

# Utjecaj izbora vinskog posuđa na polifenolni sastav vina

---

Čirjak, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:666815>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Marina Čirjak

755/PI

**UTJECAJ IZBORA VINSKOG  
POSUĐA NA POLIFENOLNI  
SASTAV VINA**

Rad je izrađen na Poljoprivrednom institutu u Ljubljani te na Biotehničkom fakultetu u Ljubljani u sklopu Erasmus + studijskog boravka.

## ZAHVALA

Ovim putem bih se zahvalila svojoj mentorici prof. dr. sc. Mari Banović na stručnom vodstvu i brojnim savjetima kako tijekom pisanja ovog diplomskog rada tako i tijekom cijelog školovanja na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Hvala joj na pristupačnosti i uvijek lijepoj riječi podrške.

Veliko hvala i Biotehničkom fakultetu u Ljubljani koji su me prihvatili u sklopu Erasmus+ studijskog boravka. Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Tatjani Košmerl te Zdenki Župančić koje su mi pružile stručno vodstvo prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada. Hvala im na iskazanom povjerenju, izuzetnom strpljenju i razumijevanju te uvijek pozitivnom duhu i prijateljskom okruženju. Također zahvaljujem svima na Poljoprivrednom institutu u Ljubljani, posebice dr. sc. Andreji Vanzo na posvećenom vremenu i ustupljenim materijalima koji su mi pomogli pri izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji koja mi je pružila svekoliku pomoć, a posebno se zahvaljujem svojoj majci na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom studiranja.

Ovim putem se želim zahvaliti i svojim prijateljima i kolegama koji su svojim prisustvom uljepšali moje studentsko razdoblje.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## UTJECAJ IZBORA VINSKOG POSUĐA NA POLIFENOLNI SASTAV VINA

*Marina Čirjak 755/PI*

**Sažetak:** Kvaliteta vina u značajnoj mjeri je definirana polifenolnim sastavom. Polifenoli definiraju boju, trpkost, gorčinu i strukturu vina, a dokazano je da imaju i pozitivne učinke na zdravlje. Na sastav i udio polifenola vina utječe: sorta grožđa, primijenjena tehnologija prerade, maceracija te uvjeti tijekom dozrijevanja grožđa i vina. Pri izradi ovog rada koristila su se crvena vina, sorti Cabernet sauvignon, Pinot crni te Merlot, različitih godina berbe, trajanja maceracije, vremena i posuđa u kojem je provedeno dozrijevanje. U eksperimentalnom dijelu rada određivani su ukupni fenoli, visoko i nisko molekularni tanini, ukupni antocijani, antioksidativna aktivnost vina te karakteristike boje. Za određivanje navedenih značajki primjenjene su spektrofotometrijske metode. Prema rezultatima u ovom radu dozrijevanje u drvenim bačvama ima najbolji utjecaj na polifenolni sastav vina.

**Ključne riječi:** crveno vino, dozrijevanje, polifenoli, spektrofotometrija

**Rad sadrži:** 58 stranica, 16 slika, 3 tablice, 76 literaturnih navoda, 8 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnici

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Prof. dr. sc. Mara Banović

**Pomoć pri izradi:** Prof. dr. sc. Tatjana Košmerl

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Branka Levaj
2. Prof. dr. sc. Mara Banović
3. Prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan
4. Doc. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (zamjena)

**Datum obrane:** 25. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Technology and Analysis of wine**

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

### THE INFLUENCE OF WINE VATS ON POLYPHENOL CONTENT OF WINE

*Marina Čirjak 755/PI*

**Abstract:** The quality of the wine is significantly defined by the polyphenol composition. Polyphenols define color, astringency, bitterness and the structure of wine. Content of polyphenols in wine is influenced by: grape variety, applied processing technology, maceration and conditions during maturation. In this work, red wines, Cabernet sauvignon, Pinot noir and Merlot were used. Difference between them was year of harvest, duration of maceration, time and vats of maturation. In the experimental part, total phenols, high and low molecular tannins, total anthocyanins, antioxidant activity of wine and color characteristics were determined. Spectrophotometric methods were used to determine these characteristics. Due to results in this thesis the maturation in wooden barrels has the best effect on the polyphenol composition of wine.

**Keywords:** wine aging, phenols, spectrophotometry

**Thesis contains:** 58 pages, 16 figures, 3 tables, 76 references, 8 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Mara Banović, Full professor

**Technical support and assistance:** PhD. Tatjana Košmerl, Full professor

**Reviewers:**

1. PhD. Branka Levaj, Full professor
2. PhD. Mara Banović, Full professor
3. PhD. Vesna Zechner-Krpan, Full professor
4. PhD. Danijela Burać Kovačević, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 25. September 2017.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. FENOLNI SASTAV VINA .....	2
2.1.1. Flavonoidi.....	2
2.1.2. Neflavonoidi.....	8
2.2. DOZRIJEVANJE VINA .....	11
2.2.1. Dozrijevanje vina u drvenim bačvama.....	12
2.2.2. Dozrijevanje vina korištenjem fragmenata drveta .....	13
2.2.3. Dozrijevanje vina korištenjem mikrooksigenacije.....	14
2.2.4. Dozrijevanje vina na talogu.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. MATERIJALI .....	17
3.1.1. Opis uzorak .....	17
3.2. METODE .....	18
3.2.1. FTIR analiza.....	18
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola .....	18
3.2.3. Određivanje niskomolekularnih tanina .....	20
3.2.4. Određivanje visikomolekularnih tanina .....	21
3.2.5. Određivanje ukupnih antocijana.....	23
3.2.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti vina .....	24
3.2.7. Određivanje intenziteta boje.....	25
3.2.8. Određivanje nijanse boje.....	26
3.2.9. Određivanje udjela boje otporne na SO <sub>2</sub> .....	26
3.2.10. Određivanje intenziteta i nijanse boje bez učinka SO <sub>2</sub> .....	27
3.2.11. Određivanje udjela (%) crvene boje pri različitim valnim duljinama.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	30
4.1. REZULTATI I RASPRAVA FTIR ANALIZE .....	31
4.2. REZULTATI I RASPRAVA ODREĐIVANJA UKUPNIH POLIFENOLA, NISKOMOLEKULARNIH I VISKOMOLEKULARNIH TANINA, UKUPNIH ANTOCIJANA TE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VINA.....	32
4.2.1. Masena koncentracija ukupnih fenola.....	32
4.2.2. Masena koncentracija nisko i visoko molekularnih tanina .....	35
4.2.3. Masena koncentracija ukupnih antocijana .....	36



4.2.4. Antioksidacijska aktivnost vina .....	38
4.3. REZULTATI I RASPRAVA ODREĐIVANJA INTENZITETA I NIJANSE BOJE TE UDJELA CRVENE BOJE PRI RAZLIČITIM VALNIM DULJINAMA U VINU .....	40
4.3.1. Intenzitet boje .....	40
4.3.2. Nijansa boje .....	42
4.3.3. Udio crvene boje (%) pri različitim valnim duljinama .....	44
5. ZAKLJUČAK .....	46
6. LITERATURA .....	47
PRILOZI .....	55

# 1. UVOD

Fenolni spojevi utječu na kakvoću i kvalitetu vina te pridonose boji, okusu i orangoleptičkim svojstvima. Smatra se da su odgovorni i za „francuski paradoks“, odnosno nositelji su antioksidacijskih svojstava vina. U grožđu i vinu identificirano je nekoliko stotina fenolnih spojeva, a nalaze u pokožici, sjemenki, pulpi te u peteljci. Dijelev se na flavonoide i neflavonoide, a svi oni ulaze u različite kemijske reakcije, bilo međusobno, bilo sa drugim spojevima tijekom proizvodnje i starenja vina. Iako se glavnina polifenolnih spojeva ekstrahira iz različitih dijelova grožđa tijekom procesa vinifikacije, oni mogu nastati i djelovanjem kvasaca ili se ekstrahirati iz drveta bačvi tijekom dozrijevanja.

Kako bi proizveli vino vrhunske kvalitete njegovo dozrijevanje je nezaobilazan dio postupka. Tijekom dozrijevanja dolazi do mnogobrojnih modifikacija polifenolnog sastava mladih vina koja u pravilu imaju opor miris i oštar okus dok nakon provedenog dozrijevanja vino poprima svoj prepoznatljivi miris i zaokruženije tijelo. Dozrijevanje vina u hrastovim bačvama je tradicionalna i najšire prihvaćena tehnika, kako među proizvođačima tako i među potrošačima vina. No iako daje vina najbolje kvalitete dozrijevanje u drvenim bačvama između ostalog sa sobom nosi i veće troškove koje proizvođači žele izbjeći. Shodno tome podliježe se i alternativnim tehnikama dozrijevanja kao što je opisano u ovom radu.

Analize uzoraka provedene su standardnim spektrofotometrijskim metodama. Cilj rada bio je odrediti utjecaj različitih vrsta posuda (hrastove bačve, inox posuda, betonska posuda) i vremena dozrijevanja (6 i 12 mjeseci) na polifenolni sastav vina.

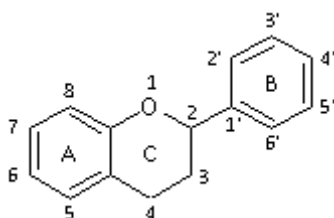
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FENOLNI SASTAV VINA

Senzorska kvaliteta grožđa i vina uvelike je određena fenolnim sastojcima. Upravo oni odgovorni za svojstva kao što su: aroma, boja, okus, gorčina i trpkost (Garrido i Borges, 2013). Trpkost je taktilni osjećaj uglavnom uzrokovan taloženjem proteina sline čime se smanjuje podmazivanje u ustima. Komponente vina odgovorne za trpkost uključuju fenolne tvari kao što su proantocijanidini ili tanini drveta (elagitanini i galotanini) koji reagiraju s proteinima sline, uzrokujući njihovo kompleksiranje te potom taloženje na epitelu usta (Gambutti i sur., 2012). Fenolni sastav vina ovisi o brojnim faktorima kao što su sorta i stupanj zrelosti grožđa, okolišnim uvjeti u vinogradu (klima, tlo), primjenjena tehnologija proizvodnje te uvjeti fermentacije i dozrijevanja (Garrido i Borges, 2013). Istraživanja su pokazala da fenolni spojevi u vinu u pravilu nastaju ekstrakcijom iz grožđa tijekom vinifikacije te manjim dijelom od drvene bačve ili metabolizmom kvasca ili nekog drugog mikrobiološkog izvora (Stavridou i sur., 2016). Fenoli u vinu dijele se u 2 osnovne skupine flavonoide i neflavanoide. U flavonoide ubrajamo flavanole, flavonole te antocijane dok su neflavanoidi hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline, hidrolizabilni tanini te stilbeni.

#### 2.1.1. Flavonoidi

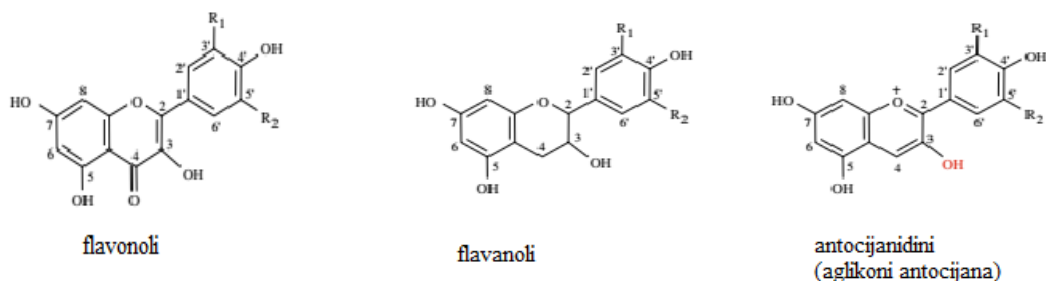
Osnovnu strukturu flavonoida čini difenolpropanski kostur ( $C_6-C_3-C_6$ ) (Slika 1.). Sastoji se od dva fenolna prstena (A i B prsten) koji su međusobno povezani preko heterocikličkog piranskog prstena (C prsten) (Balasundram i sur., 2006).



**Slika 1.** Osnovna kemijska struktura flavonoida (Zhang i sur., 2015)

Prema razlici u stupnju oksidacije i prema supstituciji C prstena međusobno se razlikuju različite skupine flavonoida. Zasićeni C prsten karakterizira flavanole, keto skupina na

položaju 4 te nezasićenost između položaja 2 i 3 specifična je za flavonole dok je za antocijane karakterističan potpuni aromatski prsten sa pozitivnim nabojem. Nastavak -ol upućuje na supstituent alkohola na C prstenu kao na primjer kod flavan-3-ola (Waterhouse, 2002).

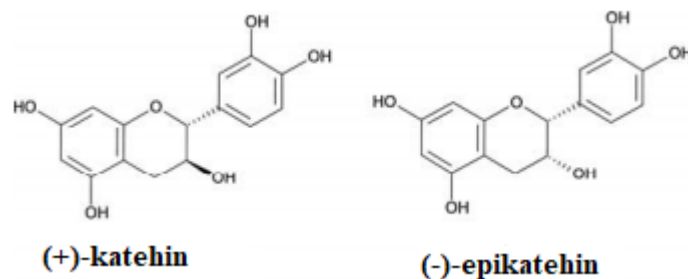


**Slika 2.** Kemijska struktura flavonoida (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Flavonoidi mogu biti slobodni ili vezani u polimere sa drugim flavonoidima, šećerima, neflavonoidima ili kombinacija svega navedenog. Uglavnom se sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu prije premještanja i pohranjivanja u vakuolu stanice. Njihova pretpostavljena funkcija u grožđu, kako i u drugim biljkama je prva linija obrane protiv mikrobnih patogena, štetnih insekata i biljojeda (Jackson, 2008). U najvećoj koncentraciji u grožđu su prisutni tijekom cvjetanja, a kako grožđe raste njihova se koncentracija smanjuje (Garrido i Borges, 2013). Predstavljaju većinu fenola u crvenom vinu, a u njega dopijevaju ekstrakcijom iz kože i sjemenke grožđa prilikom procesa maceracije i fermentacije (Waterhouse, 2002).

### 2.1.1.1 Flavanoli

Flavanoli su najzastupljenija skupina flavanoida u vinu, ali i u grožđu gdje se nalaze i u sjemenci i u kožici bobice. Flavanole se još naziva i flavan-3-oli jer su hidroksilirani na položaju C<sub>3</sub>. Oni su u grožđu prisutni kao monomeri, ali i kao oligomeri te polimeri. Glavni monomeri flavan-3-ola u grožđu su (+)-katehin i njegov izomer (-)-ekipatehin (Slika 3.), dok je u manjim količinama pronađen i epikatehin-3-galat. Ukupna količina monomera flavan-3-ola u tipičnom crvenom vinu je od 40-120 mgL<sup>-1</sup>, od čega je većina katehin. Koncentracija uvelike ovisi o duljini same maceracije (Waterhouse, 2002; Jackson, 2008).



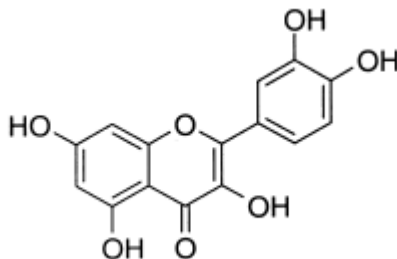
**Slika 3.** Kemijska struktura (+)-katehina i (-)-epikatehina (Jackson, 2008).

Polimerizacijom monomernih flavanola nastaju kondenzirani tanini ili proantocijanidini koji mogu stvarati stabilne komplekse sa proteinima i drugim biljnim polimerima kao što su primjerice polisaharidi (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Figueiredo-González i suradnici (2014.) su proveli istraživanje na slatkim crvenim vinima te su dokazali da se koncentracija monomera flavan-3-ola tijekom dozrijevanja u drvenim bačvama smanjuje sa 73 na 28 mgL<sup>-1</sup> kod likerskih vina i sa 21 na 18 mgL<sup>-1</sup> kod desertnih vina. Među monomerima najzastupljeniji je katehin, a prate ga epikatehin i galokatehin. U istom istraživanju dokazano je da se tijekom dozrijevanja smanjila i koncentracija proantocijanidina sa 322 na 108 mgL<sup>-1</sup> kod likerskih vina te sa 121 na 88 mgL<sup>-1</sup> kod desertnih vina. Ovi rezultati su u suglasju sa rezultatima koje su 2012. godine dobili Chira i suradnici provodeći istraživanje fenolnog sastava sorte Cabernet sauvignon. Dva su glavna procesa tijekom kojih dolazi do nestanka proantocijanidina u vinima. Prvi je tipično kiselinama katalizirano pucanje C-C veza tijekom dozrijevanja vina, a drugi je taloženje polimera kada dosegnu toliku veličinu da više nisu topljivi u vinima te se počnu taložiti, time dolazi i do gubitka boje te povećane trpkooće kod starijih crvenih vina (Figueiredo-González i sur., 2014).

