

# Antioksidacijska svojstva vina

---

**Cedilak, Andrea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:372572>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

Andrea Cedilak

6642/ BT

## ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA VINA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnološki aspekti proizvodnje vina

Mentor: *Prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan*

Zagreb, rujan 2016.

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

## ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA VINA

Andrea Cedilak 6642/ BT

**Sažetak:** Antioksidacijska aktivnost polifenola prisutnih u vinu predmet je brojnih istraživanja najviše zbog njihovog blagotvornog utjecaja na ljudsko zdravlje, ali i na organoleptička svojstva vina. U grožđu, pa tako i u vinu polifenolni spojevi su zastupljeni u dvije osnovne grupe: flavonoidi i neflavonoidi. Predstavnici flavonoida su flavonoli, flavanoli, flavan-3-oli i antocijani, a neflavonoida fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne), te stilbeni, antocijanidi i proantocijanidi. Polifenolni sastav vina primarno ovisi o kultivaru, ali i o ampelotehničkim zahvatima u vinogradu, te o tehnologiji proizvodnje vina. Antioksidansi imaju vrlo bitnu ulogu u redukciji slobodnih radikala čime se sprječava oksidacija daljnjih važnih molekula u nizu reakcija. Međutim, jedan od glavnih problema tijekom vinifikacije je proces tamnjenja vina, koji se dijeli na enzimsko i neenzimsko, a za što su odgovorni fenoli, posebice o-difenoli. Enzimsko tamnjenje obuhvaća reakcije hidroksilacije fenola, a neenzimsko tamnjenje reakcije oksidacije i polimerizacije fenola. Sve te reakcije utječu na promjenu boje vina, pri čemu bijela vina poprimaju nepoželjnu smeđu boju, dok crvena vina postaju mekša i manje trpka. Mjerenje antioksidacijske aktivnosti temelji se na inhibiciji slobodnih radikala, kelaciji metalnih iona i lipidnoj peroksidaciji, a najčešće primjenjene metode su ORAC, DPPH i ABTS.

**Ključne riječi:** antioksidansi, fenoli, tamnjenje vina

**Rad sadrži:** 53 stranice, 7 slika, 1 tablicu

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan

**Rad predan: rujan, 2016.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

## ANTIOXIDANT PROPERTIES OF WINE

Andrea Cedilak 6642/BT

**Abstract:** Antioxidant activity of polyphenols present in wine is the subject of numerous studies mainly due to their beneficial effects on human health, but also the organoleptic characteristics of wine. In grapes and wine polyphenolic compounds are present in two main groups: flavonoids and nonflavonoids. Representatives of flavonoids are flavonols, flavanols, flavan-3-ols and anthocyanins, and of nonflavonoids are phenolic acids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic), stilbenes, anthocyanidins and proanthocyanidins. Polyphenolic composition of the wines primarily depends on the cultivar, the viticultural practices in the vineyard and the wine production technology. Antioxidants play crucial role in the reduction of free radicals by which the oxidation of downstream molecules is prevented. However, one of the main problems during the vinification process is wine browning, which is divided into enzymatic and non-enzymatic, and for which the phenols, especially o-diphenols are responsible. Enzymatic browning involves the hydroxylation reaction of phenols and non-enzymic browning can arise through several reactions which includes oxidation and polymerization. All these reactions affect discolouration of wine, where white wines take on unwanted brown color, while red wines become softer and less bitter. Measurement of antioxidant activity is based on inhibition of free radicals, chelation of metal ions and lipid peroxidation, and applied methods are ORAC, DPPH and ABTS.

**Keywords:** antioxidants, phenols, browning

**Thesis contain:** 53 pages, 7 figures, 1 table

**Original in:** *Croatian*

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

**Mentor:** *PhD. Vesna Zechner-Krpan, Full Professor*

**Thesis delivered: september, 2016.**

# SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO .....	1
2.1	ANTIOKSIDANSI .....	3
2.2	FENOLI .....	4
2.2.1	POLIFENOLNI SPOJEVI U GROŽĐU I VINU.....	5
2.2.2	FLAVONOIDI.....	7
2.2.3	FLAVANOLI.....	7
2.2.4	FLAVONOLI.....	8
2.2.5	ANTOCIJANIDI.....	8
2.2.6	PROANTOCIJANIDI .....	12
2.2.7	NEFLAVONIDI.....	13
2.2.8	FENOLNE KISELINE.....	13
2.2.9	STILBENI.....	16
2.3	BIOLOŠKE AKTIVNOSTI FLAVONOIDA.....	17
2.3.1	ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE.....	17
2.3.2	PROTUTUMORSKO DJELOVANJE.....	17
2.3.3	PROTUUPALNO DJELOVANJE.....	18
2.3.4	PROTUVIRUSNO DJELOVANJE .....	19
2.4	OKSIDACIJA I LIPIDNA PEROKSIDACIJA .....	19
2.5	TAMNENJE VINA .....	21
2.5.1	ENZIMSKO TAMNENJE.....	21
2.5.2	NEENZIMSKO TAMNENJE VINA .....	23
2.5.3	AKTIVACIJA KISIKA U VINU.....	27
2.5.4	IONI ŽELJEZA I BAKRA U VINU.....	27
2.6	PARAMETRI PRI PROIZVODNJI VINA.....	27
2.6.1	KISIK.....	27
2.6.2	pH-VRIJEDNOST .....	28
2.6.3	KONCENTRACIJA FENOLA .....	28
2.6.4	DODATAK KISIKA TIJEKOM ALKOHOLNE I MALOLAKTIČNE FERMENTACIJE .....	29
2.7	UČINAK KISIKA NA VINO TIJEKOM DOZRIJEVANJA .....	30
2.7.1	UTJECAJ NA BOJU BIJELIH VINA .....	30
2.7.2	UTJECAJ NA BOJU CRVENIH VINA .....	31
2.7.3	UTJECAJ NA OKUS VINA.....	32
2.7.4	UTJECAJ NA AROMU VINA.....	32
2.8	MJERENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI.....	33
3.	RASPRAVA .....	35
2.	ZAKLJUČAK.....	35
3.	LITERATURA .....	38

## 1. UVOD

U ljudskom organizmu kao posljedica normalnog metabolizma nastaju slobodni radikali, a to su spojevi sa slobodnim (nesparenim) elektronima. Upravo zbog slobodnih elektrona ovakvi spojevi su vrlo reaktivni, te mogu prouzročiti oksidativnu štetu biomolekulama stanica u organizmu ljudi. Spojevi koji neutraliziraju slobodne radikale i tako umanjuju oksidativan stres u stanicama nazivaju se antioksidansima. Za održavanje ravnoteže antioksidansa u tijelu važni su endogeni antioksidansi, a kako oni u nekim stresnim situacijama nisu dovoljni, u organizam treba unositi i dodatne antioksidanse zdravom hranom, poput voća, povrća, žitarica i sl. Najvažniji u vodi toplivi antioksidansi se polifenoli, kojih u niskim koncentracijama ima u grožđu, pa i u vinu. U bobici grozda neflavonoidni polifenolni spojevi su smješteni uglavnom u mesu, dok se flavonoidni polifenoli najvećim dijelom nalaze u kožici, sjemenkama i peteljci. Procesom vinifikacije spomenuti spojevi prelaze u vino, gdje su najzaslužniji upravo za zdravstvene učinke vina, ali i doprinose senzorskim karakteristikama vina poput boje, okusa, gorčine i oporosti. Najvažniji flavonoid u vinu je resveratrol, jaki antioksidans, koji hvata slobodne radikale te zaustavlja pojačano razaranje stanica štiteći ljubitelje vina od preuranjena starenja. Ima cijeli niz blagotvornih učinaka na zdravlje ljudi: sprječava klijenut srčanog mišića i tvorbu nakupina na mozgu i krvnim žilama, usporava grušanje krvi, blagtvoran je kod upalnih bolesti crijeva (ulcerativni kolitis i Crohnova bolest) i dijabetesa. Među važne fenolne spojeva spada i katehin, koji sprječava nastajanje krvnih ugrušaka. Tu su još kvercetin i epikatehin, koji zaustavljaju rast stanica raka i štite LDL kolesterol od oksidacije. Svi spomenuti fenolni spojevi usporavaju protok hrane kroz crijeva poslije obroka, spječavaju oscilacije u razini šećera u krvi nakon apsorpcije hrane u krvotok. Na taj način pomažu pri liječenju dijabetesa, djelujući na razgradnju glukoze u stanicama isto kao i sintetski lijekovi.

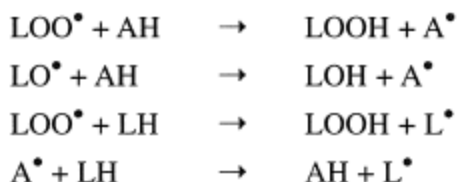
Antioksidacijska aktivnost vina je u korelaciji s koncentracijom ukupnih fenola u vinu te ovisi i o koncentraciji pojedinih fenolnih spojeva te o njihovim međusobnim odnosima. Primjenom različitih analitičkih metoda poput ORAC, DPPH i ABTS moguće je utvrditi koncentraciju fenola u vinu kao i antioksidacijsku aktivnost vina.

## 2. TEORIJSKI DIO



## 2.1 ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su spojevi koje u niskoj koncentraciji u odnosu na oksidirani supstrat, usporavaju ili inhibiraju oksidaciju tog supstrata (Halliwell i Gutteridge, 1995). Oni imaju svojstva koja djeluju kao reducirajuće sredstvo, te neutraliziraju slobodne radikale dajući im svoj elektron i time inhibiraju njihovu aktivnost. Slobodni radikali su molekule koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u elektronskim orbitalama, što ih čini vrlo reaktivnima prema mnogim drugim molekulama u stanici. Jednom takvom reakcijom slobodni radikali se mogu vezati na molekulu DNA, a što dovodi do njenog oštećenja. Također su moguće i druge reakcije slobodnih radikala koje naposljetku dovode do uništavanja stanične strukture te brojnih degenerativnih bolesti. Slobodni radikali mogu oštetiti lipidnu membranu stvarajući ugljikov radikal koji reagira s kisikom i daje peroksidni radikal koji dalje reagira s masnim kiselinama stvarajući nove ugljikove radikale. Kada neka od nastalih oštećenja ostanu nepopravljena to dovodi do narušavanja raznih funkcija unutar stanice. To se posebno događa pri oksidativnom stresu kada razina slobodnih radikala poraste te mehanizmi popravka ne mogu efikasno uklanjati sva nastala oštećenja. Vrlo je bitno održavati ravnotežu antioksidansa u tijelu, stoga je potrebno uz endogene antioksidanse, unositi dodatne zdravom prehranom (Ames i sur., 1993). Najviše antioksidansa ima u voću, povrću, žitaricama, tamnoj čokoladi i drugdje.



**Slika 1.** Reakcije neutralizacije slobodnih radikala;  $\text{LOO}^\bullet$ =peroksidni radikal,  $\text{AH}$ =fenolni antioksidant,  $\text{A}^\bullet$ =fenolni radikal,  $\text{LO}^\bullet$ =alkoksilni radikal,  $\text{LH}$ =polinezasićene masne kiseline (Shahidi i Wanasundara, 1992)

Antioksidanse dijelimo na enzimatske i neenzimatske. Neki od najznačajnijih enzimatskih antioksidansa su superoksid dismutaza, katalaza, askorbat peroksidaza i glutacion

reduktaza. Superoksid dismutaza je metaloenzim zaslužan za dismutaciju  $O_2^-$  u vodikov peroksid ( $O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ ); nalazi se u citosolu, mitohondrijima, peroksisomima, a kod biljnih stanica i u kloroplastima. Katalaza pak sudjeluje u dismutaciji molekule  $H_2O_2$  u vodu i kisik ( $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ ) To je tetrameran enzim koji sadrži molekulu hema, a najviše ga nalazimo u peroksisomima, gdje  $H_2O_2$  nastaje tijekom  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina (Del Río i sur., 2006). Askorbat, glutation, karotenoidi i polifenoli su neki od najvažnijih neenzimatskih antioksidansa. Askorbat je najzastupljeniji antioksidans pronađen u svim tipovima biljnih stanica i veoma je bitan za zaštitu membrana, jer reagira direktno s  $O_2^-$  i  $H_2O_2$ .

## 2.2 FENOLI

Fenolni spojevi su najvažniji u vodi topivi antioksidansi, a nalazimo ih u biljkama i u hrani (Macheix i sur., 1990). Ovi sekundarni metaboliti biljaka su karakteristični po tome što sadrže aromatski (fenolni, benzenov) prsten sa šest atoma ugljika i s jednom ili više hidroksilnih (OH) skupina ili derivata ove osnovne strukture. Upravo zbog hidroksilnih skupina i zbog nezasićenih dvostrukih veza osjetljivi su na oksidaciju, što ih čini dobrim antioksidansima (Rice-Evans i sur., 1997). Kronične bolesti kao što su arteroskleroza i rak, vodeće bolesti u zapadnim zemljama, upravo su posredovane slobodnim radikalima i lipidnom peroksidacijom (Halliwell i Gutteridge, 1990). Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva su važna kod određivanja njihove zaštitne uloge protiv slobodnih radikala te kao takvi mogu ih neutralizirati i smanjiti rizik od nastajanja mnogih bolesti. Zaštitna uloga polifenola u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja elektrona slobodnog radikala što se još naziva i antiradikalna aktivnost. Osim ove aktivnosti polifenoli pokazuju sposobnost keliranja iona prijelaznih metala ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ). To višestruko djelovanje je odgovorno za ukupnu učinkovitost polifenolnih spojeva, a sve zajedno se naziva antioksidacijska aktivnost.

