

# Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na sastav polifenolnih spojeva i arome vina tijekom starenja

---

**Magdić, Valentina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:159:817019>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Valentina Magdić

1116/PI

**UTJECAJ VISOKOG  
HIDROSTATSKOG TLAKA I  
DODATKA ANTIOKSIDANSA NA  
SASTAV POLIFENOLNIH  
SPOJEVA I AROME VINA  
TIJEKOM STARENJA**

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

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo te u Laboratoriju za tehnološke operacije na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Natke Ćurko, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Marine Tomašević i Katarine Lukić, mag. ing..

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA I DODATKA ANTIOKSIDANSA NA SASTAV POLIFENOLNIH SPOJEVA I AROME VINA TIJEKOM STARENJA

*Valentina Magdić, 1116/PI*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj visokog hidrostatskog tlaka (200 MPa, 5 minuta) i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na sastav polifenolnih spojeva i aromu bijelog vina Graševina te crnog vina Cabernet Sauvignon nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Koncentracija ukupnih fenola, tanina i antocijana određene su primjenom spektrofotometrijskih metoda, dok je koncentracija fenolnih kiselina, flavanola i slobodnih antocijana određena primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Spojevi arome identificirani su i kvantificirani plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom (GC/MS). Dobiveni rezultati pokazali su kako tretiranje bijelog vina nije uzrokovalo značajne promjene u sastavu polifenolnih spojeva nakon 12 mjeseci starenja, međutim utjecalo je na smanjenje koncentracije pojedinih spojeva arome (estera, viših alkohola i masnih kiselina), pri čemu je dodatak glutaciona pokazao učinkovito djelovanje. Tretiranje crnog vina nakon 12 mjeseci starenja značajno je utjecalo na smanjenje koncentracije ukupnih i slobodnih antocijana, međutim nije utjecalo na značajnije promjene u sastavu arome.

**Ključne riječi:** vino, visoki hidrostatski tlak, polifenolni spojevi, aroma, starenje

**Rad sadrži:** 46 stranica, 4 slike, 7 tablica, 54 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *doc.dr.sc. Natka Ćurko*

**Pomoć pri izradi:** *doc.dr.sc. Marina Tomašević, Katarina Lukić, mag. ing.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Karin Kovačević Ganić*
2. Doc.dr.sc. *Natka Ćurko*
3. Doc.dr.sc. *Sven Karlović*
4. Prof.dr.sc. *Damir Ježek* (zamjena)

**Datum obrane:** 26. rujna, 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### IMPACT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE AND ANTIOXIDANT ADDITION ON THE WINE POLYPHENOLIC AND AROMA COMPOSITION DURING AGEING

*Valentina Magdić, 1116/PI*

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the influence of high hydrostatic pressure (200 MPa, 5 minutes) and antioxidant addition (sulfur dioxide and glutathione) on the phenolic and aroma composition of white wine Graševina and red wine Cabernet Sauvignon after 12 months of ageing in the bottles. Concentration of total phenols, tannins and anthocyanins was determined using spectrophotometric methods, while the concentration of phenolic acids, flavanols and free anthocyanins was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The aroma compounds were identified and quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The obtained results showed that the treatment of white wine did not cause significant changes in the composition of polyphenolic compounds after 12 months of ageing, however, it had the effect of reducing the concentration of certain aroma compounds (esters, higher alcohols and fatty acids), whereby addition of glutathione proved to be effective. Treatment of red wine after 12 months of ageing significantly reduced concentrations of total and free anthocyanins, but did not significantly affect changes in aroma composition.

**Keywords:** wine, high hydrostatic pressure, phenolic compounds, aroma, ageing

**Thesis contains:** 46 pages, 4 figures, 7 tables, 54 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Natka Ćurko, Assistant professor*

**Technical support and assistance:** *Katarina Lukić, mag. ing.; PhD. Marina Tomašević, Assistant professor*

**Reviewers:**

1. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full professor
2. PhD. *Natka Ćurko*, Assistant professor
3. PhD. *Sven Karlović*, Assistant professor
4. PhD. *Damir Ježek*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 26<sup>th</sup> September, 2019

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Polifenolni spojevi vina .....	2
2.1.1. Neflavonoidi .....	2
2.1.2. Flavonoidi .....	3
2.1.3. Kemijske promjene u sastavu polifenolnih spojeva tijekom proizvodnje i dozrijevanja vina .....	5
2.2. Aroma vina .....	6
2.2.1. Sortna aroma .....	6
2.2.2. Aroma fermentacije .....	7
2.2.3. Aroma starenja .....	9
2.3. Utjecaj dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na kemijski sastav vina .....	9
2.4. Visoki hidrostatski tlak .....	12
2.4.1. Povijesni razvoj visokog hidrostatskog tlaka .....	12
2.4.2. Princip djelovanja visokog hidrostatskog tlaka .....	12
2.4.3. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na vino .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	15
3.1. Materijal .....	15
3.1.1. Uzorci vina .....	15
3.1.2. Kemikalije .....	15
3.1.3. Aparatura i pribor .....	16
3.2. Metode .....	18
3.2.1. Priprema vina za tretiranje .....	18
3.2.2. Tretman vina visokim hidrostatskim tlakom .....	18
3.2.3. Punjenje vina u boce i starenje .....	18
3.2.4. Određivanje ukupnih fenola u bijelom i crnom vinu .....	19
3.2.5. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu .....	20
3.2.6. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu .....	21
3.2.7. Određivanje fenolnih kiselina i flavanola u bijelom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) .....	22
3.2.8. Određivanje slobodnih antocijana u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) .....	23
3.2.9. Određivanje spojeva arome bijelog i crnog vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME–GC/MS) .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	27
4.1. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na polifenolni sastav vina .....	27
4.1.1. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na polifenolni sastav vina Graševina .....	27
4.1.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na polifenolni sastav vina Cabernet Sauvignon .....	31
4.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na aromu vina .....	35
4.2.1. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na aromu vina Graševina .....	35
4.2.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na aromu vina Cabernet Sauvignon .....	37
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	40
<b>6. LITERATURA</b> .....	41

# 1. UVOD

Polifenolni spojevi čine kompleksnu skupinu sekundarnih metabolita koji su prisutni u grožđu, odnosno vinu. Njihov sastav u vinu ovisi u prvom redu o sastavu same sirovine (grožđa) i tehnologiji proizvodnje, ali i kemijskim promjena tijekom dozrijevanja i starenja. U proizvodnji vina polifenolni spojevi ističu se višestrukim ulogama. Imaju antioksidacijska svojstva, a također, odgovorni su i za senzorske karakteristike okusa i boje vina te većinu razlika između crnih i bijelih vina. Procesom prerade i primjenom različitih enoloških postupaka, a kasnije i tijekom procesa dozrijevanja i starenja vina, uslijed kompleksnih kemijskih reakcija dolazi do značajnih promjena u sastavu polifenolnih spojeva, a time i senzorskih karakteristika vina.

Aromu vina čini nekoliko stotina različitih spojeva te je ona jedna od najvažnijih parametara kvalitete vina. Ovisno o fazama nastanka aromu vina dijelimo na (i) primarnu odnosno sortnu aromu, koja nastaje u predfermentativnoj fazi; zatim (ii) sekundarnu odnosno fermentacijsku aromu, koja nastaje tijekom procesa fermentacije pod utjecajem djelovanja kvasca; te (iii) tercijarnu odnosno aromu starenja, koja nastaje uslijed kemijskih i biokemijskih promjena u procesu dozrijevanja i starenja vina.

Visoki hidrostatski tlak je netoplinška metoda obrade hrane koja ima sve veću, ali još uvijek nedovoljno zastupljenu primjenu u prehrambenoj industriji. Obrada visokim tlakom podrazumijeva podvrgavanje tekuće ili čvrste hrane djelovanju tlaka od 100 do 800 MPa, u trajanju od nekoliko sekundi do 20 minuta. Ova netoplinška tehnologija ne utječe značajno na povišenje temperature tijekom tretiranja čime senzorska svojstva i sama tekstura proizvoda ostaju u znatnoj mjeri očuvana. Dosadašnja istraživanja pokazala su potencijal primjene visokog tlaka u inaktivaciji mikroorganizama te postizanju funkcionalnosti proizvoda. S druge strane, mogućnosti ove netoplinške tehnologije u enologiji, a posebice njezin dugoročni učinak na kvalitetu vina je nedostavno istražen.

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti djelovanja visokog hidrostatskog tlaka od 200 MPa tijekom 5 minuta i dodatka antioksidansa (standardne i snižene koncentracije sumporovog dioksida te glutaciona) na sastav polifenolnih spojeva i arome bijelog vina Graševina i crnog vina Cabernet Sauvignon tijekom dozrijevanja u bocama.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI VINA

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti, koji uključuju više od 8000 spojeva različite kemijske strukture (Gülçin, 2006). Sastoje se od hidroksilne skupine (-OH) izravno vezane na skupinu aromatskih ugljikovodika. Fenolni spojevi jedan su od najvažnijih parametara kvalitete vina, obzirom da doprinose senzorskim svojstvima, posebno boji, trpkoci i gorčini (Monagas i sur., 2006).

Fenoli u vinu se dijele u dvije velike skupine: neflavonoide (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati te stilbeni) i flavonoide (antocijani, flavanoli i flavonoli) (Monagas i sur., 2006). Hidroksicimetne kiseline, flavanoli (polimeri), antocijani i stilbeni nalaze se uglavnom u pokožici bobice grožđa, dok u pulpi i sjemenci prevladavaju redom hidroksibenzojeve kiseline i flavanoli (monomeri i oligomeri).

#### 2.1.1. Neflavonoidi

Neflavonoidi čine većinu polifenolnih spojeva u bijelim vinima. Različite enzimske reakcije poput hidroksilacije, konjugacije i hidrolize odgovorne su za veliku kemijsku raznolikost spojeva koje pronalazimo u vinu (Garrido i Broges, 2013).

Fenolne kiseline mogu se podijeliti u dvije osnovne grupe, a to su benzojeve kiseline, koje sadrže sedam ugljikovih atoma ( $C_6-C_1$ ) i cimetne kiseline, koje sadrže devet ugljikovih atoma ( $C_6-C_3$ ). Ovi spojevi postoje uglavnom kao hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline koje se mogu pojaviti u slobodnom ili konjugiranom obliku (Garrido i Broges, 2013). Hidroksibenzojeve kiseline razlikuju se po mjestu supstitucije na benzenskom prstenu, a u grožđu su najčešće zastupljene u obliku glikozida ili kao esteri. Od hidroksibenzojevih kiselina najzastupljenije su galna, vanilinska, siringinska i protokatehinska kiselina. Galna kiselina smatra jednim od važnijih fenolnih spojeva, jer je prekursor za sve hidrolizirajuće tanine. Etilni esteri ovih fenolnih kiselina također su identificirani u vinu (Kallithraka i sur., 2009). Hidroksicimetne kiseline su najznačajniji predstavnici fenolnih kiselina u grožđu i vinu općenito. U hidroksicimetne kiseline ubrajaju se: *p*-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, ferulinska i sinapinska kiselina. Hidroksicimetne kiseline povezane su s

posmeđivanjem vina i prekursori su hlapivih fenolnih spojeva (Kallithraka i sur., 2009). *Trans*-kaftarinska i *trans*-ferulinska kiselina su uglavnom smještene u pulpi grožđa te u sok prelaze tijekom prešanja. Nasuprot tome, *trans* -i *cis*- izomeri *p*-kumarinske kiseline su smješteni u kožici grožđa pa je njihova koncentracija nešto niža (Garrido i Broges, 2013). Iako bijela vina imaju nižu koncentraciju fenolnih spojeva u usporedbi s crnim vinima, u svom sastavu imaju visoku koncentraciju hidroksicimetnih kiseline, osobito kaftarinske kiseline. Hidroksicimetne kiseline i njihovi esteri najznačajniji su fenolni spojevi bijelog vina te glavni neflavonoidni fenoli u crnim vinima (Vanzo i sur., 2007).

Stilbeni su fenolni spojevi koji sadrže dva aromatska prstena povezana etenskim mostom. Resveratrol je stilben koji se najčešće spominje u grožđu i vinu. Osim vina, identificiran je u vinovoj lozi i u pokožici bobice te je poznato da se njegova koncentracija značajno smanjuje tijekom sazrijevanja grožđa. Koncentracija resveratrola u vinu ovisit će o koncentraciji u grožđu, pri čemu viša koncentracija može biti posljedica gljivične infekcije (npr. *Botrytis cinerea*) ili produkt abiotičkog stresa (uzrokovana UV zračenjem ili katalizom teških metala) (Pezet i sur., 2003); te o primijenjenoj metodi vinifikacije, kao i uvjetima dozrijevanja i starenja. Koncentracija ovog spoja veća je u crnim u usporedbi s bijelim vinima (Pezet i sur., 2003).

### 2.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi čine veliku skupinu spojeva koji se razlikuju po položaju i broju metilnih i hidroksilnih skupina (Mattivi i sur., 2006), a budući da se oslobađaju tijekom maceracije, karakteristični su za crno vino.

Flavanoli su benzopirani koji imaju zasićeni ugljikov lanac između  $C_2$  i  $C_3$  te hidroksilnu skupinu na  $C_3$ . Najzastupljeniji flavan-3-oli u prirodi su katehin i njegov enantiomer epikatehin, dok su u grožđu i vinu uz navedene spojeve još identificirani i galokatehin, epigalokatehin i epikatehin galat. Ovi spojevi odgovorni su za karakterističan okus (gorčinu) crnog, ali i bijelog vina (Garrido i Broges, 2013). Također, flavan-3-oli smatraju se najosjetljivijim flavonoidima u kontekstu neenzimskih procesa oksidacije (Li i sur., 2008).

Kondenzirani tanini (proantocijanidini) su polimeri flavan-3-ola, smješteni u pokožici i sjemenci grožđa. Ovi spojevi ekstrahiraju se u vino tijekom procesa maceracije i

fermentacije (Koponen i sur., 2007). Koncentracija i struktura proantocijanidina (stupanj polimerizacije) izrazito su važni parametri, odgovorni za osjet i okus vina (trpkocu i gorčinu). Također, zbog sposobnosti oksidacije, kondenzacije i polimerizacije, proantocijanidini imaju važnu ulogu u procesu starenja vina (Cheynier i sur., 2006).