#### 2.1.1.2. Flavonoli

Flavonoli imaju C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> dvostruku vezu te na položaju C<sub>4</sub> vezanu keto skupinu (Hornsey, 2007). Postoje samo 3 skupine jednostavnih flavanola u grožđu, kvarcetin (Slika 4.), miricetin i kampferol, ali budući da oni tvore razne glikozide prisutni su mnogi pojedinačni spojevi od kojih su najzastupljeniji 3-glikozidi kvarcetina koji imaju dihidroksilirani B prsten (Waterhouse, 2002; Hornsey, 2007). Količina flavanola u grožđu ovisi o stupnju razvoja te o genetičkim i ekološkim faktorima. Njihova biosinteza započinje tijekom cvjetanja te ponovo nakon zrenja bobice, nakon čega je zabilježen konstantan rast koncentracije (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

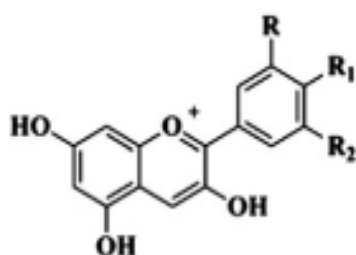
Studija provedena na Pinotu crnom pokazala je da količina sunčeve svjetlosti koja dospije na bobicu uvelike povećava razinu flavonola iz čega proizlazi da biljka proizvodi ove sastojke kao prirodnu zaštitu od sunca (Price i sur., 1995). Također studija koja je uspoređivala koncentraciju flavonola između jeftinijih i skupljih vina sorte Cabernet sauvignon pokazuje kako je u skupljim vinima koncentracija znatno veća, sugerirajući kako je to grožđe imalo bolju izloženost suncu, a posljedično tome dalo i vino bolje kvalitete (Waterhouse, 2002).



**Slika 4.** Kemijska struktura kvarcetina (Waterhouse, 2002).

#### 2.1.1.3. Antocijani

Antocijani su glavni izvor crvene boje vina. No slobodni antocijani nisu osobito stabilni, stoga je za stabilnost boje u vinu neophodna njihova polimerizacija. Stabilnost se razvija kroz složen niz mehanizama, oni mogu biti kratkotrajni, kao što je na primjer kopigmentacija ili dugotrajni, kao što je polimerizacija sa flavan-3-olima i procijanidinima. Također može doći i do stvaranja novih pigmenata, piranoantocijanina. Dodatan izvor pigmentacije dolazi i od oksidacije te polimerizacije flavonoida iz hrasta, ako je vino dozrijevalo u drvenim bačvama ili uz korištenje drvenih fragmenata (He i sur., 2012). U sortama crvenog grožđa identificirano je 6 vrsta antocijanidina: cijanidin (narančasta crvena), peonidin (crvena), delfinidin (plavičasto crvena), pelargonidin (narančasta), petunidin i malvidin (plavičasto crvena) (Slika 5.). Smatra se da je u sortama *V. vinifera* najzastupljeniji antocijanidin malvidin koji je kod sorte Grenache zastupljen je u količinama od 90%, a kod sorte Sangiovese manje od 50% (Moreno-Arribas i Polo, 2009; Garrido i Borges, 2013).



	R	R1	R2
cijanidin	OH	OH	
peonidin	OCH <sub>3</sub>	OH	
delfinidin	OH	OH	OH
pelargonidin	H	OH	H
petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
malvidin	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

**Slika 5:** Kemijska struktura antocijanidina (Garrido i Borges, 2013).

Antocijani identificirani u pokožici grožđa (*Vitis vinifera*) i vinima su 3-*O*-glikozidi gore navedenih antocijanidina. Postoje četiri različite strukture antocijana, međusobno u ravnoteži, u kiselom ili u neutralnom mediju: flavijev kation (crveni), kinonska baza (plava), hemikelat ili karbinol pseudo-baza (bezbojna) i halkon (blijedo žuti) (Brouillard, 1994; He i sur., 2012).

Profil antocijana za svaku sortu grožđa je relativno stabilan dok apsolutne koncentracije mogu jako varirati između različitih berbi zbog okolišnih i agronomskih faktora, prinosa i zrelosti grožđa (Vivas i sur., 2001; Garrido i Borges, 2013.). Boja antocijana, kao i njihova struktura vezana je uz pH-vrijednost. Pri jako niskoj pH-vrijednosti oni su crveni, dok u lužnatom mediju gube boju. Maksimalan gubitak boje je u rasponu pH-vrijednosti od 3,2 do 3,5. Pri pH-vrijednosti 3,5 ravnoteža se počinje pomicati prema bezbojnoj hemikelatnoj strukturi dok se pri pH-vrijednostima iznad 4 mijenja od svijetlo ljubičaste do plave da bi na kraju u neutralnom i alkalnom mediju prešla u žutu (Ribéreau-Gayon i sur., 2006; Moreno-Arribas i Polo, 2009; He i sur., 2012). Međutim, količina slobodnog sumpornog dioksida je najvažniji čimbenik koji utječe na boju mladih crvenih vina. Sumporni dioksid se dodaje pri proizvodnji vina kako bi ga zaštitio od mikrobnog i fungalnog rasta te kako bi zaustavio oksidaciju vina (Moreno-Arribas i Polo, 2009). No, s druge strane on tvori bezbojne produkte s flavijevim kationom. Konstanta disocijacije sulfita ( $pK_s$ ) je 5 te su prema tome antocijanin-sulfat produkti stabilni pri pH-vrijednosti vina 3,2-4. Prema tome, antocijanini su zarobljeni kao bezbojni produkti razmjerno količini dodanog sumpornog dioksida u mošt (Fulcrand i sur. 2006; He i sur, 2012). Slobodni antocijanini u crvenim vinima nisu osobito stabilni, a njihova koncentracija obično brzo opada tijekom dozrijevanja u bačvama ili u bocama. Da tijekom dozrijevanja vina dolazi do opadanja koncentracije antocijana su dokazali Figueiredo-González i suradnici u svom istraživanju provedenom 2014. godine na slatkim vinima. Nakon 6 mjeseci dozrijevanja vina u drvenim bačvama koncentracija antocijana smanjila se sa početnih 433 mgL<sup>-1</sup> na 54 mgL<sup>-1</sup> kod likerskih vina, dok se kod prirodnih slatkih vina

koncentracija antocijana smanjila sa  $93 \text{ mgL}^{-1}$  na  $16 \text{ mgL}^{-1}$ . Nakon dozrijevanja od jedne godine kod likerskih vina koncentracija se smanjila na  $43 \text{ mgL}^{-1}$ , dok je kod prirodnih slatkih vina iznosila svega  $12 \text{ mgL}^{-1}$  (Figueiredo-González i sur., 2014). Rezultate slične ovima dobili su i 2001. godine Mateus i De Freitas na istraživanju provedenom na Porto vinima. Nakon nekoliko godina dozrijevanja vina ostaju crvena, ali gotovo da nema prisutnih monomernih antocijana već nastaju novi spojevi koji su stabilniji od početnih antocijana. Ti spojevi nastaju preko direktnih ili u acetaldehidnom mediju antocijan-flavanol i antocijan-antocijan reakcija kondenzacije te preko reakcija koje dovode do sinteze piroantocijana (Cano-López i sur., 2007). Te reakcije su:

*1) Reakcije direktne antocijan-flavanol i antocijan-antocijan kondenzacije*

Predložena su dva različita mehanizma reakcije čiji su produkti antocijan-flavanol ( $A^+-F$ ) i flavanol-antocijan ( $F-A^+$ ):

*a) Reakcija direktne antocijan-flavanol ( $A^+-F$ ) kondenzacije.* Reakcija počinje sa nukleofilnim napadom na položaju  $C_6$  ili  $C_8$  flavanola na  $C_4$  položaj antocijana u strukturi flavilijevog kationa pri čemu nastaje bezbojni međuprodukt, flaven. On oksidacijom prelazi u odgovarajući flavilijev kation i na kraju dehidracijom u žutu ksantilijevu sol, ili u bezbojni biciklički produkt (Remy-Tanneau i sur., 2003; Fulcrand i sur., 2006).

*b) Reakcija direktne flavanol-antocijan ( $F-A^+$ ) kondenzacije.* Karbokationi, nastali cijepanjem interflavanske veze, djeluju kao elektrofilni te se vežu na položaju  $C_6$  ili  $C_8$  antocijana u hidratiranoj hemiketalnoj formi, pri čemu nastaje bezbojni dimer koji se može dehidratirati u odgovarajući crveni flavilijev kation ovisno o pH-vrijednosti vina ili o njegovom vlastitom  $pK_h$  (Remy-Tanneau i sur., 2000; Fulcrand i sur., 2006).

*2) Reakcije antocijan-flavanol i antocijan-antocijan kondenzacije u acetaldehidnom mediju*

Acetaldehid je metabolit kvasca, koji je prisutan u vinu kao rezultat alkoholne fermentacije. Dio acetaldehida u vinu nastaje oksidacijom etanola u prisutnosti polifenola, tijekom starenja vina (Atanasova i sur., 2002; Fulcrand i sur., 2006). Prema predloženom mehanizmu, acetaldehid u strukturi karbokationa reagira sa flavanolom (ili taninom) na položaju  $C_6$  ili  $C_8$ . Dehidratacijom flavanol-acetaldehida spoj prelazi u novi karbokation koji reagira sa antocijanom (na položaju  $C_8$ ). Nastali spoj se stabilizira deprotonacijom tvoreći kinonsku bazu ljubičaste boje. U predloženoj strukturi flavanol i antocijan su povezani etilnim mostom. Produkti povezani etilnim mostom obično podliježu polikondenzaciji čime nastaju novi, polimerizirani pigmenti. Kasnije je demonstrirano da je reakcija moguća i na položaju  $C_6$  antocijana (Es-Safi i sur., 1999; Atanasova i sur., 2002).



### 3) Reakcije koje dovode do sinteze piranoantocijana

Postoje četiri tipa reakcije koje karakteriziraju produkti koji njima nastaju. Ti produkti su hidroksifenil-piranoantocijani, flavanil-piranoantocijani, karboksi-piranoantocijani i vinilpiranoantocijanski pigmenti.

U reakcijama kondenzacije antocijan-vinilfenol i antocijan-hidroksicimetne kiseline dolazi do sinteze *hidroksifenil-piranoantocijana*. Hidroksi-piranoantocijani nastaju cikloadicijom etilenskog dijela molekule 4-vinilfenola na položaje C<sub>4</sub> i C<sub>5</sub> antocijana, čime nakon oksidacije nastaje piranski prsten, po čemu su piranoantocijani i dobili ime. U reakcijama hidroksicimetne kiseline i antocijana, nukleofilni C<sub>2</sub> položaj hidroksicimetne kiseline veže se na elektrofilni C<sub>4</sub> položaj antocijana te nastaje pozitivno nabijeni međuspoj, karbenijev ion. Hidroksilna skupina na položaju C<sub>5</sub> antocijana onda može intramolekularno zarobiti karbenijev ion, tvoreći piranski prsten. Konačni produkt nastaje oksidacijom i dekarboksilacijom međuprodukta (Fulcrand i sur., 2006; Schwarz i sur., 2003). Reakcijom kondenzacije antocijan-vinilflavanola nastaje *flavanil-piranoantocijan*. Vinilflavanoli mogu nastati cijepanjem flavanol-etil-flavanol oligomera ili dehidracijom flavanol-etanola. Mehanizam sinteze flavanil-piranoantocijana sličan je mehanizmu sinteze hidroksifenil-piranoantocijana (Mateus i sur., 2003; Moreno-Arribas i Polo, 2009). *Karboksi-piranoantocijani* nastaju reakcijom kondenzacije antocijana i enolizaciji podložnih ketona i aldehida koji su obično sekundarni produkti metabolizma kvasca tijekom fermentacije. Jedan od glavnih prekursora za ovaj tip reakcije kondenzacije je pirogroždana kiselina (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Mehanizam ovog tipa kondenzacije također je sličan mehanizmu sinteze hidroksifenil-piranoantocijana. Prekursori za sintezu *vinilpiranoantocijanskih* pigmenata su karboksi-piranoantocijani, vinilfenoli i vinilflavanoli. Prema predloženom mehanizmu nastanka flavanil-vinilpiranoantocijanskih pigmenata karboksi-piranoantocijan reagira na C<sub>10</sub> položaju sa vinilnom skupinom vinilflavanola. Zadnji korak u sintezi je odcijepljenje karboksilne skupine i oksidacija, čime nastaje plavi pigment (Mateus i sur., 2003).

#### 2.1.2. Neflavonoidi

Neflavonoidi se sastoje od C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> kostura te su strukturno jednostavniji od flavonoida. Neflavonoidni fenolni spojevi dijele se na: hidroksibenzojeve i hidroksicimente kiseline, stilbene te hidrolizirajuće tanine (Waterhouse 2002; Jackson, 2008). Iako nebojani, neflavonoidni spojevi stabiliziraju boju vina te osim toga neki pridonose i okusu vina te pokazuju određenu biološku aktivnost (Moreno-Arribas i Polo, 2009). U vinima koja nisu

dozrijevala u hrastovim bačvama, primarni neflavonoidi su fenolne kiseline. One se dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Slika 6.; Tablica 1.). Nalaze se uglavnom u vakuolama stanica grožđa te se lako ekstrahiraju tijekom gnječenja (Jackson, 2008).



**Slika 6.** Kemijske strukture hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Garrido i Borges, 2013).

**Tablica 1.** Hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline prisutne u vinu (Garrido i Borges, 2013).

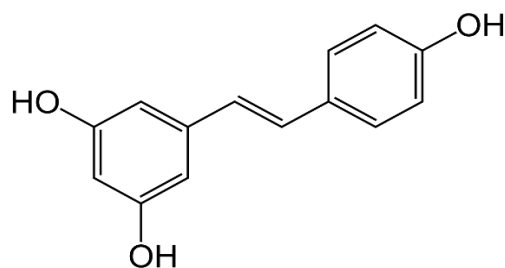
Hidroksibenzojeva kiselina	R	R <sub>1</sub>	Hidroksicimetna kiselina	R	R <sub>1</sub>
Galna	OH	OH	Kafeinska	OH	H
p-hidroksibenzojeva	H	H	p-kumarinska	H	H
Protokatehinska	OH	H	Ferulinska	OCH <sub>3</sub>	H
Siringinska	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Sinapinska	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Vanilinska	OCH <sub>3</sub>	H			

Nekoliko vrsta hidroksibenzojevih kiselina je identificirano kako u grožđu tako i u vinu. Najzastupljenije su galna, p-hidroksibenzojeva, protokatehinska, siringinska te vanilinska (Garrido i Borges, 2013). Među njima najzastupljenija je galna kiselina, dio potječe od grožđa a dio nastaje hidrolizom kondenziranih i nekondenziranih tanina (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Galna kiselina je stabilna tijekom dozrijevanja i starenja vina te je jedna od lako vidljivih fenolnih sastojaka tijekom kromatografske analize starijih crvenih vina. U crvenim vinima prosječno je ima oko 70 mgL<sup>-1</sup> dok je kod bijelih vina prosjek blizu 10 mgL<sup>-1</sup> (Waterhouse, 2002).

Hidroksicimetne kiseline jedne su od najvažnijih fenolnih kiselina koje se nalaze u grožđu i vinu. Kafeinska, p-kumarinska, ferulinska te sinapinska su neke od najvažnijih (Tablica 1.). Udio ovih spojeva varira u grožđu, ali kafeinska kiselina je daleko najdominantnija u vinu s udjelom od oko  $170 \text{ mg kg}^{-1}$  u sortama *V. vinifere* (Waterhouse, 2002). Njezin *o*-difenol ima važnu ulogu u oksidativnom posmeđivanju i polimerizaciji fenola u moštu (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Hidroksicimetne kiseline u vinu su prisutne većinom kao esteri, posebno vinske kiseline dok su u slobodnoj formi prisutne u jako niskim koncentracijama. Osim estera vinske kiseline prisutni su i etil- i dietil-estri te glukozni esteri hidroksicimetnih kiselina (Baderschneider i Winterhalter, 2001; Moreno-Arribasa i Polo, 2009). Kao što je ranije spomenuto hidroksicimete kiseline igraju značajnu ulogu u posmeđivanju vina, osobito bijelog vina. Kad se grožđe gnječi dolazi do oslobađanja enzima polifenoloksidaze, oni su ti koji oksidiraju hidroksicimetne kiseline do kinona. Kinoni će reagirati sa glutationom prisutnim u moštu te formirati bezbojne produkte. Prema tome vina bogata glutationom imaju manji potencijal posmeđivanja (Waterhouse, 2002).

Hidrolizabilni tanini su složeni polifenoli koji se mogu degradirati kroz promjene pH-vrijednosti, kao i enzimatskom ili neenzimatskom hidrolizom na manje fragmente, uglavnom šećere i fenolne kiseline. Sastoje se od estera galne i elaginske kiseline s glukozom ili srodnim šećerima te ih shodno tome dijelimo na galotanine i elagitanine. Poznato je da dozrijevanje vina u drvenim bačvama potiče ekstrakciju niskomolekularnih fenola, osobito elagitanina (Waterhouse, 2002; Garrido i Borges, 2013).