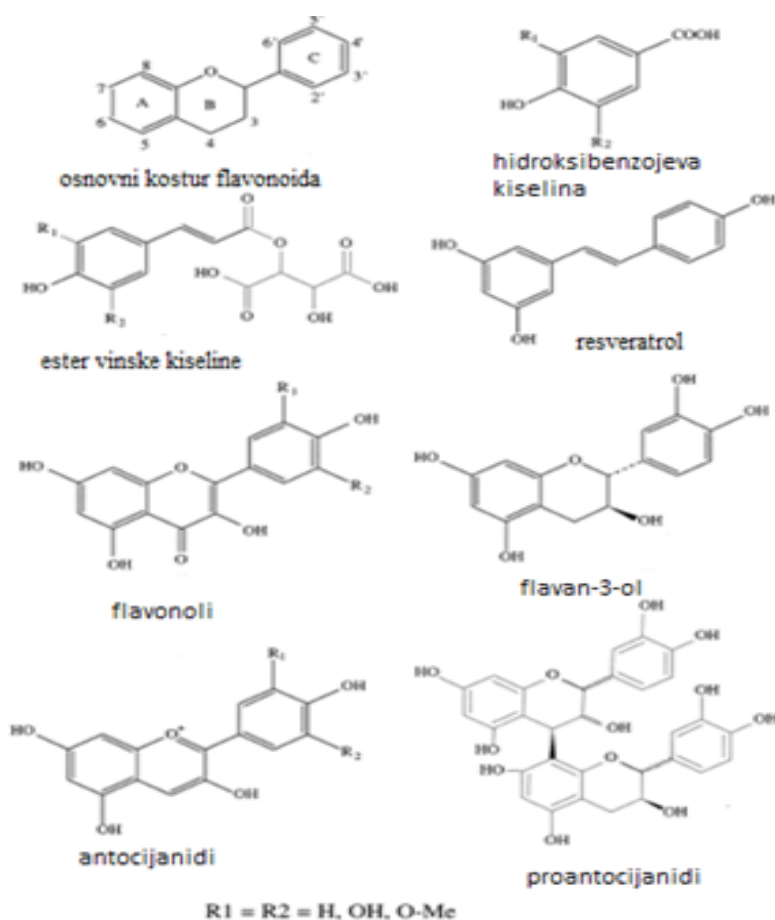
## 2.2.1 POLIFENOLNI SPOJEVI U GROŽĐU I VINU

Glavnina polifenolnih spojeva u vinu potječe iz grožđa, a manji dio može nastati radom mikroorganizama ili ekstrakcijom iz drvenih bačvi tijekom dozrijevanja vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Kennedy, 2008). Iako su u grožđu i vinu zastupljeni u niskim koncentracijama polifenolni spojevi doprinose senzorskim karakteristikama vina poput boje, okusa, gorčine i oporosti, ali i antioksidacijskog potencijala (Fischer i Noble, 1994; Soleas i sur., 1997; Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Kennedy, 2008). Niz čimbenika utječe na koncentraciju i sastav polifenolnih spojeva u vinu (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b), koji imaju baktericidno, antikancerogeno i antioksidativno djelovanje (Minussi i sur., 2003; Fernández-Pachón i sur., 2004; Cimino i sur., 2007). U prvom redu čimbenik je kultivar sa svojim biološkim potencijalom za sintezu polifenola, zatim ekološki uvjeti u kojima loza raste, primjena različitih agrotehničkih i ampelotehničkih zahvata u vinogradu, te različitih tehnika vinifikacije (Jackson i Lombard, 1993; Goldberg i sur., 1998; Yokotsuka i sur., 1999; Downey i sur., 2006).

U grožđu i vinu polifenolni spojevi zastupljeni su u dvije osnovne grupe: flavonoidi i neflavonoidi. Neflavonoidi su jednostavnije građe od flavonoida i imaju jedan fenolni prsten za razliku od flavonoida koji imaju dva fenolna prstena međusobno povezana lancem od tri ugljikova atoma (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Jackson, 2008). Predstavnici flavonoida u grožđu i vinu su flavanoli, flavanoli, flavan-3-oli i antocijanidi (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Jackson, 2008; Li i sur., 2008), a neflavonoida su fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne), te stilbeni, hidrolizirani tanini i resveratrol. Poznato je da flavonoidi onemogućuju oksidaciju LDL-a (engl. low-density lipoprotein) u *in vitro* uvjetima i time štite od kardiovaskularnih bolesti (Nijveldt i sur., 2001).

Biosinteza svih fenolnih spojeva prisutnih u vinu ima sličan biokemijski put nastanka. Sintetiziraju se putem šikiminske kiseline, te acetatnim putem (Paixao i sur., 2007; Kennedy, 2008). Koncentracija polifenolnih spojeva u grožđu raste tijekom razvoja bobice. Nakupljanje tanina i hidroksicimetnih kiselina počinje kod zametanja bobice i raste sve do pojave šare (Kennedy i sur., 2001, Downey i sur., 2003). S druge strane, akumulacija antocijanida započinje u šari i raste tijekom dozrijevanja grožđa, a u najkasnijim stadijima razvoja bobice njihova koncentracija može čak i malo opadati (Kennedy i sur., 2002). U bobici su neflavonoidni

polifenolni spojevi smješteni uglavnom u mesu, dok se flavonoidni polifenoli najvećim dijelom nalaze u kožici, sjemenkama i peteljci (Paixao i sur., 2007).



**Slika 2.** Strukture fenolnih spojeva (De Beer i sur., 2002)

Postoje velike razlike u koncentraciji i sastavu polifenolnih spojeva između crvenih i bijelih vina. De Beer i sur. (2002) navode da ukupni polifenoli kod crvenih vina variraju od 700 - 4059 mg/L, dok se kod bijelih te vrijednosti kreću od 96 - 331 mg/L. Jednako tako, velike su razlike u zastupljenosti pojedinih polifenolnih spojeva u crnim i bijelim vinima. Najvažniji polifenolni spojevi u bijelim vinima su hidroksicimne kiseline, koje kao supstrati za oksidaciju i prekursori smeđenja uvelike doprinose vizualnoj kakvoći bijelih vina (Singleton i sur., 1984; Kennedy i sur., 2006; Kennedy, 2008). U crvenim vinima su antocijani kao najbrojniji pigmenti

nosioci boje, a kroz stvaranje polimera s taninima sudjeluju i u povećanju stabilnosti boje (Robinson i sur., 1966; Gómez-Míguez i Heredia, 2004; Kennedy, 2008).

**Tablica 1.** Relativne koncentracije fenolnih kiselina i flavonoida u vinu i razlike između crvenih i bijelih vina (De Beer i sur., 2002).

FENOLNI SPOJEVI	KONCENTRACIJA(mg/L)	
	crvena vina	bijela vina
<b>NE-FLAVONOIDI</b>	<b>240-500</b>	<b>160-260</b>
hidroksibenzojeva kiselina	0-260	0-100
hidroksicinamatna kiselina	143.1(74.1-226)	130-154
resveratrol	1.2(0.09-3.2)	0.04(0-0.1)
<b>FLAVONOIDI</b>	<b>750-1060</b>	<b>25-30</b>
flavonoli	127.8(65.3-238.3)	u tragovima
flavan-3-ol	208.8(27.3-557)	11.5(2-29)
antocijani	270.9(39.4-469)	0
<b>Ukupno</b>	<b>1686.4(700-4059)</b>	<b>177.6(96-331)</b>

### 2.2.2 FLAVONOIDI

Flavonoide čine flavanoli, flavonoli, antocijanidi i proantocijanidi.

### 2.2.3 FLAVANOLI

Glavni predstavnik je flavan-3-ol i pojavljuje se u vinu, čaju, voću i čokoladi. Ova skupina spojeva razlikuje se od drugih flavonoida, jer se ne pojavljuju u obliku glikozida. Veća količina flavan-3-ola je primjećena kod crvenih vina nego kod bijelih zbog ekstrakcije iz sjemenki i kožice grožđa (González-Manzan i sur., 2009).

## 2.2.4 FLAVONOLI

Pojavljuju se u vodi i povrću, te u pićima poput vina i čaja. U pravilu se pojavljuju kao glikozidi sa šećerom vezanim na trećem atomu. Iako je glukoza uglavnom glavni šećer, može se vezati i galaktoza, arabinoza i ksiloza. Bijela vina sadrže malu količinu flavonola.

## 2.2.5 ANTOCIJANIDI

Antocijanidi i antocijani (glikolizirani derivat antocijanida) su prisutni u crvenom, plavom i ljubičastom voću i cvijeću te služe kao obrambeni mehanizam biljaka od UV oštećenja. Odgovorni su za intenzivnu boju crvenih vina. Kopigmentacija antocijanida sa drugim flavonoidima i fenolnim kiselinama doprinosi boji crvenih vina. Jedino monoglukozidi mogu biti vezani na antocijan kod crvenih vina roda *Vitis vinifera*. Samim time grožđe drugih vrsta će moći biti detektirano prisutnošću diglukozida.

Antocijani, spojevi koji nastaju putem sinteze flavonoida, odgovorni su za sve nijanse narančaste, ružičaste, crvene, plave i purpurne boje koje se javljaju u grožđu, vinu i drugim proizvodima od grožđa (Fulcrand i sur., 2006; Revilla i sur., 2010). Osim što formiraju boju crnog grožđa i vina, oni sudjeluju i u senzaciji astringencije, a mogu biti u interakciji i s nekim aromatskim spojevima, te doprinositi aromi grožđa i vina (Vidal i sur., 2004; He i sur., 2010). Obzirom da su najmnogobrojniji od svih flavonoida prisutnih u bobici, antocijani imaju mnoštvo bioloških funkcija. Odgovorni su za zaštitu od prejake insolacije i UV zračenja, za skupljanje slobodnih radikala i antioksidativni kapacitet, obranu od velikog broja patogena, kao i privlačenje predatora u svrhu rasprostranjivanja sjemenki (He i sur., 2010).

Osim toga, posljednjih desetak godina dokazani su brojni pozitivni učinci antocijana i njihovih derivata na ljudsko zdravlje. Oni uključuju skupljanje slobodnih radikala i antioksidacijsku aktivnost, antimikrobno i antivirusno djelovanje, prevenciju kardiovaskularnih oboljenja, zaštitnu ulogu od oštećenja i oboljenja jetre, antikancerogeno i antimutageno djelovanje itd. (Jing i sur., 2008; Maletić i sur., 2009). Zahvaljujući njihovoj intenzivnoj boji, dobroj topljivosti u vodi, te povoljnim biološkim svojstvima, antocijani se razmatraju kao potencijalni prirodni pigmenti koji bi mogli zamijeniti brojna sintetska bojila u proizvodnji hrane (He i sur., 2010). Strukturalno, antocijani su glikozidi i acetilirani glikozidi antocijanidina, a aglikoni (2-fenilbenzopirilij) se međusobno razlikuju po različitim hidroksi- ili metoksi- skupinama vezanim

na njihovu osnovnu strukturu (Boss i Davies, 2009). Malvidin, petunidin, delfinidin, peonidin i cijanidin su antocijanidini koji prevladavaju u većini crnog grožđa (Ribereau-Gayon i sur., 2000b). Kada se na aromatski prsten antocijanidina vežu šećeri, nastaju antocijani. Kod vinove loze postoji samo *O*-glikozilacija antocijana, a šećer koji se veže je uglavnom glukoza. Osim glukoze, šećeri koji mogu biti u sastavu antocijana su galaktoza, ramnoza, arabinoza i ksiloza. Vrsta *Vitis vinifera* je specifična, jer kod nje molekula šećera može biti vezana na navedene antocijanidine samo preko glikozidne veze na C-3 poziciji i tvoriti isključivo 3-*O*-monoglukozidne antocijane (Boss i Davies, 2009). Razlog tome leži u činjenici da *Vitis vinifera* ne posjeduje dominantni alel uključen u stvaranje diglukozidnih antocijana. Za razliku od nje, druge vrste roda *Vitis* mogu imati vezu na C-3, jednako kao i na C-5 atomu, te tvoriti 3,5-*O*-diglukozidne antocijane. Prema tome, prisutnost diglukozidnih antocijana se može koristiti za determinaciju međuvrskih hibrida, jer većina crnih francuskoameričkih hibrida sintetizira diglukozidne antocijane (Hebrero i sur., 1989; Favretto i Flamini, 2000). Diglukozidni antocijani su stabilniji nego monoglukozidni, dok monoglukozidi imaju intenzivniju boju od diglukozidnih formi (He i sur., 2010). Nadalje, mnogi antocijani imaju ostatak šećera aciliranog s aromatskim (kao što su *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska ili sinapična kiselina) ili alifatskim kiselinama (octena, jabučna, malonilna, oksalna i sukcinatna kiselina) na C-6 poziciji glukoznog dijela molekule (Nijveldt i sur., 2001).

Acilacija šećera u antocijanu također može povećati njegovu kemijsku stabilnost (He i sur., 2010). Međutim, poznato je da acilirane antocijane ne mogu proizvesti svi kultivari *V. vinifera*. Najpoznatiji primjer za to je Pinot crni koji uopće ne sintetizira acilirane antocijane, a i drugi antocijani su u relativno niskim koncentracijama (Mazza i sur., 1999). Osim toga, neki crveno obojani mutanti bijelih kultivara, kao što je crveni Chardonnay ili ružičasta Sultanina, također ne sintetiziraju acilirane antocijane, a nisu nađeni ni kod vrsta kao što su *V. rotundifolia* ili *V. amurensis*. Prema tome, pojedinačni antocijani tipični za sorte *V. vinifera* su 3-*O*-monoglukozidi i 3-*O*-acilirani monoglukozidi delfinidina, cijanidina, petunidina, peonidina i malvidina, ali ne i pelargonidina. Najzastupljeniji pojedinačni antocijan u grožđu crnih kultivara *V. vinifera* je mavidin-3-*O*-monoglukozid, varirajući od 90% (Grenache) do ispod 50% (Sangiovese) od ukupnih antocijana (Ribereau-Gayon i sur., 2000b). Kod ostalih vrsta roda *Vitis* nađeni su 3-*O*-monoglukozidi, kao i 3,5-*O*-diglukozidi svih nabrojanih antocijanidina, uključujući i pelargonidin. U posljednje vrijeme nekoliko autora navodi da je nađen i

pelargonidin-3-Oglukozid kod nekih kultivara *V. vinifera*, doduše samo u tragovima (Castillo-Munoz i sur., 2009). Čak štoviše, smatra se da njihova odsutnost u prijašnjim istraživanjima nije rezultat njihovog potpunog izostanka u kultivarima *V. vinifera*, već ekstremno niskih koncentracija, koje su redovito ispod praga detekcije. Jednako tako, potvrđena je i prisutnost tragova diglukozida u vinima dobivenim iz nekih kultivara *V. vinifera* (npr. Dornfelder) (Andersen i Markham, 2006). Kod glavnine crnih kultivara antocijani se najvećim dijelom akumuliraju u hipodermalnom sloju stanica bobice i to nakon nastupa šare (Kennedy, 2008; Boss i Davies, 2009). Nakon što dostignu maksimalne koncentracije, njihova koncentracija može i lagano opadati u kasnijim stadijima razvoja bobice (Kennedy i sur., 2002).

