

Utjecaj dodataka antioksidansa na stabilnost antocijana i tanina vina tijekom starenja

Marušić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:974718>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Ana Marušić

1200/N

**UTJECAJ DODATAKA
ANTIOKSIDANSA NA
STABILNOST ANTOCIJANA I
TANINA VINA TIJEKOM
STARENJA**

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

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Natki Ćurko na velikoj pomoći, srdačnosti, susretljivosti, ohrabrujućoj radnoj atmosferi te na svakom savjetu i dobronamjernoj kritici koji su pomogli da ovaj rad bude uspješno napisan.

Isto tako, veliko hvala Katarini Lukić, mag. ing. na pomoći i strpljenju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Na kraju, želim se zahvaliti svim svojim prijateljima i Brunu koji su bili tu uz mene u lakšim i onim težim trenucima te ovo putovanje do diplome učinili puno zabavnijim. Posebno hvala mojoj obitelji, osobito roditeljima, na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i ljubavi koje su mi pružali tijekom cijelog mog obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ DODATAKA ANTIOKSIDANSA NA STABILNOST ANTOCIJANA I TANINA VINA TIJEKOM STARENJA

Ana Marušić, 1200/N

Sažetak: U ovom radu ispitan je utjecaj dodataka antioksidansa (sumporovog dioksida i glutaciona) na stabilnost antocijana i tanina u vinu Cabernet Sauvignon nakon 12 mjeseci starenja u boci. Istraživanje je provedeno na vinima sa sniženom koncentracijom SO₂ (10 mg L⁻¹ slobodnog SO₂) uz ili bez dodatka glutaciona (20 mg L⁻¹ glutaciona) pri čemu je kao kontrolno vino korišteno vino sa standardnom koncentracijom SO₂ (25 mg L⁻¹ slobodnog SO₂). Provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih tanina i antocijana. Sastav slobodnih antocijana i flavanola određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Dobiveni rezultati pokazali su kako je koncentracija antioksidansa (sumporovog dioksida i glutaciona) značajno utjecala na kemijske promjene u sastavu antocijana i flavan-3-ol monomera i dimera tijekom starenja vina, pri čemu su više koncentracije antioksidansa pokazale zaštitno djelovanje te pozitivan učinak na stabilnost navedenih spojeva. Također, glutation pokazao je zaštitno djelovanje u vinu sa sniženim koncentracijom SO₂.

Gljučne riječi: polifenoli, antocijani, tanini, sumporov dioksid, glutation

Rad sadrži: 43 stranica, 9 slika, 5 tablica, 75 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc. dr. sc. Natka Ćurko*

Pomoć pri izradi: *Katarina Lukić, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Karin Kovačević Ganić*
2. Doc. dr. sc. *Natka Ćurko*
3. Prof. dr. sc. *Draženka Komes*
4. Prof. dr. sc. *Helga Medić (zamjena)*

Datum obrane: 22. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS ADDITION ON STABILITY OF ANTHOCYANINS AND TANNINS IN WINE DURING AGEING

Ana Marušić, 1200/N

Abstract: In this paper, the effects of adding the antioxidants sulphur dioxide and glutathione on the stability of anthocyanins and tannins in Cabernet Sauvignon wine after 12 months of ageing, was examined. The study was conducted on wines with the reduced concentration of SO₂ (10 mg L⁻¹ free SO₂), with or without the addition of glutathione (20 mg L⁻¹ glutathione), where the wine with the standard concentration of SO₂ (25 mg L⁻¹ free SO₂) was used as the case-control wine. A spectroscopic method of analysis was conducted regarding the number of total tannins and anthocyanins. The composition of free anthocyanins and flavanols has been determined by using the technique of high-performance liquid chromatography (HPLC). The obtained results showed that the concentration of antioxidants (sulphur dioxide and glutathione) had affected significantly the chemical changes in the composition of anthocyanins and flavan-3-ol monomers and dimers during wine aging, where the higher concentrations of antioxidants showed a protective effect and a positive impact on the stability of the abovementioned compounds. Also, glutathione showed a protective effect in wine with a reduced concentration of SO₂.

Keywords: polyphenolic compounds, anthocyanins, tannins, sulfur dioxide, glutathione

Thesis contains: 43 pages, 9 figures, 5 tables, 75 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, BSc. research assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full professor
2. PhD. *Natka Ćurko*, Assistant professor
3. PhD. *Draženka Komes*, Full professor
4. PhD. *Helga Medić*, Full professor

Thesis defended: July 22, 2020

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. POLIFENOLNI SASTAV VINA | 3 |
| 2.1.1. Antocijani..... | 5 |
| 2.1.2. Flavanoli (flavan-3-oli) | 6 |
| 2.1.3. Tanini | 6 |
| 2.2. PROMJENE U SASTAVU POLIFENOLNIH SPOJEVA TIJEKOM DOZRIJEVANJA I STARENJA VINA | 9 |
| 2.3. UPOTREBA ANTIOKSIDANSA | 11 |
| 2.3.1. Sumporov dioksid | 11 |
| 2.3.2. Glutation..... | 12 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 3.1. MATERIJALI | 15 |
| 3.1.1. Uzorci vina Cabernet Sauvignon..... | 15 |
| 3.1.2. Kemikalije..... | 15 |
| 3.1.3. Aparatura i pribor..... | 16 |
| 3.2. METODE..... | 17 |
| 3.2.1. Dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) | 17 |
| 3.2.2. Punjenje vina u boce i stavljanje na starenje | 17 |
| 3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu | 17 |
| 3.2.4. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu | 18 |
| 3.2.5. Određivanje slobodnih antocijana u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)..... | 19 |
| 3.2.6. Određivanje flavanola u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) | 21 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 23 |
| 4.1. UTJECAJA DODATAKA ANTIOKSIDANSA NA STABILNOST ANTOCIJANA VINA | 24 |
| 4.2. UTJECAJA DODATAKA ANTIOKSIDANSA NA STABILNOST TANINA VINA | 31 |
| 5. ZAKLJUČAK | 35 |
| 6. LITERATURA | 36 |