Stilbeni su neflavonoidi koji se pojavljuju u raznim rodovima biljaka, ali se smatra da su vino i grožđe njihovi najvažniji prehrambeni izvori (Buiarelli i sur., 2007). Najzastupljeniji stilben u vinu je resveratrol (Slika 7.). Osim u vinu zastupljen je i u lišću loze te u kožici grožđa, a njegova koncentracija se značajno smanjuje kako grožđe dozrijeva. Biljka ga sintetizira kao odgovor na infekciju *Botrytisom* ili neku drugu gljivičnu infekciju te kao odgovor na nekakav abiotski stres kao na primjer izloženost UV zračenju. Na udio resveratorla u konačnom proizvodu, vinu najviše utječe odluka enologa, odnosno metoda kojom će on proizvesti vino. Dakle ona vina koja duže dozrijevaju imat će veći udio resveratorla, dok će također veći udio imati crvena u odnosu na bijela vina (Garrido i Borges, 2013).



**Slika 7.** Kemijska struktura 3,5,4'-trihidroksistilbena (resveratrola) (Anonymus1, 2017)

## 2.2. DOZRIJEVANJE VINA

Generalno govoreći proces proizvodnje vina se sastoji od uzgoja grožđa, fermentacije, dozrijevanja i punjenja u boce. Sam proces dozrijevanja može se podijeliti u dvije faze. Prva faza dozrijevanja odnosi se na promjene u vinu do kojih dolazi nakon fermentacije, a prije punjenja u boce dok druga faza predstavlja dozrijevanje u samim bocama i često se naziva starenje vina (Tao i sur., 2013). Tijekom alkoholne fermentacije dolazi do formiranja velikog broja aromatičnih spojeva, poput viših alkohola, aldehida, estera, kiselina, ketona i drugih. Ti spojevi su karakteristični za mlada vina i daju im opor miris, oštar okus i potencijalno štetne nuspojave stoga je potrebno provoditi dozrijevanje vina jer njime dolazi do modifikacije gore navedenih spojeva te vino poprima svoj prepoznatljivi miris i zaokruženiije tijelo. Prema tome, kako bi se proizvelo visoko kvalitetno vino dozrijevanje je nezaobilazan dio procesa u proizvodnji vina (Tao i sur., 2013).

Fenolni spojevi su jedni od najznačajnijih sastojaka vina. Jedan od razloga je i to što se nalaze u visokim koncentracijama, ali i zato što su važni spojevi za organoleptiku vinu. Među fenolima antocijani su najznačajniji za boju mladih crvenih vina. Oni su nestabilni i tijekom dozrijevanja oni stupaju u reakcije s drugim fenolnim spojevima, prije svega s flavan-3-olima. Tako nastaju stabilniji spojevi koji stabiliziraju boju vina pošto su uglavnom otporni na gubitak boje uslijed primjene  $\text{SO}_2$  te pružaju bolju stabilnost boje pri pH-vrijednosti vina. Njihov udio i struktura u konačnom proizvodu ne ovisi samo o početnom sastavu vina već i o prisutnosti kvasca i pravilnoj izloženosti kisiku. Također, osim boje, različite fenolne molekule utječu i na gorčinu, trpkost i punoću crvenih vina. Flavanoli su ti koji najviše utječu na ove karakteristike. Tanini u vinu su jako reaktivne molekule. Monomeri i oligomeri tanina su više gorki dok su polimeri ti koji nose osjet trpkosti. Do polimerizacije dolazi tijekom dozrijevanja i u prisutnosti kisika (Tao i sur., 2013).

### 2.2.1. Dozrijevanje vina u drvenim bačvama

Dozrijevanje vina u drvenim bačvama je tradicionalan i najčešći način dozrijevanja. Za proizvodnju drvenih bačvi već preko 2000 godina koristi se drvo hrasta. Glavne vrste hrasta koje se koriste za proizvodnju bačvi su *Quercus alba* iz Sjeverne Amerike te *Quercus robur* i *Quercus sessilis* iz Francuske. Vrsta hrasta te njegovo podrijetlo igraju važnu ulogu. Tako je na primjer kod američkog hrasta veća koncentracija cis-laktona koji je nositelj arome kokosa i drveta, a ujedno i jedan od senzorski najbitnijih spojeva. Zbog toga vina koja su dozrijevala u američkom hrastu imaju veći omjer cis/trans laktona nego li vina koja su dozrijevala u francuskom hrastu. S druge strane francuski hrast ima veću poroznost od američkog i sukladno tome bačve izrađene od francuskog hrasta imaju veću propusnost kisika (Tao i sur., 2013; Crump, 2015). Procijenjeno je da brzina difuzije kisika u novim bačvama od francuskog hrasta između 1,66 i 2,3 mL<sup>-1</sup> na mjesec (Oberholster i sur., 2015). Također zrenje i tostiranje drveta su izuzetno važni. Sušenje i zrenje ne samo da smanjuju vlažnost drveta kako bi se postigla ravnoteža s vlažnošću zraka već dovode i do reduciranja gorčine i trpkosti te povećavaju aromatična svojstva drveta. Tostiranje se primjenjuje prilikom savijanja drveta tijekom sastavljanja bačve te potiče pirolizu lignina, tanina i hemiceluloze. Razlikuju se 3 različita stupnja tostiranja: lagano, srednje i jako. Svaki od načina nosi svoje karakteristike. Tako će na primjer vino dozrijevano u bačvama koje su lagano tostirane biti manje aromatično te će imati visoku koncentraciju tanina. U vinima iz srednje paljenih bačvi dominira će okus vanilije dok će vina iz jako paljenih bačvi imati dimljen i pikantan okus (Tao i sur., 2013). Vina dobivena u bačvama stalno su izložena malim količinama kisika koji polako prolaze kroz pore hrasta. Umjereni unos kisika tijekom starenja može ubrzati i / ili izazvati specifične reakcije određenih fenolnih spojeva koje utječu na senzorska svojstva, između ostalog dolazi i do mekšanja tanina. Kroz reakcije kondenzacije i polimerizacije između tanina i antocijanina dolazi i do poboljšanja stabilnost, okusa i strukture vina, čime vino dobiva stabilniju boju i manji osjet trpkosti. Tijekom dozrijevanja vina u hrastovim bačvama hlapljivi spojevi iz bačve se ekstrahiraju u vinu i daju željene hrastove arome i okuse. Međutim njihova raspoloživost i brzina difuzije u vinu, kao što je već navedeno u velikoj mjeri ovise o vrsti hrasta, uvjetima zrenja hrasta, volumenu i broju uzastopnih primjena bačve te o vremenu kontakta između same bačve i vina. Uz već spomenuti cis-lakton drugi važniji hlapljivi spojevi iz bačve koji mogu doprinijeti aromi vina su furfural (badem), gvajakol (aroma po dimu/zapaljenom), eugenol (začini, klinčić) i vanilin (vanilija). No osim toga, hlapljivi spojevi iz hrasta mogu utjecati na okus vina neizravno kroz fizikalne ili

kemijske interakcije s drugim sastojcima vina, utječući na netopljivost drugih spojeva i raspoloživost kisika (Gambuti i sur., 2012; Crump, 2015).

Iako je dozrijevanje u bačvama najčešći i najcjeljeniji način dozrijevanja vina pokazalo se da ima nekoliko nedostataka. Prije svega treba naglasiti da je starenje u drvenim bačvama dugotrajno. Naime, vino u bačvama može stariti od 3-5 mjeseci pa sve do 3-5 godina, a nekad i više od toga. Iz ekonomskih razloga vinari si često ne mogu dopustiti da im vino toliko dugo stoji u podrumu već ga žele što prije plasirati na tržište. Također, same bačve su izuzetno skupe, zauzimaju previše mjesta u vinariji te se ne smiju koristiti kroz duži period. Što su bačve starije to je veća vjerojatnost da će biti kontaminirane neželjenim mikroorganizmima kao što je *Brettanomyces* (Tao i sur., 2013). *Brettanomyces* može proizvesti visoke koncentracije etilfenola koji je nositelj antiseptičkog mirisa te mirisa po konjskom znoju. Osim toga, što su bačve starije to je i difuzija kisika kroz bačvu sporija pošto je većina pora začepljena naslagama vina. Stoga se ne preporuča koristiti drvene bačve duže od 3 godine. Sukladno svemu navedenom u vinarskoj industriji sve je veći interes za razvoj alternativnih načina dozrijevanja, ali da se ipak zadrže pozitivne karakteristike dozrijevanja u bačvi (Gómez-Plaza i Cano-López, 2011).

#### 2.2.2. Dozrijevanje vina korištenjem fragmenata drveta

Pošto su vina koja su bila u kontaktu s drvetom široko prihvaćena među potrošačima, a samo dozrijevanje u drvenim bačvama za sobom povlači već gore navedene mane, kao što su visoka cijena i dugotrajnost postupka, moralo se pribjeći nekim drugim alternativama. Jedna od njih je dodatak drvenih fragmenata kao što su „čips“ i „štapići“. Dodatak drvenih fragmenta prvo se počeo upotrebljavati u zemljama Novog svijeta dok se u zemljama Europske Unije koristi tek od 2006. godine s tim da se to mora naglasiti na etiketi vina (Tao i sur., 2013; Oberholster i sur., 2015). Drveni fragmenti također mogu ispustiti „drvene“ arome u vino. Ovi aromatski sastojci ovise o vrsti hrasta, geografskom podneblju iz kojeg dolazi, stupanj tostiranja, veličini i količini fragmenata te o vremenu kontakta (Arfelli i sur., 2011). Prilikom upotrebe drvenih fragmenata cijela njihova površina je iskoristiva, odnosno vino može prodrijeti kroz cijelu njihovu površinu za razliku od drvenih bačvi kada je samo 40 % površine u kontaktu sa vinom. Stoga je brzina ekstrakcije spojeva iz drveta brža prilikom upotrebe drvenih fragmenata i samim time može se reducirati vrijeme dozrijevanja. No, valja uzeti u obzir i činjenicu da su istraživanja (Bautista-Ortín i sur., 2008) pokazala da će prilikom korištenja čipsa doći do ubrzanog otpuštanja aromatskih spojeva u vino u prva 3 mjeseca dozrijevanja i da ta koncentracija aromatskih spojeva ostaje ista ili se čak i smanjuje u narednih 6 mjeseci.

Također se pokazalo da i nakon punjenja u boce ima razlike u ponašanju između vina koje je dozrijevalo u bačvi i onog prilikom čijeg dozrijevanja je korišten čips. Sanza i Dominiguez su 2006. u svom istraživanju dokazali da u vinima prilikom čijeg dozrijevanja je upotrebljavan čips dolazi do bržeg gubitka antocijana nakon punjenja u boce. Dakle, korištenjem drvenih fragmenata vrijeme dozrijevanja može biti smanjeno sukladno bržoj ekstrakciji aromatskih spojeva. No stabilizacija boje zahtjeva duže dozrijevanje i prisutnost male koncentracije kisika. A pošto kisik ne može difundirati kroz tankove od nehrđajućeg čelika dopušten je dodatak aditiva karamel E-150 u vino kako bi se riješio taj problem. Druga alternativa je kontrolirano puštanje malih količina kisika prilikom dozrijevanja vina, odnosno mikrooksigenacija (Oberholster i sur., 2015; Tao i sur., 2013).

### 2.2.3. Dozrijevanje vina korištenjem mikrooksigenacije

Mikrooksigenacija je postupak koji podrazumijeva kontinuirano dovođenje malih količina kisika u vino i to kako bi se poboljšala njegova boja, aroma, tekstura i održivost (Arapitsas i sur., 2012). Prilikom provođenja mikrooksigenacije izuzetno je bitno da se kisik uvodi brzinom jednakom ili manjom od brzine kojom ga vino može primiti, kako ne bi došlo do nakupljanja otopljenog kisika, a može se provoditi prije ili nakon jabučno mliječne fermentacije s tim da ju je preporučljivo provoditi prije (Grainger i Tattersall, 2005; Gómez-Plaza i Cano-López, 2011). Najveće prednosti mikrooksigenacije kao procesa dozrijevanja su to što ona pojačava te stabilizira boju crvenih vina, pozitivno utječe na zdravlje kvasaca tijekom fermentacije, poboljšava okus, strukturu i aromu vina, uklanja neželjene reduktivne okuse te ako se primjenjuje zajedno sa drvenim fragmentima može oponašati dozrijevanje vina u drvenim bačvama (Tao i sur, 2013; Anli i Cavuldak, 2013). Analiza koju su proveli Oberholster i suradnici 2015. godine pokazuje da mikrooksigenacija u kombinaciji s alternativama drveta, kao što su čips i štapići, može imitirati kratkotrajno (šest mjeseci) dozrijevanje u novim drvenim bačvama od američkog i francuskog hrasta s obzirom na senzorske karakteristike. Glavni razlog zašto je kisik uopće potreban tijekom dozrijevanje vina je kvasac. Kvasci često mogu prerano odumirati uslijed oksidativnog stresa stanica. Precizno doziranje kisika prilikom dozrijevanja je bitno, jer tada kvasci mogu postati otporniji na etanol te im se povećava fermentacijska aktivnost dok se istovremeno smanjuje proizvodnja sumpornih spojeva, ali i samo vrijeme fermentacije. Nadalje, još jedna od prednosti mikrooksigenacije je i smanjenje reduktivnih i vegetativnih mirisa, a povećanje voćnost i pikantnost arome. Mikrooksigenacija dovodi do oksidacije tiola odgovornih za vegetativne mirise te do promjene sulfida odgovornih za reduktivne mirise smanjujući tako

njihov prag osjeta u vinu. Iako mikrooksidacija ima brojne prednosti, još uvijek postoje i negativni aspekti same primjene. Naime, najveći nedostatak je mogućnost prekomjernog dodatka kisika što može dovesti do pretjerane polimerizacije, suhoće, gubitka boje, smanjenja svježine te nastanka aldehida i oksidativnih aroma. Također oksidacija može dovesti i do rasta aerobnih mikroorganizama, kao što su bakterije octene kiseline i *Brettanomyces*. Iako se *Brettanomyces* može razviti i u anaerobnim uvjetima u prisutnosti kisika njegov rast je značajno brži (Gómez-Plaza i Cano-López, 2011; Arapitsas i sur., 2012)

#### 2.2.4. Dozrijevanje vina na talogu

Tradicionalno talog se koristi tijekom dozrijevanja pjenušavih, bijelih te tijekom biološkog dozrijevanja sherry vina. U novije vrijeme dozrijevanje na kvascima se proširilo i na proizvodnju crvenih vina. U pravilu su talog sastoji od kvasaca te u manjim količinama i od drugih neorganskih sastojaka te vinske kiseline (Fia i sur., 2016). Najčešća kvašćeva kultura koja se koristi za dozrijevanje je *Saccharomyces cerevisiae*, ali u posljednje vrijeme počeli su se koristiti i ne-*Saccharomyces* kvasci među kojima prevladavaju *Sacharomycodes* i *Schizosaccharomyces*. Ovakav način dozrijevanja koristi se skupa s dozrijevanjem u drvenim bačvama ili u neki drugim posudama, kao što su tankovi od betona ili nehrđajućeg čelika. Ali osim toga sve više se radi i na kombiniranju dozrijevanja na kvascima s mikrooksidacijom te fragmentima drveta, ali još uvijek su potrebna detaljnija istraživanja kako bi se razjasnile sve karakteristike takvog načina dozrijevanja vina (Tao i sur., 2013; Fia i sur., 2016). Dozrijevanje na talogu ne samo da može smanjiti gorčinu i trpkost, povećati strukturu, zaokruženost i tijelo vinima već može proizvesti kompleksniju i dugotrajniju aromu. Kod crvenih vina dozrijevanjem na talogu dobije se stabilnija boja (Arfelli i sur., 2011). Tijekom dozrijevanja na talogu dolazi do autolize kvasaca. Stanična stijenka se postupno razgrađuje tijekom vremena te dolazi do otpuštanja sastojaka kao što su polisaharidi, amino kiseline, peptidi, masne kiseline i lipidi. Prema tome kvasci mogu utjecati na promjenu aromatičnih svojstava vina te popraviti konačni „bouquet“ vina. Također prilikom kontakta vina sa talogom dolazi do smanjenja hlapljivih spojeva u vinu, može doći do ublažavanja utjecaja drveta na vino, a uz to vina dozrijevana na talogu u pravilu znaju imati malo manji intenzitet boje. No također prisutnost taloga može dovesti i do nastanka sumpornog mirisa i nekih negativnih hlapljivih spojeva. Stoga, kako bi se to izbjeglo potrebno je tijekom dozrijevanja na talogu povremeno provesti postupak „batonnage“odnosno promiješati sadržaj posude. Osim na aromatski profil, talog utječe i na polifenolni sastav vina. Smatra se da su steroli, prisutni u staničnoj membrani kvasca odgovorni za apsorpciju fenolnih sastojaka i to



prvenstveno međuprodukata reakcije posmeđivanja. Ovo svojstvo dozrijevanja na kvascima bitno je za dozrijevanje bijelih vina jer se tako sprječava njihovo posmeđivanje bez promjene senzorskih svojstava. Kod crvenih vina kvasci mogu apsorbirati kondenzirane tanine i antocijane (Tao i sur., 2013).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Opis uzorak

Svi uzorci vina dobiveni su iz vinarije Klet Brda, Slovenija. Uzorke čine 3 sorte crvenog vina i to Cabernet sauvignon, Pinot crni te Merlot. Karakteristike svakog uzorka prikazane su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Opis uzoraka

Broj uzorka	Sorta	Godina berbe	Vrijeme maceracije/ dani	Vrijeme dozrijevanja/mjeseci	Uvjeti dozrijevanja
1	Cabernet sauvignon	2015	5	12	Bačva od američkog hrasta
2	Cabernet sauvignon	2015	5	12	Bačva od francuskog hrasta
3	Cabernet sauvignon	2015	7	12	Bačva od slavonskog hrasta
4	Cabernet sauvignon	2016	5	6	Betonska posuda
5	Cabernet sauvignon	2016	4	6	Inox posuda
6	Pinot crni	2016	4	6	Francuski barrique
7	Pinot crni	2016	4	6	Inox posuda
8	Merlot	2016	4	6	inox posuda

## 3.2. METODE

### 3.2.1. FTIR analiza

Fourier transform IR spektroskopija korištena je u svrhu određivanja osnovnih kemijskih parametara vina kao što su: relativna gustoća, alkoholna jakost, ukupni suhi ekstrakt, reducirajući šećeri, šećerni ekstrakti, ukupne kiseline, hlapljive kiseline, jabučna kiselina, mliječna kiselina, vinska kiselina, glicerol, otopljeni CO<sub>2</sub>, suma glukoze i fruktoze. Analiza je provedena na Bacchus 3 uređaju na Zavodu za poljoprivredu i šumarstvo u Novoj Gorici, Slovenija.