Neki kultivari akumuliraju visoke koncentracije antocijana i u mezokarpu bobice, a nazivaju se bojadiseri (Boss i Davies, 2009; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Osim vrste, kultivara i dozrelosti grožđa, na koncentraciju i sastav antocijana veliki utjecaj imaju i godina, ekološki uvjeti, agrotehnika i ampelotehnika itd. (Downey i sur., 2006; Yamane i sur., 2006; Guidoni i sur., 2008; Revilla i sur., 2010), zbog čega se u literaturi navode vrlo različite vrijednosti njihovih koncentracija. Osim toga, slično kao i kod flavan-3-ola, postoje velike varijacije u analitičkim protokolima i načinu ekstrakcije, te jedinicama u kojima se vrijednosti izražavaju (mg/kg svježeg ili sušenog grožđa, g/bobici, µg malvidin-3-glukozida/cm<sup>2</sup> kože itd.). Na koncentraciju antocijana u vinu, osim navedenih faktora, utječu i tehnike vinifikacije, prije svega duljina i uvjeti maceracije, te starost vina. Maksimalne koncentracije antocijana ekstrahiraju se iz kože u tekuću frakciju već nakon nekoliko dana maceracije, nakon čega dolazi do laganog pada njihovih koncentracija, zbog adsorpcije u stanične stijenke kvasaca (Nagel i Wulf, 1979; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Nakon fermentacije vrijednosti njihovih koncentracija i dalje padaju, te acilirani antocijani u potpunosti nestaju već nekoliko mjeseci nakon fermentacije. Ribéreau-Gayon i sur. (2000b) također navode prosječne vrijednosti antocijana u mladim vinima nakon fermentacije od 100 mg/L (Pinot crni) pa do 1500 mg/L (Syrah, Cabernet sauvignon itd.). Tijekom dozrijevanja i starenja vina, njihova se koncentracija nakon nekoliko godina smanjuje na svega 0-50 mg/L, što dovodi do djelomičnog gubitka boje. Naravno, samo mali dio antocijana u vinu zaista nestane, i to zbog raspadanja njihovih molekula pod utjecajem vanjskih faktora (temperatura, svjetlost, kisik itd.) ili taloženja. Ostatak antocijana se, zbog slabe stabilnosti i sklonosti oksidaciji pojedinačnih molekula, vežu međusobno ili s drugim spojevima vina, te na taj način povećavaju stabilnost boje. Ti mehanizmi uključuju kratkoročne, što su njihovo



međusobno vezanje i kopigmentacija, te dugoročne faktore, kao što je polimerizacija s flavan-3-olima i procijanidinima, te formiranje novih pigmenata – piranoantocijana i polimernih antocijana (Boulton i sur., 2001; Jackson, 2008; Boss i Davies, 2009).

Nijansa i stabilnost boje crnih vina uvelike ovise o pH i koncentraciji sumpornog dioksida u vinu. U mladim crnim vinima antocijani su u dinamičkoj ravnoteži pet molekularnih stanja, od kojih je jedan vezan na sumporni dioksid, dok su ostala četiri u slobodnim formama (Jackson, 2008). Većina tih formi je bezbojna, osim u mediju s pH tipičnim za vino. Crvena boja vina dolazi najvećim dijelom iz malih koncentracija antocijana u flavilium stanju, čije koncentracije ovise o pH i sadržaju slobodnog sumpornog dioksida. Niski pH povećava koncentraciju flavilium stanja i doprinosi crvenoj boji, te usporava hidrolizu molekule antocijana, a kako pH raste, tako intenzitet boje i koncentracija antocijana u flavilium stanju ubrzano pada. S druge strane, vezanjem na molekule sumpornog dioksida antocijani gube boju, tako da je koncentracija slobodnog sumpornog dioksida faktor koji, iako reverzibilno, najviše utječe na intenzitet boje mladih crnih vina (Jackson, 2008).

Ekološki uvjeti, gledani prije svega kroz svjetlost, temperaturu i vlažnost, od velike su važnosti za akumulaciju antocijana u bobici. Spayd i sur. (2002) su proučavajući utjecaj svjetlosti i temperature na kemijski sastav bobice Merlota primijetili da je izloženost sunčevoj svjetlosti povećala koncentraciju ukupnih antocijana u kožici, čak i u grozdovima kojima su namjerno spuštali temperaturu. S druge strane, u grozdovima u kojima je temperatura povremeno prelazila 40 °C zabilježen je pad koncentracije ukupnih antocijana. Smatra se da više temperature (iznad 30 °C) ne utječu značajno na transkripciju u putu biosinteze antocijana, ali uzrokuju redukciju nakupljanja antocijana u kožici bobice, najvjerojatnije kroz povećanje kemijske degradacije antocijana (Boss i Davies, 2009; He i sur., 2010).

U bobicama kultivara Cabernet sauvignon i Grenache koncentracija antocijana rasla je linearno s izloženošću sunčevoj svjetlosti na hladnijoj sjevernoj strani reda, ali je padala kad je na toplijoj južnoj dosegla 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  (Bergqvist i sur., 2001). S druge strane, zasjenjivanje grozdova Shiraza neprozirnim kutijama u dvije od tri eksperimentalne godine nije utjecalo na akumulaciju antocijana (Downey i sur., 2003). Tarara i sur. (2008) iznose da slaba izloženost sunčevoj svjetlosti sama za sebe ne smanjuje akumulaciju antocijana, ali kombinacija slabe osvjetljenosti i izrazito visokih temperatura vodi do smanjivanja koncentracije ukupnih

antocijana u bobici, dok umjerene temperature bobice, bez obzira na osvjetljenje, uzrokuju porast koncentracije antocijana u bobici.

Iz svega navedenog može se zaključiti da temperatura općenito ima veći utjecaj na nakupljanje antocijana nego svjetlost, te da je zajednički utjecaj svjetlosti i temperature na akumulaciju antocijana u bobici vrlo kompleksan, pozitivnog predznaka kod umjerenih temperatura i potencijalno inhibitornog djelovanja kod temperaturnih ekstrema. Kataoka i sur. (1984) sugeriraju da uz sve navedeno u obzir treba uzeti i utjecaj kultivara na sintezu antocijana. Naime, zasjenjivanje grozdova kultivara Kyoho tijekom dozrijevanja inhibiralo je aktivnost enzima fenilalanin amonij liaze (PAL) i sintezu antocijana u bobici, dok je isti zahvat proveden na kultivaru Super hamburg utjecao vrlo malo ili uopće nije utjecao na aktivnost PAL i sintezu antocijana. Kad se govori o utjecaju vlažnosti na akumulaciju antocijana u bobici, većina autora se slaže da dozrijevanje grožđa u uvjetima nedostatne vlažnosti stimulira biosintezu antocijana, rezultirajući povećanjem njihove akumulacije. Naknadnom dehidracijom bobice se akumulirani antocijani mogu još dodatno koncentrirati (Kennedy i sur., 2002; Ojeda i sur., 2002; He i sur., 2010). Naravno, postoje i istraživanja koja su dala oprečne rezultate. Esteban i sur. (2001) su tijekom dvije godine navodnjavali lozu u periodu dozrijevanja i dobili povećani sadržaj nekoliko antocijana u berbi, kao i veću težinu bobice, te povećani prinos.

Jednako kao kod temperature, i kod radova koji uključuju utjecaj vlažnosti na sintezu i nakupljanje antocijana postoje teškoće u interpretaciji rezultata i donošenja generalnih zaključaka. Naime, promjene vlažnosti redovito mijenjaju fiziologiju loze, te uzrokuju promjene u veličini bobice, prinosu i bujnosti, što u konačnici dovodi i do promjena u izloženosti bobica svjetlosti. Uz to, interpretaciju rezultata otežavaju i genetske razlike među kultivarima, prvenstveno glede njihove otpornosti na vodeni stres (Boss i Davies, 2009).

## 2.2.6 PROANTOCIJANIDI

Grupa su kompleksnih flavonoida prirodno prisutnih u žitaricama, nekom voću, vinu i čaju. Struktura ove grupe spojeva sadrži flavon-3-ol jedinicu povezanu na četvrtom i osmom položaju, odnosno na četvrtom i šestom položaju. Procijanidni dimeri poput procijanina B1, B2, B3 i B4 pojavljuju se u vinu kao i mala količina trimera poput C1, T2 i tetramera (Bagchi i sur., 2000).

### 2.2.7 NEFLAVONIDI

Neflavonoidi preventivno pridonose boji bijelih vina, iako kemijski značaj nije u potpunosti razjašnjen. U neflavonoide spadaju fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), hidrolizirani tanini i resveratrol.

### 2.2.8 FENOLNE KISELINE

Dvije osnovne grupe fenolnih kiselina u grožđu i vinu su hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. One su smještene u staničnim vakuolama mesa i kože, te se prešanjem lako ekstrahiraju u mošt, odnosno vino, zbog čega nema velikih razlika u koncentraciji između crnih i bijelih vina (Singleton i Trousdale, 1992; Kennedy i sur., 2006).

Hidroksicimetne kiseline u grožđu se ne nalaze u slobodnoj formi, već su vezane u estere s vinskom kiselinom, iako se mogu vezati i sa šećerima i drugim organskim kiselinama (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Jackson, 2008). Najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u grožđu i vinu su cimetna, kutarinska i fertarinska kiselina, što su tartaratni esteri cimetne, p-kumarinske i ferulinske kiseline (Boulton i sur. 1998; Jackson, 2008). Kako uslijed prerade grožđa dolazi do hidrolize, dio hidroksicimetnih kiselina se oslobodi od tartaratnog dijela, te ih se u moštu i vinu može naći i u obliku cimetne, p-kumarinske i ferulinske kiseline, međutim još uvijek u vrlo niskim koncentracijama. Daljnjim dozrijevanjem i čuvanjem vina povećava se i stupanj hidrolize, te se iz tartaratnih estera mogu osloboditi veće količine slobodnih formi hidroksicimetnih kiselina (Somers i sur., 1987; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Romeyer i sur. (1983) opisali su promjene koje se događaju s hidroksicinamatima tijekom razvoja i dozrijevanja bobice. Tartaratni esteri hidroksicimetnih kiselina počinju se u bobici nakupljati tijekom i nakon cvatnje, a najviše koncentracije dosežu prije šare. Nakon toga njihova koncentracija lagano pada i na toj razini zadržuje se tijekom dozrijevanja bobice, sve do berbe. Smatra se da do tog pada koncentracije hidroksicimata tijekom dozrijevanja dolazi zbog njihovog katabolizma, te zbog njihovog korištenja u biosintezi drugih polifenolnih spojeva. Glavnina hidroksicimetnih kiselina se kod većine kultivara *Vitis vinifera* nalazi u stanicama mesa. Hipodermalne stanice također sadrže hidroksicinamate, međutim zbog značajno većeg udjela mezokarpa u cjelokupnoj masi bobice, promjene koje se događaju tijekom razvoja i dozrijevanja bobice obično se povezuju s

promjenama u mezokarpu (Adams, 2006). Njihove koncentracije u vinu ovise o mnogo faktora kao što su kultivar, klimatski uvjeti, agro i ampelotehnički zahvati u vinogradu, rok berbe, uvjeti vinifikacije itd., pa ne čudi da se u literaturi nalaze vrlo različiti podaci o njihovoj zastupljenosti u vinu. Singleton i sur. (1986), na temelju analize mošta 37 različitih *Vitis vinifera* kultivara, navode vrijednosti koje variraju od svega 16 mg/L, pa sve do 430 mg/L, s prosječnom vrijednosti od 145 mg/L mošta. Moreno-Arribas i Polo (2009) pak navode prosječne vrijednosti od oko 100 mg/L za crna i za bijela vina. Gore navedene koncentracije vrijede u slučajevima kad su moštovi zaštićeni od pojave oksidacije, jer iako bezbojne u alkoholnoj otopini, hidroksicimetne kiseline (posebno cimetna) su primarni supstrati za polifenoloksidaze, te su odgovorni za oksidaciju i posmeđivanje bijelih moštova (Cheynier i sur., 1989; Cilliers i Singleton, 1990; Jackson, 2008). Također se kod proizvodnje suhica uslijed oksidacije kaftarinske kiseline pojavljuje posmeđivanje bobica, posebno ako je tkivo bobice oštećeno (Singleton i sur., 1985). Razlog tome je enzimatska oksidacija do koje dolazi kad uslijed fizičkog oštećenja staničnog tkiva (kod berbe, napada sive plijesni ili muljanja i prešanja grožđa) kada fenoli dođu u kontakt s kisikom i dvjema grupama enzima, polifenoloksidaze i peroksidaze, koji pretvaraju fenole u kinone, a oni zatim mogu polimerizirati u smeđe pigmente, melanine (Sapis i sur., 1983; Singleton, 1990). To dovodi do značajnih promjena u boji i aromi vina, te u konačnici umanjuje njegovu kakvoću (Sapis i sur., 1983). Isti autori, proučavajući potencijal posmeđivanja velikog broja crnih i bijelih kultivara kroz dvije godine, zaključili su kako posmeđivanje grožđa uvelike ovisi o kultivaru, odnosno o koncentraciji supstrata za polifenoloksidaze, iako su one prisutne u grožđu svih istraživanih kultivara. Dakle, prema koncentraciji supstrata za oksidaciju, što su najvećim dijelom hidroksicimetne kiseline, kultivari se mogu podijeliti na one osjetljive, te više ili manje rezistentne na posmeđivanje. Cilliers i Singleton (1990) navode da se reakcije oksidativnog posmeđivanja mogu događati čak i u odsustvu aktivnih polifenoloksidaza tijekom prerade i čuvanja vina. Glavni supstrat ove neenzimatske oksidacije je cimetna kiselina, koja se djelovanjem pektinaza hidrolizira do kafeinske kiseline, a ona je glavni spoj koji pridonosi posmeđivanju bijelih vina. To potkrijepljuju činjenicom da je nađena jaka korelacija između posmeđivanja vina i kafeinske kiseline utrošene tijekom reakcija oksidacije. Kako je oksidacija kafeinske kiseline pod velikim utjecajem pH i temperature, te se sa svakim povišenjem temperature i/ili pH bitno povećava i koncentracija produkata oksidacije u vinu, navedene reakcije smatraju glavnim razlogom za brzo starenje vina iz vrućih vinogradarskih regija. U

malim koncentracijama, oksidirani derivati cimetine i kutarinske kiseline mogu doprinijeti poželjnoj žuto-zlatnoj nijansi bijelih vina, dok jednaka koncentracija u crvenim vinima bude maskirana prisutnošću antocijana i procijanidina (Jackson, 2008). S druge strane, hidroksicimetine kiseline se vežu s antocijanima te sudjeluju u kopigmentaciji, tako da više koncentracije hidroksicimernih kiselina u crvenim vinima doprinose intenzivnijoj obojenosti crvenih vina (Boulton i sur., 2001; Pérez-Magariño i González-San José, 2005). Osim što svojom sklonošću oksidaciji i kopigmentacijom mogu utjecati na boju vina, a pridonose i trpkoci vina (Nagel i Wulf, 1979; Hufnagel i Hofmann, 2008), hidroksicimetine kiseline mogu utjecati i na miris vina. Naime, one su prekursori u nastajanju hlapljivih fenola, spojeva koji, iako su u vinu prisutni u najnižim koncentracijama od svih polifenolnih spojeva, uvelike doprinose olfaktornim karakteristikama vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Nastaju dekarboksilacijom hidroksicimernih kiselina djelovanjem kvasaca iz roda *Brettanomyces* i *Dekkera sp.*, a u manjoj mjeri i nekih bakterija ili čak kvasca *Saccharomyces cerevisiae* tijekom alkoholne fermentacije (Chatonnet i sur., 1995). U crvenim vinima su najzastupljeniji etil-fenol i etil-gvajakol, koji u malim koncentracijama doprinose kompleksnosti mirisa, ali već u koncentracijama od 600 – 700 µg/L njihov se miris opisuje kao animalni, miris staje, konjskog znoja i sl. (Chatonnet i sur., 1995; Ribéreau-Gayon i sur., 2000b). Uz bijela vina veže se pojava vinil-fenola i vinil-gvajakola, koji su u malim koncentracijama također poželjni, ali čim njihova koncentracija prijeđe prag detekcije, javlja se neugodan miris na lijekove, medicinski ili farmaceutski miris (Chatonnet i sur., 1995; Ribéreau-Gayon i sur., 2000b).