Antocijani su pigmenti odgovorni za crvenu boju vina, a u grožđu i vinu nalaze se u obliku glukozida. Reakcije i ravnoteža antocijana ovisi o pH vrijednosti, pri čemu viša pH vrijednost rezultira nastankom kionidalne forme (plavo-ljubičasta boja), a niža pH vrijednost nastankom flavilijevog kation (crvena boja). U grožđu i vinu identificirano je pet osnovnih slobodnih antocijan-glukozida: cijanidin, delphinidin, malvidin, peonidin i petunidin (Ribereau-Gayon i sur., 2006). Ovi spojevi međusobno se razlikuju po broju metilnih i hidroksilnih grupa na molekuli antocijana, koje također utječu na jači ili slabiji oksidacijski potencijal molekule. Koncentracija i sastav antocijana u grožđu uvjetovan je određenim čimbenicima, kao što su podrijetlo i sorta vinove loze, stupanj zrelosti i vremenski uvjeti (osobito intenzitet svjetlosti i temperature) (Ferrandino i Guidoni, 2010), međutim također i godinom berbe. Wang i sur. (2003) potvrdili su da su malvidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozid acetat glavni antocijani prisutni u ekstraktu grožđa. Koncentracija ovih spojeva u vinu ovisit će o u prvom redu o koncentraciji u grožđu, duljini i temperaturi maceracije i vinifikacije; međutim i o promjenama tijekom dozrijevanja i starenja. Naime, tijekom dozrijevanja ovi spojevi sudjeluju u formiranju antocijan-vinil derivata (Wang i sur., 2003). Također, poznato je kako se smanjenje koncentracije antocijana u vinu događa istovremeno s formiranjem stabilnijih oligomernih pigmenata, a novonastali produkti kondenzacije su manje osjetljivi na pH nego antocijani (Remy-Tanneau i sur., 2003) te pokazuju izuzetnu stabilnost i otpornost na sulfitno obezbojenje (Mateus i sur., 2001).

### 2.1.3. Kemijske promjene u sastavu polifenolnih spojeva tijekom proizvodnje i dozrijevanja vina

Polifenolni sastav vina ovisi u prvom redu o sastavu samog grožđa te uvjetima i tehnikama vinifikacije. Sorta, godina berbe, okolišni i klimatski uvjeti, bolest biljaka, tip tla i geografski položaj također mogu utjecati na koncentraciju polifenolnih spojeva u grožđu (Mulero i sur., 2009). Metode vinifikacije i primijenjeni tehnološki postupci (maceracija, fermentacija, bistrenje, starenje itd.) mogu značajno utjecati na intenzitet promjena u sastavu ovih spojeva (Balik i sur., 2008).

Također, u proizvodnji visoko kvalitetnog vina dozrijevanje u hrastovim bačvama je nezaobilazan dio procesa u proizvodnji vina (Tao i sur., 2014). Dozrijevanjem vina dolazi do modifikacije u sastavu polifenolnih spojeva, ali i spojeva arome pa vino poprima svoj prepoznatljiv miris i okus (zaokruženo tijelo). Naime, kako je ranije istaknuto polifenolni spojevi su najznačajniji sastojci vina koji su izuzetno važni za senzorske karakteristike vina. Antocijani, koji su odgovorni za boju crnih vina, su izrazito nestabilni spojevi koji tijekom dozrijevanja i starenja stupaju u reakcije s drugim polifenolnim spojevima, čime dolazi do stabilizacije boje (He i sur., 2012). Osim boje, različiti polifenoli poput tanina i monomernih i oligomernih flavan-3-ola utječu i na gorčinu, trpkocu te tijelo vina. Monomeri i dimeri flavan-3-ola su više gorki dok su polimeri ti koji su nositelji osjeta trpkocē. Tijekom dozrijevanja u hrastovoj bačvi i/ili u prisutnosti kisika (mikrooksidacija) dolazi do repolimerizacije i precipitacije, a time i smanjenja stupnja polimerizacije tanina (Tao i sur., 2014). Kao posljedica ovih reakcija dolazi do smanjenja gorčine i trpkocē vina (Arfelli i sur., 2011).

Nadalje, starenjem vina u boci koncentracija većine polifenolnih spojeva u vinu se smanjuje. Na promjenu polifenolnog sastava utječu i uvjeti skladištenja. Čimbenici poput temperature i svjetlosti mogu utjecati na hidrolitičke, oksidacijske i kondenzacijske reakcije koje se odvijaju tijekom skladištenja (Kallithraka i sur., 2009). Navedene kvalitativne ili kvantitativne promjene tijekom procesa starenja vina, kako je i ranije navedeno, uglavnom povezane su uz prisutnost hidroksicimetnih estera, antocijana i tanina.

## 2.2. AROMA VINA

Percepcija arome vina je rezultat mnoštva interakcija između velikog broja kemijskih spojeva (kako sinergističkih tako i antagonističkih) i senzornih receptora. Aroma vina ovisit će o brojim činiteljima, među kojima su svakako najvažniji kemijski sastav sirovine odnosno grožđa, mikroflora fermentacije (kvasac *Saccharomyces cerevisiae*) te sekundarna mikroflora koja se može pojaviti tijekom fermentacije. Međutim, i različiti tehnološki postupci nakon fermentacije te postupci dozrijevanja i starenja vina imaju doprinos u stvaranju arome vina (Styger i sur., 2011).

### 2.2.1. Sortna aroma

Hlapivi spojevi u grožđu karakteristika su sorte. Primjerice, aroma muškatnih sorti vina vezana je uz prisutnost izoprenoida i monoterpena u grožđu te spojeva poput linalola, geraniola, nerola i citronelola (Styger i sur., 2011). Monoterpeni se mogu naći u slobodnom i glikozidno vezanim oblicima u bobicama grožđa. Tijekom fermentacije kvasci hidroliziraju glikozidne veze monoterpena, koji doprinose mirisu vina (Hernandez-Orte i sur., 2008). Hlapivi tioli su spojevi sorti vina oslobođeni cijepanjem iz prekursora pod djelovanjem kvasaca tijekom fermentacije, koji daju vinu karakteristični *bouquet*. Ovi spojevi nisu prisutni u soku grožđa u hlapivom obliku, ali se pojavljuju u grožđanom moštu kao konjugati vezani na cistein (Styger i sur., 2011). Nadalje, karotenoidi su izoprenoidi tetraterpena i imaju važnu ulogu u sortnoj aromi. Oksidacijom karotenoida nastaju hlapivi spojevi koji doprinose mirisu, poznati kao C<sub>13</sub>-norizoprenoidi čiji su predstavnici β-damaskenon (tropsko voće), β-ionon (miris ljubičica), noizoprenoid TND (kerozin i petrolej, rajnski rizling) i vitispiren (cvjetno, voćni miris) (Styger i sur., 2011).

### 2.2.2. Aroma fermentacije

Aroma fermentacije je aroma koja se razvija tijekom procesa fermentacije pod utjecajem djelovanja kvasaca. Kvasac različitim mehanizmima utječe na aromu vina: tijekom alkoholnog vrenja biosintezom arome te nakon fermentacije putem autolize, a također može utjecati i na rast malolaktičkih i bakterija kvarenja. Međutim, biosinteza spojeva arome je najvažnija, budući da hlapivi spojevi nastali tijekom fermentacije čine najveći udio ukupne arome (Polaskova i sur., 2008).

Kvantitativno, metaboliti koji su direktni proizvodi i nusproizvodi glikoze se nalaze u najvišoj koncentraciji (etanol i glicerol). Nadalje, visoka koncentracija šećera povećava osmotski stres, koji kvasac mora tolerirati tijekom početne faze fermentacije, ali i koncentraciju etanola i nusproizvoda, glicerola i octene kiseline. Visoke koncentracije etanola osim što utječu negativno na percepciju okusa i arome, mogu povećavati percepciju trpkocće i gorčine vina (Jones i sur., 2008). Glicerol koji je nakon etanola drugi kvantitativno najznačajniji produkt fermentacije značajno pridonosi osjetu vina u ustima.

Nadalje, acetaldehid je također važan sastojak arome koji nastaje tijekom vinifikacije i predstavlja 90 % ukupnog sadržaja aldehida. U niskim koncentracijama pridonosi ugodnoj voćnoj aromi, ali u višim koncentracijama stvara se neugodan miris. Iz acetaldehida tijekom malolaktičke fermentacije nastaje diacetil koji se metabolizira u acetoin i 2,3-butandiol. Diacetil u niskim koncentracijama ima izraženu orašastu aromu, dok u visokim koncentracijama ima karakterističnu maslačnu aromu (Styger i sur., 2011). Također, izrazito je reaktivan, a u reakcijama s cisteinom stvara sumporne spojeve koje znatno utječu na aromu vina.

Nakon alkoholnog vrenja, najčešće slijedi jabučno-mliječna fermentacija, koju provode bakterije mliječne kiseline uključujući *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. i *Pediococcus* spp. (Liu, 2002). Tijekom ovog procesa jabučna kiselina prelazi u mliječnu kiselinu, a mijenja se sastav vina te poboljšavaju njegove senzorske karakteristike (Moreno-Arribas i Polo, 2005). Pritom je utvrđeno da može doći do izraženiije voćne i maslačne arome, a istovremeno do smanjenja zelene, vegetativne arome (Liu, 2002).

Esteri su najzastupljeniji od svih funkcionalnih spojeva u vinu, a otkriveno je više od 160 spojeva. Mogu biti prisutni u samom grožđu, ali većina nastaje uslijed alkoholne fermentacije. Esteri su odgovorni za svježiu, voćnu aromu vina (Swiegers i sur., 2005).

Većina estera se nalazi u vinu u tragovima, osim acetatnih i etilnih estera koji imaju značajan učinak na aromu. Etilni esteri nastaju esterifikacijom etanola s acetyl-CoA, uz enzim aciltransferazu te imaju ugodan miris po voću i medu i doprinose finoći bijelih vina. Do sinteze etil estera tijekom starenja dolazi zahvaljujući većoj količini etanola i prisutnosti različitih kiselina u vinu (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Najpoželjniji etilni esteri u vinu su etil heksanoat te etil oktanoat koji doprinose cvjetnoj i voćnoj aromi vina. Nadalje, acetatni esteri nastaju esterifikacijom octene kiseline i etanola ili viših alkohola. Najznačajniji spoj iz skupine acetatnih estera je etil acetat koji nastaje tijekom alkoholne fermentacije u manjoj količini, dok većina nastaje djelovanjem aerobnih octenih bakterija starenjem u boci (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Uz etil acetat aromatskom profilu vina doprinosi i *i*-amil acetat koji također jedan od zastupljenijih acetatnih estera, a specifičnog je voćnog mirisa po banani (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Viši alkoholi su alkoholi s više od dva ugljikova atoma, a mogu nastati anaboličkim putem, pretvorbom iz ugljikohidrata ili kataboličkim putem transformacijom aminokiselina prisutnih u vinu (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Ovi spojevi imaju snažan miris i okus te značajno utječu na karakter vina. Na njihovu koncentraciju u vinu mogu utjecati različiti čimbenici poput temperature, koncentracije etanola, pH te stupnja zrelosti grožđa. Pri koncentracijama nižim od 300 mg L<sup>-1</sup> doprinose aromatičnosti vina, dok pri višim koncentracijama mogu imati negativan utjecaj na kvalitetu vina (Swiegers i sur., 2005). Od važnijih viših alkohola ističu se *i*-amil alkohol, 1-heksanol koji daje vinima miris po travi te 2-fenil etanol kojeg karakterizira aroma ruže i meda te se smatra jedinim višim alkoholom koji je uvijek poželjan za aromu vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

### 2.2.3. Aroma starenja

Dozrijevanjem vina u hrastovim bačvama i starenjem u bocama dolazi do gubitka karakterističnih aroma vezanih za sortu grožđu i fermentaciju te formiranja nove arome karakteristične za dozrela vina. Tijekom starenja vina dolazi do smanjenja koncentracije etilnih estera odgovornih za voćnu aromu te povećanja koncentracije hlapivih masnih kiselina i dugolančanih alkohola (Perez-Seradilla i Lunque de Castro, 2008). Autolizom kvasca oslobađaju se različite komponente, poput dušika, aminokiselina, peptida i proteina. Važan aspekt su manoproteini koji imaju ulogu pri stabilizaciji boje (Martinez-Rodriguez i sur., 2001). Oslobađanjem masnih kiselina dolazi do stvaranja hlapivih komponenti poput estera, aldehida i ketona. Nadalje, karakteristike drveta, poput poroznosti i propusnosti te kemijskog sastava, (uključujući tanine i druge polifenolne spojeve), mogu utjecati na složene biokemijske procese koji se odvijaju tijekom oksidacijskog starenja vina u hrastovim bačvama.

Ekstrakcija aromatskih spojeva iz drveta pridonosi kompleksnosti arome (Jarauta i sur., 2005), pri čemu vrsta hrasta te njegovo podrijetlo imaju važnu ulogu. Nadalje, sušenje i zrenje su izuzetno važni jer ne samo da smanjuju vlažnost drveta kako bi se postigla ravnoteža s vlažnošću zraka već dovode i do smanjenja gorčine i trpkocće te povećanja aromatičnih svojstva drveta (Tao i sur., 2014).

## **2.3. UTJECAJ DODATKA ANTIOKSIDANSA (SUMPOROV DIOKSID I GLUTATION) NA KEMIJSKI SASTAV VINA**

Sumporni dioksid ( $\text{SO}_2$ ) je najčešće korišten konzervans u proizvodnji vina. Manja količina  $\text{SO}_2$  može nastati metabolizmom kvasca, međutim najveći dio u vinu posljedica je njegovog dodatka tijekom procesa proizvodnje. Veći dio  $\text{SO}_2$  u vinu vezan je za karbonilne spojeve, kao što je acetaldehid, slobodni  $\text{SO}_2$  uglavnom je u obliku bisulfitnog iona ( $\text{HSO}_3^-$ ), a samo mali dio se identificira kao molekularni (slobodni)  $\text{SO}_2$ .

