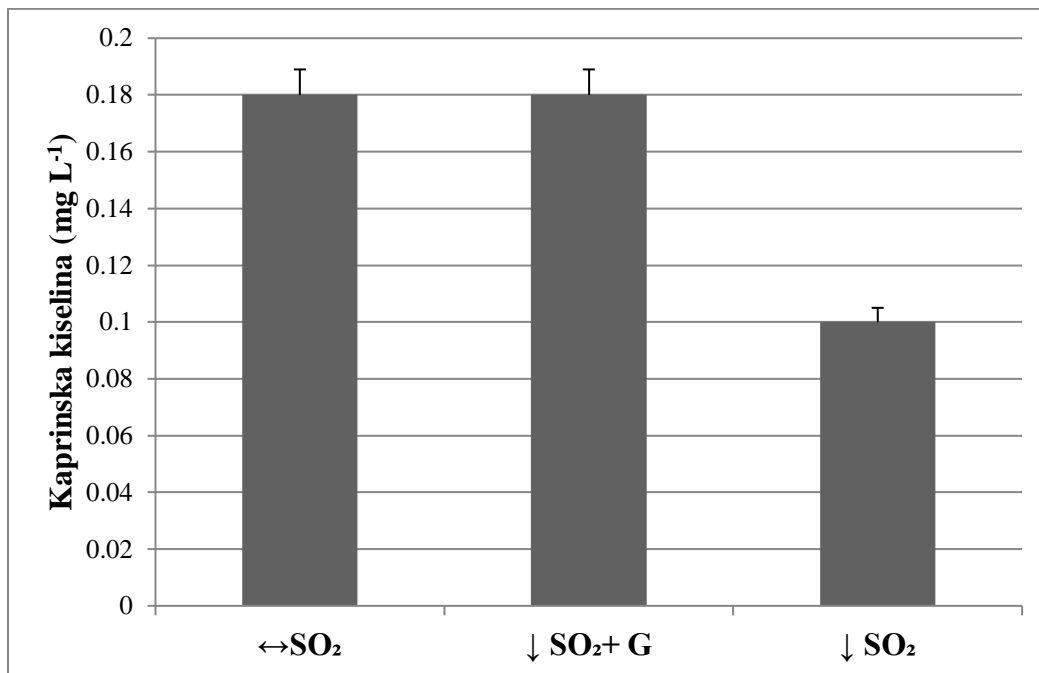
Slika 13. Ovisnost koncentracije kapronske kiseline o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutacion) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Rezultati dobiveni za kaprilnu kiselinu prikazani su na slici 14. Kombinacija snižene koncentracije SO<sub>2</sub> i glutaciona rezultirala je istim koncentracijama kao i u kontrolnom uzorku, dok je snižena koncentracija SO<sub>2</sub> bez glutaciona dovela do pada koncentracije ovog spoja. Dodatak glutaciona u mošt za proizvodnju pjenušavih vina rezultirao je smanjenjem koncentracije ovog spoja, ali dodatkom u vino rezultiralo je njegovim povećanjem (Webber i sur., 2014). U istraživanju Andújar-Ortiz i sur. (2014) dodatak glutaciona nije utjecao na koncentraciju kaprilne kiseline, ali je tijekom procesa starenja vina došlo do njenog povećanja. Također, kaprilna kiselina utječe na ukupnu aromu analiziranih uzoraka zbog detektirane koncentracije koja prelazi senzorski prag osjetljivosti od 0,5 mg L<sup>-1</sup> (Francis i Newton, 2005).



Slika 14. Ovisnost koncentracije kaprilne kiseline o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