Hidroksibenzojeve kiseline su druga skupina fenolnih kiselina, a u grožđu i vinu su zastupljene u znatno nižim koncentracijama nego hidroksicimetine kiseline. Uključuju sedam različitih kiselina, a to su p-hidroksibenzojeva kiselina, protokatehinska, vanilinska, galna, siringinska, salicilna i gentizinska kiselina (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Moreno-Arribas i Polo, 2009; Tian i sur., 2009). U grožđu su prisutne uglavnom u obliku glukozida iz kojih se u kiselom mediju oslobađaju putem hidrolize, te estera s flavan-3-olima (galni i elaginski tanini) koji hidroliziraju u lužnatom mediju (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b). U vinima, a posebno crvenim, zbog navedenih hidroliza prevladavaju slobodne forme hidroksibenzojevih kiselina (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Monagas i sur., 2005), a najzastupljenija je galna (Monagas i sur., 2005; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Vina koja dozrijevaju u hrastovim bačvama sadrže povećanu koncentraciju derivata hidroksibenzojeve kiseline. Topivi derivati ovih komponenti

imaju jednu alkoholnu grupu esterificiranu s vinskom kiselinom te ujedno mogu biti glikolizirane i acilirane na raznim pozicijama. Najvažnija je elaginska kiselina, koja se sastoji od dvije molekule galne kiseline, koja pojačava boju crvenih vina tako što reagira kao kopigment s antocijaninima.

Hidrolizirani tanini potječu iz hrastovih bačvi. Ovi fenoli se sastoje od galne i elaginske kiseline sa vezanom glukozom ili nekim drugim šećerom. Upravo zbog te esterske veze ih opisujemo kao tanine podložne hidrolizi.

### 2.2.9 STILBENI

Stilbeni su spojevi koji se sintetiziraju u bobici kao reakcija biljke na stres (npr. napad patogena ili UV zračenje), te tijekom vinifikacije prelaze u mošt, odnosno vino. Obzirom na svoj antioksidativan, antikancerogen i antimutagen potencijal, imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Oni su derivati cimetne kiseline, a sastoje se od dva benzenska prstena vezana etanskim ili ponekad etilenskim lancem (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Najznačajniji i najviše proučavan stilben je trans-resveratrol. Sintetizira se u kožici bobice, dok ga u mezokarpu nema ili je zastupljen u vrlo niskim koncentracijama (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Resveratrol se nalazi u hrani poput sjemenki i kožici grožđa, a nastaje kao posljedica okolišnog stresa ili gljivičnog oboljenja. Njegova je koncentracija do deset puta veća u crvenim (oko 5 mg/L) u odnosu na bijela vina, te je odgovoran za smanjenje rizika raznovrsnih oboljenja, a ponajviše kroničnih bolesti poput raka i kardiovaskularnih bolesti. Mehanizam djelovanja resveratrola nije do kraja objašnjen. Neka istraživanja uporabu resveratrola dovode u vezu s produženjem životnog vijeka testiranih životinja. Pretpostavlja se da bi jedan od načina djelovanja mogao biti utjecaj na funkciju mitohondrija te zaštita stanične opne i staničnih struktura od propadanja uslijed oksidacije (Gambuti i sur., 2004; Perrone i sur., 2007).

Osim njega, u grožđu su identificirane oligomerne i polimerne forme, koje se nazivaju viniferini. One nastaju oksidativnom polimerizacijom monomernog resveratrola aktivnošću peroksidaze (Jean-Denis i sur., 2006). Koncentracije stilbena u vinu variraju i ovise o mnogim faktorima, kao što su klima, kultivar, infekcija patogenima (Jeandet i sur., 1995; Perrone i sur.,

2007), te enološkim postupcima u podrumu (Gambut i sur., 2004). Čini se da starenje vina nema velikog utjecaja na koncentraciju stilbena (Jeandet i sur., 1995). Crvena vina obično sadrže veće koncentracije stilbena nego rose ili bijela vina, zbog duljeg kontakta kožice i tekuće frakcije tijekom fermentacije, te općenito većeg sadržaja fenola kod crnih kultivara (Perrone i sur., 2007). Ribéreau-Gayon i sur. (2000b) navode vrijednosti od 1 - 3 mg/L.

## 2.3 BIOLOŠKE AKTIVNOSTI FLAVONOIDA

### 2.3.1 ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE

Upotreba flavonoida protiv infekcija uzrokovanih bakterijama, gljivicama i protozoama ima dva cilja: 1. ubiti stanice bakterija; 2. suzbiti širenje i učinke bakterijskih toksina (Havsteen, 2002). Upravo flavonoidima su uništeni mnogi iako ne svi bakterijski sojevi sa kojima ljudi dolaze u kontakt. Mnogi flavonoidi kao što su apigenin, galangin, flavonski i flavonolski glikozidi, izoflavoni, flavanoni i kalkan pokazuju snažnu antibakterijsku aktivnost. Bakterije nemaju mnoge enzime poput lipoksigenaza i cAMP fosfodiesteraza koji se nalaze u eukariotima i koji su važna mjesta djelovanja flavonoida. Stoga flavonoidi djeluju antibakterijski inhibirajući ionske kanale i metalo-enzime koji su zajednički i bakterijama i životinjskim stanicama. Njihovo antimikrobno djelovanje može biti povezano i sa njihovom sposobnošću da inaktiviraju mikrobne adhezine, enzime i transportne proteine stanične membrane stvaranjem kompleksa sa proteinima bakterija vodikovim i kovalentnim vezama te hidrofobnim učinkom. Antibakterijski flavonoidi imaju najvjerojatnije višestruke stanične ciljeve, a ne pojedina specifična mjesta djelovanja (Kumar i Pandey, 2013).

### 2.3.2 PROTUTUMORSKO DJELOVANJE

Rak je naziv za grupu bolesti uzrokovanih kombinacijom endogenih i egzogenih faktora koji dovode do nekontrolirane stanične diobe odnosno transformacije normalnih stanica u tumorske. Stanice raka ne reagiraju na signale koji inače kontroliraju ponašanje normalnih stanica stoga one nekontrolirano rastu i dijele se. Rak se smatra preventivno izlječivom bolešću budući da se stilom života može utjecati na dosta čimbenika koji uzrokuju oboljenje. Tako mnoge studije pokazuju da polifenolni antioksidansi, kao što su flavonoidi u crvenom vinu,

zajedno s antioksidansima iz maslinova ulja i svježega voća i povrća smanjuju rizik od kroničnih bolesti osobito raka. Flavonoidi djeluju na veliki broj regulacijskih mehanizama u organizmu kao što su regulacija rasta, dioba stanica, apoptoza, transkripcija, popravak gena, energija metabolizma, upale i odgovori na stres (Havsteen, 2002). Zbog tih različitih učinaka flavonoida na metabolizam tumorskih stanica teško je racionalizirati njihove učinke na nekoliko osnovnih i specifičnih mehanizama. Međutim, mogu se izdvojiti 4 glavna mehanizma kojima flavonoidi sprječavaju nastanak ili daljnje širenje tumora:

1. antioksidativna aktivnost
2. regulacija proteina p53
3. inhibicija aktivnosti protein kinaza
4. apoptoza.

### 2.3.3 PROTUUPALNO DJELOVANJE

Upala je biološki proces koji se javlja kao odgovor na ozljedu tkiva, mikrobnu patogenu infekciju ili kemijsku iritaciju. Organizam se koristi procesom upale za uklanjanje štetnih podražaja i kako bi pokrenuo proces ozdravljenja. Kad dođe do upale, kemikalije iz bijelih krvnih stanica se otpuštaju u krvi ili oštećeno tkivo kako bi zaštitile tijelo od stranih tvari. Ovo otpuštanje kemikalija povećava protok krvi u području ozljede ili infekcije što dovesti do crvenila i topline. Neke od kemikalija uzrokuju istjecanje tekućine u tkivo, a to pak dovodi do oteklina. Ovaj zaštitni postupak može stimulirati živce i uzrokovati bol. Progresivno uništavanje tkiva u nedostatku upale bi ugrozilo opstanak organizma. U normalnim uvjetima upala je brz i samoograničavajući proces, ali kada upala nije regulirana i kada se vrijeme upale produži dolazi do brojnih kroničnih oboljenja. Imunološki sustav može se modificirati prehranom, farmakološkim tvarima i zagađivačima okoliša. Pojedini flavonoidi značajno utječu na funkciju imunološkog sustava i upalnih stanica. Klasični primjer brzog lijeka pomoću flavonoida je liječenje upale grla i povišena tjelesne temperatura s etanolnim ekstraktom propolisa. Neki flavonoidi poput hesperidina, apigenina, luteolina i kvercetina posjeduju protuupalne i analgetičke učinke. Flavonoidi mogu inhibirati izoforme inducibilne dušikov-oksida sintaze, ciklooksigenaze, lipooksigenaze, koji su odgovorni za proizvodnju velike količine dušikovog



oksida, prostanoida, leukotriena i drugih medijatora upalnog procesa kao što su citokini, kemokini, ili adhezijske molekule (Kumar i Pandey, 2013). I bol i groznica su rezultat slanja kemijskih signala iz ozlijeđenog tkiva u mozak (Havsteen, 2002). Eikosanoidi, spojevi koji se sintetiziraju iz arahidonske kiseline su spojevi koji otpuštaju te kemijske signale. Flavonoidi inhibiraju biosintezu eikosanoida i tako djeluju protuupalno. Citokini su polipeptidi ili glikopeptidi, koji prenose informacije među stanicama i važni su medijatori upalnih procesa. Postoje proinflammatorni i antiinflammatorni citokini. Upalni citokini aktiviraju koagulaciju i inhibiraju fibrinolizu odnosno razgradnju ugruška što može rezultirati difuznim oštećenjem endotela kapilara, s posljedičnom disfunkcijom brojnih organa i smrću. Za razliku od toga protuupalni citokini slabe upalne procese inhibirajući stvaranje upalnih citokina. Flavonoidi utječu na biosintezu i proinflammatorni i antiinflammatorni citokina i na taj način reguliraju upalne procese.

#### 2.3.4 PROTUVIRUSNO DJELOVANJE

Flavonoidi mogu utjecati na različite stadije replikacijskog ciklusa virusa. Na primjer neki flavonoidi utječu na intracelularnu replikaciju virusa, dok drugi inhibiraju infekcijska svojstva virusa. Pokazalo se da kvercetin inhibira i infekcije i replikaciju virusa. Herpes simplex virus, adenovirus, respiratorni sincicijski virus i virus parainfluence su virusi na koje flavonoidi mogu utjecati (Nijveld i sur., 2001). Različite kombinacije flavona i flavonola su pokazale sinergizam tako kempferol i luteolin pokazuju sinergetički učinak protiv herpes simplex virusa. Sinergizam se javlja i između flavonoida i drugih antivirusnih tvari. U posljednjih dvadeset godina se istražuje antivirusni učinak flavonoida na HIV. Međutim ta su istraživanja uglavnom bila *in vitro* i zbog toga nema dokaza o pozitivnom djelovanju flavonoida kod ljudi oboljelih od HIV-a (Kumar i Pandey, 2013).

#### 2.4 OKSIDACIJA I LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Oksidacija je kemijska reakcija u kojoj dolazi do prijenosa elektrona ili vodika sa supstance na oksidativni agens pri čemu nastaju slobodni radikali. Oksidacija unutar stanica je blisko povezana i nerazdvojiva s mehanizmom oksidacije nusproizvoda u stanicama. Oksidativni stres se odnosi na neravnotežu između oksidiranih nusproizvoda i antioksidacijskog obrambenog

mehanizma (Davies, 1995). Četiri endogena sustava pridonose produkciji oksidansa u stanici, a to su mitohondrijska energijska proizvodnja, aktivnost fagocitnih stanica, peroksisomalni mehanizam masnih kiselina i metabolizam određenih enzima. Egzogeni izvori poput viška željeza ili bakra te izlaganje okolišnim toksinima i kancerogenima poput dima cigareta pridonose oksidativnom stresu. Najvažniji oksidansi u stanicama su vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikal ( $\bullet OH$ ) i dušikov oksid radikal ( $\bullet NO$ ). Od svih radikala ( $\bullet OH$ ) je najreaktivniji i stoga će reagirati drugim molekulama u blizini svog nastanka, ukoliko mehanizam za neutraliziranje radikala nije dostupan (Davies, 1995).

Ionizirajuće zračenje dovoljno je velike energije da može uzrokovati razmjještanje elektrona unutar atoma, a ako se to dogodi na molekuli vode nastanu slobodni radikali kisika procesom koji nazivamo radioliza. Iz vode najprije nastane hidroksil, zatim vodikov peroksid te superoksid, pri čemu se u svakom koraku izgubi po jedan elektron. Vodikov peroksid može revertirati u hidroksil primanjem elektrona s iona željeza Fentonovom reakcijom, a željezo se nakon toga obnavlja primanjem elektrona sa superoksidnog radikala (Pecorino, 2012). Slobodni radikali kisika također nastaju i prirodno u stanici njenim aerobnim metabolizmom, odnosno na mitohondrijskim membranama za transport elektrona (Ambrosio i sur., 1993). Ti slobodni radikali češće oštećuju mitohondrijsku DNA koja je puno bliže mjestu njihova nastanka nego jezgrena DNA, a također i zato što ne sadrži zaštitne histone i ima manje efikasne mehanizme popravka. Oštećenja mitohondrijske DNA često su povezana s neurodegenerativnim bolestima. Kada se količina slobodnih radikala kisika u stanici znatno poveća te premašuje mogućnosti obrambenih mehanizama, kažemo da je stanica u stanju oksidativnog stresa (Sharma i sur., 2012)

Lipidna peroksidacija je autooksidacijski proces, a označava reakciju između atmosferskog kisika i organske molekule, sa štetnim učincima na hranu i metaboličke procese stanica te je uz slobodne radikale jedan od glavnih uzročnika kroničnih bolesti (Chan, 1987). U hrani može dovesti do užeglosti i gubitka nutritivne vrijednosti, a u stanicama je povezana s mnogim oštećenjima i citotoksičnošću. To je posljedica promjene u membranskoj strukturi i fluidnosti, povećanoj permeabilnosti membrane i oštećenja biološki važnih molekula poput DNA i proteina što dovodi do pojave ranije spomenutih kroničnih bolesti.