Sumporni dioksid ima višestruka pozitivna djelovanja, a najvažnija su antimikrobna aktivnost čime inhibira rast nepoželjnih bakterija te antioksidativna aktivnost čime potiskuje aktivnost nekoliko oksidaza i neenzimskih oksidativnih reakcija (Roussis i Sergianitis, 2008). Oksidativno posmeđivanje je dugogodišnji problem u vinarstvu, a sumporov dioksid je



antioksidans koji se koristi za kontroliranje posmeđivanja vina (Li, 2008). Nadalje, sprječava mnoge ključne oksidacijske reakcije reagirajući s vodikovim peroksidom i acetaldehidom, koji inače ulaze u reakcije kondenzacije inhibirajući pritom nastanak polimernih pigmenata. SO<sub>2</sub> se može oksidirati u modelnoj otopini vina samo uz prisutnost katalitičkih metala (željezo ili bakar) koji povećavaju oksidaciju etanola u acetaldehid nakon čega slijedi akumulacija SO<sub>2</sub> vezanog na acetaldehid. Bijelo vino, ima znatno manju koncentraciju flavanola, preferira interakciju sa SO<sub>2</sub> putem sulfoniranja indola, dok kod crnog vina interakcija sa SO<sub>2</sub> dovodi do nastanka sulfoniranih monomernih i oligomernih oblika flavanola. Ta reakcija mogla bi biti ključ za razumijevanje poželjnog smanjenja gorkih i oporih nota mladih crnih vina starenjem (Arapitsas i sur., 2018). Naime, sulfonirani monomeri i dimeri flavanola modificiraju reaktivnost spojeva koji su izloženi izravnoj interakciji s proteinima te time poboljšavaju senzornu kvalitetu crnog vina tijekom starenja. Dodavanje sumporovog dioksida (tijekom procesa ekstrakcije) može dovesti do povećanja sadržaja flavan-3-ola te posljedičnog utjecaja na boju i gorčinu vina (Garrido i Broges, 2013). Dokazano je i da sumporov dioksid ima učinak pri povećavanju sposobnosti određenih polifenolnih spojeva poput kafeinske i galne kiseline u cilju zaštite od oksidacije pojedinih spojeva arome uključujući estere i terpene (Badea i Antoce, 2015).

Alergije uzrokovane spojevima dobivenim iz sumporovog dioksida postaju sve učestalije. Slijedom toga, zakonski propisana maksimalna koncentracija SO<sub>2</sub> dopuštena u vinima postupno se smanjuje. Iz tog razloga, ključno je u konkurentnoj globalnoj strategiji proizvodnje vina, smanjiti ili čak eliminirati upotrebu SO<sub>2</sub> kao konzervansa i tražiti nove zdravije i sigurnije strategije (Santos i sur., 2011). Međutim, zbog višestrukih funkcija sumpornog dioksida u očuvanju vina, teško je predvidjeti njegovu potpuna zamjenu. Ipak, glutation koji ima sličnu antioksidacijsku ulogu može pridonijeti smanjenju doziranja sumpornog dioksida u vino (Badea i Antoce, 2015).

Glutation (GSH) je tripeptid L-glutamata, L-cisteina i glicina. Ima antioksidativna svojstva, a prirodno je prisutan u grožđu i vinu u niskim koncentracijama (Kritzinger i sur., 2012). Koncentracija glutaciona u vinu varira ovisno o nizu čimbenika kao što su sorte grožđa, termin berbe, pa sve do upotrebe različitih sojeva kvasaca i tehnologije proizvodnje (Kritzinger i sur., 2012). Ukupna koncentracija GSH u vinu je pod utjecajem metabolizma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* tijekom alkoholne fermentacije. Razine GSH smanjuju se tijekom starenja, a poznato je da pokazuju snažnu zaštitu važnih spojeva arome kao što su esteri, monoterpeni i hlapivi tioli. Mehanizam zaštite spojeva arome temelji se na sposobnosti

glutationa da reagira kao nukleofil s kinonima. Međutim, dozrijevanjem vina na talogu ne dolazi do smanjenja glutaciona (Badea i Antoce, 2015). Važno je razlikovati reducirani i ukupni glutacion, zbog toga što jedino reducirani glutacion ima antioksidativna svojstva. GSH kao antioksidans ima ulogu pri sprječavanju posmeđivanja i gubitka arome vina, procesa koji se odvijaju kao rezultat oksidacije vina. Sa svojim visokim afinitetom za kisik, glutacion sprječava gubitak aromatičnih voćnih nota mladih vina i sprječava prerano starenje vina tako što djeluje inhibitorno na stvaranje 2-aminoacetofenona koji doprinosi razvoju atipične arome tijekom starenja (Badea i Antoce, 2015). Glutacion ima ključnu ulogu i pri oksidaciji mošta, pri čemu zadržava *o*-kinone nastale tijekom oksidacije i sprječava formiranje smeđih pigmenta. Novije studije ukazuju na blagotvoran utjecaj dodavanja glutaciona pri proizvodnji bijelog vina, posebno za očuvanje sortnog karaktera vina dobivenih od aromatičnog grožđa. Dokazan je izravan odnos između oksidacijske stabilnosti bijelih vina, pH vrijednosti, ukupne razine fenola i ukupne količine GSH u vinu tijekom punjenja. Vino s dodanim GSH pri punjenju u boce ograničava akumulaciju acetaldehida i nakon 12 mjeseci starenja čuva kompleksnost i svježinu (Nikolantonaki i sur., 2018).

Glutacion ima pozitivan učinak i na senzorska svojstva vina, a sinergističkim djelovanjem s kafeinskom kiselinom djeluje inhibitorno na smanjenje *i*-amil acetata i etil heksanoata tijekom skladištenja vina (Roussis i Sergianitis, 2008). Nadalje, glutacion može reagirati s vodikovim peroksidom sprječavajući oksidaciju polifenola. Hlapivi i nehlapivi karbonilni spojevi u vinu čine primarne produkte oksidacijskih reakcija u kiselim uvjetima vina, a njihova reaktivnost s GSH može sugerirati učinkovito upravljanje oksidacijskim mehanizmom. Također, glutacion može djelovati neizravno kao kofaktor za nekoliko antioksidacijskih enzima, poput GSH peroksidaze, GSH reduktaze te GSH S-tranferaze te na taj način inhibirati reakcije koje pospješuju posmeđivanje vina (Badea i Antoce, 2015).

## 2.4. VISOKI HIDROSTATSKI TLAK

### 2.4.1. Povijesni razvoj visokog hidrostatskog tlaka

Visoki hidrostatski tlak (HHP) je netoplinska metoda obrade čija povijest upotrebe datira iz 1899. g., kada je otkriveno kako je visokim hidrostatskim tlakom moguće uništiti mikroorganizme te njegovo korištenje u svrhu konzerviranja hrane (Elamin i sur., 2015). Međutim, njegova važnost u prehrambenoj industriji započinje tek oko 1990. g. u Japanu. Nadalje, ova tehnologija nalazi sve veću primjenu u prehrambenoj industriji zbog visokog potencijala da zadovolji sve zahtjeve koje nameću novi trendovi u prehrambenoj industriji. Potencijal primjene visokog tlaka u komercijalne svrhe je u sljedećim područjima obrade hrane: inaktivacija mikroorganizama i enzima, modifikacija funkcionalnih svojstava biopolimera, zadržavanje značajki kvalitete proizvoda (boja, aroma, nutritivna vrijednost) te postizanje funkcionalnosti prehrambenih proizvoda.

### 2.4.2. Princip djelovanja visokog hidrostatskog tlaka

Obrada visokim tlakom podrazumijeva podvrgavanje tekuće ili čvrste hrane, s ambalažom ili bez nje, djelovanju tlaka od 100 do 800 MPa. Temperatura obrade može se kretati od ispod 0 °C do iznad 100 °C, a vrijeme izloženosti djelovanju tlaka, ovisno o cilju obrade, može varirati od nekoliko sekundi do preko 20 minuta (Krešić, 2009). Učinak visokog hidrostatskog tlaka slijedi Le Chatelier-Braunov zakon, u uvjetima ravnoteže, zbog djelovanja povišenog tlaka na zatvoreni sustav bit će pospješene one reakcije koje vode smanjenju volumena, dok će nasuprot tome one reakcije koje vode povećanju volumena sustava biti potisnute. Upravo su zbog ovog fenomena nekovalentne kemijske veze (vodikove, ionske i hidrofobne) osjetljive na djelovanje visokog tlaka dok su nasuprot tome kovalentne veze neosjetljive na njegovo djelovanje. Posljedično, komponente hrane velike molekulske mase u kojima je terciarna struktura od presudne važnosti za izražavanje funkcionalnih svojstava (npr. bjelancevine, enzimi i polisaharidi) podložne su promjenama konformacije i funkcionalnih svojstava zbog tretiranja visokim tlakom. Nasuprot tome, kao glavna prednost djelovanja visokog tlaka ističe se činjenica da su komponente hrane koje su odgovorne za specifičnu nutritivnu vrijednost i senzorske značajke hrane (npr. vitamini i komponente arome), zahvaljujući malom udjelu sekundarne, terciarne i kvaterne strukture praktički neosjetljive na djelovanje visokog tlaka (Krešić i sur. 2011). Tlak može utjecati na

konformaciju makromolekula, temperature faznih prijelaza vode i lipida te na kinetiku kemijskih reakcija. Iako visoki tlak ne može djelovati na kemijske veze u hrani, neke reakcije koje uključuju cijepanje kemijskih veza mogu pod njegovim djelovanjem biti ubrzane ili usporene. Zbog djelovanja visokog hidrostatskog tlaka, ravnoteža kemijskih reakcija pomiče se prema „kompaktnom stanju” (stanje manjeg obujma), a brzina kemijskih reakcija se povećava ili smanjuje ovisno o tome je li „aktivacijski obujam reakcije” (razlika obujma aktivacijskog kompleksa i obujma reaktanata) pozitivan ili negativan. Energija kompresije 1 litre vode pri 400 MPa iznosi 19,2 kJ, što je manje u usporedbi s energijom potrebnom za zagrijavanje 1 litre vode od 20 °C na 25 °C (20,9 kJ). Manja količina energije uključena u tretiranje visokim tlakom objašnjava činjenicu da su kovalentne veze manje osjetljive na djelovanje visokog tlaka u usporedbi s drugim kemijskim vezama (Krešić i sur., 2011). Dodatna pogodnost ovog postupka sa stanovišta potrošnje energije je da nakon postizanja željenog tlaka održavanje tretiranog materijala pod postignutim tlakom ne zahtijeva dodatno dovodenje energije, a vrijeme tretiranja ne ovisi o dimenzijama uzorka. Jedno od najvažnijih svojstava djelovanja visokog tlaka je upravo njegovo brzo i ravnomjerno širenje kroz sustav, što posljedično minorizira utjecaj mase i geometrije uzorka koji se obrađuje. Uslijed navedenog, namirnica koja se obrađuje zadržava svoj oblik i kod ekstremnih tlakova.

Primjena visokog hidrostatskog tlaka kao netopliniska metoda ima brojne prednosti. Visokim hidrostatskim tlakom postiže se antimikrobni učinak uz istodobnu eliminaciju ili znatnu redukciju postupka zagrijavanja, čime se izbjegava toplinska degradacija komponenti hrane, zadržava okus, boja i nutritivna vrijednost. Tretiranje namirnice je brzo i ravnomjerno, a potreba za dodavanjem kemijskih aditiva je minimalna (Krešić i sur., 2011). Novija istraživanja mjerena su na potencijal ove tehnologije za kreiranje novih struktura, okusa i funkcionalnih svojstava hrane nakon tretmana visokim hidrostatskim tlakom.

#### 2.4.3. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na vino

Tretman obrade visokim hidrostatskim tlakom (HHP) je učinkovit alat za inaktiviranje neželjenih mikroorganizama u vinu. Utvrđeno je od strane nekoliko studija da je uz HHP pri umjerenim pritiscima postignuto učinkovito inaktiviranje mikroorganizama u vinu bez izazivanja značajnih fizikalno-kemijskih i senzorskih promjena (Morata i sur., 2012). S druge strane, pokazalo se da je obrada HHP na 650 MPa uzrokovala promjene u fizikalno-kemijskim i senzornim svojstvima vina (Tao i sur., 2012). Osim toga, istraživanja koja su

proveli Santos i sur. (2013a), pokazala su da je HHP dugoročno utjecao na fizikalno-kemijske parametre crnih i bijelih vina bez sumpornog dioksida. Također, dosadašnja istraživanja pokazuju uspješnu primjenu visokog hidrostatskog tlaka kao tehnologije za ubrzano dozrijevanja vina (Santos i sur., 2013b). Jedna od mogućih primjena HHP u vinarstvu uključuje i tretman vina hrastovim čipsom, čime se ubrzava oslobađanje spojeva iz hrasta i modificira sastav vina u kratkom vremenskom tretmanu (Tao i sur. 2015). Sa stajališta starenja vina HHP se može potencijalno koristiti za promjenu ravnoteže kemijskih reakcija u vinu i ubrzano mijenjanje senzorskih svojstava vina, odnosno za ubrzavanje procesa starenja vina. Naime, nedostatak tradicionalnog dozrijevanja vina u hrastovim bačvama upravo je vrijeme potrebno za starenje, međutim i drugi faktori kao što su visoka cijena drvenih bačava, prostor koji zauzimaju u vinariji, ograničeni životni vijek, ali i potencijalno mikrobiološko onečišćenje. Stoga primjena HHP-a za starenje vina može biti od koristi vinskoj industriji u navedenim aspektima.. Osim toga, trošak HHP opreme također treba uzeti u obzir u njegovoj primjeni (Tao i sur., 2012).