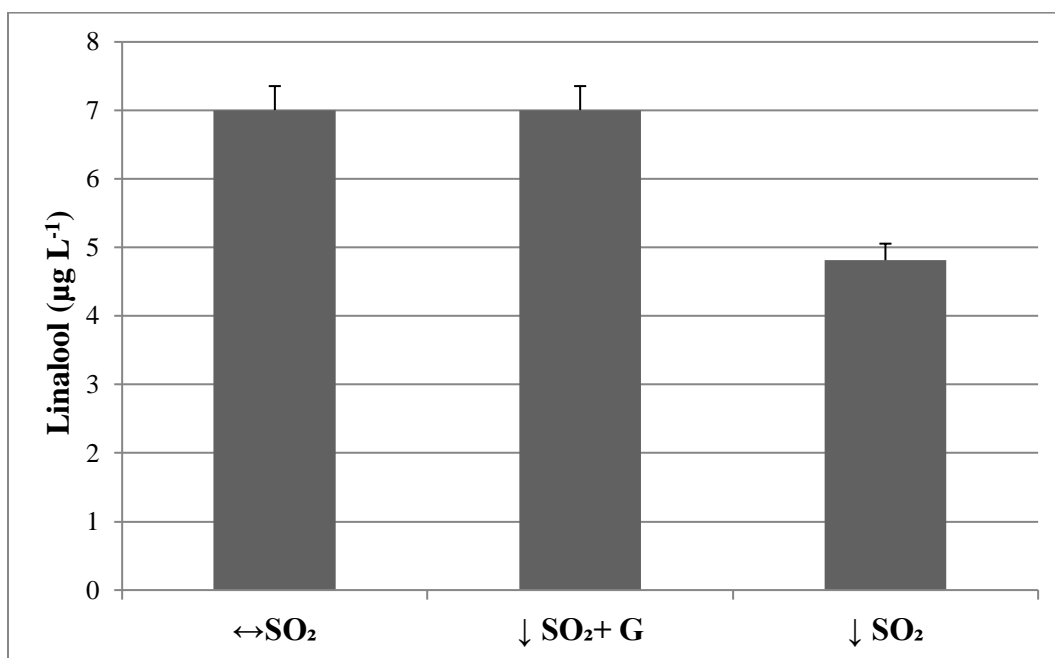
Rezultati za posljednju analiziranu hlapivu masnu kiselinu, kaprinsku kiselinu, u uzorcima vina nakon 12 mjeseci starenja u bocama, prikazani su na slici 15. Iz priloženog je odmah vidljivo da je dobivena koncentracija kaprinske kiseline manja od senzorskog praga osjetljivosti ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) i da ne utječe na ukupnu aromu vina (Francis i Newton, 2005). Osim toga, kombinacija snižene koncentracije SO<sub>2</sub> i glutationa (uzorak 2) rezultirala je istim koncentracijama kao i u kontrolnom uzorku 1, dok je snižena koncentracija SO<sub>2</sub> bez glutationa (uzorak 3) dovela do pada koncentracije ovog spoja. Gabrielli i sur. (2017) ispitivali su utjecaj glutationa i inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutationom na aromu vina, dodatkom u mošt Sauvignon blanc, nakon 3 mjeseci starenja u bocama. Najvišu koncentraciju kaprinske kiseline detektirali su u uzorku sa dodatkom glutationa od  $5,5 \text{ mg L}^{-1}$ , a najnižu u uzorku sa dodatkom glutationa od  $80 \text{ mg L}^{-1}$ . Webber i sur. (2014) koji su proveli istraživanje na pjenušavim vinima, rezultiralo je smanjenjem koncentracije kaprinske kiseline dodatkom glutationa u mošt ili vino. Andújar-Ortiz i sur. (2014) pokazali su kako se dodatkom glutationa njegova koncentracija ne mijenja, već se povećava tijekom procesa starenja vina.



Slika 15. Ovisnost koncentracije kaprinske kiseline o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Terpeni predstavljaju tipične arome koje se opisuju kao cvjetna, aroma ruže (geraniol, nerol), korijandera (linalool), aroma na zeleno (nerol oksid) i biljna aroma (Marais, 1983). Tijekom starenja vina dolazi do gubitka cvjetne arome koja je povezana sa monoterpenima (Rapp i Mandery, 1986), koji se transformiraju u stabilnije spojeve, njihove derivate (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Koncentracija linaloola se smanjuje tijekom skladištenja vina (Lambropoulos i Roussis, 2007), dok se  $\alpha$ -terpineola povećava (Ferreira i sur., 1997). U Rizling vinu, tijekom 3 godine starenja, koncentracija linaloola se smanjila i za 80 % u usporedbi s početnom vrijednosti, dok se istovremeno koncentracija linalool oksida, nerol oksida i  $\alpha$ -terpineola povećala (Jackson, 2008). Senzorski prag osjetljivosti monoterpena je jako nizak i varira između 50 i 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ , dok njihovi derivati imaju puno viši prag, od 3000 do 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Rapp, 1998). Osim toga, razlikuju se i po mirisu, pri čemu  $\alpha$ -terpineol ima zagasit i miris bora, dok njegov prethodnik linalool ima voćnu aromu.

Na slici 16 prikazane su dobivene vrijednosti za spoj linalool u uzorcima vina nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Iz rezultata se može vidjeti da vino sa smanjenom koncentracijom SO<sub>2</sub> uz dodatak glutaciona pokazuje veću vrijednost koncentracije u odnosu na uzorak bez glutaciona.