**Slika 8.** Bacchus 3 uređaj (Annonymus 2, 2017)

### 3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

#### **Princip metode:**

Ukupni fenoli određeni su preko redukcije fosfomolibdenske i fosfomolibdenske kiseline (Folin-Ciocalteu reagens) do plavog obojenja od strane fenola u alkalnoj otopini (Di Stefano i Guidoni, 1989). Pomoću spektrofotometra mjere se apsorbancije, a dobivene vrijednosti uvrste se u slijedeće jednadžbe

$$\text{(+)katehini (mgL}^{-1}\text{)} = (186,5 \times A \times d) / V \quad [1]$$

$$\text{galna kiselina (mgL}^{-1}\text{)} = (196,8 \times A \times d) / V \quad [2]$$

#### **Aparatura i kemikalije:**

- spektrofotometar
- odmjerne tikvice od 20 mL
- automatske pipete
- Sep-Pak kolone

- plastične kivete od 10 mm
- 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- metanol
- filter – 0,45 μm
- 10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bezvodni

### **Priprema kemikalija:**

#### 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

28 mL 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> otopi se u 1 L deionizirane vode

#### 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Od već pripremljene 1N otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> odpipetira se 10 mL te razrijedi u odmjernoj tikvici od 1L sa deioniziranom vodom.

#### 10% bezvodni Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

5g bezvodnog Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> otopi se u 500 mL deionizirane vode

### **Opis rada:**

Uzorci se najprije razrijede 20 puta tako što se u tikvicu od 20 mL doda 1 mL uzorka te se do oznake dopuni sa 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Zatim je potrebno aktivirati Sep-Pak C18 kolonu. Ona se aktivira tako da se kroz nju propusti 2 mL metanola, a potom 5 mL 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Na kolonu se nanese točno 1 mL razrijeđenog uzorka a odmah nakon toga kroz nju se propusti i 2 mL 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Fenolne komponente eluiraju se u odmjernu tikvicu od 20 mL pomoću 2 mL metanola te 5 mL deionizirane vode. Najprije je potrebno pripremiti slijepu probu. To se radi tako da se u odmjernu tikvicu od 20 mL doda 2 mL metanola, 5 mL deionizirane vode, 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa te potom i 4 mL 10% bezvodnog Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Do konačnog volumena tikvica se dopuni vodom. U tikvice sa uzorcima u kojima se već nalazi 2 mL eluata te 5 mL deionizirane vode doda se još 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa te zatim i 4 mL 10% bezvodnog Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Do konačnog volumena tikvice je također potrebno dopuniti deioniziranom vodom. Nakon 90 minuta uzorci se profiltriraju kroz filter (0,45 μm) te im se mjeri apsorbancija u 10 mm plastičnoj kivetu pri valnoj duljini od 700 nm (Rigo i sur., 2000).

### 3.2.3. Određivanje niskomolekularnih tanina

#### **Princip metode:**

Niskomolekularni tanini određeni su pomoću vanilin-HCl metode koju su postavili Broadhurst i Jones (1978) a koja je optimizirana od strane Di Stefano i suradnika (1989a). Koncentracija niskomolekularnih tanina računa se preko slijedeće formule:

$$(+)\text{-katehin (mgL}^{-1}\text{)} = A \times 290,8 \times d$$

[3]

#### **Aparatura i kemikalije:**

- spektrofotometar
- odmjerne tikvice od 20 mL
- automatske pipete
- epruvete
- Erlenmeyerove tikvice od 50 mL
- termostatska kupelj
- Sep-Pak kolone
- plastične kivete od 10 mm
- 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- metanol
- 4% vanilin
- 37% HCl

#### **Priprema kemikalija:**

##### 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

U tikvicu od 1 L doda se 28 mL 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> te se tikvica do oznake dopuni vodom

##### 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Od već pripremljene 1 N otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> odpipetiramo 10 mL te razrijedimo u odmjernoj tikvici od 1 L tako što deioniziranu vodu dopunimo do oznake.

##### 4% vanilin

4 g vanilina otopi se u 100 mL metanola.

**Opis rada:**

Uzorci se razrijede 4 puta pomoću 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Aktivirama se Sep-Pak kolona kao i do sada te se na nju nanese 2 mL uzorka koji se potom ispere sa 2 mL 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Flavanolni se potom eluiraju u epruvetu pomoću 5 mL metanola. Epruvete se prethodno oblože aluminijskom folijom. Slijepa proba se pripremi tako da se u doda 1 mL eluata te 6 mL čistog metanola. Za pripremu uzoraka potrebno je u Erlenmeyerove tikvice od 50 mL dodati 1 mL eluata te 6 mL 4% vanilina. Prethodno je Erlenmeyerove tikvice također potrebno obložiti aluminijskom folijom kako bi se uzorke zaštitilo od svjetlosti. Nakon što su pripremljene sve slijepa probe i svi uzorci stave se u termostatiranu vodenu kupelj na temperaturu od 20 °C. Zatim u sve Erlenmeyerove tikvice u razmaku od 1 minute dodaje se po 3 mL 37% HCl. Nakon što se doda HCl započinje reakcija. Nakon točno 15 minuta od trenutka kada je dodana klorovodična kiselina mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 500 nm (Rigo i sur., 2000).

**3.2.4. Određivanje visokomolekularnih tanina****Princip metode:**

Proantocijanidni se određuju tako da se prati njihova pretvorba u cijanidine (Di Stefano i sur.,1989). Spektrofotometar mjeri valnu duljinu između 380 i 700 nm. Slijepa proba je destilirana voda. Paralelno se pripremaju po 2 otopine za svaki uzorak, jedna se kuha, a druga hladi kako bi se dobila neto vrijednost apsorbancije (Rigo i sur., 2000). Visokomolekularni tanini se izražavaju kao mgL<sup>-1</sup> cijanidina prema slijedećoj formuli:

$$\text{mgL}^{-1} \text{ cijanidina} = \frac{(A_t - A_h) \times 1162,5 \times d}{V}$$

[4]

**Aparatura i kemikalije:**

- spektrofotometar
- odmjerne tikvice od 20 mL
- automatske pipete
- epruvete
- Erlenmeyerove tikvice od 50 mL
- termostatirana vodena kupelj

- kuhalo
- Sep-Pak kolone
- plastične kivete od 10 mm
- 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- metanol
- etanol 96% (vol)
- otopina FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O u 37% HCl

### **Priprema kemikalija:**

#### 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

100 mL 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> razrijedimo u tikvici od 1 L sa destiliranom vodom.

#### 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Od već pripremljene 1 N otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> odpipetiramo 10 mL te razrijedimo u odmjerne tikvici od 1 L tako što deioniziranu vodu dopunimo do oznake.

#### FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O u HCl

Pripremi se otopina FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O u 37% HCl tako da konačna koncentracija iznosi 300mgL<sup>-1</sup>.

### **Opis rada:**

Uzorci se razrijede 10 puta pomoću 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Zatim slijedi aktivacija Sep-Pak kolone kao što je prethodno objašnjeno. Potom se na aktiviranu kolonu nanosi 2 mL uzorka koji se zatim ispere sa 2 mL 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Proantocijanidini se potom eluiraju iz kolone u prethodno aluminijskom folijom obložene Erlenmeyerove tikvice od 50 mL pomoću 3 mL etanola. Paralelno se pripreme uzorci za vruću i hladnu reakciju. U Erlenmeyerove tikvice u kojima se već nalazi eluat doda se još 9,5 mL etanola 96% (vol) te potom 12,5 mL otopine FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O u HCl. Svi uzorci „A“ postavljaju se na kuhalo i refluksiraju ih se 50 minuta, zatim ih se još 10 minuta drži u termostatom vodenoj kupelji na 20 °C. Potom se mjeri apsorbancija. Hladna reakcija se postavlja tako da se svi uzorci „B“ drže u ledu 50 minuta a potom jednako kao i kod vruće reakcije još 10 minuta u termostatskoj kupelji. Po isteku vremena mjeri se apsorbancija.

### 3.2.5. Određivanje ukupnih antocijana

#### **Princip metode:**

Ukupni antocijani određeni su spektrofotometrijski prema Di Stefano i suradnici metodi. Uzorak se provuče kroz prethodno aktiviranu Sep-Pak kolonu te se doda mala količina koncentrirane HCl a potom se do konačnog volumena doda smjesa etanola, vode i HCl u omjeru 70:30:10. Ukupni antocijani izravno su kvantificirani na osnovu maksimalne apsorpcije u vidljivom rasponu (536-540 nm) u odnosu na slijepu probu koji čini smjesa etanol/voda/HCl u omjeru 70:30:1 (Rigo i sur., 2000).

$$\text{Antocijani (mgL}^{-1}\text{)} = A \times d \times 26,6 \times 4$$

[5]

#### **Aparatura i kemikalije:**

- spektrofotometar
- odmjerne tikvice od 20 mm
- automatske pipete
- Sep-pak kolone
- plastične kivete od 10 mm
- 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH: H<sub>2</sub>O: HCl= 70:30:1
- Metanol

#### **Priprema otopina:**

##### 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

U tikvicu od 1 L doda se 28 mL 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> te se tikvica do oznake dopuni vodom

##### 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Od već pripremljene 1 N otopine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> odpipetiramo 10 mL te razrijedimo u odmjerne tikvici od 1 L tako što deioniziranu vodu dopunimo do oznake.



C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH: H<sub>2</sub>O: HCl= 70:30:1

U tikvicu od 1 L pomiješa se 700 mL apsolutnog etanola, 300 mL deionizirane vode te 10 mL 37% HCl.

### **Opis rada:**

Uzorci se razrijede (10×) pomoću 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Zatim se aktivira Sep-Pak kolona tako da se kroz nju propusti 2 mL metanola te 5 mL 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Na aktiviranu kolonu nanese se 5 mL uzorka te ga se ispere sa 2 mL 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Crveni pigment koji je zaostao u koloni eluira se u odmjernu tikvicu od 20 mL pomoću 3 mL metanola te se potom u tikvicu doda 2-3 kapi 37% HCl. Do konačnog volumena tikvica se dopuni sa smjesom etanola, vode i 37% HCl u omjeru 70:30:1. Odmah potom se mjeri apsorbanacija. Slijepu probu predstavlja C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH: H<sub>2</sub>O: HCl= 70:30:1 (Rigo i sur., 2000).

### 3.2.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti vina

#### **Princip metode:**

DPPH metoda koristi se za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Poznato je da DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil radikal) reagira sa različitim antioksidansima pri različitim molarnim omjerima (Brand-Williams i sur., 1995). Molarni omjer DPPH•/antioksidans može se jednostavno odrediti mjerenjem preostalih DPPH• u otopinama u koje su dodane poznate koncentracije antioksidansa i zatim oduzimanjem tih apsorbanacija od kontrolne otopine gdje je prisutan samo DPPH• (Košmerl i Cigić, 2008).

$$C_{DPPH} = \frac{A_{DPPH} - A_{DPPH + antioksidans}}{12000L(mol^{-1}cm^{-1}) \times 1 cm}$$

[5]

#### **Aparatura i kemikalije:**

- spektrofotometar
- tehnička vaga
- epice
- štoperica
- automatske pipete
- plastične kivete od 1 mm
- metanol
- otopina DPPH

### **Priprema kemikalija:**

#### Otopina DPPH

Rastopi se 4 mg DPPH u 20 mL metanola

### **Opis rada:**

Uzorci se razrijede  $15 \times$  sa metanolom. Pripremi se paralelno uzorke, referentne otopine te slijepu probu. Uzorci se pripreme tako da se u epicu doda 50  $\mu$ L uzorka te 1,5 mL standardne otopine DPPH. Referentne otopine pripreme se tako da se doda 50  $\mu$ L metanola te 1,5 mL standardne otopine DPPH dok slijepu probu predstavlja 50  $\mu$ L uzorka te 1,5 mL metanola. Pripremljeni uzorci se dobro promiješaju te im se nakon točno 30 minuta mjeri apsorbancija pri 517 nm. Izračuna se razlika između apsorbancija referentne otopine i uzorka koja je proporcionalna antioksidacijskom potencijalu vina. Što je apsorbancija manja to je antioksidativni potencijal vina veći. Na kraju se antioksidativna aktivnost izrazi kao koncentracija reduciranog DPPH• u  $\text{mgL}^{-1}$ . Prilikom izračuna bitno je voditi računa o razrijeđenju ( $15\times$ ).

#### 3.2.7. Određivanje intenziteta boje

### **Princip metode:**

Intenzitet boje određuje se sprektrofotometrijskom metodom tako što se uzorak razrijedi sa puferom (pH- vrijednost 3,5) te se mjeri apsorbancija pri 420 i 520 nm, a kao slijepa proba koristi se destilirana voda. Intenzitet boje predstavlja zbroj apsorbancije svjetlosti pri valnoj duljini od 420 nm, koja predstavlja sadržaj crvene boje te pri valnoj duljini od 520 nm koja predstavlja sadržaj žute i smeđe boje u vinu (Iland i sur., 2000).

$$\text{Intenzitet boje} = A_{420} + A_{520}$$

[6]

### **Aparatura i kemikalije:**

- spektrofotometar
- pH metar
- kvarcna kiveta od 10 mm
- epruvete
- automatske pipete
- kapaljke
- pufer, pH- vrijednost 3,5

**Opis rada:**

Uzorci vina razrijede se s puferom (pH-vrijednost 3,5), dobro promiješaju i prenesu u kvarcnu kivetu od 10 mm. Mjeri se optička gustoća pri valnim duljinama od 420 nm i 520 nm. Konačni rezultat dobije se tako da se dobivene vrijednosti zbroje i pomnože s faktorom razrjeđenja.

## 3.2.8. Određivanje nijanse boje

**Princip metode:**

Princip metode je identičan kao i kod određivanja intenziteta boje. Za izračun se koristi slijedeća formula:

$$\text{Nijansa boje} = A_{420} / A_{520}$$

[7]

**Aparatura i kemikalije:**

- spektrofotometar
- pH metar
- kvarcna kiveta od 10 mm
- epruvete
- automatske pipete
- kapaljke
- pufer, pH-vrijednost 3,5

**Opis rada:**

Princip rada je isti kao i pri određivanju intenziteta boje.

3.2.9. Određivanje udjela boje otporne na SO<sub>2</sub>**Princip metode:**

Uzorku vina doda se sumporov dioksid (SO<sub>2</sub>) te se mjeri apsorbancija pri 520nm. Tako se dobije koncentracija crvenih pigmenata koji su otporni na gubitak boje nakon dodavanja sumpornog dioksida (Iland i sur, 2000).

sadržaj boje otporne na SO<sub>2</sub> (a.u.):  $A_{520}^{SO_2}$

[8]

**Aparatura i kemikalije:**

- spektrofotometar
- pH metar
- kvarcna kiveta od 10 mm
- epruvete
- automatske pipete
- kapaljke
- 25 % (w/v) otopina  $K_2S_2O_5$

**Priprema otopina:**25% (w/v) otopina  $K_2S_2O_5$ 

U tikvicu od 100 mL doda se 25 mL kalijevog metabisulfida i do oznake dopuni deioniziranom vodom.

**Opis rada:**

U epruvetu se odpipetira 10 mL razrijeđenog vina te se doda 150  $\mu$ L 25% (w/v) otopine  $K_2S_2O_5$ , dobro promiješa, prelije u kvarcnu kivetu od 10 mm te se mjeri apsorbancija pri 420 i 520 nm. Slijepa proba je voda.