Novija istraživanja usmjerena su na mogućnosti iskorištenja visokog hidrostatskog tlaka i drugih tehnologija (poput pulsirajućeg električnog polje, ultrazvučnog i/ili UV zračenja) kao alternativnih tehnologija kojima bi se potencijalno mogla smanjiti upotreba SO<sub>2</sub> u vinarstvu. Naime, sumporov dioksid ima široku primjenu u vinarstvu. Jedna od njegovih najvažnijih uloga antioksidacijsko djelovanje kojim se smanjuje aktivnost enzima prvenstveno polifenoloksidaze, ali i oksidacijske promjene polifenolnih spojeva (Jackson, 2000). Nadalje, dodatak SO<sub>2</sub> tijekom prerade grožđa u koncentraciji od 30-50 mg L<sup>-1</sup> je nužan jer djeluje inhibitorno na rast nepoželjnih mikroorganizama kao i enzima (Jackson, 2000 ). Međutim, obzirom da ovaj aditiv kod osjetljivih pojedinaca može izazvati alergijske reakcije, posljednjih godina stvorile se potrebu za njegovim smanjenjem ili zamjenom. Primjena visokog hidrostatskog tlaka s nižom dozom SO<sub>2</sub> pokazala se potencijalno jednako učinkovito kao i veća doza SO<sub>2</sub> (Santos i sur., 2013b). Međutim, da bi primjena ove tehnologije zaživjela u punoj mjeri potrebno je svakako ispitati i njezin dugoročni učinak na kvalitetu vina (sastav polifenolnih spojeva i arome) kao i njegove senzorske karakteristike.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Uzorci vina

Vina, korištena u ovom radu, bila su bijelo vino Graševina te crno vino Cabernet Sauvignon (Erdutski vinogradi d.o.o., Erdut, Hrvatska), proizvedena 2017. godine sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

Tablica 1. Osnovni fizikalno-kemijski sastav vina Graševina i Cabernet Sauvignon

Parametar	Graševina	Cabernet Sauvignon
Alkohol (vol %)	11,4	13,1
Ukupna kiselost (g L <sup>-1</sup> vinske kiseline)	5,1	5,3
Hlapiva kiselost(g L <sup>-1</sup> octene kiseline)	0,31	0,61
Reducirajući šećeri (g L <sup>-1</sup> )	2,8	4,1
pH	3,37	3,46
Jabučna kiselina (g L <sup>-1</sup> )	1,2	0,1
Mliječna kiselina (g L <sup>-1</sup> )	0,3	1,3
Ukupni sumporov dioksid (mg L <sup>-1</sup> )	78	25
Slobodni sumporov dioksid (mg L <sup>-1</sup> )	15	15

##### 3.1.2. Kemikalije

Reagensi korišteni u spektrofotometrijskim analizama bili su najmanje pro analysis (p.a.) stupnja čistoće, a za analizu provedenu plinskom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti svi reagensi i standardi bili su pro chromatography stupnja čistoće.

- Natrijev klorid, Carlo Erba, Vale de Reuil, Francuska
- *n*-amil alkohol, Fluka, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev karbonat, bezvodni, p.a., Gram-mol, Zagreb, Hrvatska

- Natrijev hidrogen sulfit, p.a., Acros, Geel, Belgija
- Folin Ciocalteu reagens, Reagecon, Shannon, Irska
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Mravlja kiselina (98-100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Etanol (96 %), Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- Metanol (100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Metanol, HPLC čistoće, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska
- Acetonitril (100 %), HPLC čistoće, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska
- Galna kiselina, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- Protokatehinska kiselina, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- Vanilinska kiselina, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- Siriginska kiselina, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- Kafeinska kiselina, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- *p*-Kumarinska kiselina, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- Ferulinska kiselina, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- Kaftarinska kiselina, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- (+)-Katehin, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- (-)-Epikatehin, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- Procijanidin B1, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- Procijanidin B2, SigmaAldrich, St.Louis, MO, SAD
- Malvidin-3-*O*-glukozid klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### *Aparatura:*

- Uređaj za visoki tlak: FPG7100 Stansted Fluid Power Iso-lab High Pressure System; Stansted Fluid Power Ltd., Harlow, Essex, UK
- Uređaj za vakuumiranje, Besser Vacuum SRL, Dignano, Italija
- Spektrofotometar (Specord 50 Plus), AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD
- Termostat, Inkolab, Zagreb, Hrvatska

- HPLC Agilent Technologies 1260 Series, Santa Clara, CA, SAD sastavljen iz sljedećih komponenti:
  - ✓ *Kvarterna Pumpa (Bin Pump SL) G7111B*
  - ✓ *Autosampler (DL-ALS) G2258A*
  - ✓ *Termostat Autosampler-a (FC/ALS Term) G1330B*
  - ✓ *Temostatirani odjeljak za kolonu (TCC SL ) G1316B*
  - ✓ *Diode Array Detector (DAD VL) G1316A*
  - ✓ *Agilent Chemstation Softver*
- Plinski kromatograf (GC), Agilent Technologies 6890 Network GC System, Santa Clara, CA, SAD
- Maseni spektrometar, Agilent Technologies 5973 *Inert* Mass Selective Detector, Santa Clara, CA, SAD
- Termoblok s magnetskom miješalicom, Pierce, Reacti-Therm, Heating/Stirring module, No. 18971, Rockford, IL, SAD

*Pribor:*

- Plastične vrećice za vakuumiranje, Jarden Consumer Solutions, Chesire, UK
- Plastične bočice volumena 100 mL
- Mikropipete od 100 i 1000  $\mu$ L, Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD
- Staklene tube za hidrolizu, Pirex, Corning, NY, SAD
- Pipete volumena 10, 20, 25 mL
- Odmjerne tikvice volumena 10, 25, 50, 100, 250, 500 i 1000 mL
- Staklene epruvete
- Plastična ladica za vaganje
- Laboratorijske čaše volumena 100, 150, 250 mL
- Staklene kivete od 1 cm
- SPME vlakno: 100  $\mu$ m PDMS, 23 Ga, Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- Magnet
- HSS bočice, 20 mL, Restek, Bellefonte, PA, USA
- Slikonski čepovi za HSS bočice, Düren, Njemačka



## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema vina za tretiranje

Vina koja su tretirana uključivala su nekoliko varijanti s odnosno bez antioksidansa, a pritom su korišteni antioksidansi sumporov dioksid i glutation. Varijante tretiranih vina obuhvatile su: (a) vino sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> (15 mg L<sup>-1</sup> slobodnog SO<sub>2</sub>) (b) vino sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> i glutationom (15 mg L<sup>-1</sup> slobodnog SO<sub>2</sub> uz dodatak 20 mg L<sup>-1</sup> glutationa) te (c) vino sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub> (30 mg L<sup>-1</sup> slobodnog SO<sub>2</sub>). Kontrolno vino je vino sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub>. Primijenjene varijante bile su jednake za crno i bijelo vino.

### 3.2.2. Tretman vina visokim hidrostatskim tlakom

Tretman vina visokim hidrostatskim tlakom proveden je pomoću uređaja za visoki tlak (FPG7100, Stansted Fluid Power, Iso-lab High Pressure System, Stansted Fluid Power Ltd., Harlow, Essex, UK). Tretiranja su izvršena pri tlaku od 200 MPa i trajanju tretmana od 5 minuta. Postupak HHP tretiranja vina bio je sljedeći: plastična bočica od 100 mL napunjena je vinom do vrha, dobro zatvorena čepom te vakuumirana u vrećicu. Potom je postavljena u radni cilindar volumena 2000 mL ispunjenim tlačnom tekućinom (propilen–glikol).

### 3.2.3. Punjenje vina u boce i starenje

Nakon provedenog tretmana, vina su odmah punjena u boce koje su potom zatvorene plutenim čepom uz pomoć ručne čepilice. Prije prelijevanja vina, boce su propuhane dušikom (kroz 1,5 min) zbog eliminacije kisika iz unutrašnjosti boce.

Odmah nakon provedenog punjenja u boce, vina su skladištena pri kontroliranim uvjetima u hladnjaku. Boce s vinom su postavljene u vodoravni položaj te su čuvane na suhom i tamnom mjestu. Temperatura hladnjaka za čuvanje vina iznosila je 12 °C.

### 3.2.4. Određivanje ukupnih fenola u bijelom i crnom vinu

#### *Princip određivanja:*

Određivanje ukupnih polifenola temelji se na reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteu reagensom kojeg čine smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline (Singleton i Rossi, 1965). Intenzitet nastalog plavog obojenja izmjeren je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm. Dobiveni rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u  $\text{mg L}^{-1}$ .

#### *Postupak određivanja:*

U tikvicu od 100 mL otpipetirati 1 mL uzorka bijelog vina ili razrijeđenog (1:9) uzorka crnog vina, 5 mL Folin Ciocalteu reagensa (razrijeđenog 1:2) i 60 mL vode. Sve promiješati i nakon 30 sekundi dodati 15 mL 20 % otopine natrijevog karbonata. Zatim tikvicu nadopuniti do oznake s destiliranom vodom i ostaviti 2 sata na sobnoj temperaturi. Slijepu probu pripremiti na isti način, ali umjesto uzorka uzeti 1 mL destilirane vode. Nakon 2 sata izmjeriti apsorbanciju pri valnoj duljini od 765 nm.

#### *Izrada baždarnog pravca:*

Otopine galne kiseline pripremiti u 100 % metanolu sljedećih koncentracija: 50, 200, 400 i 600  $\text{mg L}^{-1}$ . U tikvicu od 100 mL otpipetirati 1 mL otopine određene koncentracije, te za daljnje korake koristiti propis za određivanje ukupnih fenola. Izraditi baždarni pravac pri čemu koncentraciju galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ) nanijeti na apscisu, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri valnoj duljini od 765 nm.

#### *Račun:*

Pomoću programa Microsoft Excel dobivena je jednadžba pravca prema kojoj je izračunata koncentracija ukupnih fenola.

Izračunata jednadžba pravca:

$$y = 0,0010x + 0,0276$$

$$R^2 = 0,999$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm

x- koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$R^2$ - koeficijent determinacije

### 3.2.5. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu

#### *Princip određivanja:*

Ukupni tanini određeni su Bate-Smith metodom temeljenoj na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina, tzv. kondenziranih tanina na temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1966).

Razlika u obojenju zagrijanog, hidroliziranog i nehidroliziranog uzorka koji je bio na sobnoj temperaturi određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 550 nm, a pokazuje količinu ukupnih tanina u uzorku.

#### *Postupak određivanja:*

U dvije tube za hidrolizu otpipetirati po 2 mL uzorka (razrijeđenog 49:1), 1 mL destilirane vode te 3 mL koncentrirane klorovodične kiseline te tube hermetički zatvoriti. Jednu tubu ostaviti je na sobnoj temperaturi, a drugu staviti u vodenu kupelj na temperaturu od 100 °C. Nakon 30 minuta, tuba izvaditi iz vodene kupelji te ju ohladiti ledom kako bi se što prije zaustavila daljnja reakcija kiselinske hidrolize. U svaku od tuba potom dodati 0,5 mL etanola. Izmjeriti optičku gustoću pri valnoj duljini 550 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

#### *Račun:*

Koncentracija tanina u 50 puta razrijeđenom uzorku izračunata je prema formuli:

$$\text{Tanini (g L}^{-1}\text{)} = 19,33 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:

19,33- faktor preračunavanja

D<sub>1</sub>- optička gustoća hidroliziranog uzorka

D<sub>2</sub>-optička gustoća nehidroliziranog uzorka

### 3.2.6. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu

#### *Princip određivanja:*

Ukupni antocijani u uzorku crnog vina određeni metodom temeljenoj na dodatku otopine natrij hidrogensulfita u uzorak te činjenici da se  $\text{HSO}_3^-$  ion veže na 2' položaj obojene molekule antocijana te ju tako prevodi iz obojenog kationa u bezbojni leuko oblik. Paralelni uzorak vina istovremeno je tretiran destiliranom vodom pri čemu ne dolazi do promjene na strukturi molekula antocijana. Količinu prisutnih antocijana u crnom vinu pokazuje razlika spektrofotometrijski određenih apsorbancija u oba uzorka (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1965).

#### *Postupak određivanja:*

U tikvicu od 25 mL otpipetirati 1 mL uzorka, 1 mL 0,1 (v/v) klorovodičnom kiselinom zakiseljenog 96 % etanola i 20 mL 2 % vodene otopine klorovodične kiseline. Zatim, po 10 mL napravljene smjese otpipetirati u dvije tikvice nakon čega u prvu tikvicu dodati 4 mL destilirane vode, a u drugu 4 mL 15 % otopine natrij hidrogensulfita. Nakon 15 minuta izmjeriti apsorbancija oba uzorka na 520 nm pri čemu kao slijepu probu koristiti destiliranu vodu.

#### *Račun:*

Koncentracija antocijana u ispitivanom uzorku izračunata je prema formuli:

$$A_c (\text{mg L}^{-1}) = 875 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:

$A_c (\text{mg L}^{-1})$  – količina antocijana u ispitivanom uzorku

875 – faktor preračunavanja

$D_1$ - apsorbancija uzorka kojemu je dodana voda

$D_2$ - apsorbancija uzorka kojemu je dodana 15 % otopina natrijevog hidrogensulfita

### 3.2.7. Određivanja fenolnih kiselina i flavanola u bijelom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Analiza hidroksibenzojevih kiselina (galna, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina), hidroksicimetnih kiselina (kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska, kaftarinska kiselina), flavan-3-ol monomera [(+)-katehin i (-)-epikatehin] i flavan-3-ol dimera (procijanidin B1 i B2) provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) na Agilent1260 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module kvarterne pumpe, autosamplera, modula kolone te uz detekciju na DAD detektoru.

Priprema uzorka za HPLC analizu sastojala se filtriranja uzorka vina kroz celuloza acetat filtar promjera 25 mm i veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20  $\mu\text{L}$  ovako pripremljenog uzorka. Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na koloni Gemini C18, dimenzija 250 x 4.6 mm (Phenomenex, SAD), pri temperaturi od 25  $^{\circ}\text{C}$  te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 98:2; v/v) i otapalo B (metanol). Pripremljene mobilne faze su filtrirane i odzračene. Razdvajanje fenolnih kiselina, flavanola provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u tablici 2. uz protok mobilne faze od 1  $\text{mL min}^{-1}$ .

Tablica 2. Gradijent korišten kod HPLC analize fenolnih kiselina i flavanola

Vrijeme (min)	A (%)	B (%)	Protok ( $\text{mL min}^{-1}$ )
0	98	2	1
20	68	32	1
30	60	40	1
40	50	50	1
50	50	50	1

Detekcija fenolnih spojeva provedena je pomoću DAD detektora snimanjem spektra od 220 do 450 nm. Identifikacija fenolnih spojeva provedena je na sljedećim valnim duljinama: 280 nm (hidroksibenzojeve kiseline i flavanoli) te 320 nm (hidroksicimetne kiseline). Kvantifikacija spojeva je provedena usporedbom retencijskog vremena ( $R_t$ ) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar spoja.

Koncentracija pojedinačnih polifenolnih spojeva (galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska, kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska, kaftarinska kiselina, katehin, epikatehin, procijanidin B1 i B2) izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravca pripadajućih standarda. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su u mg L<sup>-1</sup>. Ukupne hidroksibenzojeve kiseline izračunate su kao suma koncentracije galne, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiseline, dok su ukupne hidroksicimetne kiseline izračunate kao suma kafeinske, ferulinske, *p*-kumarinske i kaftarinske kiseline. Ukupni flavan-3-ol monomeri izračunati su kao suma katehina i epikatehina, dok su ukupni flavan-3-ol dimeri izračunati kao suma procijanidina B1 i B2.