1. UVOD

Antocijani i tanini najznačajniji su polifenolni spojevi crnog vina, koji pripadaju skupini flavonoida. Navedeni spojevi odgovorni su za antioksidacijsku aktivnost vina, međutim također i za senzorske karakteristike vina, kao što su boja, trpkoca, i gorčina. Koncentracija navedenih spojeva u vinu stoga je izuzetno važna, budući da direktno utječe na kvalitetu samog vina. Osim o sorti vinove loze te sastavu grožđa, koncentracija ovih spojeva ovisit će također o samoj tehnologiji proizvodnje (u prvom redu o načinu ekstrakcije spojeva tijekom tehnološkog postupka prerade) te kemijskim promjenama koje se događaju tijekom dozrijevanja i starenja vina. Naime, antocijani, pigmenti odgovorni za boju crnog grožđa i mladog vina, su izrazito nestabilni spojevi koji tijekom proizvodnje, dozrijevanja i starenja vina sudjeluju u velikom broju različitih kemijskih reakcija, kao što su reakcije kopigmentacije, reakcije kondenzacije s flavanolima (direktno ili posredovanjem spojeva poput acetaldehida) te formiranju novih spojeva poput piroantocijana. S druge strane, flavan-3-ol monomeri, oligomeri i polimeri (proantocijanidini ili tanini) nositelji su trpkocē i gorčine, a tijekom proizvodnje, dozrijevanja i starenja vina također ulaze u interakciju s različitim polifenolnim spojevima, u prvom redu antocijanima.

Nadalje, antocijani i tanini podložni su reakcijama oksidacije. Naime, poznato je kako umjereno i kontrolirano izlaganje vina kisiku može doprinijeti poboljšanju senzorskih karakteristika vina, no s druge strane dugotrajno i nekontrolirano izlaganje rezultirat će smanjenjem kvalitete vina. Navedene reakcije rezultiraju promjenama u koncentraciji i sastavu antocijana i tanina, a time i senzorskih karakteristika vina koje se u prvom redu očituju u promjeni boje vina odnosno posmeđivanju, međutim i pojavi negativnih oksidacijskih aroma. Neželjene oksidacijske promjene vina tijekom proizvodnje, dozrijevanja i starenja moguće je spriječiti dodatkom različitih antioksidansa u vino. Sumporov dioksid je najznačajniji antioksidans u proizvodnji vina jer osim što pomaže u očuvanju lako oksidirajućih spojeva poput polifenola, zbog svog antimikrobnog djelovanja također osigurava i mikrobiološku ispravnost vina. Ipak, uslijed pseudoalergijskog djelovanja ovog antioksidansa kod osjetljive populacije, posljednjih godina nastoje se iznaći alternativna rješenja kojima bi se smanjila upotreba sumporovog dioksida u vinarstvu. Stoga, jedan od najvećih enoloških izazova danas je svakako proizvodnja vina sa smanjenom koncentracijom sumporovog dioksida koje će vremenom dobiti na kompleksnosti senzorskih svojstava i zadržati mikrobiološku ispravnost. Novija istraživanja usmjerena su na primjenu glutathiona, antioksidansa koji je prirodno prisutan

u samom grožđu. Naime, ranija istraživanja pokazala su kako glutation pomaže u očuvanju sorte arome, sprječava posmeđivanje vina i razvoj nepoželjnih aroma osobito kod bijelih vina, dok su mogućnosti primjene ovog antioksidansa, a posebice u kombinaciji sa smanjenom koncentracijom sumporovog dioksida tijekom starenja crnog vina u bocama nedostavno istražene.

U ovom radu istražit će se utjecaj dodataka antioksidansa (sumporovog dioksida i glutaciona) na stabilnost antocijana i tanina nakon 12 mjeseci starenje vina Cabernet Sauvignon u bocama, kao i mogućnosti smanjenja koncentracije sumporovog dioksida u proizvodnji crnog vina. Promjene u sastavu antocijana i tanina ispitat će se u vinima s različitim koncentracijama antioksidansa i to u (i) vinu sa sniženom koncentracijom SO_2 (10 mg L^{-1} slobodnog SO_2), kao i (ii) vinu sa sniženom koncentracijom SO_2 uz dodatak glutaciona (10 mg L^{-1} slobodnog SO_2 i 20 mg L^{-1} glutaciona) te usporediti s kontrolnim vino sa standardnom koncentracijom SO_2 (25 mg L^{-1} slobodnog SO_2).

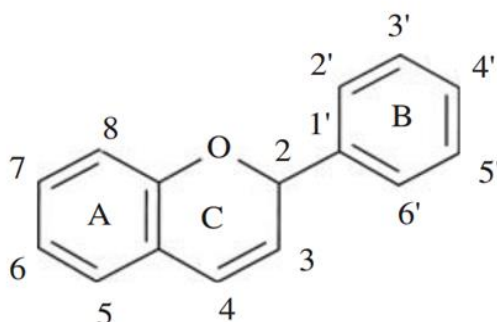
2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOLNI SASTAV VINA

Polifenolni spojevi obuhvaćaju široku i kompleksnu skupinu spojeva u koje ubrajamo specifične pigmente i sekundarne biljne metabolite (Paixao i sur., 2007). Do danas je poznato preko 8 000 različitih fenolnih struktura. Ovi spojevi sudjeluju u brojnim biokemijskim procesima, djeluju antioksidacijski, antimikrobno te kao fotoreceptori (Beer i sur., 2002). Doprinosu boji, okusu i mirisu biljke, a pronalazimo ih u voću, povrću, žitaricama kao i u prehrambenim proizvodima poput vina, piva, čaja i kakaa (Arnous i sur., 2001).

Fenolni spojevi sastoje se od benzenskog ili aromatskog prstena na koji je direktno vezana jedna hidroksilna skupina. Ukoliko je vezano više hidroksilnih skupina, govorimo o polifenolima, a mogu biti prisutni i drugi supstituenti. Polifenoli se prema kemijskoj strukturi dijele na flavonoide i neflavonoide (Boulton, 2001).

Flavonoidi su spojevi građeni od tri fenolna prstena (A, B i C) (slika 1). Dva aromatska prstena (A i B) povezani su piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik. Međusobno se razlikuju prema položaju hidroksilnih skupina i glikozidnim vezama te po stupnju konjugacije između prstena A i B. U tu skupinu spojeva ubrajamo flavonole, flavanone, flavone, dihidroflavonole, izoflavone, flavanonole, flavane, flavanole, halkone, dihirohalkone, proantocijanidine (kondenzirani tanini) i antocijane (Bravo, 1998).