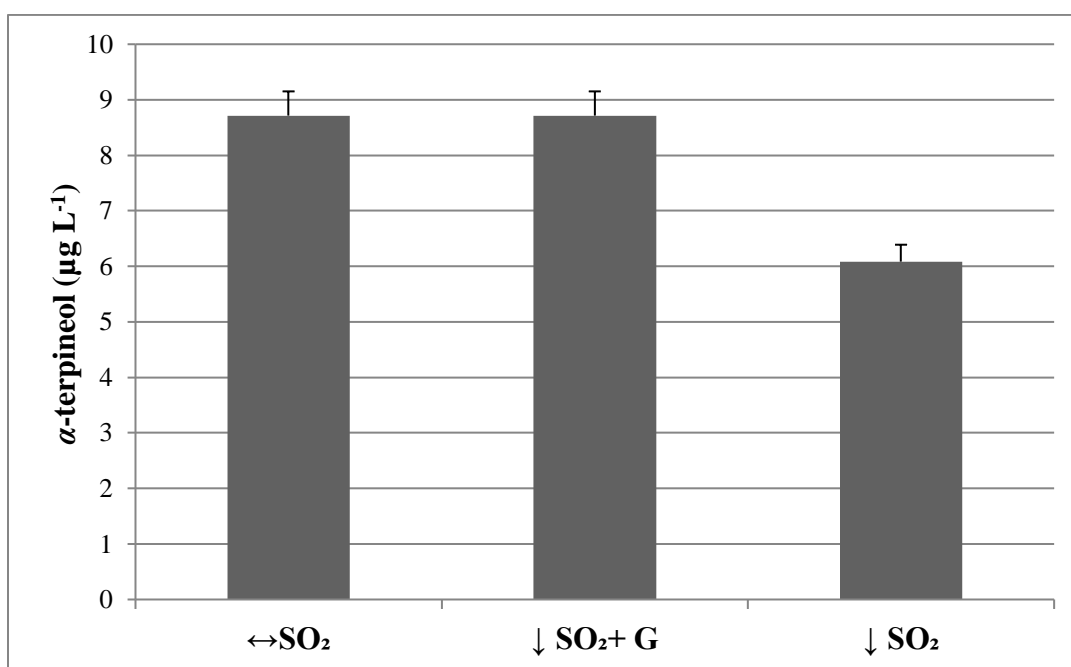


Slika 16. Ovisnost koncentracije linaloola o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Inače linalool karakterizira cvjetna i voćna aroma, aroma lavande i citrusa sa senzorskim pragom osjetljivosti od 25 µg L<sup>-1</sup> (Gómez-Míguez i sur., 2007). Rezultati dobiveni u ovom radu pokazuju kako linalool ne utječe na ukupnu aromu analiziranih uzoraka vina, jer se u njima nalazi u puno manjoj koncentraciji od senzorskog praga osjetljivosti. Prema Rodríguez-Bencomo i sur. (2014) dodatkom 10 mg L<sup>-1</sup> glutaciona ili inaktiviranog kvasaca obogaćenog glutationom, dolazi do očuvanja linaloola u uzorcima vina. Papadopoulou i Roussis (2008) su dokazali kako se dodatkom glutaciona i *N*-acetil-cisteina u vino, očuvala koncentracija linaloola tijekom starenja vina. Prema Roussis i sur. (2007) dodatkom glutaciona od 20 mg L<sup>-1</sup> u uzorke sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub>, dovelo je do veće zaštite linaloola u odnosu na uzorak sa višom koncentracijom SO<sub>2</sub> bez glutaciona. Papadopoulou i sur. (2001) su svojim istraživanjem dokazali

kako se dodatkom glutaciona ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) prije punjenja u boce štiti koncentracija linaloola u vinu tijekom skladištenja.

Koncentracije  $\alpha$ -terpineola u uzorcima vina, prikazane su na slici 17, nakon 12 mjeseci starenja u bocama.  $\alpha$ -terpineol karakterizira cvjetni i slatki miris te miris na ljiljan sa vrlo niskim senzorskim pragom osjetljivosti ( $25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ). Ne utječe na aromu ovih uzoraka vina zbog detektirane vrlo niske koncentracije (Gómez-Míguez i sur., 2007). Obzirom na koncentraciju antioksidansa, snižena koncentracija  $\text{SO}_2$  rezultirala je smanjenjem koncentracije ovog terpena u analiziranim uzorcima vina.



Slika 17. Ovisnost koncentracije  $\alpha$ -terpineola o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