### 3.2.8. Određivanje slobodnih antocijana u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Sastav ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozid), antocijan-3-*O*-glukozid acetata (peonidin-3-*O*-glukozid acetat i malvidin-3-*O*-glukozid acetat), antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat) u uzorcima vina određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Kromatografske analize provedene su na Agilent1260 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module kvarterne pumpe, autosamplera, modula kolone te uz detekciju na DAD detektoru.

Priprema uzorka za HPLC analizu sastojala se od filtriranja uzorka vina kroz celuloza acetat filter promjera 25 mm i veličine pora 0,45 μm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 μL ovako pripremljenog uzorka. Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na koloni Nucleosil C18, dimenzija 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD), pri temperaturi od 40 °C te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 95:5; v/v) i otapalo B (acetonitril/mravlja kiselina; 95:5; v/v) (Lorrain i sur., 2011). Pripremljene mobilne faze su filtrirane i odzračene. Razdvajanje slobodnih antocijana provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u tablici 3. uz protok mobilne faze od 1 mL min<sup>-1</sup>.

Tablica 3. Gradijent korišten kod HPLC analize slobodnih antocijana

Vrijeme (min)	A (%)	B (%)	Protok (mL min <sup>-1</sup> )
0	90	10	1
25	65	35	1
26	0	100	1
28	0	100	1
29	90	10	1
35	90	10	1

Slobodni antocijani detektirani su pomoću DAD detektora snimanjem spektra od 280 do 600 nm. Identifikacija i kvantifikacija slobodnih antocijana provedena je na 520 nm usporedbom retencijskog vremena (Rt) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar spoja. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a koncentracije pojedinačnih slobodnih antocijana izražene su kao ekvivalent malvidin-3-*O*-glukozid klorida (mg L<sup>-1</sup>). Ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozidi izračunati su kao suma koncentracija delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozida. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid acetati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid acetata i malvidin-3-*O*-glukozid acetata. Ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.

### 3.2.9. Određivanje spojeva arome bijelog i crnog vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS)

Za određivanje spojeva arome korištena je plinska kromatografija s masenom detekcijom (GC/MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME). Pri tom su određeni sljedeći spojevi arome: norizoprenoidi [ $\beta$ -damaskenon i 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN)], esteri [etilni esteri (etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat i dietil sukcinat), acetatni esteri (etil acetat, *i*-butil acetat, *i*-amil acetat, heksil acetat i 2-feniletil acetat) i ostali esteri (metil oktanoat i metil dekanat)], viši alkoholi (*i*-amil alkohol, 1-heksanol, *cis*-3-hexen-1-ol i 2-fenil etanol) i hlapive masne kiseline (kapronska, kaprilna i kaprinska kiselina).

Princip GC/MS analize temelji se na razdvajanju spojeva arome u uzorku koji se strujom inertnog plina nosioca unosi na kromatografsku kolonu. Na koloni se razdvajaju sastojci između nepokretne faze - adsorbensa i pokretne faze – plina nosioca. Vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na kromatografskoj koloni pri zadanim uvjetima naziva se retencijsko vrijeme. Na izlazu iz kolone je maseni detektor u kojem se određuje prisutnost odijeljenih sastojaka uzorka u pokretnoj fazi. U masenom detektoru dolazi do ionizacije spojeva te svaki spoj karakterizira određeni omjer mase i naboja ( $m/z$ ). Detektor redom detektira količinu eluiranih sastojaka kao funkciju vremena te na računaru dobivamo kromatogram. Svaki pik na kromatogramu karakterističan je za pojedini spoj, a površina ispod pika proporcionalna je koncentraciji pojedinog spoja u uzorku. Integracijom površine dobiva se točna koncentracija izražena u  $\text{mg L}^{-1}$ .

GC/MS analiza:

Kromatografska kolona: BP20 (50 m x 220  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ), SGE Analytical Science, Victoria, Australija

Uvjeti rada plinskog kromatografa (GC/MS):

- Temperatura injektora: 250 °C
- Temperatura detektora: 280 °C
- Temperaturni program: 40 °C, 5 min  $\rightarrow$  200 °C, 3 °C min<sup>-1</sup>  $\rightarrow$  240 °C, 30 °C min<sup>-1</sup>
- Pokretna faza: Helij
- Protok pokretne faze: 1,2 mL min<sup>-1</sup>



- Mode injektiranja: „Splitless“

*Priprema uzorka za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME):*

U odmjernu tikvicu volumena 50 mL dodati dio uzorka vina i interni standard – *n*-amil alkohol u koncentraciji od 20 mg L<sup>-1</sup> te nadopuniti tikvicu uzorkom vina do oznake. Zatim, pripremljeni uzorak staviti u termostat na temperaturu od 20 °C. Izvagati 2 +/- 0,05 g natrijevog klorida na analitičkoj vagi u HSS bočicu i dodati 10 mL pripremljenog uzorka s internim standardom. Cilj dodavanja natrijevog klorida je povećati ionsku jakost, odnosno povećati učinkovitost same ekstrakcije. U HSS bočicu s uzorkom dodati magnet, a potom bočicu zatvoriti i postaviti u termoblok s magnetskom miješalicom koji je prethodno zagrijan na 40 °C. Postaviti SPME iglu na adsorpciju uz konstantnu temperaturu i miješanje kroz 30 minuta. Nakon adsorpcije vlakno prenijeti u injektor plinskog kromatografa i postaviti na desorpciju u trajanju od pet minuta.

*Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome:*

Identifikacija spojeva arome provedena je usporedbom retencijskih vremena spojeva s retencijskim vremenima standarda te usporedbom masenih spektara spojeva s masenim spektrima u Nist05 knjižnici masenih spektara. Kvantifikacija navedenih spojeva arome provedena primjenom baždarnih krivulja pripadajućih standarda. Analiza pojedinog uzorka provedena je u duplikatu, a dobiveni rezultati su izraženi u mg L<sup>-1</sup>. Ukupni norizoprenoidi izračunati su kao suma koncentracija  $\beta$ -damaskenona i TDN-a. Ukupni etilni esteri izračunati su kao suma koncentracija etil butanoata, etil heksanoata, etil oktanoata, etil dekanata i dietil sukcinata; dok su acetatni esteri izračunati su kao suma koncentracija etil acetata, *i*-butil acetata, *i*-amil acetata, heksil acetata i 2-feniletal acetat, a ukupni ostali esteri kao suma metil oktanoata i metil dekanata. Ukupni viši alkoholi izračunati su kao suma *i*-amil alkohola, 1-heksanola, *cis*-3-hexen-1-ola, 2-fenil etanola. Ukupne hlapive masne kiseline izračunate su kao suma kapronske, kaprilne i kaprinske kiseline. Računalna obrada dobivenih kromatograma provedena je u programu Enhanced ChemStation (Agilent Technologies), a analiza rezultata u programu Microsoft Excel 2016.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu ispitan je utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa tijekom 5 minuta uz dodatak antioksidansa na sastav polifenolnih spojeva i aromu bijelog i crnog vina nakon 12 mjeseci starenja u bocama.

U bijelom vinu Graševina provedeno je spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih fenola, dok je koncentracija fenolnih kiselina i flavanola određena primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). U crnom vinu Cabernet Sauvignon provedeno je spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih fenola, tanina i antocijana, dok je koncentracija slobodnih antocijana provedena HPLC analizom.

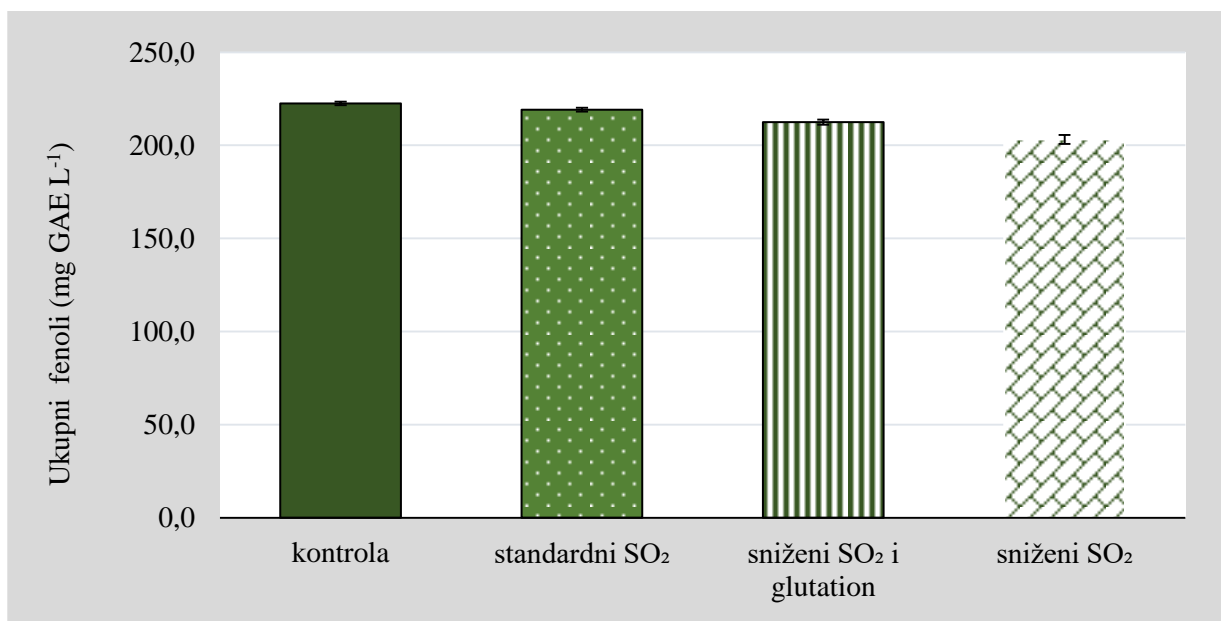
Analiza arome u bijelom i crnom vinu provedena je plinskom kromatografijom u kombinaciji s masenom spektrometrijom uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS).

Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 1-4, u obliku grafova te u tablicama 4-7 za svaki pojedini spoj i to kao srednja vrijednost koncentracije dva ponavljanja uz standardnu devijaciju.

### **4.1. UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA I DODATKA ANTIOKSIDANSA NA POLIFENOLNI SASTAV VINA**

#### **4.1.1. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na polifenolni sastav vina Graševina**

Nakon 12 mjeseci starenja nije utvrđena značajna razlika između kontrolnog uzoraka koji nije tretiran visokim hidrostatskim tlakom i uzorka sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub> koji je tretiran visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa tijekom 5 minuta (slika 1). Nadalje, kod vina sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> i dodatkom glutaciona zamijećen je blagi pad koncentracije ukupnih fenola, dok je najniža koncentracija uočena u uzorku vina sa sniženim SO<sub>2</sub>. Uspoređujući posljednja dva uzorka može se zaključiti kako je dodatak glutaciona imao zaštitnu ulogu s obzirom da je veća koncentracija ukupnih fenola utvrđena u vinu s dodatkom ovog antioksidansa. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Santos i sur. (2013a), u kojem je ispitan utjecaj visokog hidrostatskog tlaka od 500 MPa i 425 MPa u trajanju



Slika 1. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih fenola u vinu Graševina

tretmana od 5 minuta na sastav fenolnih spojeva bijelog vina s 40 ppm SO<sub>2</sub> tijekom 12 mjeseci skladištenja. Tretirana vina pokazala su nižu koncentraciju ukupnih fenola te manju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na kontrolu, a kao razlog smatra se stvaranje visoko reaktivnih radikala tijekom tretmana visokim hidrostatskim tlakom te oksidacije fenola tijekom skladištenja (Santos i sur. 2013a).

Tretiranje visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa tijekom 5 minuta utjecalo je na blago smanjenje koncentracije većine hidroksibenzojevih kiselina osim vanilinske kiseline, obzirom da su netretiranom kontrolnom vinu utvrđene neznatno veće koncentracije navedenih spojeva od onih u tretiranim uzorcima vina (tablica 4). Također, navedeni tretman vina utjecao je i na smanjenje koncentracije hidroksicimetnih kiselina u svim uzorcima, izuzev ferulinske kiseline. Značajniji utjecaj tretmana visokim tlakom doveo je do smanjenja *p*-kumarinske kiseline u posljednja dva tretmana. Istraživanjem utjecaja visokog hidrostatskog tlaka na fenolni sastav vina, Chen i sur. (2012) utvrdili su promjene u koncentraciji pojedinih fenolnih kiselina. Naime, najveće promjene nakon tretmana uočene su kod kafeinske i siringinske kiseline, dok je koncentracija ferulinske kiseline ostala gotovo ista. Promjene su bile značajnije pri tretmanu višim tlakovima odnosno pri tlaku od 400 MPa došlo je do smanjenja koncentracije fenolnih kiselina (Chen i sur., 2012). Nadalje, u tretiranim uzorcima utvrđen je i pad koncentracije flavan-3-ol monomera, međutim samo u