3.2.10. Određivanje intenziteta i nijanse boje bez učinka  $SO_2$ **Princip metode:**

Dodatak viška  $CH_3CHO$  te potom mjerenje apsorbancije pri 520 nm daje nam informaciju o koncentraciji crvenih pigmenata u vinu pri prirodnim pH- vrijednostima vina, ali lišenih bilo kakvih učinaka  $SO_2$ .

$$\text{Modificirani intenzitet boje} = A_{520}^{CH_3CHO} + A_{420}^{CH_3CHO} \quad [9]$$

$$\text{Modificirana nijansa boje} = \frac{A_{420}^{CH_3CHO}}{A_{520}^{CH_3CHO}} \quad [10]$$

**Aparatura i kemikalije:**

- spektrofotometar
- kvarcna kiveta od 10 mm
- epruvete
- automatske pipete
- kapaljke
- 10% (w/v) otopina CH<sub>3</sub>CHO

**Priprema otopina:**10% (w/v) otopina CH<sub>3</sub>CHO

U tikvicu od 100 mL otpipetira se 10 mL acetaldehida (CH<sub>3</sub>CHO) te se potom tikvica do oznake dopuni deioniziranom vodom

**Opis rada:**

U epruvetu se otpipetira 10 mL prethodno razrijeđenog vina te se doda 100 μL 10% (w/v) otopina CH<sub>3</sub>CHO, dobro se promiješa te se nakon 45 minuta mjeri apsorbancija pri 420 i 520 nm u kvarcnoj kivetu od 10 mm.

## 3.2.11. Određivanje udjela (%) crvene boje pri različitim valnim duljinama

**Princip rada:**

Princip metode je jednak kao i pri određivanju intenziteta boje, ali još se mjeri i apsorbancija pri 620 nm.

Udio (%) crvene boje pri zasebnim valnim duljinama:

$$\text{pri 420 nm: } dA_{420} (\%) = \left( \frac{A_{420}}{I} \right) \times 100 \quad [11]$$

$$\text{pri 520 nm: } dA_{520} (\%) = \left( \frac{A_{520}}{I} \right) \times 100 \quad [12]$$

$$\text{pri 620 nm: } dA_{620} (\%) = \left( \frac{A_{620}}{I} \right) \times 100 \quad [13]$$

$$\text{Intenzitet boje } I = \sum ( A_{420} + A_{520} + A_{620} ) \quad [14]$$

**Aparatura i kemikalije:**

- spektrofotometar
- pH metar
- kvarcna kiveta od 10 mm
- epruvete
- automatske pipete
- kapaljke
- pufer, pH- vrijednosti 3,5

**Opis rada:**

Princip rada isti je kao kod određivanja intenziteta boje, ali ovaj put se mjere apsorbancije pri 420, 520 te 620 nm. Dobivene vrijednosti predstavljaju udio crvenog pigmenta pri svakoj valnoj duljini zasebno.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti kako će dozrijevanje vina u različitim vinskim posudama utjecati na njegov polifenolni sastav. Prilikom izrade rada korišteno je 8 uzoraka crvenih vina, 3 različitih sorti, Cabernet sauvignon, Pinot crni te Merlot. Uzorci se međusobno razlikuju u godini berbe, dužini maceracije te posudi u kojoj su dozrijevali, a detaljnije su opisani u Tablici 2.

Od polifenolnog sastava određivani su ukupni fenoli (Slika 9.), niskomolekularni (Slika 10.) i visokomolekularni tanini (Slika 11.) te ukupni antocijani (Slika 12.). Uz to određivan je antioksidacijski potencijal (Slika 13.) uzoraka te karakteristike boje kao što su intenzitet boje (Slika 14.), nijasna boje (Slika 15.) te udio crvene boje pri različitim valnim duljinama (Slika 16.).

#### 4.1. REZULTATI FTIR ANALIZE

Tablica 3. Rezultati FTIR analize

Br. uzorka	1	2	3	4	5	6	7	8
relativna gustoća (/)	0,9966	0,9947	0,9952	0,9956	0,9947	0,9929	0,9929	0,9938
alkoholna jakost (vol%)	11,93	14,64	13,76	12,53	12,41	13,43	13,35	12,88
ukupni suhi ekstrakt (gL <sup>-1</sup> )	30,90	32,44	31,98	30,67	28,08	26,90	26,55	27,12
reducirajući šećeri (gL <sup>-1</sup> )	1,94	2,24	2,06	1,54	1,31	3,44	3,16	1,43
šećerni ekstrakt (gL <sup>-1</sup> )	28,96	30,20	29,38	29,13	26,77	23,46	23,39	25,69
glukoza+fruktoza (gL <sup>-1</sup> )	0,87	1,12	1,42	0,54	0,35	2,12	1,88	0,45
glicerol (gL <sup>-1</sup> )	7,05	9,77	8,80	7,21	7,06	6,63	6,79	7,41
pH-vrijednost (/)	3,74	3,81	3,79	3,73	3,65	3,63	3,61	3,66
ukupne kiseline (gL <sup>-1</sup> )	5,45	4,48	4,74	5,40	5,83	4,51	4,95	5,09
hlapljive kiseline (gL <sup>-1</sup> )	0,69	0,58	0,61	0,51	1,37	0,79	1,24	1,01
mliječna kiselina (gL <sup>-1</sup> )	1,43	1,19	1,15	1,25	1,14	1,50	1,41	0,76
jabučna kiselina (gL <sup>-1</sup> )	0,31	0,00	0,00	0,35	0,33	0,00	0,17	0,16
vinska kiselina (gL <sup>-1</sup> )	1,95	1,86	1,82	1,96	1,90	1,77	1,75	1,86
limunska kiselina (gL <sup>-1</sup> )	0,18	0,26	0,22	0,21	0,08	0,21	0,12	0,16
otopljeni CO <sub>2</sub> (mgL <sup>-1</sup> )	407	406	410	610	511	553	561	605

Legenda: Uzorak 1: Cabernet sauvignon (2015) - američki hrast; Uzorak 2: Cabernet sauvignon (2015)- francuski hrast; Uzorak 3: Cabernet sauvignon (2015)- slavonski hrast; Uzorak 4: Cabernet sauvignon (2016)- betonska posuda; Uzorak 5: Cabernet sauvignon (2016)- inox posuda; Uzorak 6: Pinot crni (2016)- francuski hrast; Uzorak 7: Pinot crni (2016)- inox posuda; Uzorak 8: Merlot (2016)- inox posuda

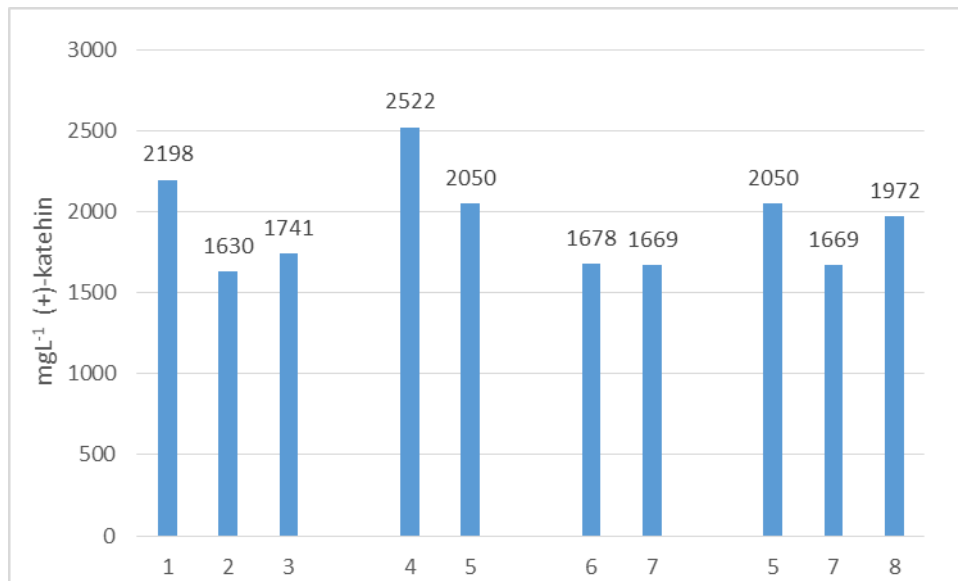


Rezultati FTIR analize prikazani su u Tablici 3. Iz prikazanih rezultata vidi se da su svi osnovni sastojci uzoraka u skladu sa zahtjevima pravilnika (Pravilnik o vinu, 1996). Iako određivanje pojedinih kiselina, nije Pravilnikom propisano, njihove količine prisutne su u standardnim vrijednostima (Ribéreau-Gayon, 2006). Jedino odstupanje je vidljivo kod vrijednosti za hlapljivu kiselost, u uzorcima 5 i 8 u kojima vrijednosti za hlapljivu kiselost prelaze dopušteni limit od  $1\text{gL}^{-1}$  i iznose 1,37 odnosno  $1,01\text{gL}^{-1}$ .

## **4.2. REZULTATI I RASPRAVA ODREĐIVANJA UKUPNIH POLIFENOLA, NISKOMOLEKULARNIH I VISOKOMOLEKULARNIH TANINA, UKUPNIH ANTOCIJANA TE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VINA**

### 4.2.1. Masena koncentracija ukupnih fenola

Fenolni spojevi igraju važnu ulogu u senzorskim karakteristikama i grožđa i vina jer su važni za njihov karakter i kvalitetu, posebno za boju crvenih vina te općenito utječu na miris vina i njegov okus (Jackson, 2008; Garrido i Borges, 2013). Udio ukupnih fenola u vinu manji je nego u grožđu iz razloga što tijekom proizvodnje vina klasične metode ruljanja, muljanja i fermentacije obično ne pogoduju stupnju ekstrakcije većem od 60% (Horesy, 2007). Kao što je u teorijskom dijelu ovog rada već i navedeno na fenolni sastav vina utječu mnogi čimbenici kao što su sorta i stupanj zrelosti grožđa, okolišni uvjeti u vinogradu, godina berbe, korištena tehnologija proizvodnje te uvjeti fermentacije i dozrijevanja (Mazza i sur., 1999.) Pravilnikom o vinu iz 1996. godine dopušteni udio ukupnih fenola u crvenom vinu je do  $5500\text{mgL}^{-1}$  (kao ekvivalent galne kiseline), a analizom je utvrđeno da svi uzorci zadovoljavaju ovaj kriterij.



Legenda: Uzorak 1: Cabernet sauvignon (2015) - američki hrast; Uzorak 2: Cabernet sauvignon (2015)- francuski hrast; Uzorak 3: Cabernet sauvignon (2015)- slavonski hrast; Uzorak 4: Cabernet sauvignon (2016)- betonska posuda; Uzorak 5: Cabernet sauvignon (2016)- inox posuda; Uzorak 6: Pinot crni (2016)- francuski hrast; Uzorak 7: Pinot crni (2016)- inox posuda; Uzorak 8: Merlot (2016)- inox posuda

**Slika 9.** Masena koncentracija ukupnih fenola izražena kao mgL<sup>-1</sup>(+) katehina

Uzorci 1, 2 i 3 predstavljaju sortu Cabernet sauvignon, berba 2015. godina, s tim da je svaki od uzoraka dozrijeva u drvenoj bačvi od različite vrste hrasta. Uzorak 1 dozrijeva u bačvi od američkog, Uzorak 2 od francuskog dok je Uzorak 3 dozrijeva u bačvi od slavonskog hrasta. Svi uzorci dozrijevali su 12 mjeseci u navedenim bačvama. Iz dobivenih rezultata (Slika 9.) vidljivo je da je najviše polifenola prisutno u vinu koje je dozrijevalo u američkom hrastu (Uzorak 1.). To je u suglasju sa istraživanjem kojeg su 2003. godine proveli Fernández de Simon i suradnici. Oni su međusobno uspoređivali dozrijevanje crvenog vina u američkom, francuskom i španjolskom hrastu. Njihovo istraživanje je pokazalo da je nakon 12 mjeseci dozrijevanja najviše fenola ostalo sačuvano u vinu koje je dozrijevalo u američkom hrastu, s tim da je daljnje istraživanje pokazalo kako nakon 21 mjesec dozrijevanja više nisu vidljive značajne razlike u koncentracijama ukupnih fenola između različitih uzoraka. Također je bitno uočiti kako su dozrijevanje u francuskom i slavonskom hrastu daje jako slične rezultate što upućuje na to kako su europske vrste hrasta međusobno sličnije nego li u usporedbi sa američkim hrastom (Fernández de Simon i sur., 2003). U usporedbi s drvetom europskih vrsta, američko hrastovo drvo karakterizira niži ukupni sadržaj elagitanina kao i visoka razina cis-laktona, što je još jedna bitna značajka koja se koristi za razlikovanje američkog od europskog hrasta (Prida i Puech, 2006).

Uzorci 4 i 5 su također vina proizvedena od sorte Cabernet sauvignon s tim da su oni iz berbe 2016. Uzorak 4 odležavao je 6 mjeseci u betonskoj posudi, dok je Uzorak 5 jednak period

držan u tanku od inoxa. Betonske posude postale su vrlo popularne među proizvođačima početkom dvadesetog stoljeća i mnogi ih još uvijek smatraju izvrsnim fermentacijskim posudama, no novijih znanstvenih istraživanja koja proučavaju utjecaj betonske posude na samo vino nažalost nema. Betonske posude moraju biti obložene, jer kiseline u vinu nagrize materijal. U pravilu se za oblaganje koristi epoksidna smola koja se lako čisti, a i spremnici se mogu ponovno obložiti kada je to potrebno. Prije su se uglavnom koristile glazirane pločice, ali su one sklone oštećenju, i to je predstavljalo ozbiljan problem za kvalitetu vina (Puech, 1987; Grainger i Tattersall, 2005). Prema dobivenim podacima u vinu čuvanom u betonskoj bačvi (Uzorak 4) prisutno je više ukupnih fenola i to  $2522 \text{ mgL}^{-1}$ , dok je u vinu iz inoxa (Uzorak 5) prisutno  $2050 \text{ mgL}^{-1}$ . U drugoj polovici 20. stoljeća betonske posude su se polagano, prvo u Francuskoj pa potom i u cijelom svijetu zamijenile sa posudama od nehrđajućeg čelika, odnosno inox tankovima. Njihova velika prednost je jednostavnost čišćenja te mogućnost ugradnje rashladnog sustava (Grainger i Tattersall, 2005).

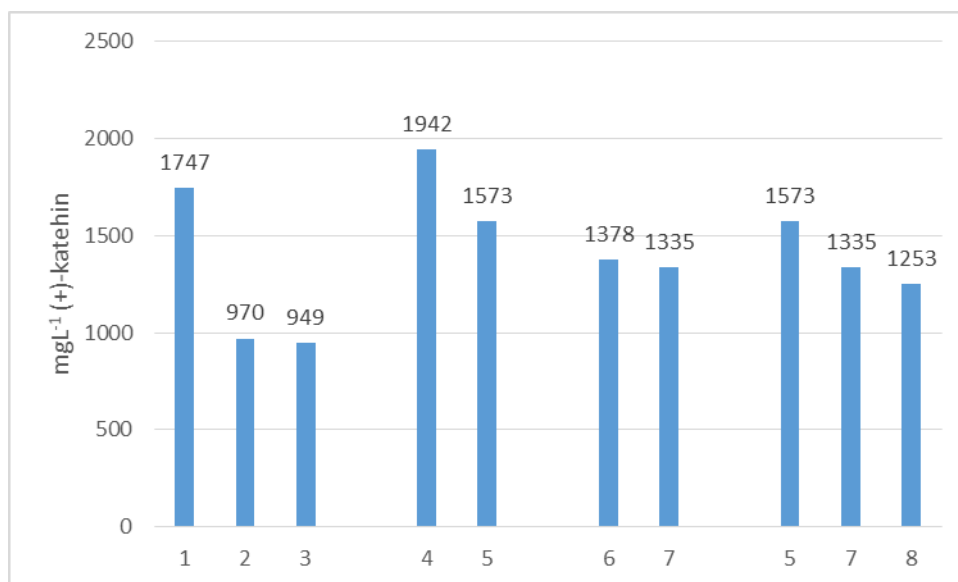
Uzorci 6 i 7 su vina proizvedena od sorte Pinot crni. Oba uzorka su prošla jednake uvjete proizvodnje s tim da je njihova međusobna razlika također u načinu dozrijevanja. Uzorak 6 dozrijevao je u hrastovoj bačvi, dok je Uzorak 7 dozrijevao u inox tanku jednak period. Prema dobivenim rezultatima nema bitne razlike u sadržaju ukupnih fenola između ta dva uzorka, iako je zabilježen nešto veći sadržaj u vinu iz drvene bačve. Ovi rezultati su u suglasju sa rezultatima koje su dobili Ibern-Gómez i sur. (2000), gdje je količina ukupnih fenola u drvenoj bačvi bila značajno veća nego u inoxu. S druge strane oni su također dokazali da je udio niskomolekularnih fenola veći kod vina koje je fermentiralo u hrastovoj bačvi. Prema rezultatima u ovom radu, razlika nije značajno velika, ali je vidljiva (Slika 10.).

Prilikom usporedbe uzoraka 5, 7 i 8 karakteristika po kojoj su se ti uzorci razlikovali je sama sorta. Uzorak 5 je Cabernet sauvignon, Uzorak 7 Pinot crni dok je Uzorak 8 Merlot. Svi uzorci su berba 2016., svi su macerirani 4 dana te su odležavali u inox posudama jednak period. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je koncentracija ukupnih fenola najmanja kod sorte Pinot crni ( $1669 \text{ mgL}^{-1}$ ). U usporedbi s vinima Cabernet sauvignon i Merlot prvi je nešto bogatiji ukupnim fenolima i sadrži  $2050 \text{ mgL}^{-1}$ , dok sadržaj ukupnih fenola u sorti Merlot, iznosi  $1972 \text{ mgL}^{-1}$ . Ti rezultati su u skladu sa literaturnim navodima jer u usporedbi s ostalim crvenim sortama *Vitis vinifera* cv. Pinot crni ima nizak omjer fenola kožice i sjemena, što utječe na konačni fenolni profil (Lee, 2010 ; Sparrow i sur; 2015).