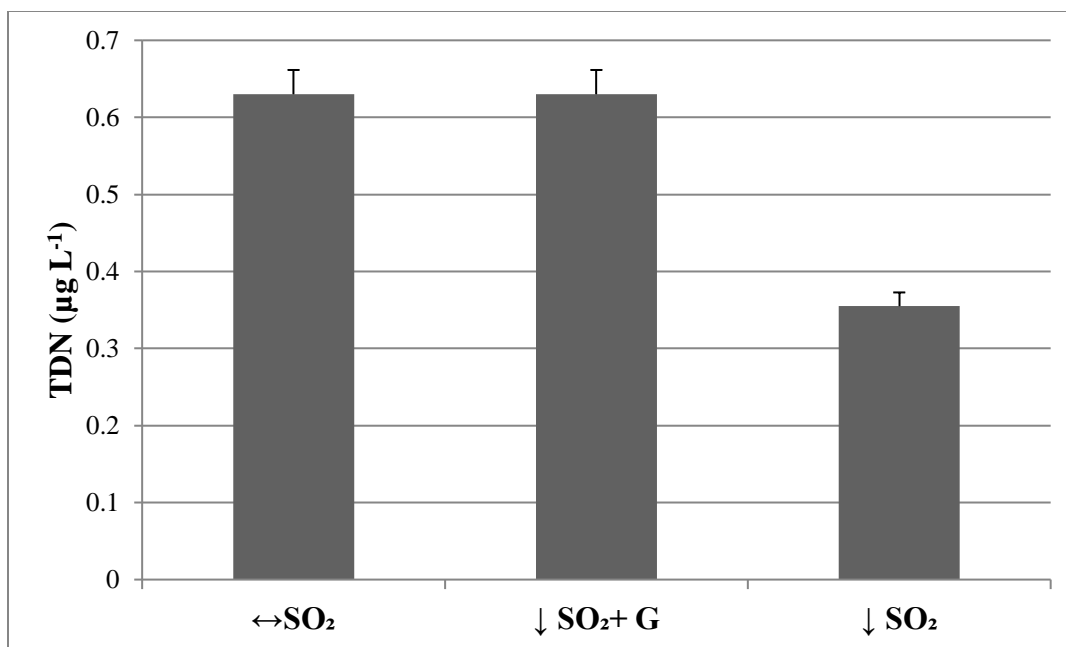
Prema Rodríguez-Bencomo i sur. (2014)  $10 \text{ mg L}^{-1}$  glutaciona ili inaktiviranog kvasaca obogaćenog glutationom koji su dodani u vino, doveli su do očuvanja  $\alpha$ -terpineola u uzorcima vina. Dokazano je i kako dodatkom  $\text{SO}_2$  ( $60 \text{ mg L}^{-1}$ ) uz minimalan pristup kisiku, dolazi do zaštite ovog spoja u vinu ili moštu (Coetzee i sur., 2013). Papadopoulou i sur. (2001) su pokazali kako se dodatkom glutaciona ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ), prije punjenja u boce, značajno očuva koncentracija  $\alpha$ -terpineola

u vinu tijekom skladištenja. Glutation pruža dobru zaštitu terpenima u vinu zbog svoje slobodne sulfhidrilne skupine (SH) koju karakteriziraju nukleofilna i redoks svojstva (Penninckx, 2000).

Norizoprenoidi koji su detektirani u analiziranim uzorcima vina su TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen) i  $\beta$ -damaskenon, vrlo niske koncentracije izražene u  $\mu\text{g L}^{-1}$ .  $\beta$ -damaskenon je najvažniji predstavnik ove skupine sa niskim senzorskim pragom osjetljivosti, te cvjetnom i voćnom aromom. Moguća su dva puta nastajanja ovog spoja: (i) kiselinskom hidrolizom i (ii) razgradnjom neoksantina. Na njegovu koncentraciju utječe pH, temperatura, udio kisika i  $\text{SO}_2$ . Drugi važni predstavnik je TDN koji daje aromu po kerozinu i tartufima, što predstavlja tipičnu aromu za oksidirana bijela vina (Silva Ferreira i sur., 2002). Formira se u grožđu iz  $\beta$ -karotena, ali njegove veće koncentracije nastaju tijekom procesa starenja vina (Jackson, 2008). U tom slučaju, predstavlja važnu ulogu u formiranju „bouqeta“ u Rizling vinima, čija je koncentracija skoro 5 puta veća nego kod ostalih vina (Black i sur., 2012). Na njegovu koncentraciju utječu pH, temperatura i kisik. Vina sa nižim pH su puno osjetljivija na formiranje TDN-a, te hladna područja imaju puno veću koncentraciju TDN-a u odnosu na toplija (Silva Ferreira i de Pinho, 2004).

Ovisnost koncentracije TDN-a o koncentraciji antioksidansa ( $\text{SO}_2$  i glutacion) u analiziranim uzorcima vina nakon 12 mjeseci starenja u boci, prikazana je na slici 18. Uzorak snižene koncentracije  $\text{SO}_2$  ima nižu koncentraciju ovog spoja u odnosu na uzorak u kojem je dodan glutacion. Glutacion štiti ovaj spoj od njegovog smanjenja koje može nastati kao posljedica smanjenje koncentracije  $\text{SO}_2$ . Također, TDN ne utječe na aromu analiziranog vina Cabernet Sauvignona, s obzirom na njegovu vrlo nisku koncentraciju u odnosu na senzorski prag osjetljivosti od  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Black i sur., 2012).