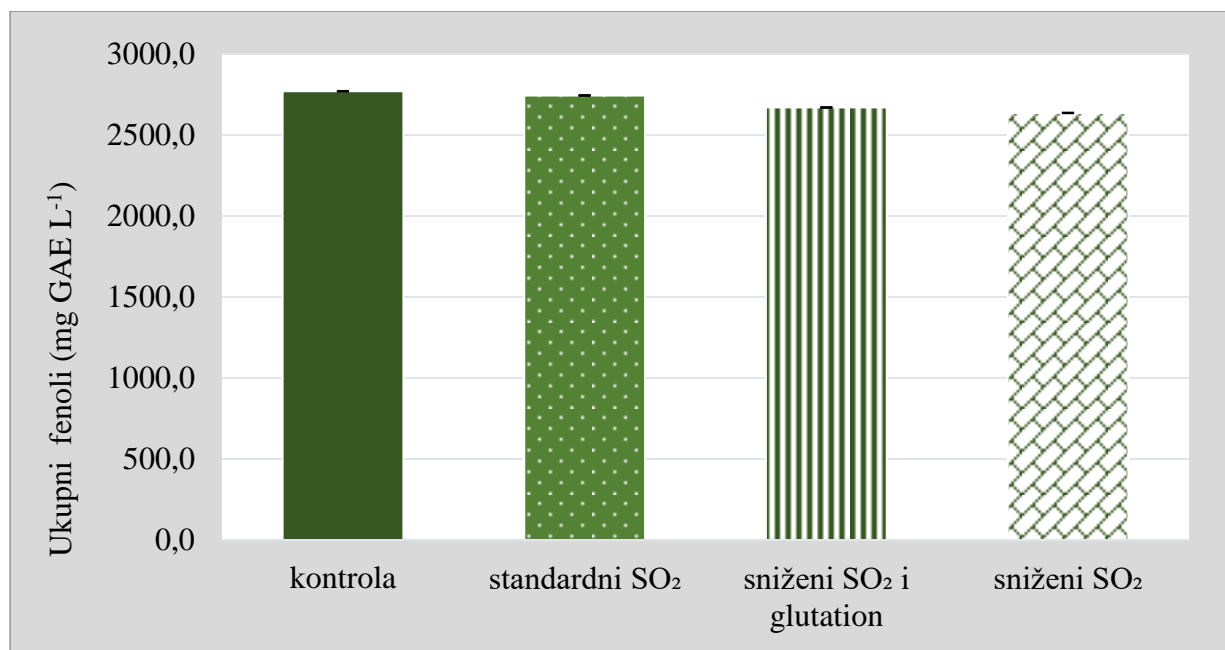
uzorcima sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, pri čemu su najniže koncentracije utvrđene u uzorku bez dodatka glutationa. Santos i sur. (2018) ispitali su utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na sastav flavanola i fenolnih kiselina, a dobiveni rezultati ukazali su na veću koncentraciju katehina i epikatehina u kontrolnim netretiranim uzorcima, kao i nižu koncentraciju procijanidina B1 i B2 u tretiranom uzorku u odnosu na kontrolni uzorak. Navedenim istraživanjem također je utvrđeno kako tretman tlakom od 500 MPa u trajanju od 5 minuta utječe na smanjenje koncentracije fenolnih kiselina, dok je u kontrolnom vinu uočene više koncentracije kaftarinske, vanilinske, ferulinske i sinapinske kiseline u odnosu na tretirana vina. Smanjenje koncentracije tih fenolnih spojeva u tretiranom vinu mogu biti povezani s proizvodnjom visoko reaktivnih radikala tijekom tlačenja, što može dovesti do brže kemijske oksidacije te utjecati na polimerizaciju fenolnih spojeva tijekom starenja (Santos i sur., 2018).

Tablica 4. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na koncentraciju fenolnih kiselina i flavanola u vinu Graševina

	<b>UZORCI</b>			
	kontrola	standardni SO <sub>2</sub>	sniženi SO <sub>2</sub> i glutation	sniženi SO <sub>2</sub>
<b>HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE</b>				
Galna kiselina	4,11 ± 0,07	4,08 ± 0,02	4,04 ± 0,02	3,99 ± 0,00
Protokatehinska kiselina	3,22 ± 0,27	3,12 ± 0,03	3,05 ± 0,04	3,63 ± 0,07
Vanilinska kiselina	4,43 ± 0,23	4,32 ± 0,77	3,92 ± 0,15	4,44 ± 0,21
Siringinska kiselina	2,34 ± 0,13	2,28 ± 0,01	2,14 ± 0,01	2,13 ± 0,05
Ukupne hidroksibenzojeve kiseline	14,10 ± 0,44	13,8 0 ± 0,77	13,15 ± 0,19	14,20 ± 0,09
<b>HIDROKSICIMETNE KISELINE</b>				
Kafeinska kiselina	3,90 ± 0,05	3,86 ± 0,00	3,85 ± 0,00	3,81 ± 0,01
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	2,33 ± 0,01	2,33 ± 0,00	1,94 ± 0,13	2,05 ± 0,01
Ferulinska kiselina	2,54 ± 0,01	2,60 ± 0,08	2,57 ± 0,02	2,66 ± 0,04
Kaftarinska kiselina	40,05 ± 0,99	38,94 ± 0,18	38,65 ± 0,41	39,06 ± 0,07
Ukupne hidroksicimetne kiseline	48,82 ± 0,94	47,72 ± 0,26	47,01 ± 0,30	47,58 ± 0,04
<b>FLAVAN-3-OL MONOMERI</b>				
(+)-Katehin	7,27 ± 0,22	7,97 ± 0,14	6,52 ± 2,63	3,78 ± 0,31
(-)-Epikatehin	11,87 ± 0,05	11,36 ± 0,70	10,22 ± 0,66	11,85 ± 0,04
Ukupni flavan-3-ol monomeri	19,14 ± 0,18	19,32 ± 0,85	16,73 ± 1,97	15,63 ± 0,27
<b>FLAVAN-3-OL DIMERI</b>				
Procijanidin B1	2,69 ± 0,02	2,73 ± 0,06	2,71 ± 0,23	2,47 ± 0,05
Procijanidin B2	3,23 ± 0,17	3,27 ± 0,06	4,59 ± 0,51	4,35 ± 0,18
Ukupni flavan-3-ol-dimeri	5,92 ± 0,15	6,00 ± 0,00	7,30 ± 0,74	6,82 ± 0,13

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. Koncentracija spoja izražena je u mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na polifenolni sastav vina Cabernet Sauvignon

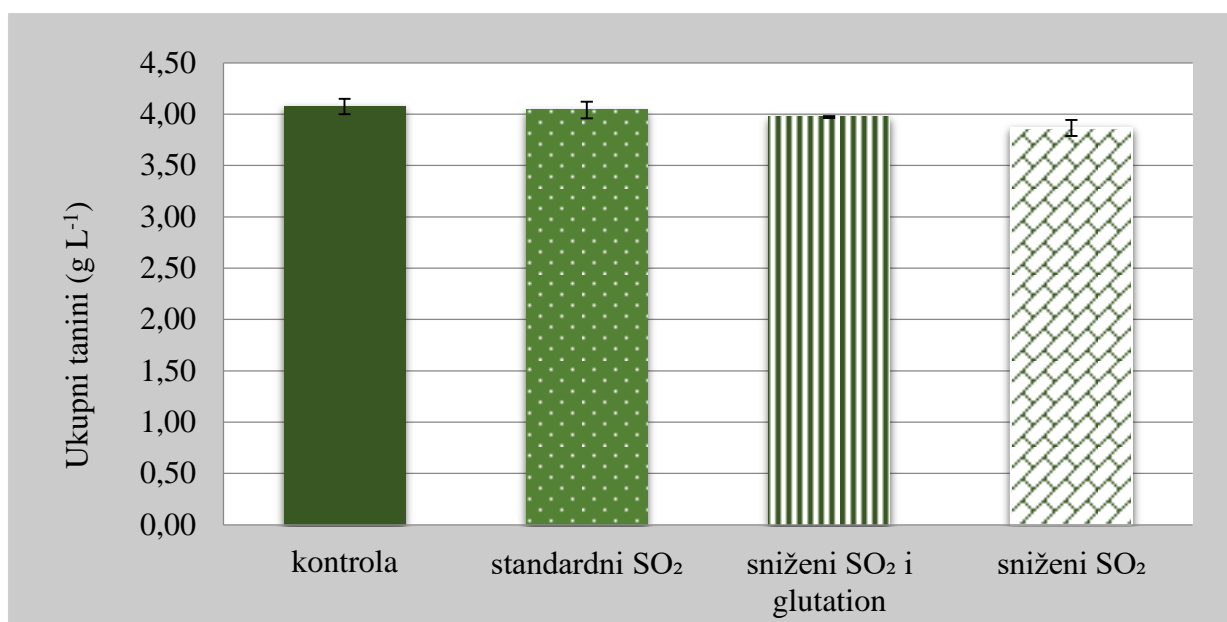


Slika 2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih fenola u vinu Cabernet Sauvignon

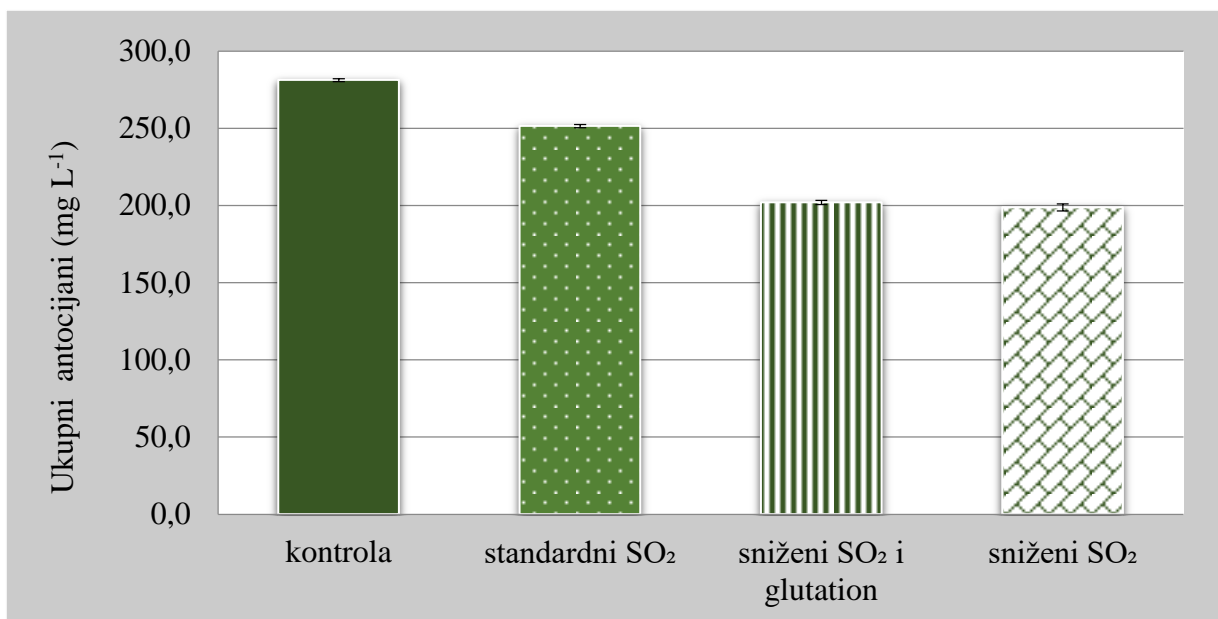
Tretman visokim hidrostatskim tlakom nije imao značajan utjecaj na sastav ukupnih fenola crnog vina. Najveći pad koncentracije ukupnih fenola uočen je pri nižoj koncentraciji SO<sub>2</sub>, dok je kod tretiranog vina sa standardnim SO<sub>2</sub> došlo do blagog smanjenja koncentracije u usporedbi s kontrolnim uzorkom (slika 2). Santos i sur. (2013b) proučavali su promjene u koncentraciji ukupnih fenola u vinu tretiranom visokim hidrostatskim tlakom gdje je kontrolni uzorak bio netretiran uzorak s 40 SO<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>. Na početku starenja nije utvrđena značajna razlika između kontrolnog i tretiranog uzorka s obzirom na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost. Međutim, nakon 9 mjeseci starenja koncentracija ukupnih fenola smanjila se za 9 % kod tretiranih vina, dok su nakon 12 mjeseci tretirani uzorci pokazali pad antioksidacijske aktivnosti za 15 do 27 % (Santos i sur., 2013b). Usporedbom djelovanja visokog hidrostatskog tlaka i pulsirajućeg električnog polja na fenolni sastav, van Wyk i sur. (2018) došli su do zaključka da nema značajne razlike između djelovanja ove dvije netoplinske metode s obzirom na kontrolni uzorak. Međutim, usporedbom koncentracija ukupnih fenola nakon 12 mjeseci skladištenja utvrđeno je smanjenje koncentracije u tretiranim uzorcima. Za visoki hidrostatski tlak pad koncentracije iznosio je 103-119 mg

GAE L<sup>-1</sup>, a za pulsirajuće električno polje 146-213 mg GAE L<sup>-1</sup> u odnosu na netretirani uzorak. Ova istraživanje je pokazalo kako tretman visokim hidrostatskim tlakom može biti učinkovit kod redukcije SO<sub>2</sub>, ali ne i njegovo potpuno uklanjanje (van Wyk i sur., 2018).

Koncentracija ukupnih tanina u tretiranim uzorcima ostala je gotovo nepromijenjena u odnosu na kontrolni uzorak, izuzev uzorka sa sniženim SO<sub>2</sub> gdje je utvrđen blagi pad koncentracije (slika 3.) Može se zaključiti da tretman visokim hidrostatskim tlakom nije utjecao na smanjenje koncentracije ukupnih tanina. Međutim, efektivnija zaštita postignuta je dodatkom antioksidansa, odnosno glutaciona kao alternative sumporovom dioksidu. Do značajne promjene u koncentraciji tanina nije došlo ni tijekom istraživanja Santosa i sur. (2018) koji su uspoređivali koncentraciju kontrolnog uzorka s tretiranim vinima, sa i bez utjecaja mikrooksigenacije tijekom dozrijevanja u hrastovim bačvama. Naime, većina polifenolnih spojeva je bila u većoj koncentraciji u vinima koja su prošla mikrooksigenaciju dok je sastav tanina ostao gotovo isti u oba tretirana uzorka u odnosu na kontrolu (Santos i sur., 2018).



Slika 3. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih tanina u vinu Cabernet Sauvignon



Slika 4. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijana u vinu Cabernet Sauvignon

Tretman visokim hidrostatskim tlakom imao je izraženiji učinak na koncentraciju antocijana. Uočen je blagi pad u koncentraciji antocijana u uzorku sa standardnim SO<sub>2</sub>, dok se u preostala dva uzroka sa sniženim SO<sub>2</sub> ta koncentracija dodatno smanjena (slika 4). Proučavajući vina tretirana visokim hidrostatskim tlakom u odnosu na kontrolni uzorak crnog vina koje nije tretirano, Morata i sur. (2012) ustanovili su smanjenje ukupne koncentracije antocijana u uzorcima tretiranim visokim hidrostatskim tlakom. U tretiranim vinima smanjila se koncentracija antocijana do 15 % (Morata, 2012). Tao i sur. (2015) istraživanje su proveli promatrajući utjecaj visokog hidrostatskog tlaka (250, 450 i 650 MPa kroz 45 minuta) na vino u koje je dodan hrastov čips (5 g L<sup>-1</sup>). Utvrđeno je smanjenje koncentracije antocijana i intenzitet boje tijekom prvih 5 minuta, kao i povećanje nakon završetka tretmana u odnosu na kontrolni uzorak koji nije tretiran. Razlog je vjerojatno utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na pojačanu interakciju antocijana i drugih polifenolnih spojeva, te formiranja novih pigmenata. Vrijeme tretiranja, za razliku od promjene razine tlaka, pokazalo je značajan utjecaj na promjene koncentracije ukupnih antocijana (Tao i sur., 2015).