Slika 1. Opća struktura flavonoida (Jackson, 2008)

Flavonoidi mogu biti prisutni u slobodnoj formi ili u obliku polimera s drugim flavonoidima, šećerima, neflavonoidima ili njihovim kombinacijama. Oni esterificirani

šećerima i neflavonoidima se nazivaju glikozidima i acil-derivatima. Sintetiziraju se u endoplazmatskom retikulumu prije nego što se pohrane u vakuolama stanica. Najčešći flavonoidi prisutni u crnom vinu su flavonoli, katehini (flavan-3-oli) i antocijanini. Također, pojavljuju se i male količine flavan-3,4-diola (leukoantocijanina). Količina flavonoida koja će se ekstrahirati u vino, osim o koncentraciji flavonoida u grožđu, ovisi i o pH, koncentraciji sumpornog dioksida i etanola te o temperaturi i trajanju fermentacije (Jackson, 2008).

Zahvaljujući antioksidativnom djelovanju i pozitivnim učincima na zdravlje ljudi polifenolni spojevi predmet su velikog broja istraživanja (Ribéreau-Gayon i sur., 2006; Villaño i sur. 2006). Odgovorni su za „francuski paradoks“ vina. Naime, u južnim regijama u Francuskoj zabilježena je puno manja stopa obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti bez obzira na visok unos masnoća (sir, crveno meso, maslac) u odnosu na druge zemlje (Renaud i sur., 1992). Vjeruje se da je taj fenomen povezan sa svakodnevnom umjerenom konzumacijom crnog vina (Beer i sur., 2002). Pokazalo se da zahvaljujući kemijskoj strukturi polifenoli mogu neutralizirati aktivnost slobodnih radikala. Također, sprječavaju oksidaciju LDL kolesterola, smanjuju agregaciju trombocita te pokazuju protuupalni učinak. Antioksidativna aktivnost polifenola uvelike ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi (Villaño i sur., 2006).

Polifenolni sastav vina doprinosi senzorskim karakteristikama vina kao što su boja, aroma, trpkoca i gorčina što je osobito važno za crna vina (Soleas i sur., 1997; Jackson, 2008). Također, ovi spojevi u vinu podložni su oksidacijskim reakcijama. Naime, umjerenom izlaganje vina kisiku može doprinijeti poboljšanju senzorskih karakteristika vina, no ipak dugotrajno izlaganje zraku rezultirat će smanjenjem kvalitete vina (Oliviera i sur., 2011). Na sastav i količinu polifenolnih spojeva u vinu utječe fenolni sastav grožđa, način ekstrakcije spojeva tijekom tehnološkog postupka prerade i kemijske promjene fenolnih spojeva koje se događaju tijekom dozrijevanja i starenja vina (Beer i sur., 2002).

U grožđu i vinu identificirani su antocijani, flavan-3-oli, proantocijanidini, flavonoli kao predstavnici flavonoidnih polifenola te fenolne kiseline kao predstavnici neflavonoidnih polifenola (Askari-Khorasgani i sur., 2019; Minussi i sur., 2003). Bijelo vino u prosjeku sadrži od 200 – 300 mg L⁻¹ ukupnih polifenola dok crno vino sadrži čak 1000 – 4000 mg L⁻¹ (Arnous i sur., 2001; Sun i Spranger., 2005).

2.1.1. Antocijani

Antocijani su pigmenti u grožđu odgovorni za boju crnog grožđa i mladog crnog vina (Puértolas i sur., 2010). Ovi spojevi osim što daju boju vinu odgovorni su i za njegove organoleptičke karakteristike. Naime, razlike između bijelog i crnog vina proizlaze upravo iz sastava antocijana i tanina ova dva vina (Ribéreau-Gayon, 1974). Pronalazimo ih u hipodermalnim stanicama pokožice bobice, rijetko u samom mesu bobice (Adams, 2006). Koncentracija antocijana u grožđu i njihova raspodjela ovisi o sorti grožđa, stupnju zrelosti, klimatskim uvjetima i geografskom položaju (Vivas i sur., 2001). Uobičajena koncentracija antocijana u mladim crnim vinima punog tijela iznosi oko 400-500 mg L⁻¹ (Liao i sur., 1992).

U grožđu su prisutni u obliku glikozida kao flavonoidna komponenta (aglikon tj. antocijanidin) vezana na šećer (Jackson, 2008). Kultivari vinove loze (*Vitis vinifera* L.) sintetiziraju isključivo monoglukozide antocijana koji se međusobno razlikuju prema položaju hidroksilnih (-OH) i metoksilnih (-OCH₃) grupa vezanih na B prsten (Jackson, 2008; Monagas i Bartolomé, 2009). Antocijani identificirani u pokožici grožđa su 3-*O*-monoglikozidi, 3-*O*-monoglikozid acetati i 3-*O*-glukozid *p*-kumarati pet glavnih antocijana (cijanidina, malvidina, delfinidina, peonidina, petunidina). U najvećoj koncentraciji u grožđu je prisutan malvidin-3-*O*-glukozid koji se smatra glavnim pigmentom odgovornim za karakterističnu crvenu boju vina (Maletić i sur., 2009). Boja antocijana, osim o koncentraciji, kemijskoj strukturi, SO₂, temperaturi, ovisi i o pH vrijednosti medija u kojem se nalaze. Većina antocijana je bezbojna u uobičajenom pH rasponu vina, a samo jedan mali dio prisutan je u obliku flavilium kationa je odgovoran za crvenu boju. U izrazito kiselom mediju poprimaju crvenu boju zbog povećanja koncentracije flavilium oblika, dok u lužnatom mediju, odnosno povećanjem pH vrijednosti, dolazi do smanjenja koncentracije flavilium oblika, a time posljedično i do gubitka boje (Jackson, 2008).

Molekule slobodnih antocijana su izrazito nestabilne uslijed čega u vinu tijekom dozrijevanja i starenja vrlo brzo dolazi do degradacije i smanjena njihove koncentracije. Također, ovi spojevi su izuzetno osjetljivi na djelovanje temperature, posebice malvidin, dok su delfinidin, petunidin i cijanidin izrazito podložni oksidacijskim promjenama. Koncentracija antocijana uvelike utječe na nijansu i stabilnost boje vina, a oba navedena svojstva ovise o stupnju hidroksilacije antocijanidinskog B prstena (Revilla i sur., 2001). Povećanjem stupnja hidroksilacije pojačava se crvena nijansa boje, dok povećanjem stupnja metilacije dolazi do pojačavanja plavog intenziteta (Jackson, 2008). Također, antocijani se smatraju vrlo važnim

kemijskim markerima u identifikaciji i karakterizaciji sorte grožđa upotrijebljene za proizvodnju vina (Ortega- Regules i sur., Revilla i sur., 2001).