#### 4.2.2. Masena koncentracija nisko i visoko molekularnih tanina

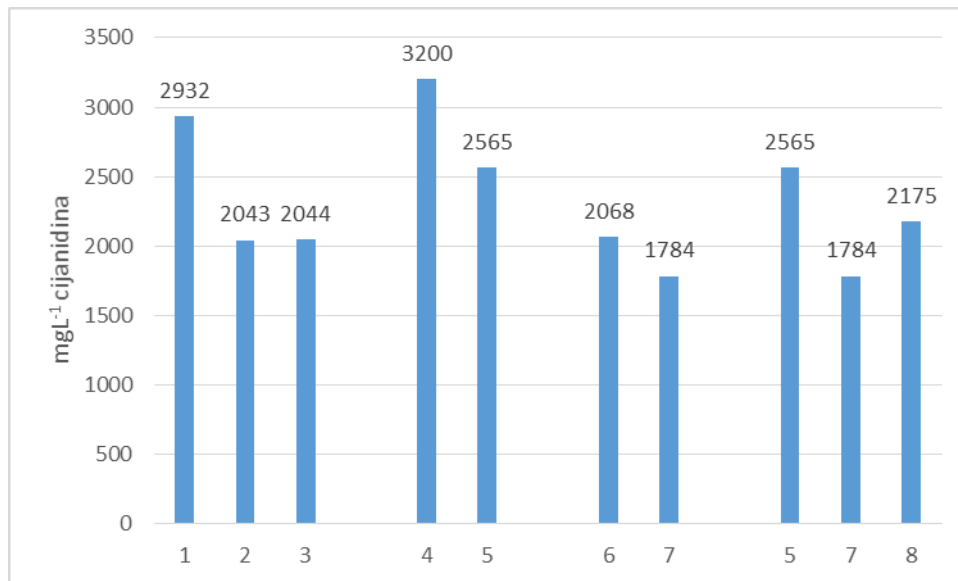
Nisko molekularni fenoli (benzojeve i cimetne kiseline te aldehidi) su u vinu prisutni u jako malim količinama ali igraju značajnu ulogu u određivanju njihovih senzorskih svojstava. Prema nekim istraživanjima oni mogu pridonijeti, posebice cimetne kiseline, gorčini i oštrini vina (Brouillard i Dangle, 1994; Del Alamo Sanza i sur., 2004).

Proantocijanidini (ili kondenzirani tanini) grožđa su polimerne strukture sastavljene od flavan-3-ol podjedinica: katehin, epikatehin, epikatehin-3-galat, epigalokatehin i galokatehin. Mnogi čimbenici utječu na akumulaciju i koncentraciju flavonoida u grožđu i vinu, među kojima su najvažnije sorta grožđa te klimatske varijable kao što su temperatura i svjetlost (Downey i sur., 2006; Kemp i sur., 2011).



Legenda: Uzorak 1: Cabernet sauvignon (2015)- američki hrast; Uzorak 2: Cabernet sauvignon (2015)- francuski hrast; Uzorak 3: Cabernet sauvignon (2015)- slavonski hrast; Uzorak 4: Cabernet sauvignon (2016)- betonska posuda; Uzorak 5: Cabernet sauvignon (2016)- inox posuda; Uzorak 6: Pinot crni (2016)- francuski hrast; Uzorak 7: Pinot crni (2016)- inox posuda; Uzorak 8: Merlot (2016)- inox posuda

**Slika 10.** Masena koncentracija niskomolekularnih fenola izražena kao mgL<sup>-1</sup> (+)-katehina



Legenda: Uzorak 1: Cabernet sauvignon (2015)- američki hrast; Uzorak 2: Cabernet sauvignon (2015)- francuski hrast; Uzorak 3: Cabernet sauvignon (2015)- slavonski hrast; Uzorak 4: Cabernet sauvignon (2016)- betonska posuda; Uzorak 5: Cabernet sauvignon (2016)- inox posuda; Uzorak 6: Pinot crni (2016)- francuski hrast; Uzorak 7: Pinot crni (2016)- inox posuda; Uzorak 8: Merlot (2016)- inox posuda

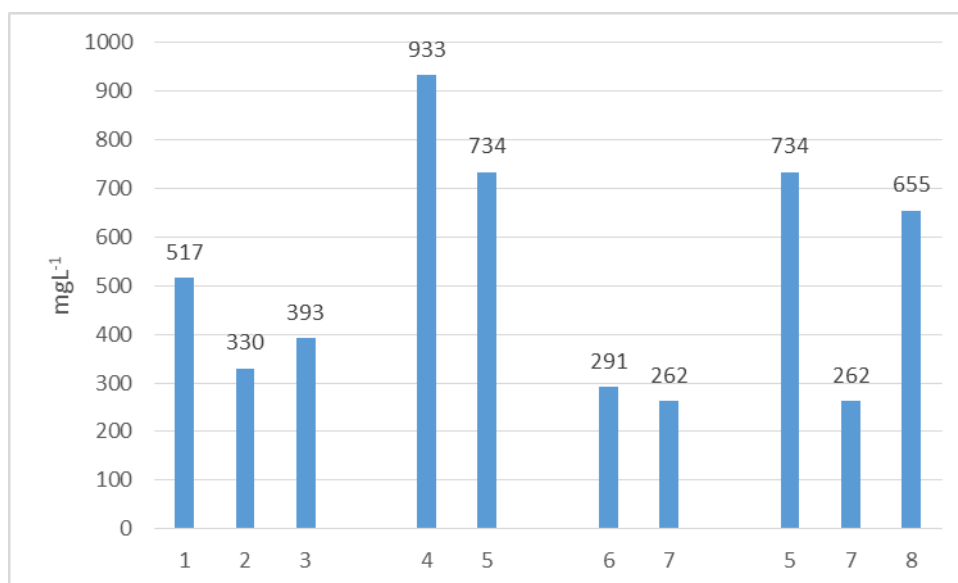
**Slika 11.** Masena koncentracija visokomolekularnih fenola izražena kao mgL<sup>-1</sup> cijanidina

Svi rezultati visko i nisko molekularnih fenola (Slika 10. i Slika 11.) prate rezultate dobivene pri analizi ukupnih fenola. Ukupni sadržaj visokomolekularnih fenola je u svim uzorcima veći nego li sadržaj niskomolekularnih fenola. Takav odnos između visoko i nisko molekularnih fenola u suglasju je s rezultatima koje su dobili Gambuti i suradnici 2012. godine. Oni su u svom istraživanju pratili koncentracije visoko i nisko molekularnih fenola u crvenim vinima podvrgnutima tretmanu mikrooksigenacije.

Jedino odstupanje od rezultata za ukupne fenole (Slika 9.) uočeno je pri usporedbi uzoraka 7 i 8 gdje proizlazi da Pinot crni ima veći sadržaj niskomolekularnih tanina nego li sorta Merlot što se može prepisati karakteristikama sorte (Sparrow i sur., 2016).

4.2.3. Masena koncentracija ukupnih antocijana

Slobodni antocijanini, ekstrahirani iz grožđa, odgovorni su za boju crvenog vina, a njihova boja ovisi o uvjetima u mediju (pH, S<sub>02</sub>) (Ivanova i sur., 2009). Profil antocijanina i njihova koncentracija u vinu u velikoj mjeri ovise o sorti grožđa, ali i o tehnologiji koja se primjenjuje za proizvodnju grožđa i vina te o reakcijama koje se odvijaju tijekom dozrijevanja i starenja vina (Moreno-Arribas i sur., 2008). Monomerni antocijanini grožđa uključeni su u reakcije neposredno nakon transfera u fermentacijski mošt i tijekom starenja vina, čime se stvaraju novi polimerni crveni pigmenti, kao i nepolimerni piranoantocijanini (Gómez Gallego i sur., 2015).



Legenda: Uzorak 1: Cabernet sauvignon (2015)- američki hrast; Uzorak 2: Cabernet sauvignon (2015)- francuski hrast; Uzorak 3: Cabernet sauvignon (2015)- slavonski hrast; Uzorak 4: Cabernet sauvignon (2016)- betonska posuda; Uzorak 5: Cabernet sauvignon (2016)- inox posuda; Uzorak 6: Pinot crni (2016)- francuski hrast; Uzorak 7: Pinot crni (2016)- inox posuda; Uzorak 8: Merlot (2016)- inox posuda

### **Slika 12.** Masena koncentracija ukupnih antocijana (mgL<sup>-1</sup>)

Ako usporedimo sve navedene uzorke međusobno vidljivo je kako uzorci vina iz berbe 2016. godine (Uzorak 4, Uzorak 5, Uzorak 6, Uzorak 7, Uzorak 8) imaju značajno viši udio antocijana nego li uzorci iz ranije berbe. Razlog tomu je upravo to što koncentracija ukupnih antocijana opada obrnuto proporcionalno vremenu dozrijevanja. Što vino duže odležava koncentracija ukupnih antocijana će biti niža, a rezultati su u suglasju s rezultatima koje su 2014. godine dobili i Figueiredo-González i suradnici. Oni su istraživali kako će vrijeme odležavanja slatkih crvenih vina utjecati na njegovu koncentraciju ukupnih antocijana te je vidljivo da tijekom dozrijevanja dolazi do značajnog opadanja. Zaključili su kako vrijeme odležavanja od 6 i 12 mjeseci u hrastovim bačvama značajno utječe na smanjenje udjela antocijana kod likerskih (87,5 i 90%) i desertnih crvenih vina (82 i 87%). Bimpilas i suradnici (2015) su u vinima proizvedenim od sorti Merlot i Syrah zabilježili da je udio monomernih antocijana smanjen za deset puta, što objašnjavaju reakcijama kopigmentacije i polimerizacija. Usporedba udjela antocijana u vinima sorte Pinot crni vidljivo je kako nema razlike pri dozrijevanju u hrastovoj bačvi (Uzorak 6) i u inox posudi (Uzorak 7). Iako razlika nije značajna ipak je nešto više ukupnih antocijana (29 mgL<sup>-1</sup>) zabilježeno u uzorku koji je dozrijeva u drvenoj bačvi. Isto tako, ako se usporede ukupni antocijani s obzirom na sortu grožđa i iste uvjete čuvanja, vino Pinot crni (Uzorak 7) u usporedbi sa Cabernet sauvignonom (Uzorak 5) i Merlotom (Uzorak 8) sadrži njihov manji udio. Prema Sparrowu i suradnicima

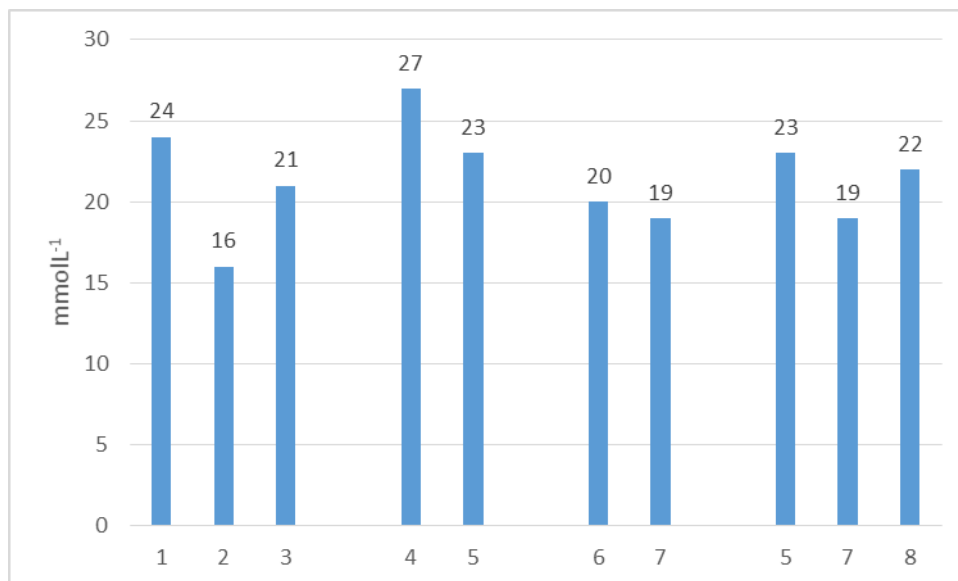
(2015) sorta Pinot crni ima najmanji sadržaj ukupnih fenola, a među njima prvenstveno antocijana u odnosu na druge crvene kultivare. Uzorak 5 ponovno je dominantniji od Uzorka 8 sa svojih  $734 \text{ mgL}^{-1}$  ukupnih antocijana dok Uzorak 8, sorta Merlot sadrži  $655 \text{ mgL}^{-1}$ .

Između uzoraka koji su svi dozrijevali u hrastovim bačvama, ali proizvedenim od različite vrste hrasta, odnosno pri usporedni uzoraka 1, 2 i 3 ponovno se vidi kako europski hrastovi međusobno imaju sličniji utjecaj na vino nego li američki hrast. Kod vina koje je dozrijevalo u bačvi od američkog hrasta (Uzorak 1) ukupni sadržaj antocijana je najviši i iznosi  $517 \text{ mgL}^{-1}$ . Među uzorcima koji su dozrijevali u bačvama od europskog hrasta, konkretno francuskog (Uzorak 2) i slavonskog (Uzorak 3) vidi se kako je vino koje je dozrijevalo u slavonskom hrastu bogatije na antocijanima. Iz toga se da zaključiti kako prilikom dozrijevanja u slavonskom hrastu sporije dolazi do polimerizacije i kopigmentacije antocijana međusobno ili sa drugim spojevima, bilo iz vina bilo iz drvene bačve. Razlog tomu može biti i starost bačve jer kada su bačve starije i difuzija kisika kroz bačvu je sporija jer je većina pora začepljena (Gómez-Plaza i Cano-López, 2011).

Vino Cabernet sauvignon (Uzorak 4) koje je dozrijevalo u betonskoj posudi ponovno pokazuje veći sadržaj fenolnih spojeva u ovom slučaju ukupnih antocijana ( $933 \text{ mgL}^{-1}$ ), u odnosu na vino koji je dozrijevalo u inoxu ( $734 \text{ mgL}^{-1}$ ) (Uzorak 5).

#### 4.2.4. Antioksidacijska aktivnost vina

Fenolni spojevi su sekundarni antioksidansi i oni su dobri proton ili elektron donori te su im fenoksidni radikali stabilni, zbog rezonantne delokalizacije nesparenog elektrona oko aromatskog prstena i manjka mjesta podložnog oksidaciji (Shahidi i sur., 1992). Oni djeluju kao hvatači slobodnih radikala i pri tome nastaje manje reaktivni fenoksidni radikali, sprječavajući tako lančanu reakciju. Crvena vina bogata su taninima, koji mogu biti visoko polimerizirani, te ulaziti u reakcije polimerizacije sa drugim spojevima. Upravo zbog znatnog stupnja polimerizacije i strukturnog razmještanja složenih polifenola, crvena vina imaju velik kapacitet vezanja kisika, tj. znatno antioksidacijsko djelovanje zbog čega imaju pozitivan utjecaj na zdravlje ako se konzumiraju racionalno (Singleton, 1987; Moreno-Arribas i Polo, 2009).



Legenda: Uzorak 1: Cabernet sauvignon (2015)- američki hrast; Uzorak 2: Cabernet sauvignon (2015)- francuski hrast; Uzorak 3: Cabernet sauvignon (2015)- slavonski hrast; Uzorak 4: Cabernet sauvignon (2016)- betonska posuda; Uzorak 5: Cabernet sauvignon (2016)- inox posuda; Uzorak 6: Pinot crni (2016)- francuski hrast; Uzorak 7: Pinot crni (2016)- inox posuda; Uzorak 8: Merlot (2016)- inox posuda

**Slika 13.** Antioksidacijska aktivnost vina izražena kao mmolL<sup>-1</sup>

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti prikazani su na Slici 13. te svi rezultati prate rezultate ukupnih fenola prikazane na Slici 9. Svi uzorci ispitivanih vina imaju jako antioksidativno djelovanje te među njima nema značajnih razlika. Vrijednosti antioksidativnih potencijala kreću se od najnižih 16 mmolL<sup>-1</sup> kod uzorka koji je dozrijeva u francuskom barriqueu (Uzorak 2.) do najviših 27 mmolL<sup>-1</sup> kod Uzorka 4 koji je dozrijeva u betonskoj posudi. Iz toga proizlazi da će nevezano u kakvoj posudi će vino dozrijevati ono zadržati svoj jaki antioksidativni potencijal i svoj pozitivan učinak na zdravlje (Rice-Evans i sur., 1996).