Tablica 5. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na koncentraciju slobodnih antocijana u vinu Cabernet Sauvignon

	UZORCI			
	kontrola	standardni SO <sub>2</sub>	sniženi SO <sub>2</sub> i glutation	sniženi SO <sub>2</sub>
<b>ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZIDI</b>				
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	6,88 ± 0,11	5,84 ± 0,00	4,28 ± 0,15	3,75 ± 0,31
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,12 ± 0,05	1,44 ± 0,59	0,64 ± 0,16	0,72 ± 0,02
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	6,91 ± 0,01	6,05 ± 0,28	3,88 ± 0,35	3,73 ± 0,44
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	6,37 ± 0,10	5,12 ± 1,13	3,46 ± 0,02	4,25 ± 0,02
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	65,11 ± 0,62	55,62 ± 2,93	39,53 ± 0,88	35,08 ± 1,07
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozidi	86,40 ± 0,57	74,06 ± 4,93	51,79 ± 1,21	47,53 ± 1,81
<b>ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZID ACETATI</b>				
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	2,12 ± 0,10	2,04 ± 0,07	1,52 ± 0,58	1,29 ± 0,31
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	18,77 ± 0,10	16,77 ± 0,43	10,43 ± 1,42	10,48 ± 0,60
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozid acetati	20,88 ± 0,00	18,81 ± 0,36	11,94 ± 2,00	11,77 ± 0,91
<b>ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZID <i>p</i>-KUMARATI</b>				
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	0,99 ± 0,17	0,94 ± 0,04	0,78 ± 0,03	0,87 ± 0,30
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	5,12 ± 0,07	4,11 ± 0,10	3,05 ± 0,35	3,43 ± 0,17
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarati	6,11 ± 0,10	5,05 ± 0,13	3,82 ± 0,32	4,30 ± 0,47

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. Koncentracija spoja izražena je u mg L<sup>-1</sup>.

Koncentracija slobodnih antocijana smanjila se u uzorcima tretiranim visokim hidrostatskim tlakom, pri čemu je uglavnom najniža koncentracija zabilježena u uzorku vina sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub>. Dobiveni rezultati su očekivani, obzirom na antioksidativno, a time i protektivno djelovanje sumporovog dioksida i glutationa. Malvidin-3-*O*-glukozida kao najzastupljenijem slobodni antocijan u vinu, pokazao je istovremeno najveću osjetljivost na djelovanje visokog hidrostatskog tlaka, ali i koncentraciju antioksidansa (tablica 5). Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Morata i sur. (2012), gdje je također utvrđen veći sadržaj slobodnih antocijana u kontrolnim uzorcima koji nisu bili tretirani, kao i najveće sniženje koncentracije kod malvidin-3-*O*-glukozida. Također, niže koncentracije monomernih antocijana u uzorcima tretiranim visokim hidrostatskim tlakom, i to u iznosu od 45-61 % od onih u kontrolnom uzorku sa 40 mg L<sup>-1</sup> SO<sub>2</sub> utvrđena su nakon 12

mjeseci starenja u istraživanju Santos i sur. (2013b). Naime, smatra se kako tretman visokim hidrostatskim tlakom potiče reakcije kondenzacije antocijana i tanina tijekom dozrijevanja odnosno starenja vina, uslijed čega je zapažena i niža koncentracija monomernih antocijana u tretiranim vinima (Santos i sur., 2013b).

## **4.2. UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA I DODATKA ANTIOKSIDANSA NA AROMU VINA**

### **4.2.1. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na aromu vina Graševina**

Uvidom u tablicu 6 vidljivo kako je tretman visokim hidrostatskim tlakom u bijelom vinu Graševina utjecao na smanjenje koncentracije estera, viših alkohola te hlapivih masnih kiselina nakon 12 mjeseci starenja u bocama, obzirom da je koncentracija svih navedenih spojeva bila veća u kontrolnom nego u tretiranom uzorku. Usporedbom treniranih uzoraka, također je vidljivo kako su najniže koncentracije norizoprenoida, etilnih i ostalih estera i viših alkohola dobivene u vinu sa standardnim sumpornim dioksidom dok su najniže koncentracije acetatnih estera i hlapivih masnih kiselina utvrđene u vinu sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida bez dodatka glutaciona.

Santos i sur. (2015) su istraživanjem utjecaja visokog hidrostatskog tlaka tijekom skladištenja na promjene hlapivog sastava vina, u koje nije dodan sumporov dioksid, ustanovili da ovaj tretman ubrzava Maillardove reakcije, oksidaciju alkohola i masnih kiselina. Navedene reakcije dovode do promjena u sastavu arome koje nalikuju brzom starenju vina ili termički tretiranim vinima. Nakon 2 mjeseca starenja u tretiranom vinu prevladavali su esteri i viši alkoholi, dok je najviša koncentracija terpena analizirana nakon 9 mjeseci skladištenja vina u boci (Santos i sur., 2015).

Tablica 6. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na koncentraciju spojeva arome u vinu Graševina

	<b>UZORCI</b>			
	kontrola	standardni SO <sub>2</sub>	sniženi SO <sub>2</sub> i glutation	sniženi SO <sub>2</sub>
<b>NORIZOPRENOIDI</b>				
TDN <sup>**</sup>	8,85 ± 0,38	2,64 ± 0,75	5,74 ± 0,23	7,80 ± 0,52
β-Damaskenon <sup>**</sup>	1,17 ± 0,10	1,23 ± 0,04	3,93 ± 0,39	3,41 ± 0,16
Ukupni norizoprenoidi <sup>**</sup>	10,02 ± 0,48	3,87 ± 0,71	9,67 ± 0,62	11,21 ± 0,37
<b>ETILNI ESTERI</b>				
Etil butanoat <sup>*</sup>	1,29 ± 0,02	1,08 ± 0,04	1,10 ± 0,09	1,02 ± 0,04
Etil heksanoat <sup>*</sup>	1,97 ± 0,08	1,53 ± 0,09	1,70 ± 0,04	1,41 ± 0,12
Etil oktanoat <sup>*</sup>	1,56 ± 0,11	0,74 ± 0,04	1,13 ± 0,05	0,97 ± 0,08
Etil dekanat <sup>*</sup>	1,12 ± 0,03	0,32 ± 0,06	0,49 ± 0,03	0,69 ± 0,01
Dietil sukcinat <sup>*</sup>	1,79 ± 0,04	1,57 ± 0,18	1,83 ± 0,07	1,34 ± 0,16
Ukupni etilni esteri <sup>*</sup>	7,71 ± 0,17	5,23 ± 0,22	6,24 ± 0,12	5,41 ± 0,40
<b>ACETATNI ESTERI</b>				
Etil acetat <sup>*</sup>	27,63 ± 0,47	21,83 ± 0,39	23,00 ± 2,08	21,29 ± 0,12
<i>i</i> -Butil acetat <sup>**</sup>	24,80 ± 2,48	16,94 ± 1,39	19,23 ± 3,83	18,75 ± 0,57
<i>i</i> -Amil acetat <sup>*</sup>	1,17 ± 0,03	0,94 ± 0,06	0,88 ± 0,05	0,82 ± 0,06
Heksil acetat <sup>*</sup>	0,09 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00
2-Feniletal acetat <sup>*</sup>	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Ukupni acetatni esteri <sup>*</sup>	29,01 ± 0,50	22,93 ± 0,45	24,04 ± 2,12	22,24 ± 0,18
<b>OSTALI ESTERI</b>				
Metil oktanoat <sup>**</sup>	255,79 ± 21,87	140,81 ± 7,25	190,64 ± 7,40	160,42 ± 18,42
Metil dekanat <sup>**</sup>	11,76 ± 0,42	3,47 ± 0,43	5,45 ± 0,29	6,74 ± 0,15
Ostali esteri <sup>**</sup>	267,54 ± 22,29	144,27 ± 6,82	196,08 ± 7,69	167,15 ± 18,57
<b>VIŠI ALKOHOLI</b>				
<i>i</i> -Amil alkohol <sup>*</sup>	93,02 ± 1,73	82,69 ± 0,57	86,32 ± 2,55	86,85 ± 0,78
1-Heksanol <sup>*</sup>	1,57 ± 0,04	1,46 ± 0,04	1,50 ± 0,03	1,47 ± 0,03
<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol <sup>**</sup>	153,64 ± 8,06	144,67 ± 0,60	155,14 ± 1,66	150,41 ± 6,60
2-Fenil etanol <sup>*</sup>	5,31 ± 0,49	4,35 ± 0,36	4,48 ± 0,33	3,52 ± 0,96
Ukupni viši alkoholi <sup>*</sup>	100,05 ± 1,29	88,63 ± 0,24	92,45 ± 2,90	91,99 ± 1,70
<b>HLAPIVE MASNE KISELINE</b>				
Kapronska kiselina <sup>*</sup>	3,55 ± 0,06	2,94 ± 0,31	3,21 ± 0,29	2,43 ± 0,40
Kaprilna kiselina <sup>*</sup>	9,00 ± 0,24	6,89 ± 0,55	6,96 ± 0,21	5,92 ± 0,83
Kaprinska kiselina <sup>*</sup>	1,70 ± 0,42	1,15 ± 0,10	1,05 ± 0,03	1,22 ± 0,04
Ukupne hlapive masne kiseline <sup>*</sup>	14,25 ± 0,60	10,98 ± 0,76	11,22 ± 0,47	9,56 ± 1,26

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. \* Koncentracija spoja izražena u mg L<sup>-1</sup>. \*\* Koncentracija spoja izražena u µg L<sup>-1</sup>.

Briones-Labarca i sur. (2017) proučavali su utjecaj visokog hidrostatskog tlaka (400 MPa, 450 MPa i 500 MPa) na spojeve arome te senzorska svojstva bijelog vina sa 15-20 mg L<sup>-1</sup> SO<sub>2</sub>. Senzorska svojstva kao što su okus i miris su ostala očuvana nakon tretmana tlakom od 400 MPa. Koncentracija estera (etilnih i acetatnih) kao najznačajnije skupina kemijskih spojeva odgovornih za aromu vina, nakon tretmana iznosila je 65-76 % ukupne arome, od čega 15 % acetatnih estera (Briones-Labarca i sur., 2017). Identificirano je svega nekoliko aldehida, a uzorci tretirani visokim hidrostatskim tlakom sadržavali su ih u većoj koncentraciji, pri čemu se može zaključiti da tretman visokim tlakom povećava sintezu aldehida.

Nadalje, najviše koncentracije hlapivih spojeva (estera, viših alkohola i hlapivih masnih kiselina) utvrđene u vinu sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida uz dodatak glutaciona (tablica 6). Razlog navedenog je u sposobnosti antioksidansa odnosno glutaciona koji sprječavajući oksidaciju štiti hlapive spojeve od degradacije. Kritzinger i sur. (2012) istraživanjem utjecaja glutaciona na spojeve arome u vinu dokazali su antioksidacijsko djelovanje glutaciona. Naime, dokazan je inhibitorni utjecaj GSH na smanjenje koncentracije *i*-amil acetata, etil heksanoata i linalola. Vino sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida (35 mg L<sup>-1</sup>) s dodatkom 20 mg L<sup>-1</sup> GSH bilo je učinkovitije u zaštiti nekoliko estera i linalola u usporedbi s vinom s 50 mg L<sup>-1</sup> dodanog sumporovog dioksida (Kritzinger i sur., 2012).

#### 4.2.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na aromu vina Cabernet Sauvignon

Tretman visokim hidrostatskim tlakom u crnom vinu Cabernet Sauvignon nije utjecao na smanjenje koncentracije spojeva arome nakon 12 mjeseci starenja u bocama (tablica 7). Rezultati tretiranja crnog vina pri standardnoj koncentraciji sumporovog dioksida pokazuju kako navedeni tretman nije utjecao na koncentraciju estera, dok koncentracije viših alkohola i hlapivih masnih kiselina u svim tretiranim vinima bile nešto više od onih u kontrolnom vinu. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Morate i sur. (2012) koji su proučavali utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na aromatski profil crnog vina. Koncentracija etil acetata se tretiranim uzorcima nije se značajno razlikovala u odnosu na kontrolni uzorak, a razlike u koncentraciji za etil acetat i etil laktat bile su do 10 % (Morata, 2012).