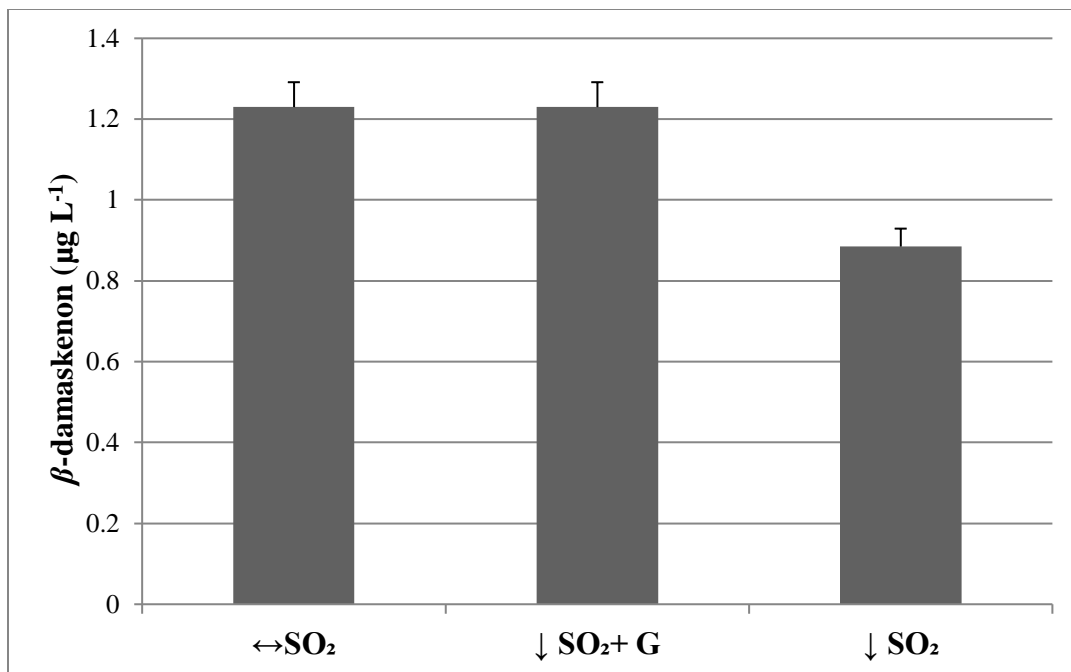




Slika 18. Ovisnost koncentracije TDN-a o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

Slika 19 prikazuje dobivene rezultate za  $\beta$ -damaskenon u analiziranim uzorcima vina nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Najniža koncentracija zabilježena je u uzorku sa smanjenom koncentracijom SO<sub>2</sub> u odnosu na uzorak sa dodanim glutationom. Jednake vrijednosti koncentracije ovog spoja određenog u kontrolnom uzorku i onog sa dodatkom glutaciona, dovode do zaključka kako glutation čuva njegovu koncentraciju u vinu. Reakcija između SO<sub>2</sub> i  $\beta$ -damaskenona, znatno smanjuje njegov utjecaj na voćnost nekoliko vina (Daniel i sur., 2004). Andújar-Ortiz i sur. (2013) analizom uzorka vina sa dodatkom inaktiviranih kvasaca koji su obogaćeni glutationom, očuvali su koncentracije  $\beta$ -damaskenon u vinu nakon 9 mjeseci starenja.

$\beta$ -damaskenon karakterizira cvjetna i voćna aroma te aroma po tropskom voću a ujedno i vrlo nizak senzorski prag osjetljivosti od 0,4 µg L<sup>-1</sup> (Pineau i sur., 2007). S obzirom na veće koncentracije ovog spoja u analiziranim uzorcima vina, može se uočiti kako on utječe na aromu vina.



Slika 19. Ovisnost koncentracije  $\beta$ -damaskenona o koncentraciji antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) u analiziranim uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignona nakon 12 mjeseci starenja u bocama

## 5. ZAKLJUČAK

Nakon svih provedenih analiza na uzorcima crnog vina Cabernet Sauvignon (nakon 12 mjeseci starenja u bocama) te dobivenih i interpretiranih rezultata, jasno se mogu donijeti slijedeći zaključci:

- Na koncentraciju aromatskih spojeva prisutnih u vinu utječe koncentracija dodanih antioksidansa (sumporov dioksid i glutacion).
- Viša koncentracija antioksidansa (sumporov dioksid i glutacion) rezultirala je većom koncentracijom analiziranih spojeva arome.
- Smanjenje koncentracije sumporovog dioksida u proizvodnji vina moguće je uz dodatak glutaciona koji je pokazao dobru zaštitu za većinu spojeva arome, osim za estere etil butirata i etil acetata.

## 6. LITERATURA

Alamo Sanza, M., Nevares Dominguez, I. (2006) Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods: Anthocyanin composition. *Anal. Chim. Acta.* **563**, 255-263.

Alves, R., Nascimento, A., Nogueira, J. (2005) Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Anal. Chim. Acta.* **546**, 11-21.

Ancín, C., Garde, T., Torrea, D., Jimenez, N. (2004) Extraction of volatile compounds in model wine from different oak woods: effect of SO<sub>2</sub>. *Food Res Int.* **37**, 375-383.

Andújar-Ortiz, I., Chaya, C., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., Pozo-Bayón, M. A. (2014) Impact of Using New Commercial Glutathione Enriched Inactive Dry Yeast Oenological Preparations on the Aroma and Sensory Properties of Wines. *Int. J. Food. Prop.* **17**, 987-1001.

Andújar-Ortiz, I., Rodríguez-Bencomo, J. J., Moreno-Arribas, M. V., MartínÁlvarez, P. J., Pozo-Bayón, M.A. (2010) Role of glutathione enriched inactive yeast preparations on the aroma of wines. Proceedings of the 33nd World Congress of Vine and Wine. OIV 2010, Geneva, str. 1-8.