## 2.5 TAMNJENJE VINA

Tamnjenje vina je jedan od glavnih problema koji nastaje za vrijeme vinifikacije i značajno utječe na senzorska svojstva vina kao što su gubitak boje, arome, okusa i gubitak nutritivne vrijednosti. Sumporov dioksid se koristi kao antioksidans za kontrolu tamnjenja vina i kao sredstvo sa antimikrobnim djelovanjem, no može izazvati alergijske reakcije (Li i sur., 2008). Ujedno dodatak SO<sub>2</sub> utječe na kvalitetu vina i pri većim koncentracijama može dati vinu nepoželjnu aromu te može doći do zamućenja vina tijekom skladištenja. Iz tog razloga se počinju koristiti druga sredstva koja mogu zamijeniti SO<sub>2</sub>. Jedno od tih sredstava je askorbinska kiselina znana kao vitamin C te njezini optički izomeri. Koriste se kao antioksidansi, posebno pri proizvodnji bijelih vina, primarno zbog njihovih reducirajućih svojstava (Bradshaw i sur., 2001). Međutim, sve više studija pokazuje da askorbinska kiselina ima pro-oksidacijska svojstva više nego antioksidacijska svojstva. Ukoliko askorbinsku kiselinu koristimo u kombinaciji s SO<sub>2</sub> tada može doći do ubrzane potrošnje SO<sub>2</sub> i proizvodnje žutih pigmenata što dovodi do tamnjenja vina (Bradshaw i sur., 2004). Neki metalni ioni, SO<sub>2</sub>, organske kiseline, etanol te fenolni spojevi prisutni u vinu su podložni oksidaciji, a među njima su fenolni spojevi najodgovorniji za tamnjenje vina (Junquera i sur., 1992). Međutim, oksidacija fenola je veoma složen proces i prvenstveno ovisi o konformaciji fenola. Tamnjenje vina možemo podijeliti u enzimsko i neenzimsko tamnjenje. Enzimsko tamnjenje se prvenstveno pojavljuje u moštu, dok se neenzimsko pojavljuje u moštu i vinu.

### 2.5.1 ENZIMSKO TAMNJENJE

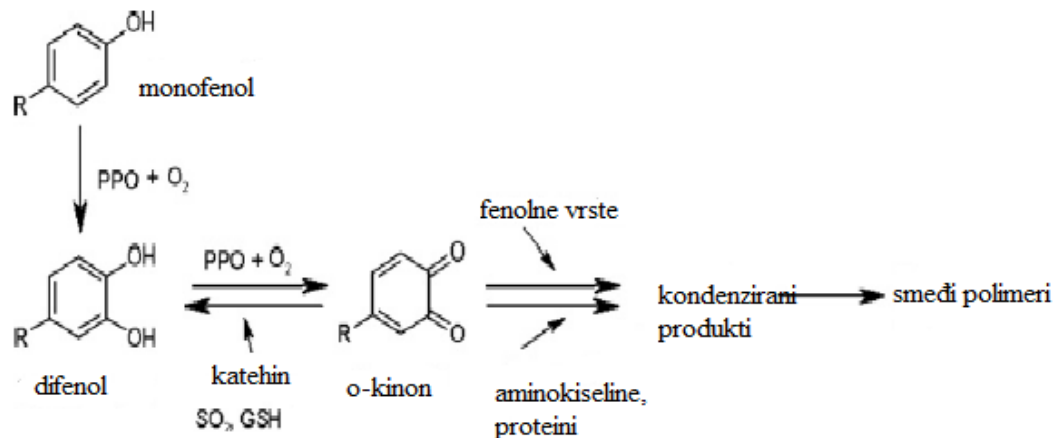
Enzimsko oksidacija fenola, posebice u prisutnosti atmosferskog kisika i polifenoloksidaze je jedna od prvih faza poznatih kao uzrok tamnjenja. U neoštećenim stanicama svježeg voća i povrća, fenoli su smješteni u vakuolama, dok su oksidoreduktaze smještene u citoplazmi čime je onemogućen njihov kontakt. Enzimsko tamnjenje se pojavljuje tek nakon što se stanice oštete (Wang, 1990). Glavne oksidoreduktaze odgovorne za enzimsko tamnjenje su polifenoloksidaze i peroksidaze (Li i sur., 2005). Polifenoloksidaza je enzim koji sadrži bakar i ima mogućnost oksidacije supstrata karakterističnih za tirozinazu i lakazu (Danilewicz, 2003). Tirozinaza je prirodno prisutna u bobicama grožđa i katalizira oksidaciju monofenola i o-

difenola, dok je lakaza dobivena iz plijesni i ima mogućnost oksidiranja raznih supstrata (Du Toit, 2006). Polifenolperoksidaza je enzim koji sadrži željezo i njegova aktivnost ovisi o raspoloživom vodikovom peroksidu u mediju (Danilewicz, 2007).

U bobicama grožđa, enzimsko tamnjenje je povezano s koncentracijom hidroksicinemata poput cimetine kiseline i kutarinske kiseline. Cimetnu kiselinu oksidira polifenoloksidaza do cimetno-vinske kiseline o-kinona (CTAQ), koji je snažni oksidans i može oksidirati druge komponente u vinu što povodi do promjene boje vina. Prvenstveno provodi reakciju hidroksilacije monofenola u o-difenole i difenole u o-kinone, te potom dolazi do brze reakcije oksidacije kinona s nekom drugom fenolnom molekulom što dovodi do nastanka dimera ili regeneracije izvornih fenola (Cheynier i sur., 1989; Oszmianski i sur., 1996). Nastali kinoni mogu ujedno i polimerizirati i kondenzirati s mnogim drugim fenolima i nefenolima. Na taj način formiraju smeđe pigmente što je izraženije pri višim pH vrijednostima. Kao oksidans, o-kinoni mogu oksidirati gotovo bilo koji supstrat poput fenola, askorbinske kiseline, SO<sub>2</sub> te se takvi kinoni onda reduciraju u svoje početno fenolno stanje. Kao elektrofilni mogu reagirati i s amino derivatima i vodom.

Glutation će utjecati na proces oksidacije mošta reagirajući s cimetno-vinskom kiselinom o-kinona (CTAQ) pri čemu nastaje 2-S-glutationil cimetna kiselina (GRP). GRP ne može biti oksidiran s tirozinazom čime se limitira oksidacijsko tamnjenje. To znači da više GRP-a može vezati kinone proizvedene tijekom enzimske oksidacije i na taj način smanjiti količinu smeđih pigmenta (Rigaud i sur., 1991; Singleton i Cilliers, 1995). S druge strane interakcija između tirozinaze i SO<sub>2</sub> može spriječiti produkciju GRP-a što omogućava više slobodne cimetine i kutarinske kiseline.

Bakar također reagira s glutationom i u kompeticiji je s CTAQ te ponekad smanjuje količinu glutaciona i pojačava tamnjenje mošta (Cheynier i sur., 1989). Nisu sve enzimske oksidacije koje se pojavljuju u bijelom grožđu loše za konačni produkt. Primjer toga je hiperokigenation koji smanjuje tamnjenje vina na dva načina, nestanak tirozinaze i trošenje fenolnih supstrata tijekom oksidacijskih reakcija pri čemu nastaje glutation koji je rezistentan na daljnje tamnjenje. Kao rezultat nastaje vino s niskim sadržajem polifenola i visokim sadržajem glutaciona. Takvo vino je stabilnije i manje podložno tamnjenju.



**Slika 3.** Mehanizam enzimskog tamnjenja (Li i sur., 2008)

## 2.5.2 NEENZIMSKO TAMNJENJE VINA

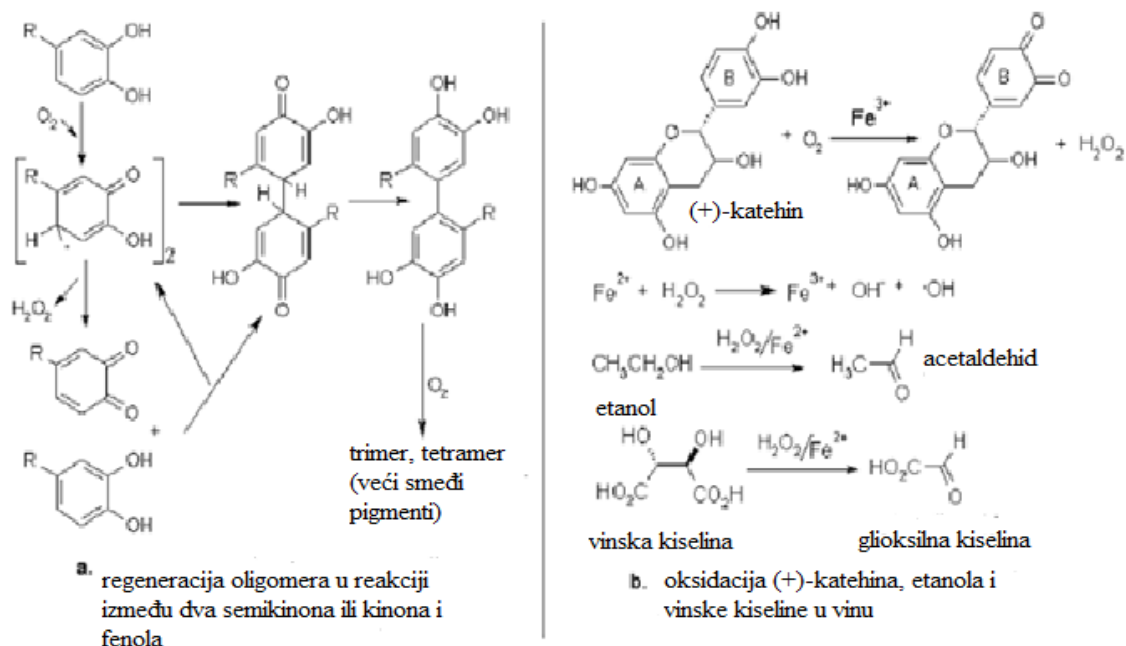
Neenzimska oksidacija, zvana i kemijska oksidacija, prevladava u vinu s karakteristikama regeneracije i autokatalize, kao i kod vina koja direktno reagiraju sa svjetlom (Main, 1992). O-difenoli, posebice cimetna kiselina, njegovi esteri, katehin te galna kiselina se smatraju najpodložnijima oksidaciji u neenzimskim reakcijama. Neenzimsko tamnjenje može nastati iz više različitih puteva povezanih s fenolima, a jedan od njih je oksidacija fenola te potom polimerizacija oksidiranih produkata. Drugi putevi uključuju polimerizaciju između polifenola i drugih komponenti prisutnih u vinu, uključujući kondenzaciju s acetaldehidom ili glioksilnom kiselinom.

### 2.5.2.1 NEENZIMSKA OKSIDACIJA POLIFENOLA IZ VINA

Tijekom neenzimske oksidacije vina, o-difenoli se oksidiraju u o-kinone i semi-kinone, dok se kisik reducira u vodikov peroksid (Lopez-Toledano i sur., 2002; Oszmianski i sur., 1996). Kinoni nastali kao primarni produkti su nestabilni i mogu se podvrgnuti daljnim reakcijama. Ove reakcije, koje mogu uzrokovati nastanak pigmenta, slične su onima u enzimskom tamnjenju.

Kinoni se mogu spontano spojiti s nukleofilnim komponentama zbog njihovog visokog elektronskog afiniteta. Zatim dobiveni produkti poput dimera i polimera preraspodijele svoju

strukturu i tvore nove difenole (Zhai i sur., 2001). Ti novonastali difenoli mogu imati niži redoks potencijal i zbog toga se puno lakše oksidiraju. Regenerirani o-difenoli se brzo oksidiraju i pri tome ubrzavaju polimerizacijske reakcije fenola. Međutim, tokom ove reakcije dolazi do nakupljanja vodikovog peroksida i sve više etanola se oksidira do acetaldehida u prisutnosti metala. Dolazi i do oksidacije onih fenola koji se inače teško oksidiraju zbog promjena strukture spomenutih ranije (Boulton i sur., 2001; Zhai i sur., 2001). Neenzimska oksidacija fenola odvija se veoma brzo pri bazičnim uvjetima, a veoma sporo pri kiselim uvjetima u mediju kao što je vino, posebice kada su prisutni metalni ioni.



**Slika 4.** Mehanizam neenzimskog tamnjenja u vinu (Li i sur., 2008)

Smatra se da je glavna antioksidacijska funkcija SO<sub>2</sub> u vinu da reagira s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i time limitira oksidaciju etanola i drugih zasićenih hidroksilnih komponenti. To treba uzeti u obzir zbog toga što H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sa željeznim ionom proizvodi reaktivne oksidanse poput hidroksilnog radikala (Boulton i sur., 2001; Danielwicz, 2007).

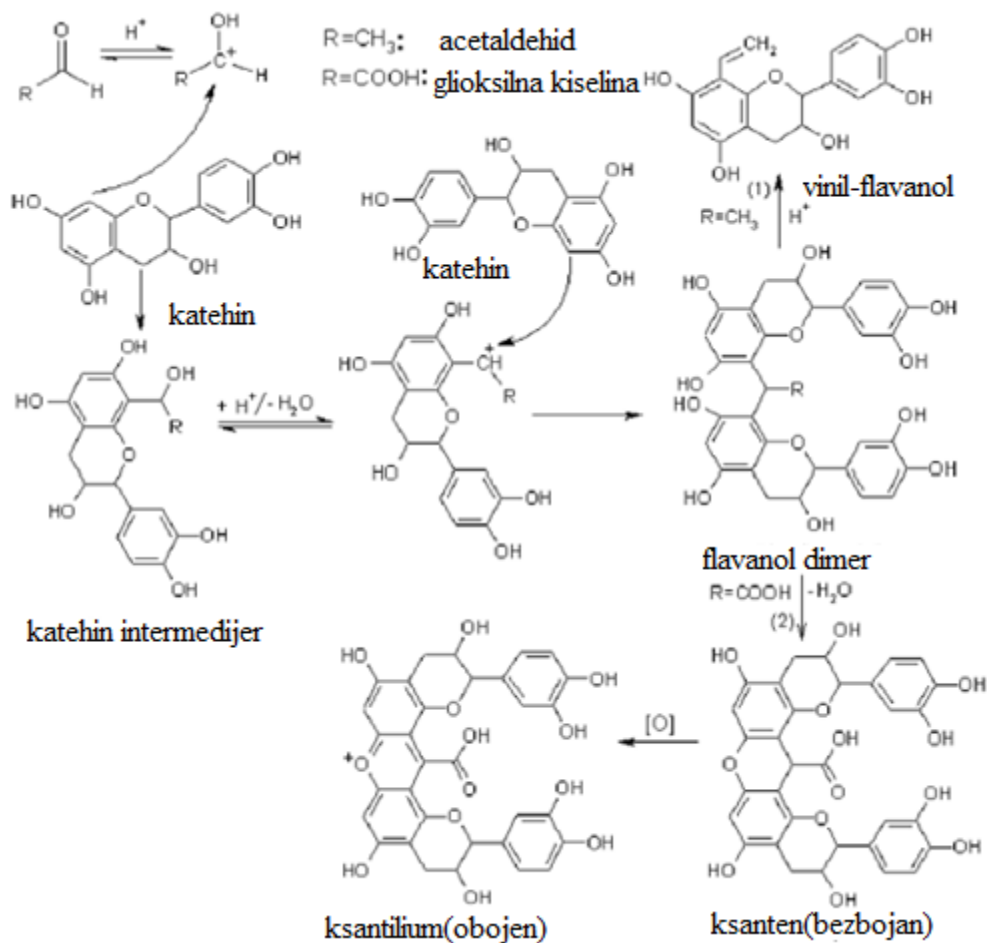
### 2.5.2.2 TAMNENJE VINA USLIJED POJAVE ACETALDEHIDA

Acetaldehid nastaje u vinu tijekom fermentacije zbog djelovanja kvasaca, tijekom odležavanja ili kod oksidacije etanola u prisutnosti metala. Dobivanje acetaldehida tijekom fermentacije je bitno kod proizvodnje sherry vina, a dobivanje tijekom odležavanja na kvascima je bitno za sva ostala vina (Wildenradt i Singleton, 1974). Acetaldehidi posjeduju intenzivan miris i okus, što u previsokim koncentracijama daje gorak i oksidiran okus vinu. Acetaldehid pridonosi stvaranju dimera i trimera među flavonoidima što pojačava boju vina. Reakcija između acetaldehida i fenola započinje protoniranjem acetaldehida u karbokation uz nukleofilni dodatak flavanola. Nakon gubitka molekule vode, nastaje novi karbokation intermedijer koji će ponovno napasti nukleofilni flavanol pri čemu nastaje flavanol dimer. Reakcija tada ponovno kreće od novonastalih dimera i ponavlja se sve do nastanka polimera. Pri tome ne dolazi do nastanka ksantilium pigmenta, ali dolazi do narančastog obojenja što je rezultat ksantilium kromofora.