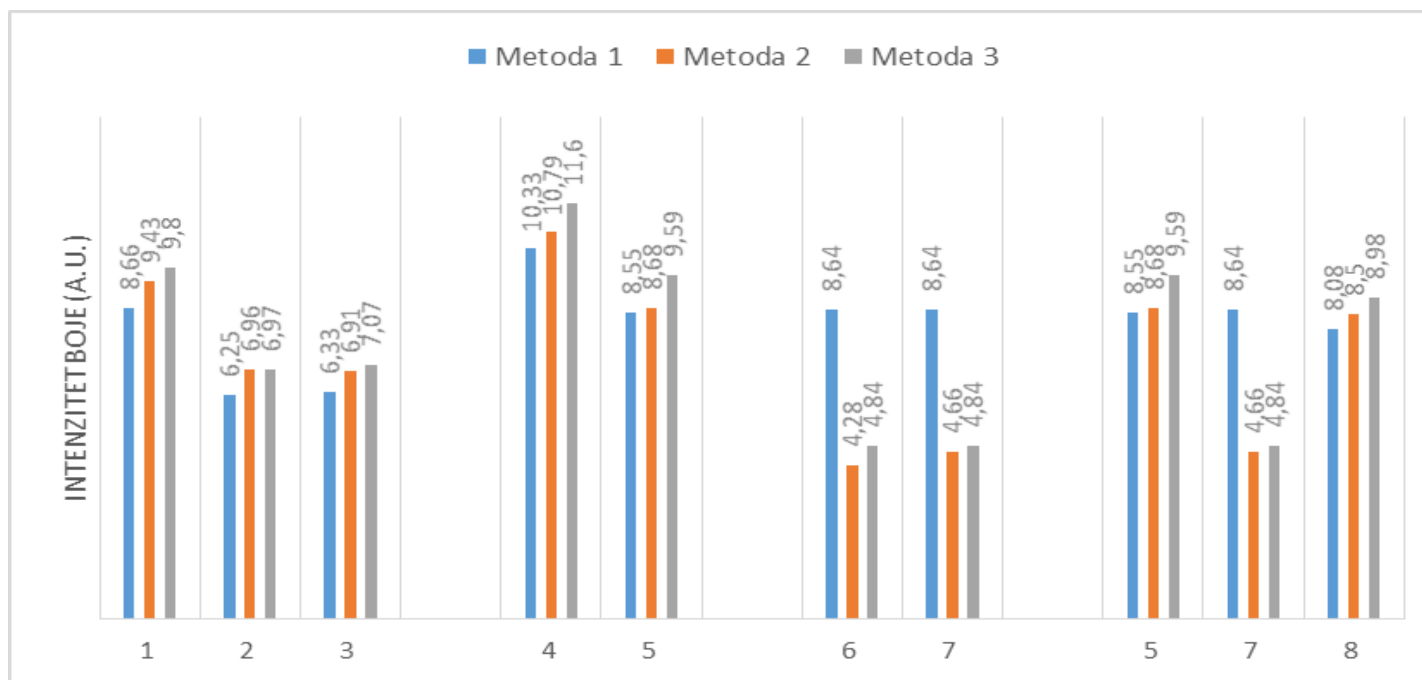
### **4.3. REZULTATI I RASPRAVA ODREĐIVANJA INTENZITETA I NIJANSE BOJE TE UDJELA CRVENE BOJE PRI RAZLIČITIM VALNIM DULJINAMA U VINU**

Pri određivanju kvalitete crvenog vina intenzitet i nijansa boje te udio (%) crvenog pigmenta imaju značajnu ulogu. Na boju vina utječu brojni čimbenici kao što su: zrelost grožđa, način, dužina i temperatura maceracije, fermentacija, pH-vrijednost vina te način dozrijevanja vina. Svi oni mogu u većoj ili manjom mjeri poboljšati ili pogoršati stabilnost i intenzitet same boje. U ovom radu gore navedene karakteristike boje određivane su spektrofotometrijski metodama po Ilandu i sur (2000) te Košmerl i Kač (2004).

#### **4.3.1. Intenzitet boje**

Intenzitet boje je fizikalno svojstvo obojenih spojeva, a određuje se spektrofotometrijski. U ovom radu intenzitet boje određivan je na 3 različita načina. Metoda 1 i 2 predstavljaju zbroj apsorbancija izračunatih pri valnim duljinama od 420 i 520 nm s tim da se pri mjerenju kod Metode 2 u otopinu doda i acetaldehid radi uklanjanja djelovanja SO<sub>2</sub> pošto se on veže na acetaldehid. Kod Metode 3 u izračun je uključena i apsorbancija pri 620 nm.

Prilikom usporedbe rezultata (Slika 14.) možemo se povesti argumentima korištenim tijekom razrade polifenolnog sastava uzoraka. Ponovno je dozrijevanje u bačvama od francuskog i slavonskog hrasta dalo sličnije rezultate nego li dozrijevanje u američkom hrastu. Uzorak 1 ima veći intenzitet boje (8,66; 9,43; 9,8) shodno i većem udjelu antocijana prikazanom na Slici 12. Ni u ovom slučaju kod Uzorka 6 i Uzorka 7 nema značajnih odstupanja te se ponovno u usporedbi sa sortama Cabernet sauvignon te Merlot očituju karakteristike sorte Pinot crni. Naime, Uzorci 6 i 7 imaju daleko veći intenzitet boje na koju se ne veže SO<sub>2</sub> i to iznosi 8,64 kod oba uzorka.



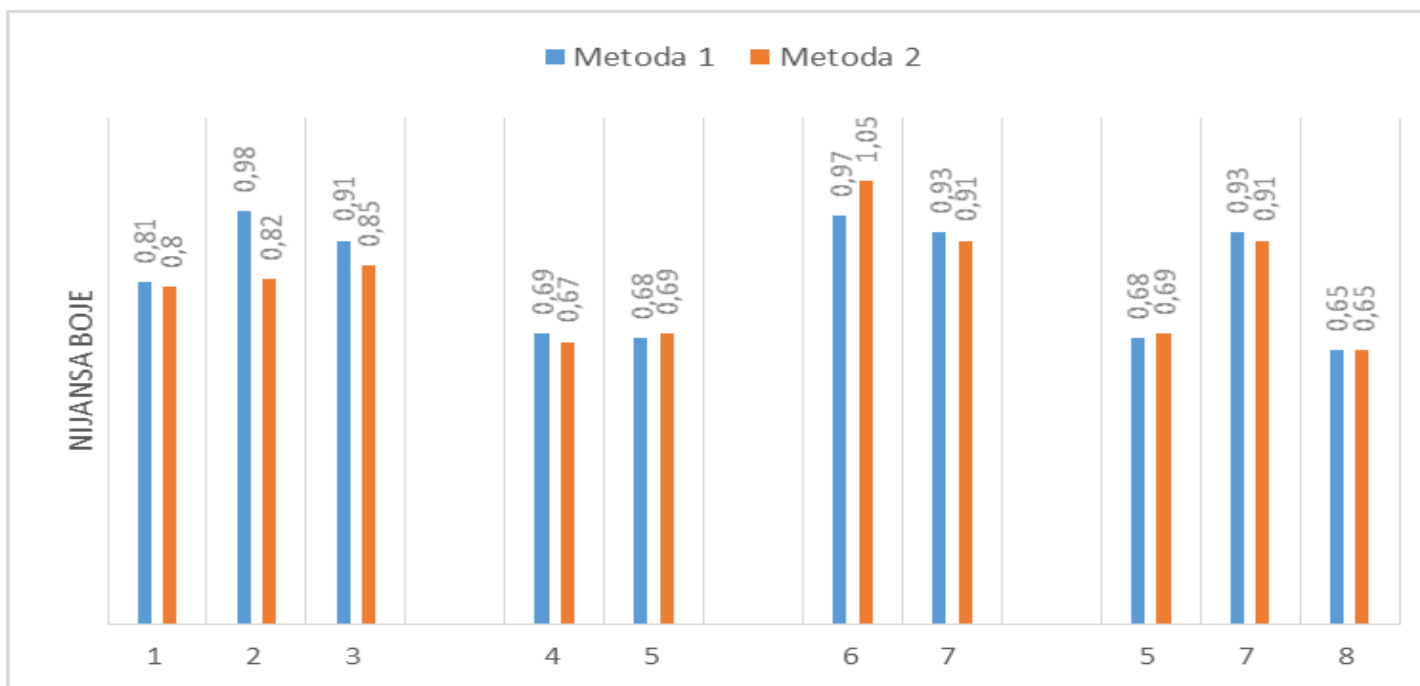
Legenda: Uzorak 1: Cabernet sauvignon (2015)- američki hrast; Uzorak 2: Cabernet sauvignon (2015)- francuski hrast; Uzorak 3: Cabernet sauvignon (2015)- slavonski hrast; Uzorak 4: Cabernet sauvignon (2016)- betonska posuda; Uzorak 5: Cabernet sauvignon (2016)- inox posuda; Uzorak 6: Pinot crni (2016)- francuski hrast; Uzorak 7: Pinot crni (2016)- inox posuda; Uzorak 8: Merlot (2016)- inox posuda

**Slika 14.** Intenzitet boje ; Legenda **Metoda 1** ( $A_{420}+A_{520}$ ), **Metoda 2** ( $A_{520}^{CH_3CHO} + A_{420}^{CH_3CHO}$ ), **Metoda 3** ( $A_{420}+A_{520}+A_{620}$ )

#### 4.3.2. Nijansa boje

Boja crvenih vina ovisi o vrsti i koncentraciji antocijana prisutnih u vinu. Pošto su antocijani amfoterni spojevi njihova boja prvenstveno ovisi o pH-vrijednosti (Waterhouse, 2002). Nijansa boje u ovom radu određivan je preko 2 različite metode. Kod Metode 1 ton boje određen je kao kvocijent između apsorbancije izmjerene na 420 i 520 nm. Prilikom izračuna kod Metode 2 radi se isto to samo što je tu pri provedbi analize dodan i acetaldehid kako bi se uklonio učinak  $S_0_2$ . Ako se usporede rezultati dobiveni s pomoću te dvije metode može se reći da su kompatibilne i daju gotovo identične rezultate, a svako odstupanje može se pripisati pogrešci prilikom analize.

Pri usporedbi rezultata prikazanih na Slici 15. ne može se zaključiti da različiti uvjeti dozrijevanja utječu na nijansu boje vina. No, ako se usporede međusobno same sorte, sorta Pinot crni ima najveću vrijednost za nijansu boje i to 1,05 dok se vrijednosti za nijansu boje kod ostale dvije sorte značajno se ne razlikuje. Za Cabernet sauvignon to je 0,68 ili 0,69 ovisno o metodi, a za sortu Merlot ta vrijednost iznosi 0,65 za obje metode.



Legenda: Uzorak 1: Cabernet sauvignon (2015)- američki hrast; Uzorak 2: Cabernet sauvignon (2015)- francuski hrast; Uzorak 3: Cabernet sauvignon (2015)- slavonski hrast; Uzorak 4: Cabernet sauvignon (2016)- betonska posuda; Uzorak 5: Cabernet sauvignon (2016)- inox posuda; Uzorak 6: Pinot crni (2016)- francuski hrast; Uzorak 7: Pinot crni (2016)- inox posuda; Uzorak 8: Merlot (2016)- inox posuda

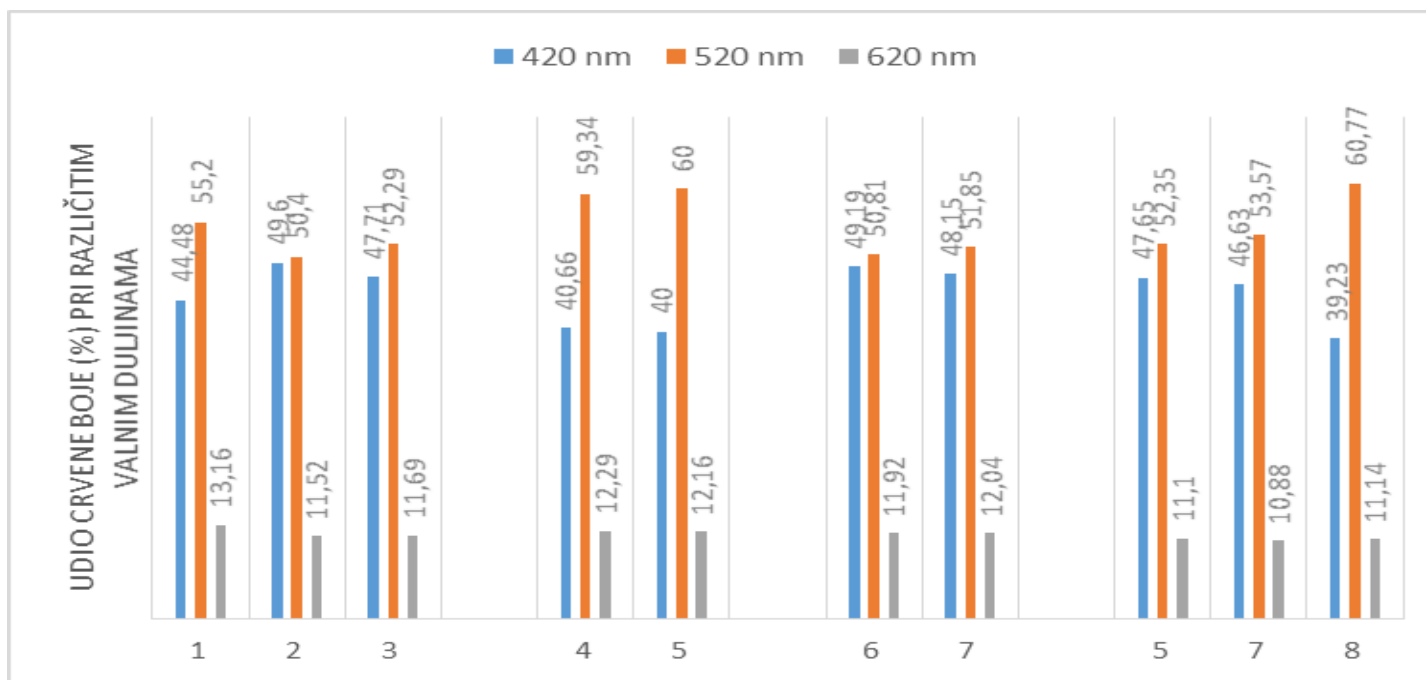
**Slika 15.** Nijansa boje; Legenda: **Metoda 1** ( $A_{420}/A_{520}$ ); **Metoda 2** ( $\frac{A_{420}^{CH_3CHO}}{A_{520}^{CH_3CHO}}$ )

### 4.3.3. Udio crvene boje (%) pri različitim valnim duljinama

Udio boje određivan je mjerenjem apsorbancije pri 3 različite valne duljine. Pri valnoj duljini od 420 nm najbolje se očituje smeđe-žuta boja vina, pri 520 to je crvena dok se pri valnoj duljini od 620 nm očituje plavo-ljubičasta boja (Iland i sur., 2000).

Atanasova i sur. (2002) navode da se tijekom dozrijevanja pojavljuju nove boje, kao posljedica stvaranja spojeva između antocijana i tanina, preko acetaldehidnih mostova. Ti novi produkti nastali polimerizacijom i kondenzacijom imaju relativno veće vrijednosti apsorbancije pri valnim dužinama 420 i 620 nm u usporedbi sa apsorbancijom pri 520 nm. Apsorbancija pri 420 nm predstavlja prisutnost kinona, a njen porast je posljedica oksidacije fenolnih spojeva (Vivas i Glories, 1996).

Pošto se se prilikom izrade ovog rada apsorbancije pri gore navedenim valnim duljinama mjerile samo nakon provedenog dozrijevanja, a ne i na samom početku odnosno po završetku fermentacije taj porast apsorbancije pri 420 i 620 nm se ne može prikazati. Ali iz rezultata prikazanih na Slici 16. se može vidjeti kako je kod Uzorka 4 (Cabernet sauvignon), Uzorka 5 (Cabernet sauvignon) i Uzorka 8 (Merlot) koji su dozrijevali 6 mjeseci (berba 2016), dakle „najmlađi“ uzorci, apsorbancija pri 520 nm puno veća u odnosu na apsorbanciju pri 420 nm u usporedbi sa ostalim uzorcima što znači da još uvijek nije došlo do značajnog posmeđivanja. Kod Uzoraka 6 i 7, sorta Pinot crni, koji su također iz berbe 2016. to nije toliko izraženo što se ponovno može prepisati i karakteristikama same sorte (Sparrow i sur., 2015).



Legenda: Uzorak 1: Cabernet sauvignon (2015)- američki hrast; Uzorak 2: Cabernet sauvignon (2015)- francuski hrast; Uzorak 3: Cabernet sauvignon (2015)- slavonski hrast; Uzorak 4: Cabernet sauvignon (2016)- betonska posuda; Uzorak 5: Cabernet sauvignon (2016)- inox posuda; Uzorak 6: Pinot crni (2016)- francuski hrast; Uzorak 7: Pinot crni (2016)- inox posuda; Uzorak 8: Merlot (2016)- inox posuda

**Slika 16.** Udio crvene boje (%) pri valnim duljinama od 420, 520 i 620 nm; Legenda: **Stupac 1** (udio crvene boje pri 420 nm), **Stupac 2** (udio crvene boje pri 520 nm), **Stupac 3** (udio crvene boje pri 620 nm)

## 5. ZAKLJUČAK

1. Najviši udio ukupnih fenola zabilježen je kod sorte Cabernet sauvignon u uzorcima čuvanim u američkom hrastu i betonu. S obzirom na sortu udio ukupnih fenola sličan je kod sorti Cabernet sauvignon i Merlot, a nešto niži kod sorte Pinot crni.
2. Trend visoko i nisko molekularnih tanina prati rezultate za ukupne fenole, a kod svih uzoraka zabilježen je veći udio visokomolekularnih nego niskomolekularnih tanina.
3. Više antocijana zabilježeno je u uzorcima vina koji su dozrijevali 6 mjeseci. S obzirom na vrstu drveta najviši udio antocijana imao je uzorak Cabernet sauvignona dozrijevan u američkom hrastu. S obzirom na sortu najmanji udio antocijana zabilježen je kod sorte Pinot crni.
4. Svi uzorci pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost što je u skladu s visokim udjelom fenolnih spojeva što je karakteristika crvenih vina.
5. S obzirom na intenzitet, nijansu i udio crvene boje najniže vrijednosti zabilježene su kod vina sorte Pinot crni.
6. Sorta Pinot crni ima najniže vrijednosti svih ispitivanih parametara, bez obzira da li je dozrijevala u hrastu ili u inoxu.