Anli, R. E., Cavuldak, Ö. A. (2012) A review of microoxygenation application in wine. *J. Inst. Brew.* **118**, 368–385.

Badea, G. A., Antoce, A. O. (2015) Glutathione as a possible replacemenet of sulfur dioxide in winemaking technologies: a review. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **59**, 123-140.

Bardi, L., Cocito, C., Marzona, M. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *Int. J. Food Microbiol.* **47**, 133-140.

Black, C. A., Parker, M., Siebert, T. E., Capone, D. L., Francis, I. L. (2015) Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. *Aust. J. Grap. Wine. R.* **21**, 582-600.

Black, C., Francis, L., Henschke, P., Capone, D., Anderson, S., Day, M., Holt, H., Pearson, W., Herderich, M., Johnson, D. (2012) Aged Riesling and the development of TDN. *Wine. Vitic. J.* **27**, 20-26.

Blanchard, L., Darriet, P., Dubourdieu, D. (2004) Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* **55**, 115–120.

Boroski, M., Crupi, P., Tamborra, P., Antonacci, D., Toci, A. T. (2017) Influence of winemaking techniques with low sulphur dioxide on wine varieties Chardonnay, Pinot and Montepulciano. *J. Food Nutr. Res.* **56**, 326–334.

Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Cacho, J. (2005) Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data. *Food Chem.* **53**, 5682-5690.

Carmel-Harel, O., Storz, G. (2000) Roles of the glutathione and thioredoxin dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 439–461.

Cheynier, V., Souquet, J. M., Moutounet, M. (1989) Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **40**, 320-324.

Coetzee, C., Lisjak, K., Nicolau, L., Kilmartin, P., du Toit, W. J. (2013) Oxygen and sulfur dioxide additions to Sauvignon blanc must: effect on must and wine composition. *Flavour Fragr. J.* **28**, 155-167.

Daniel, M. A., Elsey, G. M., Capone, D. L., Perkins, M. V., Sefton, M. A. (2004) Fate of damascenone in wine: The role of SO<sub>2</sub>. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 8127–8131.

DIRECTIVE 2003/89/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 10 November 2003 amending Directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L 308/15, 25 November 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104813>

Dubourdieu, D., Lavigne, V. (2004) The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine. *Vinidea. Net.* **2**, 1–9.

Ebeler S. E., Spalding, R. S. (1999) Characterization and Measurement of Aldehydes in Wine. U: Chemistry of Wine Flavour, ACS Symposium Series, Waterhouse, A. L., Ebeler, S. E. (Eds.), *Oxford University Press.* **35**, 166–179.

- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J., Ferreira, V. (2002) Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chem.* **77**, 325-331.
- Ferreira, V. (2010) Volatile aroma compounds and wine sensory attributes. U: Managing wine quality, (Reynolds, A.G., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 5-28.
- Ferreira, V., Escudero, A., Fernandez, P. E., Cacho, J. (1997) Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **205**, 392-396.
- Fracassetti, D., Coetzee, C., Vanzo, A., Ballabio, D., du Toit, W. J. (2013) Oxygen consumption in South African Sauvignon Blanc wines: Role of glutathione, sulphur dioxide and certain phenolics. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **34**, 156-169.
- Fragasso, M., Antonacci, D., Pati, S., Lamacchia, F., Baiano, A., Coletta, A., La Notte, E. (2010) Influence of glutathione addition on volatile Profile of Trebbiano and Bombino Bianco wines. Research Unit for table grape and wine growing and wine producing in Mediterranean environment. CRA-UTV, Turi, str. 1-5.
- Francis, I. L., Newton, J. L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* **11**, 114-126.
- Friedman M. (1994) Improvement in the safety of foods by SH-containing amino acids and peptides. A review. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 3-20.
- Gabrielli, M., Aleixandre-Tudo, J. L., Kilmartin, P. A., Sieczkowski, N., du Toit, W. J. (2017) Additions of Glutathione or Specific Glutathione-rich Dry Inactivated Yeast Preparation (DYP) to Sauvignon blanc Must: Effect on Wine Chemical and Sensory Composition. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **38**, 18-28.
- García Martín, J. F., Sun, D-W. (2013) Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends Food Sci. Tech.* **33**, 40–53.