2.1.2. Flavanoli (flavan-3-oli)

Flavanoli su spojevi koji su primarno odgovorni za trpkocu, gorčinu i općenito okus vina (Puértolas i sur., 2010). Također, sudjeluju u procesu oksidativnog posmeđivanja vina te stvaranju mutnoće i taloga. U literaturi ih najčešće pronalazimo pod nazivom flavan-3-oli zbog hidroksilacije na C3' položaju (Terrier i sur., 2009).

U grožđu i vinu su identificirani monomeri, oligomeri i polimeri flavan-3-ola. (+)-Katehin i (-)-epikatehin su glavni predstavnici monomera te se smatraju prekursorima u sintezi tanina. Međusobno se razlikuju u prostornom rasporedu hidroksilnih skupina na poziciji tri heterocikličkog C prstena (Terrier i sur. 2009). Riječ je o diastereoizmernom paru, gdje katehin ima 2,3-*trans* konfiguraciju, dok epikatehin ima 2,3-*cis* konfiguraciju (Adams, 2006). Oligomeri i polimeri flavanola se ujedno nazivaju i kondenzirani tanini ili proantocijanidini. Naziv tanini se odnosi na njihovu sposobnosti interakcije s proteinima, dok naziv proantocijanidini proizlazi iz pojave otpuštanja crvenog pigmenta antocijana pod utjecajem temperature u kiselom mediju (Terrier i sur., 2009).

Značajno veće koncentracije flavan-3-ola koje nalazimo u crnim vinima nego u bijelim, posljedica su ekstrakcije tih spojeva iz sjemenke i pokožice grožđa tijekom maceracije (Oszmianski i sur., 1986). Sastav flavanola u grožđu ovisi o sorti, zrelosti grožđa te agrotehničkim uvjetima proizvodnje (Terrier i sur., 2009), a sjemenke nasuprot peteljke i pokožice najčešće sadrže nešto veću koncentraciju ovih spojeva.

2.1.3. Tanini

Tanini su prema definiciji fenolne tvari koje mogu stvarati netopljive komplekse s ugljikohidratima i proteinima (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Pronalazimo ih u peteljci, pokožici i sjemenkama grožđa, a odgovorni su za trpkocu i gorčinu vina (Joscelyne Louis, 2009). Naime, kao posljedica interakcija tanina s proteinima sline u ustima dolazi do njihovog taloženja i formiranja osjeta trpkooće (Gawel, 1998). Možemo ih podijeliti u dvije skupine: hidrolizirajuće i kondenzirajuće tanine (proantocijanidine). Prirodno prisutni tanini u vinu većinom pripadaju skupini kondenzirajućih tanina. U mladim vinima uglavnom su prisutni u formi dimera i trimera (Garrido i sur., 2013).

Hidrolizirajući tanini složeni su polifenoli koji su podložni razgradnji. To su derivati galne i elaginske kiseline pa se prema tome dijele na galotanine i elagitanine (Garrido i sur., 2013). Galotanini su esteri galne kiseline, u kojima su galoilni dijelovi vezani na poliolne, katehinske ili triterpenoidne jezgre (Mingshu i sur., 2006). Elagitanini su esteri heksahidrodienske kiseline koja spontano prelazi u elaginsku kiselinu (Koponen i sur., 2007). Do razgradnje hidrolizirajućih tanina može doći uslijed promjene pH, enzimske ili ne-enzimske hidrolize, najčešće na šećere i fenolne kiseline (Garrido i sur., 2013). Odležavanje vina u hrastovim bačvama utječe na ekstrakciju polifenolnih spojeva niske molekulske mase u vino, osobito elagitanina. Upravo iz tog razloga elaginska kiselina se koristi kao kemijski marker za određivanje vina odležanih u bačvama (Garrido i sur., 2013).

Kondenzirani tanini ili proantocijanidini (PA) su polimeri flavonoida (Minussi i sur., 2003). Posjeduju poliflavan-3-ol strukturu, čije se osnovne jedinice razlikuju po stupnju hidroksilacije. Jedinice koje pronalazimo u grožđu su (+)-katehin, (-)-ekipatehin, (-)-ekipatehin galat i (-)-epigalokatehin (De Pascual-Teresa i sur., 2000; Jackson, 2008). Proantocijanidini pod utjecajem temperature u prisutnosti kiseline i alkohola formiraju odgovarajući antocijanidin (Jordão i sur., 2019). Mogu se podijeliti u dvije skupine – proantocijanidine i prodelfinidine, ovisno o tome formiraju li u kiselim uvjetima cijanidin ili delfinidin (De Pascual-Teresa i sur., 2000). Mogu stupati u interakciju s proteinima, metalnim ionim i drugim molekulama poput polisaharida (Schofield i sur., 2001).

Kada govorimo o PA prisutnim u grožđu njihova količina, struktura i stupanj polimerizacije ovisi o mjestu na kojem se nalaze (Ricardo- da- Silva i sur., 1991). Pronalazimo ih u sjemenkama, peteljci, pokožici i pulpi grožđa pri čemu potonja sadrži vrlo niske koncentracije PA. U sjemenkama su prisutni u obliku monomera te oligomera i polimera građenih od monomernih flavan-3-ola, (+)-katehina, (-)-epikatehina, (-)-epikatehin galata povezanih C4-C8 i/ili C4-C6 vezama. U stabljici, pokožici i pulpi grožđa moguće je pronaći (-)-epigalokatehin i u tragovima (+)-galokatehin i (-)-epigalokatehin galate. Stupanj polimerizacije vrlo je važna karakteristika PA, sukladno tome razlikujemo dimere, trimere, oligomere i polimere, odnosno PA tipa B, C i A (Jackson, 2008). Proantocijanidini prisutni u grožđu i vinu uglavnom su u obliku polimera (60 % - 80 %), slijede ih oligomerni oblici (15 %-30 %) dok monomerni oblici flavan-3-ola čine manje od 10 % ukupne koncentracije PA. Sjemenke sadržavaju više koncentracije monomernih, oligomernih i polimernih flavan-3-ola nego pokožica grožđa. S druge strane, kondenzirani tanini prisutni u pokožici imaju puno viši stupanj polimerizacije u odnosu na one prisutne u sjemenkama (Monagas i sur., 2003). Njihova

koncentracija u vinu ovisi o sorti grožđa i uvelike o metodi vinifikacije te se kreće u rasponu od 1 do 4 g L⁻¹. Dokazano je da proantocijanidini zahvaljujući antioksidativnom djelovanju doprinose pozitivnim učincima vina na zdravlje ljudi (Alén-Ruiz i sur.2009; Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