Tablica 7. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka i dodatka antioksidansa na koncentraciju spojeva arome u vinu Cabernet Sauvignon

	<b>UZORCI</b>			
	kontrola	standardni SO <sub>2</sub>	sniženi SO <sub>2</sub> i glutation	sniženi SO <sub>2</sub>
<b>NORIZOPRENOIDI</b>				
TDN <sup>**</sup>	0,19 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,22 ± 0,04
$\beta$ -Damaskenon <sup>**</sup>	2,23 ± 0,43	1,96 ± 0,27	2,04 ± 0,07	2,50 ± 0,24
Ukupni norizoprenoidi <sup>**</sup>	2,41 ± 0,45	2,06 ± 0,29	2,15 ± 0,06	2,72 ± 0,28
<b>ETILNI ESTERI</b>				
Etil butanoat <sup>*</sup>	0,32 ± 0,01	0,37 ± 0,10	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,01
Etil heksanoat <sup>*</sup>	0,38 ± 0,04	0,34 ± 0,08	0,50 ± 0,01	0,53 ± 0,10
Etil oktanoat <sup>*</sup>	0,24 ± 0,03	0,14 ± 0,04	0,22 ± 0,01	0,34 ± 0,11
Etil dekanat <sup>*</sup>	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,11 ± 0,04
Dietil sukcinat <sup>*</sup>	1,16 ± 0,13	1,39 ± 0,64	1,64 ± 0,08	1,57 ± 0,05
Ukupni etilni esteri <sup>*</sup>	2,20 ± 0,21	2,29 ± 0,87	2,84 ± 0,08	2,97 ± 0,21
<b>ACETATNI ESTERI</b>				
Etil acetat <sup>*</sup>	32,22 ± 0,95	31,84 ± 0,37	41,63 ± 0,79	41,68 ± 2,33
<i>i</i> -Butil acetat <sup>**</sup>	29,69 ± 2,43	25,87 ± 0,48	28,33 ± 0,35	29,75 ± 1,80
<i>i</i> -Amil acetat <sup>*</sup>	0,37 ± 0,01	0,40 ± 0,10	0,50 ± 0,02	0,51 ± 0,04
Heksil acetat <sup>*</sup>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01
2-Feniletal acetat <sup>*</sup>	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01
Ukupni acetatni esteri <sup>*</sup>	32,63 ± 0,97	32,29 ± 0,27	42,17 ± 0,81	42,24 ± 2,28
<b>OSTALI ESTERI</b>				
Metil oktanoat <sup>**</sup>	182,99 ± 20,13	122,51 ± 31,10	192,60 ± 3,11	172,86 ± 30,92
Metil dekanat <sup>**</sup>	5,97 ± 0,83	2,43 ± 0,54	3,32 ± 0,18	6,60 ± 2,26
Ostali esteri <sup>**</sup>	188,96 ± 20,97	124,94 ± 31,64	195,92 ± 3,30	179,46 ± 28,66
<b>VIŠI ALKOHOLI</b>				
<i>i</i> -Amil alkohol <sup>*</sup>	218,20 ± 10,44	221,71 ± 8,80	219,39 ± 2,24	223,54 ± 4,94
1-Heksanol <sup>*</sup>	2,39 ± 0,12	2,31 ± 0,01	2,39 ± 0,06	2,46 ± 0,30
<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol <sup>**</sup>	114,22 ± 2,96	104,22 ± 5,36	106,07 ± 5,30	114,73 ± 5,43
2-Fenil etanol <sup>*</sup>	13,91 ± 2,13	17,95 ± 8,44	18,84 ± 1,48	20,94 ± 2,58
Ukupni viši alkoholi <sup>*</sup>	234,60 ± 8,43	242,07 ± 17,23	240,72 ± 0,81	247,04 ± 2,67
<b>HLAPIVE MASNE KISELINE</b>				
Kapronska kiselina <sup>*</sup>	0,66 ± 0,12	0,85 ± 0,37	0,90 ± 0,05	0,95 ± 0,10
Kaprilna kiselina <sup>*</sup>	1,12 ± 0,18	1,34 ± 0,55	1,46 ± 0,06	1,54 ± 0,16
Kaprinska kiselina <sup>*</sup>	0,15 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,00	0,20 ± 0,04
Ukupne hlapive masne kiseline <sup>*</sup>	1,92 ± 0,35	2,32 ± 0,95	2,48 ± 0,11	2,68 ± 0,30

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. \* Koncentracija spoja izražena u mg L<sup>-1</sup>. \*\* Koncentracija spoja izražena u µg L<sup>-1</sup>.

Također, Santos i sur. (2015) utvrdili su više koncentracije spojeva poput ketona, acetala, furana i aldehida u vinima tretiranim visokim hidrostatskim tlakom. Detektirani ketoni rezultat su oksidacije masnih kiselina izazvanih tretmanom visokim tlakom. Također, koncentracija heksanala u tretiranom vinu nalazila se u višestruko većoj koncentraciji u usporedbi s netretiranim vinom, čime se dokazuje oksidacija nekih alkohola uzrokovana tretmanom. U tretiranim vinima detektirani su spojevi koji nastaju kao posljedica Maillardovih reakcija (2-furfural, benzaldehid), ali manje ih je bilo nego u bijelim vinima, što može biti posljedica većeg sadržaja polifenola u crnom vinu što smanjuje brzinu Maillardovih reakcija, zbog boljeg antioksidacijskog djelovanja (Santos i sur., 2015).

S druge strane, u vinima tretiranim visokim hidrostatskim tlakom pri sniženoj koncentraciji sumporovog dioksida s i bez dodatka glutaciona uočene su više koncentracije estera, viših alkohola i hlapivih masnih kiselina nego u kontrolnom uzorku. Učinak glutaciona kao antioksidansa istraživali su Roussis i Sergianitis (2008) dodajući ga u vina u kombinaciji s kafeinskom odnosno galnom kiselinom te je uspoređivan njihov učinak na spojeve arome u odnosu na sumporov dioksid. Utjecaj pojedinih antioksidanasa se ispitivao na vina koja su skladištena 8 mjeseci, a praćene su koncentracije *i*-amil acetata, etil heksanoata te linalola. Djelovanje glutaciona i kafeinske kiseline učinkovitije se dokazalo od sinergije glutaciona i galne kiseline, dok su obje kombinacije pokazale veću učinkovitost od SO<sub>2</sub> koji je dodan u koncentraciji 20 mg L<sup>-1</sup> odnosno 40 mg L<sup>-1</sup>. Sumporni dioksid u koncentraciji od 60 mg L<sup>-1</sup> pokazao je zaštitnu sposobnost usporedivu s kombinacijom glutaciona i galne kiseline (Roussis i Sergianitis, 2008).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja o utjecaju visokog hidrostatskog tlaka (200 MPa, 5 minuta) na sastav polifenolnih spojeva i arome vina nakon 12 mjeseci starenja u bocama može se zaključiti sljedeće:

- Tretman visokim hidrostatskim tlakom nije utjecao na smanjenje koncentracije ukupnih fenola bijelog vina Graševina sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub>, dok je pri nižim koncentracijama SO<sub>2</sub> dodatak glutaciona kao antioksidansa pokazao učinkovito djelovanje.
- Koncentracija fenolnih kiselina u bijelom vinu nakon tretmana visokim hidrostatskim tlakom bila je tek neznatno smanjenja, dok je niža koncentracija SO<sub>2</sub> u tretiranim vinima utjecala na promjene u sastavu flavan-3-ol monomera i dimera.
- Tretman visokim hidrostatskim tlakom nije utjecao na smanjenje koncentracije ukupnih fenola i ukupnih tanina crnog vina Cabernet Sauvignon sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub>, dok je pri nižim koncentracijama SO<sub>2</sub> utvrđeno blago smanjenje koncentracije navedenih spojeva.
- Tretman visokim hidrostatskim tlakom značajno je utjecao na smanjenje koncentracije ukupnih i slobodnih antocijana, osobito kod tretmana s nižom koncentracijom sumporovog dioksida.
- Tretman visokim hidrostatskim tlakom u bijelom vinu rezultirao je smanjenjem koncentracije estera, viših alkohola i hlapivih masnih kiselina, dok je dodatak glutaciona uz nižu koncentraciju SO<sub>2</sub> imao zaštitno djelovanje.
- Tretman visokim hidrostatskim tlakom u crnom vinu sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub> nije rezultirao značajnijim promjenama u sastavu arome.

## 6. LITERATURA

Arapitsas, P., Guella, G., Mattivi, F. (2018) The impact of SO<sub>2</sub> on wine flavanols and indoles in relation to wine style and age. *Sci. Rep.* **8**, 1-13.

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

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

Balík, J., Kyseláková, M., Tříška, J., Vrchotová, N., Veverka, J., Híc, P., Totušek, J., Lefnerová, D. (2008). The changes of selected phenolic substances in wine technology. *J. Food Sci.* **26**, 3–12.

Briones-Labarca, V., Perez-Wom, M., Habib, G., Giovagnoli-Vicuña, C., Cañas-Sarazua, R., Tabilo-Munizaga, G., Salazar, F.N. (2017) Oenological and quality characteristics on young white wines (*Sauvignon Blanc*): Effects of high hydrostatic pressure processing. *J. Food Quality* **2017**, 1-12.

Chen, X., Li, L., You, Y., Mao, B., Zhao, W., Zhan, J. (2012) The Effects of Ultra-high Pressure Treatment on the Phenolic Composition of Red Wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **33**, 203-213.

Cheyrier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 298–305.

Elamin, W.M., Endan, J.B., Yosuf, Y.A., Shamsudin, R., Ahmedov, A. (2015) High pressure processing technology and equipment evolution: A review. *J. Eng. Sci. Technol.* **8**, 75-83.

Ferrandino, A., Guidoni, S. (2010) Anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamates: an attempt to use them to discriminate *Vitis vinifera* L. cv 'Barbera' clones. *Eur. Food Res. Technol.* **230**, 417–427.



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

Gülçin, I. (2006) Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxic.* **217**, 213-220.

He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M., Duan, C.Q. (2012) Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, **17**, 1483–1519.

Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., Ferreira, V. (2008) The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chem.* **107**, 1064–1077.

Jackson R. S. (2000) Wine science: Principles, practice, perception. 2 izd. Academic Press, San Diego.

Jarauta, I., Cacho, J., Ferreira, V. (2005) Concurrent phenomena contributing to the formation of the aroma of wine during aging in oak wood: an analytical study. *J Agric. Food Chem.* **53**, 4166–4177.

Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I., Waters, E. J. (2008) The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Qual Prefer.* **19**, 596–607.

Kallithraka, S., Salachaa, M. I., Tzouroua, I. (2009) Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem.* **113**, 500–505.

Koponen, J. M., Happonen, A.M., Mattila, P. H., Törrönen, A. R. (2007) Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1612–1619.

Krešić, G. (2009) Procesiranje hrane visokim tlakom. U: Konzerviranje hrane – novi postupci (Herceg, Z., ured.), Golden marketing – Tehnička knjiga, str. 108–130.

Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2011) Primjena visokog tlaka u postupcima obrade hrane. *Kem.Ind.* **60**, 11-19.

- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., Du Toit, W. J. (2012) Role of Glutathione in Winemaking: A Review. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 269-277.
- Li, H., Guo, A., Wang, H. (2008) Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.* **108**, 1-13.
- Liu, S. Q. (2002) Malolactic fermentation in wine—beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 589–601.
- Lorrain, B., Chira, K., Teissedre, P. L. (2011) Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.* **126**, 1991-1999.
- Martinez-Rodríguez, A. J., Polo, M., Carrascosa, A. V. (2001) Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 45–51
- Mateus, N., Silva, A.M. S., Vercuteren, J., Freitas, V. (2001) Occurrence of anthocyanin derived pigments in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4836–4840.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R. (2006) Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7692-7702.
- Monagas, M., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B. (2006) Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chem.* **95**, 405-412.
- Morata, A., Benito, S., González, M. C., Palomero, F., Tesfaye, W., Suárez-Lepe, J. A. (2012) Cold pasteurization of red wines with high hydrostatic pressure to control *Dekkera/Brettanomyces*: effect on both aromatic and chromatic quality of wine. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 147-154.
- Moreno-Arribas, M., Polo, M. (2005) Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 265–286.
- Mulero, J., Pardo, F., Zafrilla, P. (2009) Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. *Eur. Food Res. Technol.* **229**, 807–812.

- Nikolantonaki, M., Julien, P., Coelho, C., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Schmitt-Kopplin, P., Gougeon, R. D. (2018) Impact of glutathione on wines oxidative stability: A combined sensory and metabolomic study. *Front. Chem.* **6**, 182.
- Perez-Seradilla, J., Luque de Castro, M. (2008) Role of lees in wine production: a review. *Food Chem.* **111**, 447–456.
- Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J. B., Tabacchi, R., Gindro, K., Viret, O. (2003).  $\delta$ -Viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stresses grapevine leaves. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5488–5492.
- Polaskova, P., Herszage, J., Ebeler, S. (2008) Wine flavor: chemistry in a glass. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 2478–2489.
- Remy-Tanneau, S., Guernevé, C., Meudec, E., Cheynier, V. (2003) Characterization of colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon–carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3592–3597.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Le dosage des tannins du vin rouge et la détermination de leur structure. *Chim. Anal - Paris* **48**, 188-196.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965) Determination of Anthocyanins in Red Wine. *B. Soc. Chim. Fr.* **9**, 2649-2652.
- Ribéreau-Gayon, P., Glores, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006) Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2. izd., John Wiley & Sons, New Jersey, str. 76-146.
- Roussis, I. G., Sergianitis, S. (2008) Protection of some aroma volatiles in a wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour Frag. J.* **23**, 35-39.
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2011) Chemical and physical methodologies for the replacement/ reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 1-12.
- Santos, M. C., Nunes, C., Rocha, M. A. M., Rodrigues A., Rocha, S. M., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2013a) Impact of high pressure treatments on the physicochemical

properties of a sulphur dioxide-free white wine during bottle storage: Evidence for Maillard reaction acceleration. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **20**, 51-58.

Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2013b) Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a Sulphur dioxide-free red wine. *Food Chem.* **141**, 2558-2566.

Santos, M. C., Nunes, C., Rocha, M. A. M., Rodrigues A., Rocha, S. M., Saraiva, J. A., Coimbra, M.A. (2015) High pressure treatments accelerate changes in volatile composition of sulphur dioxide-free wine during bottle storage. *Food Chem.* **188**, 406-414.

Santos, M. C., Nunes, C., Ferreira, A., Jourdes, M., Teissedre, P. L., Amado, O., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2018) Comparison of high pressure treatment with conventional red wine aging processes: impact on phenolic composition. *Food Res. Int.* **116**, 223-231.

Singelton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol.Vitic.* **16**, 144-158.

Styger, G., Prior, B., Bauer F.F. (2011) Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 1145-1159.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Aust. J. Grape Wine Res.* **10**, 139-173.

Tao, Y., Sun, D. W., Górecki, A., Błaszczak, Lamparski, G., Amarowicz, R., Fornal, J., Jeliński, T. (2012) Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a red wine. *Innov. Food Sci. Emerg.* **16**, 409-416.

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

Tao, Y., Sun, D.W., Górecki, A., Błaszczak, Lamparski, G., Amarowicz, R., Fornal, J., Jeliński, T. (2015) A preliminary study about the influence of high hydrostatic pressure processing in parallel with oak chip maceration on the physicochemical and sensory properties of a young red wine. *Food Chem.* **194**, 545-554.

Vanzo, A., Cecotti, R., Vrhovsek, U., Torres, A.M., Mattivi, F., Passamonti, S. (2007) The fate of trans-caftaric acid administered into the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1604–1611.

van Wyk., S., Farid, M. M., Silva, F. V. M. (2018) SO<sub>2</sub>, high pressure and pulsed electric field treatments of red wine: Effect on sensory, Brettanomyces inactivation and other quality parameters during one year storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **48**, 204-211.

Wang, H., Race, E. J., Shrikhande, A. J. (2003) Anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon wine during aging. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7989–7994.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Ime i prezime studenta