- Garde-Cerdán, T. G., Goñi, D. T., Azpilicueta, C. A. (2004) Accumulation of volatile compounds during ageing of two red wines with different composition. *J. Food Eng.* **65**, 349-356.
- Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C. (2007) Effect of SO<sub>2</sub> on the formation and evolution of volatile compounds in wines. *Food Control.* **18**, 1501-1506.
- Gómez-Míguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira V., Vicario, I. M., Heredia, F. J. (2007) Volatile components of Zalema white wines. *Food Chem.* **100**, 1464-1473.
- Jackson, R. S. (1994) Wine science. Principles and applications. Academic Press, San Diego, USA.
- Jackson, R. S. (2008) Wine science – principles and applications, 3. izd., Academic Press, San Diego, USA.
- Jourdes, M., Michel, J., Saucier, C., Quideau, S., Quideau, P-L. (2011) Identification, amounts, and kinetics of extraction of C-glucosidic ellagitannins during wine aging in oak barrels or in stainless steel tanks with oak chips. *Anal. Bioanal. Chem.* **401**, 1531-1539.
- Karbowiak, T., Gougeon, R. D., Alinc, J-B., Brachais, L., Debeaufort, F., Voilley, A., Chassagne, D. (2010) Wine Oxidation and the Role of Cork. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **52**, 1-33.
- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Krieger-Weber, S., du Toit, M., Rauhut, D. (2012) Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World J. Microb. Biot.* **28**, 1143-1153.
- Kojić, N. (2019) Djelovanje sumporovog dioksida u vinu. *Glasnik zaštite bilja* [online] 6, 86-92, <<https://hrcak.srce.hr/>>. Pristupljeno 15. travnja 2020.
- Kritzinger, E. C. (2012) Winemaking practices affecting glutathione concentrations in white wine, Stellenbosch University, Neustadt.
- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., Du Toit, W. J. (2013) Role of Glutathione in Winemaking: A Review. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 269-277.
- Lacey, M. J., Allen, M. S., Harris, R. L. N., Brown, W. V. (1991) Sauvignon blanc varietal aroma. *Aust. Grapegrower. Winemaker.* **1988**, 52-56.

- Lambrechts, M., Pretorius, I. (2000) Yeast and its importance to wine aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97–129.
- Lambropoulos, I., Roussis, I. (2007) Inhibition of decrease of volatile esters and terpenes during storage of white wine and a model white wine medium by caffeic acid and gallic acid. *Food Res. Int.* **40**, 176-181.
- Lavigne, V., Pons, A., Dubourdieu, D. (2007) Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *J. Chromatogr. A.* **1139**, 130-135.
- Li, H., Guo, A., Wang, H. (2008) Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.* **108**, 1–13.
- Lukić, K., Brnčić, M., Ćurko N., Tomašević, M., Valinger, D., Denoya, G. I., Barba, F.I., Kovačević Ganić, K. (2019) Effects of high power ultrasound treatments on the phenolic, chromatic and aroma composition of young and aged red wine. *Ultrason. Sonochem.* **59**, 1-14.
- Makhotkina, O. (2011) Stability of New Zealand Sauvignon Blanc aroma compounds: Oxidation versus hydrolysis, The University of Auckland, New Zealand.
- Makhotkina, O., Herbst-Johnstone, M., Logan, G., du Toit, W., Kilmartin, P. A. (2013) Influence of Sulfur Dioxide Additions at Harvest on Polyphenols, C6-Compounds, and Varietal Thiols in Sauvignon blanc. *Am. J. Enol. Vitic.* **64**, 203-213.
- Marais, J. (1983) Terpenes in the aroma of grapes and wines: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **4**, 49–60.
- Marais, J., Pool, H. J. (1980) Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis.* **19**, 151-164.
- Marais, J., van Wyk, C. J., Rapp, A. (1992) Effect of Sunlight and Shade on Norisoprenoid Levels in Maturing Weisser Riesling and Chenin blanc Grapes and Weisser Riesling Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **13**, 23-32.



- Marić, J., Firšt-Bača, M. (2003) Sensory evaluation and some acetate esters of bottle aged Chardonnay wines. *Plant Soil Environ.* **49**, 332–336.
- Murat, M. L., Tominaga, T., Saucier, C., Glories, Y., Dubourdieu, D. (2003) Effect of anthocyanins on stability of a key-odorous compound, 3-mercaptohexan-1-ol, in Bordeaux rosé wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **54**, 135–138.
- Nykänen, L. (1986) Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**, 84-96.
- Oliveira, J. M., Faria, M., Sá, F., Barros, F., Araújo, I. M. (2006) C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Anal. Chim. Acta.* **563**, 300-309.
- Papadopoulou, D., Roussis, I. G. (2001) Inhibition of the decline of linalool and  $\alpha$ -terpineol in muscat wines by glutathione and N-acetyl-cysteine. *Ital. J. Food Sci.* **13**, 413-419.
- Papadopoulou, D., Roussis, I. G. (2008) Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetyl-cysteine. *Int. J. Food Sci. Tech.* **43**, 1053-1057.
- Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., Mauricio, J. C. (2004) Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chem.* **84**, 585-590.
- Penninckx, M. J. (2000) A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 737–742.
- Perez-Coello, M. S., Diaz-Maroto, M. C. (2009) Volatile Compounds and Wine Aging. U: Wine Chemistry and Biochemistry (Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., ured.). Springer, New York, str. 295-307.
- Perez-Magarino, S., Iglesias, M. S., Heras, M. O., Huerta, C. G., Sanjose, M. L. G. (2007) Colour stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation. *Food Chem.* **101**, 881–893.