2.2. PROMJENE U SASTAVU POLIFENOLNIH SPOJEVA TIJEKOM DOZRIJEVANJA I STARENJA VINA

Tijekom perioda dozrijevanja i starenja vina dolazi do brojnih kemijskih promjena u sastavu polifenolnih spojeva koje se odražavaju na promjene senzorskih karakteristika vina, a u prvom redu boje i okusa vina (Alcalde-Eon i sur., 2006; Gomez-Cordoves i Gonzalez-SanJose, 1995; Santos-Buelga i De Freitas, 2009).

Naime, početna crvena boja mladog vina posljedica je visoke koncentracije slobodnih antocijana ekstrahiranih iz pokožice grožđa (Joscelyne-Louise, 2009). Tijekom dozrijevanja i starenja vina dolazi do stabilizacije boje vine uslijed smanjenja koncentracije slobodnih antocijana te formiranja novih stabilnijih pigmenata (Liao i sur., 1992; Santos-Buelga i De Freitas, 2009). Reakcije stabilizacije uključuju reakcije kopigmentacije te polimerizacije (Jackson, 2008).

Kopigmentacija uključuje hidrofobne interakcije između planarnih polarizirajućih jezgri obojanih oblika antocijana i drugih molekula te jedan je od ključnih procesa koji nam pomažu u razumijevanju povezanosti boje mladog i odležanog vina (González-Manzano i sur., 2009). Procesom kopigmentacije dolazi do nastanka strukture u kojoj je antocijan zaštićen od nukleofilnog napada vode, čime se smanjuje nastanak bezbojnih spojeva, te se formiraju spojevi otporni na izbjeljivanje sumporovim dioksidom. Moguće su reakcije kopigmentacije s taninima te formiranje antocijan-tanin kompleksa koje su ključne za formiranje boje odležanog vina. Nadalje, moguće su i hidrofobne interakcija s alkaloidima, aminokiselinama, nukleotidima, ugljikohidratima i fenolnim kiselinama (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Efekt kopigmentacije odnosi se na pojačavanje intenziteta crvene boje i pomak s crvenkastih na plavkaste nijanse (Gutiérrez i sur., 2005). Također, važna reakcija koja uključuje monomere antocijana je reakcija polimerizacije s flavan-3-olima i drugim polifenolnim spojevima kojom se formiraju piranoantocijani, spojevi otporni na izbjeljivanje sulfitima i na oksidacijske procese (Liao i sur., 1992; Raposo i sur., 2017). Polimerizacija je jednako važna za stabilizaciju boje vina jer štiti molekule antocijanidina od oksidacije (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Navedene kemijske promjene antocijana tijekom dozrijevanja i starenja vina odgovorne su za promjenu nijanse i intenziteta boja iz tamno crvene u svijetlo ciglasto crvenu boju (Alcalde-Eon i sur., 2006; Monagas i sur., 2006).

Osim promjene boje vina, tijekom starenja crnih vina dolazi i do promjene trpkocće. Naime, poznato je kako mlada vina imaju izraženiju trpkocću u odnosu na odležana. Kemijske

promjene u sastavu tanina odgovorne su za spomenuto smanjenje trpkoc e, tzv. omekšavanje vina. Predloženi su brojni mehanizmi kojima tijekom dozrijevanja i starenja vina dolazi do promjene trpkoc e. Tanini tijekom starenja mogu proći kroz reakcije polimerizacije i depolimerizacije. Također, mogu direktno ili posredstvom acetaldehida ući u interakcije s antocijanima, čime tijekom starenja dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih tanina (Saucier, 2010), dok u senzorskom smislu osim ranije navedene promjene boje navedene reakcije dovode i do smanjenja trpkoc e (Sun i sur., 2016; Liao i sur., 1992). Naime, kondenzacija između molekula flavanola te flavanola i antocijana sa i bez posredovanja acetaldehida rezultira formiranjem oligomernih pigmenata (povezanih direktno ili etilnim mostovima) te formiranjem flavan-piroantocijanina, dok novonastale spojeve karakterizira slabiji intenzitet trpkoc e u odnosu na molekule tanina. Također, proantocijanidini mogu sudjelovati u reakcijama depolimerizacije uzrokovane kiselinskom hidrolizom čime dolazi do smanjenja trpkoc e. Nadalje, precipitacije velikih polimera i obojanih kompleksa također utječu na promjenu trpkoc e (Santos-Buelga i De Freitas, 2009).

Svakako, potrebno je uložiti daljnje napore u razumijevanje kompleksnih mehanizama koji se odvijaju tijekom dozrijevanja i starenja vina (Ugliano i sur- 2011). Posebnu pažnju u daljnjim istraživanjima potrebo je posvetiti razumijevanju uloge kisika te različitim oksido-reduktivnim uvjetima tijekom dozrijevanja vina u hrastovim bačvama (prirodna mikro-oksigenacija) te starenja vina u bocama (Gambutti i sur., 2013; Santos-Buelga i De Freitas, 2009).

2.3. UPOTREBA ANTIOKSIDANSA

2.3.1. Sumporov dioksid

Sumporov dioksid je zbog svog antimikrobnog i antioksidativnog djelovanja jedan od najčešće korištenih aditiva u vinarstvu. Brojni su pozitivni učinci sumpornog dioksida u proizvodnji vina, međutim, prilikom njegovog dodatka potrebno je voditi računa i o prirodno prisutnom SO₂ u samom moštu. Faktori koji utječu na biosintezu SO₂ su soj kvasca, temperatura fermentacije i koncentracija sumpora u grožđu, koja potječe od razgradnje aminokiselina koje ga sadrže (cistein i cistin) (Jackson, 2008). Sumporov dioksid u vino može dodati u obliku plina, a češće kao kalijev metabisulfit (K₂S₂O₅) ili sumporasta kiselina.