Direktna kondenzacija između antocijanina i tanina je vrlo spora i produkti su žute ksantilium soli, koje uvijek mijenjaju boju crvenog vina u narančastu. Direktnom kondenzacijom između antocijanina i tanina te brze polimerizacije između njih posredovane acetaldehidom, dolazi do pojave jače boje vina i stabilnosti. Daljnja polimerizacija s flavonoidima dovodi do nestabilnosti, taloženja i gubitka boje vina (Liu i Pilone, 2000; Es-Safi i sur., 2000). Acetaldehid može tvoriti nove vrste pigmenata, poput vitamina B, te druge proantocijanine koji su stabilniji prema  $\text{SO}_2$  i pH.

### 2.5.2.3 TAMNENJE VINA USLIJED POJAVE GLIOKSILNE KISELINE

U prisutnosti željeza, oksidacija se odvija s vinskom kiselinom pri čemu nastaje glioksilna kiselina koja reagira s dvije flavalne jedinice te nastaje bezbojni dimer. Mehanizam reakcije je sličan onom kondenzacije acetaldehida, a nastali bezbojni dimer tvori žute pigmente nakon dehidracije i oksidacije. Osim glioksilne kiseline i acetaldehida, furfural i 5-hidroksimetilfurfural također mogu reagirati s flavonoidima i tvoriti ksantilium pigmente ili crni talog, a tada je reakcija brža s furfuralom nego 5-hidroksimetilfurfuralom (Es-Safi i sur., 2000).



**Slika 5.** Mehanizam polimerizacije s acetaldehidom i glioksilnom kiselinom (Fulcrand i sur., 2006)

#### 2.5.2.4 OSTALI PUTEVI NEENZIMSKOG TAMNJENJA VINA

Uključuju reakcije karamelizacije, Maillardove reakcije i promjene nastale kao rezultat povišene temperature. Karamelizacija se pojavljuje kod ugljikohidrata, ali zahtijeva više temperature nego što je produkt inače izložen tijekom distribucije i skladištenja (Steele, 2004). Maillardova reakcija je reakcija koja obuhvaća kondenzaciju reducirajućih šećera s aminokiselinama i proteinima, a događa se tijekom obrade i sladištenja. Određeni procesi tijekom vinifikacije kao što su zagrijavanje grožđa tijekom maceracije te punjenje u boce pri visokoj temperaturi kako bi se postigla sterilnost također potiču Maillardovu reakciju.



Nezasićeni lipidi ili kompleksni lipidi, prirodno prisutni u vinu, sadrže nezasićene masne kiseline koje su podložne oksidaciji pomoću molekularnog kisika. Autooksidacija ovih masnih kiselina u vinu mogu dovesti do nastanka peroksida iz kojih nastaju komponente neugodnog okusa.

### 2.5.3 AKTIVACIJA KISIKA U VINU

Direktna reakcija između kisika i fenola ne može se odvijati ili se odvija jako sporo u kiselim uvjetima prvenstveno zbog termodinamike. Međutim, neki prijelazni metali poput željeza i bakra mogu promijeniti put reakcije, tako da se smanji energija aktivacije i poveća brzina reakcije. Time se prevlada inicijacija u prvoj reakciji, kojoj je inače potrebno puno više energije kako bi se odvijala (Danielwicz, 2003).

### 2.5.4 IONI ŽELJEZA I BAKRA U VINU

Prijelazni metali, poput željeza i bakra, su visokoprисutni u vinu, a njihova prisutnost je povezana s vrstom tla i opremom korištenom pri proizvodnji vina. S povećanom upotrebom bačvi od nehrđajućeg čelika, količina prijelaznih metala u vinu se značajno smanjila te vino u prosjeku sadrži od 0 - 5 mg/L željeza i 0,1 - 0,3mg/L bakra (Li i sur., 2005). Međutim, do oksidativnog kvarenja može doći i pri niskim koncentracijama metala. U prisutstvu željeza i njegovih kompleksnih spojeva i  $H_2O_2$ , dolazi do Fentonove reakcije i proizvodnje jakog oksidansa  $\bullet OH$ . U kiselim uvjetima nastajanje  $\bullet OH$  je olakšano, ali ograničeno željezom. Različite koncentracije iona željeza i  $H_2O_2$  proizvest će različite radikale. S druge strane, bakar također može reagirati s  $H_2O_2$  i proizvoditi radikal  $\bullet OH$  koji je mnogo jači od onog u reakciji sa željezom.

## 2.6 PARAMETRI PRI PROIZVODNJI VINA

### 2.6.1 KISIK

Kada je vino zasićeno s  $O_2$  ono sadrži oko 6 - 8 mg/L  $O_2$ . Tijekom proizvodnje vina dolazi do kontakta vina sa zrakom, što može rezultirati različitim koncentracijama  $O_2$  u vinu.

Mošt može biti zasićen s O<sub>2</sub> već tijekom gnječenja i tiještenja svježeg grožđa (Schneider, 1998). Količina O<sub>2</sub> koja se otopi u vinu tijekom fermentacije značajno ovisi o isparenom CO<sub>2</sub> koji pritom istiskuje O<sub>2</sub> iz vina. Te operacije uključuju prepumpavanje, prijenos iz jedne u drugu bačvu, filtraciju, centrifugiranje, punjenje u boce i starenje u bačvi.

Tijekom starenja u bačvi, vlažnost i debljina drva imaju važnu ulogu. Snižena vlažnost i manja debljina drveta omogućuju da kisik lakše prodre u vino. Temperatura vina također utječe na koncentraciju otopljenog kisika u vinu, na način da je koncentracija otopljenog O<sub>2</sub> veća pri nižim temperaturama. Kontakt vina s kisikom možemo smanjiti upotrebom inertnih plinova poput N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> i argona koji istiskuju zrak iz bačvi.

Dodatak SO<sub>2</sub> također utječe na količinu O<sub>2</sub>. Potrošnja O<sub>2</sub> u moštu drastično opada s dodatkom SO<sub>2</sub>. To je zbog toga što SO<sub>2</sub> nema antioksidativnu aktivnost u moštu već inhibira oksidativne enzime. Međutim, u vinu ipak dolazi do kemijske oksidacije i to najčešće pomoću sulfitnog oblika SO<sub>2</sub> koji može reagirati s kisikom, iako je reakcija vrlo spora pri niskom pH i visokom udjelu etanola.

## 2.6.2 pH-VRIJEDNOST

Fenoli u vinu su prisutni u fenolnom ili fenolatnom anionskom obliku. Međutim, u vinu pri pH-vrijednosti između 3 - 4 broj fenolnih molekula u fenolatnom obliku je vrlo mali. Tijekom oksidacije uklanja se fenolatni anion pri čemu dolazi do njegove zamjene ovisno o ravnoteži. Oksidacija, kada je elektron uklonjen, je puno lakša iz fenolatnog aniona nego protoniranog fenola.

Fenolne molekule se mogu razlikovati i u svojoj osjetljivosti prema pH-vrijednosti, poput cimetine kiseline i galne kiseline koje postaju manje stabilne pri višoj pH-vrijednosti, dok izomeri flavan-3-ola postaju stabilniji. Dokazano je da je količina fenola u vinu od 1,4 - 18 puta veća pri kiselim uvjetima (Cilliers i Singleton, 1989). Također, količina neenzimske autooksidacije cimetine kiseline je povećana pri višoj pH-vrijednosti i temperaturi.

## 2.6.3 KONCENTRACIJA FENOLA

Koncentracija fenola u vinu ujedno je i pokazatelj kapaciteta vina za O<sub>2</sub>, gdje s većom koncentracijom fenola dolazi do većeg kapaciteta vina za kisikom. Uklanjanje fenolnih

komponenti iz vina smanjuje kapacitet vina da reagira s O<sub>2</sub>. Postupci pri proizvodnji vina koji dovode do povišenja koncentracije fenola kao što su maceracija, jako tještenje te dozrijevanje u bačvi, ujedno dovode i do većeg kapaciteta vina za O<sub>2</sub>.

#### 2.6.4 DODATAK KISIKA TIJEKOM ALKOHOLNE I MALOLAKTIČNE FERMENTACIJE

Završetak alkoholne fermentacije je presudan korak u proizvodnji vina, a tijekom tog procesa kvasac prevodi šećer u alkohol, CO<sub>2</sub> i energiju te nastaju komponente koje daju okus vinu, poput masnih kiselina, estera i viših alkohola. U slučaju nepotpune fermentacije, mikroorganizmi mogu koristiti neiskorišteni šećer pri čemu dolazi do kvarenja vina. Mnogi uzroci za usporenu alkoholnu fermentaciju su već otkriveni, što uključuje visoku razinu šećera, nisku razinu dušika, pesticide te manjak O<sub>2</sub> (Bisson, 1999).

Dodatak O<sub>2</sub> može se koristiti kako bi se omogućila fermentacija, posebice u zemljama poput Južne Afrike, gdje grožđe sadrži visoku koncentraciju šećera. Dodatak O<sub>2</sub> u moštu dovodi do povećanih koncentracija estera i viših alkohola (Valero i sur., 2002). U velikim mjerilima kisik se uvodi propuštanjem zraka kroz tan, a time se ujedno i kvasac zadržava u suspenziji.

Neka vina, posebice bijela vina iz Francuske, odležavaju na talogu kvasca nakon fermentacije. Za to vrijeme inaktivirani kvasac prolazi kroz proces autolize, koja se definira kao hidroliza intracelularnih endohidrolaza aktiviranih nakon stanične smrti. Tijekom autolize kvasac oslobađa razne dušikove komponente, lipide i polisaharide u vino. Za taj proces se smatra da pridonosi punijem okusu i aromi vina, pri čemu apsorbira tiale i antocijanine. Autoliza može također pridonijeti povećanju koncentracije proteina i vinskoj stabilnosti otpuštanjem manoproteina. O<sub>2</sub> se može uvesti tijekom ove faze otvaranjem bačvi, pretakanjem vina i kroz proces nazvan „battonage“ gdje se talog povremeno miješa kako bi se postigla ujednačena izmiješanost (Fornairon-Bonnefond i sur., 2003). Kvasac ima veći kapacitet za apsorpciju O<sub>2</sub> nego polifenoli, pri čemu im je kapacitet od 9 g/L polifenola, što je veće od prosječne količine polifenola pronađenih u vinu. Međutim, talog kvasca i polifenoli zajedno imaju puno manji kapacitet za O<sub>2</sub> nego teoretski zbroj kada su zasebno određivani. To je iz razloga što se kapacitet taloga kvasca značajno reducira nakon kontakta s polifenolima. Dolazi do kolapsa citoplazmatskog intermembranskog prostora što snizuje pristupačnost i reaktivnost O<sub>2</sub> prema sterolima i nezasićenim masnim kiselinama membrane. Početno snižavanje i kasnije povećanje

kapaciteta polifenola može biti posljedica apsorpcije na talog kvasca s postupnim otpuštanjem s taloga.

Dodatak O<sub>2</sub> tijekom fermentacije također utječe na malolaktičku fermentaciju. Utječe na senzorske karakteristike vina, posebno kod Chardonnay vina gdje diacetil doprinosi tipičnoj maslačnoj aromi. Kisik ubrzava reakciju pretvorbe  $\alpha$ -acetolaktata u diacetil, pri čemu nastaje 12 mg/L diacetila pri semi-aerobnim uvjetima dok pri anaerobnim samo 2 mg/L. Previsoka koncentracija diacetila daje preizraženu aromu po maslacu što je nepoželjno. Također prevelika izloženost kisiku, posebice u prisutstvu obligatno heterofermentativnih organizama, može dovesti do nastanka octene kiseline u prevelikoj koncentraciji.

## 2.7 UČINAK KISIKA NA VINO TIJEKOM DOZRIJEVANJA

### 2.7.1 UTJECAJ NA BOJU BIJELIH VINA

Boja mladih bijelih vina uobičajeno je svijetlo žute ili zelenkaste nijanse, a tijekom dozrijevanja u bačvama poprima tamniju žutu boju. Smeđa boja je uglavnom nepoželjna, jer je pokazatelj oksidiranosti vina. Kao što je već prije spomenuto, smeđe obojenje može biti posljedica enzimatske oksidacije, no ti enzimi najčešće nisu vrlo aktivni u vinu zbog toga što dolazi do njihovog taloženja tijekom alkoholne fermentacije i inhibicije alkoholom. Zbog toga je češća neenzimska oksidacija koja je sporija te postoje tri mehanizma odvijanja tih reakcija. Prvi mehanizam je oksidacija fenolnih molekula u kinone pod utjecajem bakra i željeza pri čemu dolazi do nastanka žuto-smeđih pigmenata. Druga reakcija obuhvaća oksidaciju vinske kiseline u glioksilnu kiselinu koja dovodi do kondenzacije fenolnih molekula, a glioksilna kiselina služi kao poveznica između fenolnih molekula. I treći mehanizam tamnjenja uključuje acetaldehide, nastale tijekom oksidacije ili fermentacije, koji potiču kondenzaciju fenolnih molekula (Es-Safi i sur., 1999).