- Perez-Prieto, L. J., Lopez-Roca, J. M., Gomez-Plaza, E. (2003) Differences in major volatile compounds of red wines according to storage length and storage conditions. *J. Food Compos. Anal.* **16**, 697-705.
- Pineau, B., Barbe, J-C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D. (2007) Which impact for  $\beta$ -damascenone on Red Wines Aroma? *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4103-4108.
- Ramney, D. D., Ough, C. S. (1980) Volatile ester Hydrolysis or Formation during Storage of Model Solutions and Wines. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 928-934.
- Rapp, A. (1998) Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung.* **42**, 351–363.
- Rapp, A., Mandery, H. (1986) Wine aroma. *Experientia.* **42**, 873–884.
- Ribéreau-Gayon, P., Boidron, J. N., Terrier, A. (1975) Aroma of Muscat grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* **23**, 1042-1047.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006) Handbook of enology Vol. 1, The Microbiology of Wine and Vinifications, 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Andujar-Ortiz, I., Moreno-Arribas, M. V., Simo, C., Gonzalez, J., Chana, A., Davalos, J., Pozo-Bayon, M. A. (2014) Impact of Glutathione-Enriched Inactive Dry Yeast Preparations on the Stability of Terpenes during Model Wine Aging. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 1373–1383.
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I., Papadopoulou, D. (2005) Inhibition of the decline of volatile esters and terpenols during oxidative storage of Muscat-white and Xinomavro-red wine by caffeic acid and N-acetyl-cysteine. *Food Chem.* **93**, 485–492.
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I., Tzimas, P. (2007) Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. *Am. J. Enol. Vitic.* **58**, 274-278.
- Roussis, I. G., Patrianakou, M., Drossiadis, A. (2013) Protection of Aroma Volatiles in a Red Wine with Low Sulphur Dioxide by a Mixture of Glutathione, Caffeic Acid and Gallic Acid. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **34**, 262-265.

- Roussis, I. G., Sergianitis, S. (2008) Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour Frag. J.* **23**, 35-39.
- Roussis, I., Papadopoulou, D., Sakarellos-Daitsiotis, M. (2009) Protective Effect of Thiols on Wine Aroma Volatiles. *Open Food Sci. J.* **3**, 98-102.
- Santos, J. P., Arroyo, T., Alexandre, M., Lozano, J., Sayago, L., Garcia, M. (2004) A comparative study of sensor array and GC–MS: application to Madrid wines characterization. *Sensors and Actuators B: Chemical.* **102**, 299-307.
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2012) Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 1-12.
- Silva Ferreira, A. C., de Pinho, P. G. (2004) Nor-isoprenoids profile during port wine ageing-influence of some technological parameters, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal.
- Silva Ferreira, A. C., Guedes de Pinho, P., Rodrigues, P., Hogg, T. (2002) Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are effected by selected technological parameters. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5919.
- Smith, C. (2013) *Postmodern Winemaking: Rethinking the Modern Science of an Ancient Craft*, University of California Press, Berkeley.
- Styger, G., Prior, B., Bauer, F. F. (2011) Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **38**, 1145–1159.
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., Jiranek, V. (2010) Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowlage and future prospects. *Food Chem.* **12**, 1-16.
- Swiegers, J. H., Kievit, R. L., Siebert, T., Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., King, E. S., Bramley, B. R. (2009) The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiol.* **26**, 204-211.

Swiegers, J. H., Pretorius, I. S. (2005) Yeast Modulation of Wine Flavour. *Adv. Appl. Microbiol.* **57**, 131-175.

Tao, Y., Garcia, J. F., Sun, D. W. (2014) Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **54**, 817–835.

Ugliano, M., Kwiatkowski, M. J., Vidal, S., Capone, D., Siebert, T., Dieval, J. B., Aagaard, O., Waters, E. J. (2011) Evolution of 3-mercatohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 2564–2572.

Vaimakis, V. i Roussis, I. G. (1996) Must oxygenation together with glutathione addition in the oxidation of white wine. *Food Chem.* **57**, 419-422.

van Wyk, S., Silva, F. V. M. (2019) Nonthermal preservation of wine, University of Auckland, New Zealand.

Webber, V., Dutra, S. V., Spinelli, F. R., Carnieli, G. J., Cardozo, A., Vanderlinde, R. (2017) Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine. *Food Chem.* **216**, 254-259.

Webber, V., Valduga Dutra, S., Rodrigues Spinelli, F., Rossi Marcon, A., João Carnieli, G., Vanderlinde, R. (2014) Effect of glutathione addition in sparkling wine. *Food Chem.* **159**, 391-398.

Zakon o vinu (2019) *Narodne novine* **32**, Zagreb

Zhang, Q-A., Xu, B-W., Chen, B-Y., Zhao, W. Q., Xue, C. H. (2019) Ultrasound as an effective technique to reduce higher alcohols of wines and its influencing mechanism investigation by employing a model wine. *Ultrason. Sonochem.* **61**, 1-44.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Kovačević

Ime i prezime studenta