Sumporni dioksid u vinu se nalazi u slobodnom ili vezanom obliku. U slobodnom obliku, samo mali dio je prisutan kao otopljeni plin (od 7,5 % pri pH=2,9 do 7 % pri pH=3,8), još manji dio je u obliku slobodnih sulfitnih iona, SO₃²⁻ (od 0,004 % pri pH=2,9 do 0,04 % pri pH=3,8), dok je najveći dio ionskog sumpornog dioksida u obliku je bisulfitnih iona, HSO₃⁻. Bisulfiti se mogu, reverzibilno ili ireverzibilno, vezati sa spojevima vina koji imaju karbonilnu grupu, prvenstveno acetaldehid, zatim piruvat, α-ketoglutarat, šećeri, tanini, antocijani čineći tako frakciju vezanog sumpornog dioksida u vinu (Jackson, 2008).

Antimikrobno djelovanje sumpornog dioksida prvenstveno ovisi o koncentraciji slobodnog, odnosno molekularnog sumporovog dioksida (Bradshaw i sur., 2004). Njegova antimikrobna aktivnost uključuje kidanje disulfidnih mostova enzima koji su odgovorni za njihovu funkcionalnu strukturu. Također, uključuje i vezanje za lipide i nukleinske kiseline, nagli pad koncentracije ATP-a, sniženje staničnog pH, interakciju sa NAD/NADP⁺ te smanjenje koncentracije tiamina. Koncentracije između 0,8 i 1,5 mg L⁻¹ molekularnog SO₂ smatraju se dostatnima za inhibiranje rasta većine divljih kvasaca i bakterija (Jackson, 2008). Važna je primjena sumporovog dioksida kao antioksidansa koji se koristi za kontroliranje posmeđivanja vina (Li i sur., 2008; Oliveira i sur. 2011). Jedan od mogućih načina njegova antioksidativnog djelovanja je direktno uklanjanje kisika, čime sprječavaju djelovanje oksidaza, enzima odgovornih za nepoželjno posmeđivanje vina (Jackson, 2008).

Nadalje, bisulfiti mogu direktno inhibirati Maillardove reakcije tako što inhibiraju enzime polifenoloksidaze, peroksidaze i proteaze, odgovorne za spomenuto nepoželjno posmeđivanje vina (Santos i sur, 2012). Sumporni dioksid može reducirati kinone nastale tijekom oksidacijskih procesa u njihov primarni fenolni oblik. Ireverzibilno vezanje

sumpora s kinonima, koje pronalazimo u pigmentima taninima, uzrokuje gubitak boje kao i inhibiciju njihovog sudjelovanja u ostalim oksidacijskim reakcijama. Antioksidativno djelovanje molekularnog sumpornog dioksida očituje se i u redukciji hidrogen peroksida koji prevodi u vodu i time sprječava oksidaciju etanola u acetaldehid (Arapitsas i sur., 2018; Jackson, 2008).

Dodatkom sumporog dioksida neposredno prije punjenja vina u boce rezultira njegovim vezanjem sa spojevima kao što su acetaldehid, piruvat i α -ketoglutarina kiselina. Također, koncentracija ovog aditiva može utjecati na dinamiku polimerizacije fenolnih spojeva te posljedično boju vina. Naime, novija istraživanja su pokazala kako koncentracija sumporovog dioksida tijekom dozrijevanja može utjecati na usporavanje pada koncentraciju slobodnih antocijana i brzinu formiranja polimernih pigmenata (Santos i sur., 2012). Također, smatra se da SO₂ štiti aromu vina tako što sprječava rast kvasaca soja *Brettanomyces* i *Dekkera* koji su odgovorni za razvoj nepoželjnih aroma (Van Wyk i sur., 2018).

Koncentracija sumpora u vinu mora biti strogo kontrolirana, ne smije uzrokovati inaktivaciju poželjnih kvasaca i bakterija, niti gubitak boje vina, a osobito ne smije doseći toksičnu koncentraciju (Considine i Frankish, 2014). Prema preporukama Međunarodne organizacije za vinogradarstvo i vinarstvo ukupna koncentracija SO₂ u crnim vinima iznosi od 150 do 160 mg L⁻¹ (Van Wyk i sur., 2018). Povećana koncentracija sulfita povezuje se s pojavom alergijskih reakcija kod osjetljivih pojedinaca koji konzumiraju vino (Vally i Thompson, 2003), zbog čega se u novije vrijeme nastoje pronaći alternativna rješenja za smanjenje njegove koncentracije u vinu.

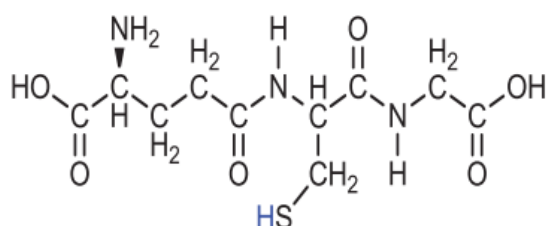
2.3.2. Glutation

Glutation (GSH) je antioksidans endogenog podrijetla prisutan u biljnim i životinjskim stanicama. Štiti stanice od slobodnih radikala i peroksida te sprječava infekcije uzrokovane plijesnima. Također, sudjeluje u metabolizmu sumpora i detoksifikaciji ksenobiotika. Biljke ga sintetiziraju u citosolu i kloroplastima, reakcijama ovisnim o koncentraciji ATP-a (Badea i Antoce, 2015).

GSH je tripeptid L-glutamata, L-cisteina i glicina (slika 2). U stanici se može nalaziti u dva oblika, kao reducirani GSH i oksidirani (dimerni) oblik GSSH (Webber i sur., 2014). Više od 90 % GSH je prisutno u reduciranom obliku koji je izrazito bitan jer je odgovoran za antioksidativna svojstva glutaciona (Badea i Antoce, 2015). Glutation je prirodno prisutan

antioksidans u grožđu u kojem njegova koncentracija ovisi o genetskim komponentama, nutritivnom statusu, stupnju zrelosti grožđa te okolišnim uvjetima. Tijekom dozrijevanja grožđa dolazi do porasta koncentracije glutathiona (Jackson, 2008). Istraživanja su pokazala da je koncentracija GSH puno veća u grožđu koje je uzgajano na tlu koje je bogato dušikom. Koncentracija glutathiona u vinu ovisi o sorti grožđa, terminu berbe, soju upotrijebljenog kvasca i tehnologije proizvodnje vina (Kritzinger i sur., 2013). Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* tijekom alkoholne fermentacije kao jedan od svojih metabolita proizvodi glutathion (Badea i Antoce, 2015).