Neka istraživanja su pokazala da se smeđa boja oksidiranih vina može reducirati dodatkom velike koncentracije kvasaca. Posebice vanilinska, siringinska, kutarinska kiselina i derivati flavan-3-ola su reducirani dodatkom kvasca. Kvasac preventivno sprječava degradaciju flavanola, a ujedno poboljšava aromu oksidiranih vina.



**Slika 6.** Razne boje bijelih vina (Anonimus 1, 2016)

## 2.7.2 UTJECAJ NA BOJU CRVENIH VINA

Boja crvenih vina potječe iz antocijana koji su ekstrahirani iz kožice grožđa tijekom maceracije. Boja također može biti pokazatelj kvalitete vina, gdje tamno crvena boja, uz druge karakteristike, označava visokokvalitetna vina. Tijekom odležavanja vina boja se mijenja iz crvene u mladom vinu do smeđe-crvene boje odležanog vina u bačvi (Ribereau-Gayon i sur., 2000b). Postoji više kemijskih reakcija odgovornih za promjenu boje, a jedna od njih je direktna kondenzacija između antocijana i tanina. Produkt ove reakcije su bezbojni flaveni koji mogu biti oksidirani do flavilium iona pri čemu nastaju žute ksantilium soli.

Druga reakcija je nastanak elektrofilnog karbokationa, nastalog reakcijom između procijanida sa antocijanom. Produkt reakcije je bezbojan, no brzo je dehidriran do narančasto-crvene boje. Ova reakcija je potaknuta povišenim temperaturama bez prisustva kisika i najčešće se odvija tijekom odležavanja u bocama.

Vinilni fenoli nastaju elektrofilnom adicijom etilenske veze između 4-venilfenolne molekule s C4 ili C5 atomom ugljika antocijana pri čemu nastaju narančasto-crveni pigmenti. Karakteristika ovih molekula je da su rezistentnije na SO<sub>2</sub> i promjene pH i djeluju kao kopigmenti te na taj način povećavaju stabilnost boje.

Acetaldehid također može utjecati na promjenu boje vina, već prije objašnjenim mehanizmom, pri čemu dolazi do narančastog obojenja.



**Slika 7.** Razne boje crvenih vina (Anonimus 2, 2016)

### 2.7.3 UTJECAJ NA OKUS VINA

Različite fenolne molekule utječu na gorčinu, trpkost i punoću crvenih vina, a među njima su flavonoidi najodgovorniji za okus i miris vina. Mlado vino može biti oštrog okusa, trpko i gorko, a tijekom dozrijevanja postaje mekše i manje trpko. To se događa zbog polimerizacije fenola pri čemu novonastale molekule postaju manje reaktivne s proteinima u ustima (Nikfardjam i Dykes, 2003).

### 2.7.4 UTJECAJ NA AROMU VINA

Kod bijelih vina dodatak  $O_2$  je uglavnom nepoželjan. Čak i male koncentracije kisika dovode do gubitka arome, posebno voćne arome iako neka vina postaju kvalitetnija malim dodatkom kisika. Kod visokih koncentracija kisika dolazi do pojave neželjenih aroma i vina imaju aromu karamele, prezrelog voća, trule jabuke, meda, drvenu ili kuhanog povrća. Iako će promjena boje u smeđu ukazati na previsoku koncentraciju kisika, i prije toga može doći do gubitka arome. Aroma kuhanog povrća potječe od eugenola, benzaldehida i furfurala. Aroma meda potječe od fenilacetaldehida i metionala. Drvena aroma oksidiranih vina, čak i onih koji nisu bili u kontaktu s drvenim bačvama, potječe od povišene koncentracije eugenola.

Kod crvenih vina, dodatak kisika u nižim koncentracijama od one koju vino može utrošiti daje pozitivne učinke vinu. To uključuje pojačanje boje vina, smanjenje trpkosti i sumporastog mirisa, povrtne arome i smanjenje troškova proizvodnje (vino je ranije spremno za tržište).

## 2.8 MJERENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti u vinu, potrebno je nekoliko različitih metoda zbog kompleksnosti okidoredukcijskih reakcija koje se odvijaju. Te metode temelje se na inhibiciji slobodnih radikala, kelaciji metalnih iona ili lipidnoj peroksidaciji. Metode za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta dijele se na direktne poput ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) i indirektne poput DPPH i ABTS koje se temelje na inhibiciji slobodnih radikala pomoću sintetičkih odnosno radikalnih kationa.

ORAC metoda temelji se na oksidativnoj degradaciji fluorescentnih molekula nakon što je uzorak pomiješan sa slobodnim radikalima poput azo inicijatora. Azo inicijator proizvodi peroksilni radikal koji uništava fluorescentne molekule i time smanjuje fluorescenciju. Međutim, antioksidansi štite fluorescentne molekule od oksidativne degradacije i stupanj zaštite mjera je koncentracije antioksidansa. Uređaj za mjerenje je fluorometar te postoje komercijalno dostupni standardi što ovu metodu čini brzom i lako dostupnom.

DPPH metoda se temelji na redukciji DPPH radikala u metalnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora  $\text{AH}$  (antioksidans koji neutralizira slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorpcije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).

ABTS metoda se temelji na kemijskoj ili enzimskoj oksidaciji otopine ABTS-a kalijevim persulfatom te potom na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline). Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti ispitivanog antioksidansa, njegovoj koncentraciji i trajanju reakcije. Stoga se udio ABTS radikala koje

„gase“ različiti antioksidansi izražava kao funkcija koncentracije i vremena, a mjeri se praćenjem smanjenja apsorbanije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbanije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima.



### 3. RASPRAVA

Slobodni radikali su spojevi sa slobodnim (nesparenim) elektronima, koji nastaju u ljudskom organizmu kao posljedica normalnog metabolizma. Zbog slobodnih elektrona vrlo su reaktivni, te mogu prouzročiti oksidativnu štetu biomolekulama stanica (Vermerris i Nicholson, 2006). Takav oksidativni stres često se povezuje s bolestima kao što su tumori, kardiovaskularnim i neurodegenerativnim oboljenjima, te procesima starenja (Bagachi i sur., 2000). Spojevi koji neutraliziraju slobodne radikale i tako umanjuju oksidativan stres u stanicama nazivaju se antioksidansima. Polifenolni spojevi prisutni u grožđu i vinu imaju antioksidativno djelovanje (Rice-Evans i sur., 1997), te djeluju kao sakupljači slobodnih radikala, sudjeluju u inhibiciji oksidacije lipida, redukciji formiranja hidroperoksida itd. (Meyer i sur., 1998). Također je dokazano njihovo antibakterijsko, antimutageno i protuupalno djelovanje (Estruch, 2000). Umjerena konzumacija vina, posebno crvenog, povezana je sa smanjenom smrtnošću od kardiovaskularnih bolesti, a taj je efekt poznat kao „francuski paradoks“ (Renaud i De Lorgeril, 1992).

Antioksidacijska aktivnost vina, iako u visokoj korelaciji s koncentracijom ukupnih fenola u vinu (Paixao i sur., 2007), ne ovisi samo o njoj, već i o koncentraciji pojedinih fenolnih spojeva, te o njihovim međusobnim odnosima (De Beer i sur., 2002). Fernández-Pachón i sur. (2004) određivali su fenolni sastav i antioksidacijsku aktivnost vina pomoću različitih analitičkih metoda (ORAC, DPPH i ABTS) kod crnih, bijelih i *sherry* vina. Pomoću svih metoda su utvrdili veću antioksidacijsku aktivnost crnih vina u odnosu na bijela i *sherry* vina, koja se međusobno nisu statistički razlikovala. Udio ukupnih fenola u vinima je bio povezan s antioksidacijskom aktivnosti vina, a najviši koeficijent korelacije je postignut s ORAC metodom. Kod crnih vina jaču antioksidacijsku aktivnost je imala zajednička frakcija flavan-3-ola i antocijana u odnosu na fenolne kiseline i flavonole.

Također, bijela vina su imala sličnu razinu antioksidacijske aktivnosti kao i frakcija fenolnih kiselina u crnim vinima, mjereno pomoću ORAC metode. Koristeći iste analitičke metode, Paixao i sur. (2007) mjerili su antioksidacijsku aktivnost i uspoređivali ju s koncentracijom ukupnih fenola u crnim, bijelim i rosé vinima. Zaključili su da su antioksidacijska aktivnost i koncentracija ukupnih fenola u snažnoj korelaciji, te su znatno više u crnim, nego u bijelim ili rosé vinima.

Slično zaključuju Li i sur. (2008), proučavajući polifenolni sastav i njen odnos s antioksidacijskom aktivnošću 37 kineskih vina. Iznose da crna vina, očekivano, imaju znatno višu koncentraciju ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet od rosé ili bijelih vina. Osim toga, koncentracija ukupnih fenola, flavonoida i flavan-3-ola u vinima bila je najvećoj korelaciji s antioksidacijskim svojstvima istraživanih vina, za razliku od koncentracije ukupnih antocijana koji pokazuju znatno niži utjecaj na antioksidacijsku aktivnost vina. Na kraju dodaju da fenolni spojevi i antioksidacijska aktivnost ovise o sorti, uvjetima uzgoja i načinu vinifikacije.

Uspoređujući fenolni sastav i antioksidacijska svojstva vina Cabernet sauvignona i Merlota iz četiri različite vinogradarske regije u Kini, Jing i sur. (2008) također su zaključili da su svi analizirani parametri jako varirali ovisno o kultivaru i okolinskim uvjetima. U vinima Cabernet sauvignona općenito su izmjerene više vrijednosti svih istraživanih parametara u odnosu na vina Merlota, a dokazana je i uska povezanost između grupa fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti vina. Koncentracije ukupnih fenola, flavonoida, flavan-3-ola i antocijana pokazale su najveću korelaciju s antioksidacijskim svojstvima vina, a od pojedinačnih fenolnih spojeva istaknuli su se katehin i epikatehin. Međutim, navode da su derivati kvercetina, laricitrina i izoramnetina, te cimetna kiselina također pridonijeli antioksidacijskom kapacitetu vina, što ih dovodi do zaključka da svaki fenolni spoj na različiti način utječe na antioksidacijska svojstva vina. I druga istraživanja potkrepljuju tvrdnju da svaki fenolni spoj zasebno ima različitu antioksidacijsku aktivnost (Fernandez-Pachon i sur., 2004). Arnous i sur. (2002) također navode flavan-3-ole (katehin i 16-epikatehin) kao spojeve sa znatno jačom antioksidacijskom aktivnošću od antocijana, dok Rivero-Perez i sur. (2008) ističu malvidin-3-glukozid kao antocijan s najjačom antioksidacijskom aktivnošću. Druga istraživanja pokazuju da polimeri procijanidina s višim stupnjem polimerizacije imaju veću antioksidacijsku aktivnost (Spranger i sur., 2008), međutim smatra se da se antioksidacijska aktivnost uzorka ne može promatrati kroz pojedinačne spojeve, već je ona sinergijsko djelovanje svih spojeva vina s antioksidacijskom aktivnošću (Maier i sur., 2009). Alén-Ruiz i sur. (2009) pratili su polifenolni sastav i njegov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost vina dva crna španjolska kultivara tijekom dozrijevanja u butelji u periodu od 12 mjeseci. I oni su utvrdili visoku povezanost između koncentracije ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti vina. Nakon 3 mjeseca čuvanja, kod oba kultivara izmjerene su veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, što pokazuje da kondenzacija i

polimerizacija fenolnih spojeva doprinose antioksidacijskoj aktivnosti vina. Međutim, nakon 12 mjeseci većina analiziranih vina izgubila je 45 % svoje antioksidacijske aktivnosti.

I enološki postupci mogu utjecati na antioksidacijsku aktivnost vina. Villaño i sur. (2006) pratili su utjecaj maceracije na crvena vina, jačinu prešanja na bijela, te bistrenja na oba tipa vina. Utvrdili su da s pojačanim pritiskom kod prešanja raste i antioksidacijska aktivnost bijelih vina, duljina maceracije ima pozitivan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost crvenih vina, dok tretmani bistrenja nisu značajno utjecali na fenolni sastav, kao ni na antioksidacijsku aktivnost vina.

## 2. ZAKLJUČAK

- Polifenolni spojevi prisutni u grožđu i vinu imaju antioksidativno djelovanje, a dokazano je njihovo antibakterijsko, antimutageno i protuupalno djelovanje.
- Količina antioksidansa u vinu ovisit će o sorti grožđa, uvjetima uzgoja, klimatskim uvjetima, izloženosti svjetlu, vrsti tla, postupku vinifikacije i odležavanju u drvenim bačvama.
- Glavni uzrok tamnjenja vina su fenoli, odnosno produkti nastali polimerizacijom fenola.
- Kisik se prvenstveno smatra nepoželjnim i pokušava se što više ograničiti njegovo prisustvo u vinu, no male količine su potrebne ukoliko se želi produžiti fermentacija dok kod nekih vina kisik pozitivno utječe na senzorske karakteristike.
- Antioksidacijska aktivnost bijelih vina raste pojačanim pritiskom kod prešanja, a duljina maceracije ima pozitivan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost crvenih vina.
- Primjenom analitičkih metoda poput ORAC, DPPH i ABTS dokazana je znatno viša antioksidacijska aktivnost i koncentracija ukupnih fenola u crvenim, nego u bijelim ili rosé vinima.

### 3. LITERATURA

*Anonimus* 1, (2016)  
[https://www.google.hr/search?espv=2&biw=1366&bih=643&tbm=isch&sa=1&q=white+wine+color&oq=white+wine+color&gs\\_l=img.3...202780.206233.0.206860.0.0.0.0.0.0.0.0...0...1c.1.64.img..0.0.0.ytSvokuRC8I#imgcr=Swln\\_OLaZruplM%3A](https://www.google.hr/search?espv=2&biw=1366&bih=643&tbm=isch&sa=1&q=white+wine+color&oq=white+wine+color&gs_l=img.3...202780.206233.0.206860.0.0.0.0.0.0.0.0...0...1c.1.64.img..0.0.0.ytSvokuRC8I#imgcr=Swln_OLaZruplM%3A) (pristupljeno 12. 7. 2016.)

*Anonimus* 2, (2016)  
[https://www.google.hr/search?espv=2&biw=1366&bih=643&tbm=isch&sa=1&q=red+wine+color&oq=red+wine+color&gs\\_l=img.3...4043.13028.0.13577.0.0.0.0.0.0.0.0...0...1c.1.64.img..0.0.0.sfiZ9NiE73A#imgcr=olnmpe6NZxHMYM%3A](https://www.google.hr/search?espv=2&biw=1366&bih=643&tbm=isch&sa=1&q=red+wine+color&oq=red+wine+color&gs_l=img.3...4043.13028.0.13577.0.0.0.0.0.0.0.0...0...1c.1.64.img..0.0.0.sfiZ9NiE73A#imgcr=olnmpe6NZxHMYM%3A) (pristupljeno 3. 8. 2016.)