## 6. LITERATURA

Anli, R. E., Cavuldak, Ö. A. (2013) A review of microoxygenation application in wine. *J. Inst. Brew.* **118**, 368-385.

Annonymus1 (2017) - <http://skr.rs/vWX> pristupljeno 09.06. 2017.

Annonymus2 (2017) – Analysers by infrared (IRTF): adapted for work in laboratory and in reception of vintages <http://skr.rs/u8x> pristupljeno 04.09.2017.

Arapitsas P., Scholz M., Vrhovsek U., Di Blasi S., Biondi Bartolini A. (2012) A metabolic approach to the study of wine micro-oxygenation. *Plos one*, **7**, 1-11.

Arfelli, G., Sartini, E., Corzani, C., Fabiani, A. (2011) Chips, lees and micro-oxygenation: influence on some flavors and sensory profile of bottled red Sangiovese wine. *Eur. Food Res. Technol.*, **233**, 1-10.

Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. (2002) Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Anal. Chim. Acta.*, **458**, 15–27.

Baderschneider, B., Winterhalter, P. (2001) Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2788-2798.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by product: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chem.*, **99**, 191-203.



Bautista-Ortín, A., Lencina, A., Pardo-Mínguez, F., López-Roca, J. & Gómez-Plaza, E. (2008) The use of oak chips during the ageing of a red wine in stainless steel tanks or used barrels: effect of the contact time and size of the oak chips on aroma compounds. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **14**, 63–70.

Bimpilas A, Tsimogiannis D, Balta-Brouma K, Lymperopoulou, T., Oreopoulou, V. (2015) Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. *Food Chem.*, **178**, 164–71.

Broadhurst, R. B., Jones, W. T. (1978) Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.* **28**, 788-794.

Brouillard R., Dangles, O. (1994) Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging? *Food Chem.*, **51**, 365-371.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **28**, 25-30.

Buiarelli, F., Coccioli, F., Jasinowska, R., Merolle, M., Terracciano, A. (2007) Analysis of some stilbenes in Italian wines by liguide chromatography/tandem mass spectrometry. *Rap. Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 2955-2964.

Cano-López, M., Pardo-Mínguez, F., López-Roca, J. M., Gómez-Plaza, E. (2007) Chromatic characteristics and anthocyanin profile of a micro-oxygenated red wine after oak or bottle maturation. *Eur. Food Res. Technol.*, **225**, 127-132.

Chira, K., Jourdes, M., Teeissedre, P. L. (2012) Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterisation and polymerisation during storage. *Eur. Food Res. Technol.*, **234**, 253-261.

Crump, A. M. (2015) Alternatives to oak barrel maturation: influence on composition, sensory properties and consumer acceptance of wine. Doctoral thesis. Faculty of Science, University of Adelaide.

Del Alamo Sanza M., Nevares Domínguez, I., Cárcel Cárcel, L. M., Navas Gracia, L. (2004) Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Anal. Chim. Acta.*, **513**, 229–237.

Di Stefano, R., Guidon, S. (1989a) The analysis of total polyphenols in must and wines. *Vignevini*, **1**, 47-52.

Di Stefano, R., Cravero, M. C., Gentilini, N. (1989b) Methods for the study of wine polyphenols. *L'Enotecnico*, **5**, 83-89.

Downey, M., Dokoozlian, N., Kristic, P. (2006) Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am. J. Enol. Viticult.*, **57**, 257–268.

Es-Safi, N., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. (1999) Studies on the acetaldehyde induced condensation of (-)-epicatechin and malvidin 3-O-glucoside in a model solution system. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2096–2102.

Fernandez de Simon, B., Hernandez, T., Cadahia, E., Duenas, M., Estrella, I. (2003) Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *Eur Food Res Technol.*, **216**, 150–156

Fia, G., Zanoni, B., Gori, C. (2016) A New Techniques for Exploitation on Wine Lees. *Agric. Agric. Sci. Proc.*, **8**, 748-754.

Figueiredo-González, M., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J., Teixeira, N., Mateus, N., De Freitas, V. (2014) The phenolic chemistry and spectrochemistry of red sweet wine-making and oak aging. *Food Chem.*, **152**, 522-530.

Fulcrand, H., Cameira Dos Santos, P.J., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., FabreBonvin, J. (1996) Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 735–739.

Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., Cheynier, V. (2006) Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57**, 289-297.

Gambutì, A., Rinaldi, A., Ugliano, M., Moio, L. (2012) Evolution of phenolic compounds and astringency during aging of red wine: effect of oxygen exposure before and after bottling. *J.Agr. Food. Chem.*, IX Italian Congress of Food Chemistry.

Garrido, J., Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols – A chemical perspective. *Food Res. Int.*, **54**, 1844–1858.

Gómez Gallego, M. A., Sánchez-Palomo, E., Hermosín-Gutiérrez, I., González Viñas, M. A. (2015) Effect of oak chip addition at different winemaking stages on phenolic composition of Moravia Agria red wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **36**, 21-31.

Gómez-Plaza, E., Cano-López, M. (2011). A review on micro-oxygenation of red wines: claims, benefits and the underlying chemistry. *Food Chem.*, **125**, 1131–1140.

Grainger, K., Tattersall, H. (2005) Wine production: vine to bottle. Blackwell Publishing, Ltd., Oxford. str. 51-62.

He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan., Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., Duan, C.-Q. (2012) Anthocyanins and their variation in red wine I. monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, **17**, 1571-1601.

Hornsey, I. (2007) The chemistry and biology of winemaking. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. str. 78-112.

Ibern-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Lao-Luque, C., Buxaderas, S., de la Torre-Boronat, M. C. (2001) Differences in phenolic profile between oak wood and stainless steel fermentation in white wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 159-164.

Iland, P., Ewart, A., Sitters, J., Markides, A., Bruer, N. (2000) Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking. Campbelltown, Patrick Iland Wine Promotions, str. 98-99.

Ivanova, V., Stefanova, M., Vojnoski, B. (2009) Assay of the phenolic profile of merlot wines from Macedonia: effect of maceration time, storage, SO<sub>2</sub> and temperature of storage. *Maced. J. Chem. Chem. En.*, **28**, 141–149.

Ivanova, V., Vojnoski, B., Stefanova, M. (2012) Effect of winemaking treatment and wine aging on phenolic content in Vranec wines. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 161-172.

Jackson, R. S. (2008) Wine Science: Principles and Applications, 3.izd., Elsevier-Academic Press, Oxford, UK, str. 287-295.

Kemp, B.S., Harrison, R., Creasy, G.L. (2011) Effect of mechanical leaf removal and its timing on flavan-3-ol composition and concentrations in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir wine. *Aust. J. Grape Wine R.*, **17**, 270–279.

Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. (1993) Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.*, **47**, 85-89.

Košmerl, T., Kač, M. (2004) Osnovne kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. 2.izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Oddelek za živilstvo: str.106

Košmerl, T., Cigić, B. (2008) Antioxidant potential and phenolic composition of white and red wines. Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia.

Lee, J. (2010) Degradation kinetics of grape skin and seed proanthocyanidins in a model wine system. *Food Chem.*, **123**, 51-56.

Mateus, N. i De Freitas, V. (2001) Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during port wine ageing. *J. Agr. Food Chem.*, **49**, 5217-5222.

Mateus, N., Silva, A.M.S., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C., de Freitas, V. (2003) A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1919-1923.

Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B. (1999) Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet franc, Merlot, and Pinot noir Wines from British Columbia *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4009-4017.

Moreno-Arribas , M.V., Gómez-Cordovés, C., Martín-Álvarez, P. J. (2008) Evolution of red wine anthocyanins during malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees. *Food Chem.*, **109**, 149-158

Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. (2009) *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer, New York. str. 437-595.

Oberholster, A., Elmendorf, B. L., Lerno, L. A., King, E.S., Heymann, H., Breneman, C. E., Boulton R. B. (2015) Barrel muration, oak alternatives and micro-oxygenation: Influence on red wine aging and quality. *Food Chem.*, **173**, 1250-1258.

Pravilnik o vinu (1996) Narodne novine (NN 096/1996).

Price, S.F., Breen , P. J., Valladao , M., Watson, B. T. (1995) Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 187–194.

Prida, A., Puech , J.-L. (2006) Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in american, french, and east european oak woods. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8115-8126.

Puech , J.-L. (1987) Extraction of phenolic compounds from oak wood in model solutions and evolution of aromatic aldehydes in wines aged in oak barrels. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 236-238.

Remy-Tanneau, S., Fulcrand, H., Labarbe. B., Cheynier, V., Moutounet, M. (2000) First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 745–751.

Remy-Tanneau, S., Guerneve, C.L., Meudec, E., Cheynier, V. (2003) Characterization of colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and the interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3592-3597.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, J., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006) Handbook of enology Vol. 2, The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, 2.Izd., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England. str. 141-205.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996) Structure- antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free. Radic. Biol. Med.*, **20**, 933-934.

Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G. (2000) Contribution of proanthocyanidines to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1996-2002.

Sanza, M. D. A., Domínguez, I.N. (2006). Wine aging in bottle from artificial system (staves and chips) and oak wood: Anthocyanin composition. *Anal. Chim. Acta.*, **563**, 255-263.

Rodríguez-Rodríguez, P., Gómez-Plaza, E. (2011) Effect of volume and toast level of French oak barrels (*Quercus petraea* L.) on Cabernet Sauvignon wine characteristics. *Am. J. Enol. Viticult.*, **62**, 359-365.

Sanza, M. D. A., Domínguez, I. N. (2006) Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods Anthocyanin composition. *Anal. Chim. Acta.*, **563**, 255-263.

Schwarz, M., Wabnitz, T. C., Winterhalter, P. (2003) Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigment in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3682-3687.

Shahidi, F., Janitha, P. K., Wanasundara, P. D. (1992) Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, 67-103.

Singleton, V. L. (1987) Oxygen with phenols and related reactions in must, wines and model systems, observations and practical implications. *Am. J. Enol. Viticult.*, **38**, 69-77.

Sparrow, A. M., Damberg, R. G., Bindon, K. A., Smith, P. A., Close, D. C. (2015) Interaction of grape skin, seed, and pulp tissues on tannin and anthocyanin extraction in Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Viticult.*, **85**, 1-27.

Stavridou, K., Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Dagkli, V. (2016) The phenolic potential of wines from french grape varieties Cabernet sauvignon, Merlot and Syrah cultivated in the region of thessaloniki (Northern Greece) and Its Evolution during Aging. *Food Nutr. Sci.*, **7**, 122-137.

Tao, Y., García, 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.

Vivas, N., Glories, Y. (1996) Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wine during aging. *Am. J. Enol. Viticult.*, **47**, 103-107.

Vivas, N., Nonier, M.-F., Guerra, C., Vivas, N. (2001) Anthocyanin in grape skins during maturation of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and Merlot Noir from different bordeaux terroirs. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **35**, 149-156.

Waterhouse, A. L. (2002) Wine Phenolics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **957**, 21-36.

Zhang, B., Cai, J., Duan, C.-Q., Reeves, M. J., He, F. (2015) A review of polyphenolics in oak woods. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 6978-7014.

## PRILOZI

### Prilog 1. Ukupni fenoli

Broj uzorka	Sorta	Godina	Razrijeđenje	Volumen (ml)	Ukupni polifenoli (mgL <sup>-1</sup> )
1	Cabernet sauvignon	2015	20	1	2320
2	Cabernet sauvignon	2015	20	1	1720
3	Cabernet sauvignon	2015	20	1	1838
4	Cabernet sauvignon	2016	20	1	2661
5	Cabernet sauvignon	2016	20	1	2163
6	Pinot crni	2016	20	1	1771
7	Pinot crni	2016	20	1	1761
8	Merlot	2016	20	1	2081

### Prilog 2. Niskomolekularni tanini

Broj uzorka	Sorta	Godina	Razrijeđenje	Volumen (ml)	Niskomolekularni tanini (mgL <sup>-1</sup> )
1	Cabernet sauvignon	2015	4	2	1747
2	Cabernet sauvignon	2015	4	2	907
3	Cabernet sauvignon	2015	4	2	949
4	Cabernet sauvignon	2016	4	2	1942
5	Cabernet sauvignon	2016	4	2	1573
6	Pinot crni	2016	4	2	1378
7	Pinot crni	2016	4	2	1335
8	Merlot	2016	4	2	1253



**Prilog 3. Visokomolekularni tanini**

Broj uzorka	Sorta	Godina	Razrijeđene	Volumen (ml)	Visokomolekularni tanini (mgL <sup>-1</sup> )
1	Cabernet sauvignon	2015	10	2	2932
2	Cabernet sauvignon	2015	10	2	2043
3	Cabernet sauvignon	2015	10	2	2044
4	Cabernet sauvignon	2016	10	2	3200
5	Cabernet sauvignon	2016	10	2	2565
6	Pinot crni	2016	10	2	2068
7	Pinot crni	2016	10	2	1784
8	Merlot	2016	10	2	2175

**Prilog 4. Ukupni antocijani**

Broj uzorka	Sorta	Godina	Razrijeđenje	Ukupni antocijani (mgL <sup>-1</sup> )
1	Cabernet sauvignon	2015	10	517
2	Cabernet sauvignon	2015	10	330
3	Cabernet sauvignon	2015	10	393
4	Cabernet sauvignon	2016	20	933
5	Cabernet sauvignon	2016	10	734
6	Pinot crni	2016	10	291
7	Pinot crni	2016	10	262
8	Merlot	2016	10	655

**Prilog 5.** Antioksidativna aktivnost vina

Broj uzorka	Sorta	Godina	DPPH (mol) *10 <sup>-8</sup>	DPPH (mmol/L)
1	Cabernet sauvignon	2015	7,89	24
2	Cabernet sauvignon	2015	5,43	16
3	Cabernet sauvignon	2015	8,87	21
4	Cabernet sauvignon	2016	8,87	27
5	Cabernet sauvignon	2016	7,81	23
6	Pinot crni	2016	6,51	20
7	Pinot crni	2016	6,26	19
8	Merlot	2016	7,20	22

**Prilog 6.** Nijansa boje

Broj uzorka	Sorta	Godina	Nijansa boje $A_{420}/A_{520}$	Nijansa boje $A_{520}^{CH_3CHO} / A_{420}^{CH_3CHO}$
1	Cabernet sauvignon	2015	0,812	0,796
2	Cabernet sauvignon	2015	0,984	0,817
3	Cabernet sauvignon	2015	0,912	0,848
4	Cabernet sauvignon	2016	0,685	0,668
5	Cabernet sauvignon	2016	0,667	0,685
6	Pinot crni	2016	0,968	1,053
7	Pinot crni	2016	0,929	0,906
8	Merlot	2016	0,646	0,647

**Prilog 7. Intenzitet boje**

Broj uzorka	Sorta	Godina	Intenzitet boje $A_{420} + A_{520}$	Intenzitet boje $A_{520}^{\text{CH}_3\text{CHO}} + A_{420}^{\text{CH}_3\text{CHO}}$	Intenzitet boje $A_{420} + A_{520} + A_{620}$
1	Cabernet sauvignon	2015	8,66	9,43	9,8
2	Cabernet sauvignon	2015	6,25	6,96	6,97
3	Cabernet sauvignon	2015	6,33	6,91	7,07
4	Cabernet sauvignon	2016	10,33	10,79	11,6
5	Cabernet sauvignon	2016	8,55	8,68	9,59
6	Pinot crni	2016	8,64	4,28	4,84
7	Pinot crni	2016	8,64	4,66	4,84
8	Merlot	2016	8,08	8,5	8,98

**Prilog 8. Udio crvene boje pri različitim valnim duljinama**

Broj uzorka	Sorta	Godina	$dA_{420}$ (%)	$dA_{520}$ (%)	$dA_{620}$ (%)
1	Cabernet sauvignon	2015	44,80	55,20	13,16
2	Cabernet sauvignon	2015	49,60	50,40	11,52
3	Cabernet sauvignon	2015	47,71	52,29	11,69
4	Cabernet sauvignon	2016	40,66	59,34	12,29
5	Cabernet sauvignon	2016	40,00	60,00	12,16
6	Pinot crni	2016	49,19	50,81	11,92
7	Pinot crni	2016	48,15	51,85	12,04
8	Merlot	2016	39,23	60,77	11,14