U vinu i moštu glutathion ima protektivni učinak koji je prepoznala i Međunarodna organizacija vinarstva i vinogradarstva te se sve više istražuje u svrhu smanjenja upotrebe sumporovog dioksida (Webber i sur., 2014; Badea i Antoce, 2015). GSH kao antioksidans ima ulogu u očuvanju sortne arome, sprječavanju posmeđivanja vina i sprječavanju razvoja nepoželjnih aroma (Badea i Antoce, 2015). Vino kultivara koji imaju povećanu koncentraciju hidroksicinaminske kisline i smanjenu koncentraciju glutathiona podložnija su posmeđivanju (El Hosry i sur. 2009; Jackson, 2008). Upotreba glutathiona pokazala se izrazito bitna u proizvodnji vina od aromatičnog grožđa. Zaštita spojeva arome temelji se na reakciji GSH kao nukleofila s kinonima. Pri oksidaciji mošta glutathion reagira s *o*-kinonima, spojevima koji su odgovorni za nastajanje smeđih pigmenata te time formira spojeve koji su otporniji na buduće oksidacijske procese (Sonni i sur., 2011).



Slika 2. Kemijska struktura glutathiona (Badea i Antoce, 2015)

Nadalje, zahvaljujući visokom afinitetu za kisik, glutathion sprječava oksidaciju fenolnih spojeva odgovornih za očuvanje sortne arome (Badea i Antoce, 2015). Hlapivi spojevi poput tiola, monoterpena i estera na taj način ostaju zaštićeni od oksidacije (Styger i sur., 2011). Također, glutathion može reagirati s vodikovim peroksidom i spriječiti oksidaciju polifenola te može djelovati i kao kofaktor nekih antioksidacijskih enzima, kao što su glutathion peroksidaze,

glutation reduktaze i glutation S-transferaze (Badea i Antoce, 2015). Glutation sprječava gubitak aromatičnih voćnih aroma mladih vina i prerano starenje vina tako što inhibira formiranje 2-aminoacetofenona, spoja koji je odgovoran za razvoj nepoželjne arome starenja (Badea i Antoce, 2015; Kritzinger i sur, 2013). Još jedan od načina očuvanja poželjnih aroma vina je sprječavanje smanjenja koncentracije *i*-amil acetata i etil heksanoata spojeva odgovornih za voćnu aromu vina (Kritzinger i sur., 2013). Tijekom starenja vina udio GSH se smanjuje, a njegov dodatak u vino tijekom punjenja u boce usporava formiranje acetaldehida i time čuva aromatsku kompleksnost i svježinu vina i nakon 12 mjeseci (Nikolantonaki i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci vina Cabernet Sauvignon

U ovom istraživanju korišteno je crno vino Cabernet Sauvignon (Erdutski vinogradi d.o.o., Erdut, Hrvatska), proizvedeno 2017. godine sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida. Osnovni fizikalno-kemijski parametri prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Osnovni fizikalno-kemijski sastav vina Cabernet Sauvignon

| Parametar | Cabernet Sauvignon |
|---|--------------------|
| Alkohol (vol %) | 13,1 |
| Ukupna kiselost (g L ⁻¹ vinske kiseline) | 5,3 |
| Hlapiva kiselost(g L ⁻¹ octene kiseline) | 0,61 |
| Reducirajući šećeri (g L ⁻¹) | 4,1 |
| pH | 3,46 |
| Jabučna kiselina (g L ⁻¹) | 0,1 |
| Mliječna kiselina (g L ⁻¹) | 1,3 |
| Ukupni sumporov dioksid (mg L ⁻¹) | 20 |
| Slobodni sumporov dioksid (mg L ⁻¹) | 10 |

3.1.2. Kemikalije

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

- Natrijev hidrogen sulfit, p.a. Acros, Geel, Belgija
- 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
- Acetonitril (100 %), HPLC čistoće, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska
- Metanol (100%), HPLC čistoće, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska

- Malvidin-3-*O*-glukozid klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- (+)-Katehin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- (-)-Epikatehin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Procijanidin B1, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Procijanidin B2, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Spektrofotometar (Specord 50 Plus), AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD
- HPLC Agilent Technologies 1260 Series, Santa Clara, CA, SAD sastavljen iz sljedećih komponenti:
 - *Kvarterna Pumpa (Bin Pump SL) G7111B*
 - *Autosampler (DL-ALS) G2258A*
 - *Termostat Autosamplera (FC/ALS Term) G1330B*
 - *Temostatirani odjeljak za kolonu (TCC SL) G1316B*
 - *Diode Array Detector (DAD VL) G1316A*
 - *Fluorescence Detector (FLD) G1321B*
 - *Agilent Chemstation Softver*

Pribor:

- Mikropipete od 100 i 1000 μ 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 lađica za vaganje
- Laboratorijske čaše volumena 100, 150, 250 mL
- Staklene kivete od 1 cm

3.2. METODE

3.2.1. Dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation)

Pripremljena su vina s različitim koncentracijama antioksidansa sumporovog dioksida i glutationa i to: (i) kontrolno vino sa standardnom koncentracijom SO_2 odnosno s 25 mg L^{-1} slobodnog SO_2 , (ii) vino sa sniženom koncentracijom SO_2 odnosno 10 mg L^{-1} slobodnog SO_2 te (iii) vino sa sniženom koncentracijom SO_2 i glutationom odnosno 10 mg L^{-1} slobodnog SO_2 uz dodatak 20 mg L^{-1} glutationa.

3.2.2. Punjenje vina u boce i stavljanje na starenje

Nakon dodatka antioksidansa vino je punjeno u boce koje su prethodno propuhane dušikom (1,5 min) kako bi se iz njih uklonio kisik. Napunjene boce su zatvorene plutenim čepom uz pomoć ručne čepilice te su skladištene u vodoravnom položaju pri kontroliranim uvjetima (na $14 \text{ }^\circ\text{C}$). Uzorci vina analizirani su nakon 12 mjeseci starenja u bocama.