Adams D.O. (2006): Phenolics and Ripening in Grape Berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 249-256.

Alén-Ruiz F., García-Falcón M.S., Pérez-Lamela M.C., Martínez-Caraballo E., Simal-Gándara J. (2009): Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chem.* 113: 53-60.

Ambrosio G., Zweier J. L., Duilio C., Kuppusamy P., Santoro G., Elia P. P., Tritto I., Cirillo P., Condorelli M., Chiariello M., Flaherty J.T. (1993): Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J. Biol. Chem.* 268: 18532-18541.

Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 7915-7922.

Andersen M., Markham K.R. (2006): Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications. *CRC Press, Taylor & Francis group*, Boca Raton, USA.

Arnous A., Makris D.P., Kefalas P. (2002): Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Compos. Anal.* 15: 655-665.

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



- Bergqvist J., Dokoozlian N., Ebisuda N. (2001): Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet sauvignon and Grenache in the central San Joaquin Valley of California. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 1-7.
- Bisson L.F. (1999): Stuck and sluggish fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 107-119.
- Boss P.K., Davies C. (2009): Molecular biology of anthocyanin accumulation in grape berries. *Grapevine molecular physiology & biotechnology*. Roubelakis-Angelakis K.A. (ur). Springer science, Business media B.V., New York, USA.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1998): Principles and Practices of Wine making. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, SAD.
- Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. (2001): Principles and practices of winemaking (chinese trans.). Beijing: China light industry press.
- Bradshaw M.P., Prenzler P.D., Scollary G.R. (2001): Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system. *J. Agr. Food Chem.* 49: 934-939.
- Bradshaw M.P., Prenzler P.D., Scollary G.R. (2004): Examination of the sulfur dioxide-ascorbic acid anti-oxidant system in a model white wine matrix. *J. Sci. Food Agricul.* 84: 318-324.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995): Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30.
- Castillo-Munoz N., Fernandez- Gonzalez M., Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E., Hermosin-Gutierrez I. (2009): Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *J. Agr. Food Chem.* 57: 7883-7891.
- Chan H.W-S. (1987): Autoxidation of unsaturated lipids. *Academic press*, London.
- Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J. (1995): The influence of Brettanomyces/Dekkera sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 463-467.

- Cheyrier V., Basire N., Riguard J. (1989): Mechanism of trans-caffeolytartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* 37: 1069-1071.
- Cilliers J.J.L., Singleton V.L. (1989): Nonenzymatic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.* 37: 890-896.
- Cilliers J.J.L., Singleton V.L. (1990): Nonenzymic autoxidative reactions of caffeic acid in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 84-86.
- Cimino F., Sulfaro V., Trombetta D., Saija A., Tomaino A. (2007): Radical-scavenging capacity of several Italian red wines. *Food Chemistry* 103: 75-81.
- Danilewicz J.C. (2003): Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 73-85.
- Danilewicz J.C. (2007): Interaction of sulfur dioxide, polyphenols and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* 58: 53-60.
- Davies K.J.A. (1995): Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61: 1-31.
- De Beer D., Joubert E., Gelderblom W.C.A., Manley M. (2002): Phenolic compounds: A review of their possible role as *in vivo* antioxidants of wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 23: 48-71.
- Del Río L.A., Sandalino L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B. (2006): Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging and role in cell signaling. *Plant Physiol.* 141: 330-335.
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P. (2003): Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9: 15-27.
- Downey M.O., Dokoozlian N.K., Krstic M.P. (2006): Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 257-268.

- Du Toit W.J. (2006): The effect of oxygen on the composition and microbiology of red wine. Stellenbosch university, private bag X1, South Africa.
- Es-Safi N.E., Fulcrand H.L., 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.
- Es-Safi N. E., Chenynier V., Moutounet M. (2000): Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5946-5954.
- Esteban M.A., Villanueva M.J., Lissarrague J.R. (2001): Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *J. Sci. Food Agr.* 81: 409-420.
- Estruch R. (2000): Wine and cardiovascular diseases. *Food Res. Int.* 33: 219-226.
- Favretto D., Flamini R. (2000). Application of electrospray ionization mass spectrometry to the study of grape anthocyanins. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 55-64.
- Fernandez-Pachon M.S., Villano D., Garcia-Parilla M.C., Troncoso A.M. (2004): Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta.* 513: 113-118.
- Fischer U., Noble A.C. (1994): The effect of ethanol, catechin concentration and pH on sourness and bitterness of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 6-10.
- Fornairon-Bonnefond C., Aguera E., Deyieux F., Sablayrolles J.M., Salomon J.M. (2003): Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 496-503.
- Fulcrand H., Duenas M., Salas E., Cheynier V. (2006): Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 289-297.

Gambutì A., Strollo D., Ugliano M., Lecce L., Moio L. (2004): Trans-resveratrol, quercetin, (+)-catechin, (-)-epicatechin content in south italian monovarietal wines: Relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5747-5751.

Goldberg D.M., Karumanchri A., Tsang E., Soleas G.T. (1998): Catechin and epicatechin concentrations of red wines: regional and cultivar- related differences. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 23-33.

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

González-Manzan, S., Due M., Rivas-Gonzalo J.C., Escribano-Bailón M.T., Santos-Buelga C. (2009): Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chem.* 114: 649-656.

Guidoni S., Ferrandino A., Novello V. (2008): Effects of seasonal and agronomical practices on skin anthocyanin profile of Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 59: 22-29.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Meth. Enzym.* 186: 1-85.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1995): How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem. Soc. Symp.* 61: 73-101.

Havsteen B.H. (2002): The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Elsevier Science: Kiel, Germany.

He F., Mu L., Yan G.L., Liang N.N., Pan Q.H., Wang Y., Reeves M.J., Duan, C.Q. (2010): Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 15: 9057-9091.

Hebrero E., Garcia-Rodriguez C., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C. (1989): Analysis of anthocyanins by high performance liquid chromatography-diode array spectroscopy in a hybrid grape variety (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* 41B). *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 283-291.

Hufnagel J.C., Hofmann T. (2008): Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1376-1386.

Jackson D.I., Lombard P.B. (1993): Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality-a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 409-430.

Jackson R.S. (2008): Wine science: Principles and applications. Third edition. Academic press, Elsevier, Burlington, USA.

Jean-Denis J.B., Pezet R., Tabacchi R. (2006): Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected leaves by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Photoionisation Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. Agr.* 1112: 263-268.

Jeandet P., Bessis R., Sbaghi M., Meunier P., Trollat P. (1995): Resveratrol content of wines of different ages: Relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 1-4.

Jing P., Bomser J.A., Schwartz S.J., He J., Magnuson B.A., Giusti M.M. (2008): Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9391-9398.

Junquera B., Gonzalez-San Jose M.L., Diez C. (1992): Enzymic browning of grapes and wines. *Revista Espanola de Ciencia y Tecnologia de Alimentos* 32: 481-491.

Kataoka I., Kubo Y., Sugiura A., Tomana T. (1984): Effects of temperature, cluster shading and some growth regulators on L-phenylalanine ammonia lyase activity and anthocyanin accumulation in black grapes. *Mem. Coll. Agric., Kyoto Univ.* 124:35-44.

Kennedy, J.A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E.J., Jones G.P. (2001): Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5348-5355. 83.

Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.I. (2002). Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 268- 274. 84.

Kennedy, J.A., Saucier, C., Glories, Y. (2006). Grape and wine phenolics: History and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 239-248.

Kennedy, J.A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Cien. Inv. Agr.* 35: 107-120.

Kumar S., Pandey A.K. (2013): Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* 2013: 1-16.

Li H., Wang H., Yuan C., Wang S. (2005): Wine chemistry. Beijing: *Scientific publishing company*.

Li H., Guo A., Wang H. (2008): Mechanism of oxidative browning of wine. *Food Chem.* 108: 1-13.

Liu S.Q., Pilone G.J. (2000): An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International journal of food science and technology.* 35: 49-61.

Lopez-Toledano A., Mayen M., Merida J., Medina M. (2002): Yeast-induced inhibition of (+)-catechin and (-)-epicatechin degradation in model solutions. *J. of Agricultural and Food Chem.* 50: 1631-1635.

Macheix J-J., Fleuriet A., Billot J. (1990): Fruit phenolics. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, SAD.

Maier T., Schieber A., Kammerer D.R., Carle R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera*) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem.* 112: 551-559.

Main G.L. (1992): Juice fining treatments to reduce browning and use of sulfur dioxide in white wine production. PhD Thesis, University of Arkansas, AR, United States.

Maletić E., Karoglan Kontić J., Preiner D., Jeromel A., Patz C.-D., Dietrich H. (2009): Anthocyanin profile and antioxidative capacity of some autochthonous Croatian red wines. *J. Food Agr. Environ.* 7: 48-51.

- 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.
- Meyer A.S., Donovan J.L., Pearson D.A., Waterhouse A.L., Frankel E.N. (1998): Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density oxidation in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1783-1787.
- Minussi R.C., Rossi M., Bologna L., Cordi L., Rotilio D., Pastore G.M. (2003): Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry* 82: 409-416.
- Monagas M., Suárez R., Gómez-Cordovés C., Bartolomé B. (2005): Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC- DAD/ESI-MS. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 139-147.
- Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (2009): Wine chemistry and biochemistry. *Springer science, Business media*, LLC, New York, USA.
- Nagel C.W., Wulf L.W. (1979): Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 30: 111-116.
- Nijveldt R.J., von Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K., van Leewen P.A.M. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74: 418-425.
- Nikfardjam M., Dykes S. (2003): Micro-oxygenation research at Lincoln University, Part 3: polyphenolic analysis of Cabernet Sauvignon wine under the application of micro-oxygenation. *Austr. NZ Grapegrower & Winemaker* 468: 41-44.
- Ojeda H., Andary C., Kraeva E., Carbonneau A., Deloire A. (2002): Influence of pre- and post-véraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 261-267.
- Oszmianski J., Cheynier V., Moutounet M. (1996): Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1712-1715.

Paixao N., Perestrelo R., Marques J.C., Câmara J.S. (2007): Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry* 105: 204-214.

Pecorino L. (2012): Molecular biology of cancer. Mechanisms, targets and therapeutics. *Oxford University Press*: 27-29.

Pérez-Magariño S., González-San José M.L. (2005): Effect of ripening stage of grapes on the low molecular weight phenolic compounds of red wines. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 597-606.

Perrone G., Nicoletti I., Pascale M., De Rossi A., De Girolamo A., Visconti A. (2007): Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol related compounds in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6807-6812.

Renaud S., De Lorgeril M. (1992): Wine, alcohol, platelets and the french paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 339: 1523-1526.

Revilla E., Carrasco D., Benito A., Arroyo-Garcia R. (2010): Anthocyanin composition of several wild grape accessions. *Am. J. Enol. Vitic.* 61: 536-543.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2000b): Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, Engleska.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Food Sci.* 2: 152-159.

Rigaud J., Cheynier V., Souquet J.M., Moutounet M. (1991): Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. *J. Sci. Food Agric.* 57: 55-63.

Rivero-Perez M.D., Muniz P., Gonzalez-Sanjose M.L. (2008): Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food Chem. Toxicol.* 46: 2815-2822.

Robinson W.B., Weirs L.D., Bertino J.J., Mattick L.R. (1966): The relation of anthocyanin composition to color stability of New York State wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 17: 178-184. 59: 22-29.



Romeyer F.M., Macheix J.J., Goiffon J.P., Reminiac C.C., Sapis J.C. (1983): The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *J. Agric. Food Chem.* 31: 346-349.

Sapis J.C., Macheix J.J., Cordonnier R.E. (1983): The browning capacity of grapes. II. Browning potential and polyphenol oxidase activities in different mature grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* 34: 157-162.

Schneider V. (1998): Must hyperoxidation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 65-73.

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

Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012: 2170.

Singleton V. L., Zaya J., Trouslade E., Salgues M. (1984): Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. *Vitis.* 23: 113-120.

Singleton, V.L., Trousdale, E., Zaya, J. (1985). One reason sun-dried raisins brown so much. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 111-113.

Singleton, V.L., Zaya, J., Trousdale, E. (1986). Caftaric and coutaric acids in fruit of *Vitis*. *Phytochem.* 25: 2127-2133.

Singleton, V.L. (1990). Tannins and qualities of wines. U: R.W. Hemingway i P.E. Laks (Ur.): Plant Polyphenols (859-880). *Plenum*, New York, SAD.

Singleton, V.L., Trousdale, E.K. (1992). Anthocyanin-Tannin Interactions Explaining Differences in Polymeric Phenols Between White and Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 63-70.

Singleton V.L., Cilliers J.J.L. (1995): Phenolic browning – a perspective from grape and wine research. Enzymatic browning and its prevention (Vol. 600). Washington: *American Chemical Society*, pp. 23-48.

Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. (1997): Wine as biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J.Clin.Lab.Anal.* 11: 287-313.

Somers T., Vérette E., Pocock K. (1987): Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification and effects of exogeneous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.* 40: 67-78.

Spayd S.E., Tarara J.M., Mee D.L., Ferguson J.C. (2002): Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 171-182.

Spranger I., Sun B., Mateus A.M., De Freitas V., Ricardo-da-Silva J.M. (2008): Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chem.* 108: 519-532.

Steele R. (2004): Understanding and measuring the shelf-life of food. Abington: *Woodhead Publishing*.

Tarara J.M., Lee J., Spayd S.E., Scagel C.F. (2008): Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 59: 235-247.

Tian R.R., Pan Q.H., Zhan J.C., Li J.M., Wan S.B., Zhang Q.H., Huang W.D. (2009): Comparison of phenolic acids and flavan-3-ols during wine fermentation of grapes with different harvest times. *Molecules* 14: 827-838.

Valero E., Moyano I., Millan M., Ortega J. M. (2002): Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. *Food Chem.* 78: 57-61.

Vermerris W., Nicholson R. (2006): Phenolic Compound Biochemistry. Springer: Dordrecht, Nizozemska

Vidal S., Francis L., Williams P., Kwiatkowski M., Gawel R., Cheynier, V., Waters E. (2004): The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chem.* 85: 519-525.

Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. (2006): Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chem.* 95: 394-404.

Wang Z. (1990): Food enzymology. Beijing: *China Light Industry Press*.

Wildenradt H. L., Singleton V. L. (1974): The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 25: 119-126.

Yamane T., Seok T.J., Goto-Yamamoto N., Koshita Y., Kobayashi S. (2006): Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 54-59.

Yokotsuka K., Nagao A., Nakazawa K., Salto M. (1999): Changes in anthocyanins in berry skins of Merlot and Cabernet sauvignon grapes grown in two soils modified with limestone or Oyster shells versus a native soil over two years. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 1-12.

Zhai H., Du J., Guan X., Qiao X., Pan Z. (2001): Cultivating and processing technologies for wine grapes. Beijing: *China Agricultural Press*.