3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu

Princip određivanja:

Koncentracija ukupnih antocijana određena je metodom koja se temelji na dodatku otopine natrij hidrogensulfita u uzorak vina. Dodatkom navedene otopine dolazi do vezanja HSO_3^- iona na položaj 2' obojenog kation antocijana što dovodi do prelaska obojenog kationa u bezbojni leuko oblik. Paralelni uzorak tretiran je deioniziranom vodom pri čemu ne dolazi do strukturne promjene antocijana. Razlika absorbancija oba uzorka izmjerena je spektrofotometrijski pri 520 nm iz čega je izračunata koncentracija antocijana u mg L^{-1} (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1965).

Postupak određivanja:

U tikvicu od 25 mL otpipetirati 1 mL uzorka, 1 mL 96% etanola zakiseljenog sa $0,1 \text{ (v/v)}$ HCl i 20 mL 2% otopine HCl . Zatim po 10 mL pripremljene otopine otpipetirati u dvije tikvice. U prvu tikvicu dodati 4 mL deionizirane vode, a u drugu 4 mL 15% otopine natrij hidrogensulfita. Nakon 15 minuta izmjeriti apsorbanciju oba uzorka na valnoj duljini od 520 nm nasuprot deioniziranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Udio antocijana u ispitivanom uzorku vina izračunat je prema formuli:

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

gdje je:

A_c (mg L^{-1}) - količina antocijana u ispitivanom uzorku

875 - faktor preračunavanja

D_1 - apsorbancija uzorka kojemu je dodana deionizirana voda

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

3.2.4. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu

Princip određivanja:

Koncentracija ukupnih tanina određena je Bate-Smith metodom koja se bazira na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina tzv. kondenziranih tanina na temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1966). Razlika obojenja između zagrijanog, hidroliziranog i nehidroliziranog uzorka držanog na sobnoj temperaturi izmjerena je spektrofotometrijski je pri valnoj duljini od 550 nm, a pokazuje količinu ukupnih tanina u uzorku u g L^{-1} .

Postupak određivanja:

U dvije tube za hidrolizu otpipetirati po 2 mL uzorka prethodno razrijeđenog u omjeru 49:1, 1 mL destilirane vode te 3 mL koncentrirane klorovodične kiseline zatim tube hermetički zatvoriti. Jednu tubu ostaviti na sobnoj temperaturi, a drugu staviti u vodenu kupelj na 100° C. Nakon 30 minuta tubu izvaditi iz vodene kupelji te ohladiti ledom kako bi se zaustavila reakcija kiselinske hidrolize. U svaku tubu dodati 0,5 mL etanola te homogenizirati. Optičku gustoću izmjeriti pri 550 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

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

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

gdje je:

19,33- faktor preračunavanja

D_1 - optička gustoća hidroliziranog uzorka

D_2 - optička gustoća nehidroliziranog uzorka

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

Princip određivanja:

Analiza slobodnih antocijana provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) na uređaju Agilent1260 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) uz module kvaterne pumpe, autosampler-a, modula kolone te DAD detektora. U uzorcima vina određen je 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) i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat).

Priprema uzorka za HPLC analizu:

Prethodno analizirani uzorak vina filtriran je kroz celuloza acetat filter promjera 25 mm i veličine pora 0,45 μm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 μL pripremljenog uzorka. Korištena je binarna mobilna faza koja se sastojala od otapala A (voda/mravlja kiselina; 95:5; v/v) i otapala B (acetonitril/mravlja kiselina; 95:5; v/v). Pripremljene mobilne faze su filtrirane te degazirane (Lorrain i sur., 2011). 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 uz protok mobilne faze od 1 mL min⁻¹ i primjenom gradijenta prikazanog u tablici 2.

Tablica 2. Gradijent korišteni za razdvajanje slobodnih antocijana

| Vrijeme (min) | A (%) | B (%) | Protok (mL min⁻¹) |
|--------------------------|------------------|------------------|---|
| 0 | 90 | 10 | 1 |
| 25 | 65 | 35 | 1 |
| 26 | 0 | 100 | 1 |
| 28 | 0 | 100 | 1 |
| 29 | 90 | 10 | 1 |
| 35 | 90 | 10 | 1 |

Detekcija slobodnih antocijana:

Detekcija slobodnih antocijana provedena je pomoću DAD detektora, snimanjem spektra od 280 do 600 nm. Identifikacija i kvantifikacija slobodnih antocijana provedena je pri 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. Koncentracije pojedinačnih slobodnih antocijana izražene su kao ekvivalent malvidin-3-*O*-glukozid klorida (mg L⁻¹). Ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozidi izračunati su iz sume koncentracija delfinidin-3-*O*-glukozida, cijanidin-3-*O*-glukozida, petunidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3-*O*-glukozida i malvidin-3-*O*-glukozidaa. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid acetati izračunati iz sume koncentracija peonidin-3-*O*-glukozid acetata i malvidin-3-*O*-glukozid acetata. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati izračunati su iz sume koncentracija peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.

3.2.6. Određivanje flavanola u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Princip određivanja:

Analiza sastava flavan-3-ol monomera [(+)-katehin, (-)-epikatehin] i flavan-3-ol dimera (procijanidin B1, B2, B3 i B4) provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) na Agilent1260 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module kvarterne pumpe, autosampler-a, modula kolone te uz detekciju na fluorescentnom detektoru.

Priprema uzorka za HPLC analizu:

Priprema uzorka vina uključivala je filtriranja uzorka kroz celuloza acetat filtar promjera 25 mm i veličina pora 0,45 μm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 μL profiltriranog uzorka. Razdvajanje je provedeno binarnom mobilna faza koja se sastojala od otapala A (voda/mravlja kiselina; 99,5:0,5; v/v) i otapala B (acetonitril/mravlja kiselina; 99,5:0,5; v/v) (Silva i sur., 2012). Pripremljene mobilne faze su filtrirane i degazirane. Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na koloni LiChrospher 100-RP – 18, dimenzija 250 x 4,6 mm (Merck, Darmstadt, Njemačka), pri temperaturi od 25 °C primjenom gradijenta prikazanog u tablici 3 uz protok mobilne faze od 1 mL min⁻¹.

Tablica 3. Gradijent korišten za razdvajanje flavanola

| Vrijeme (min) | A (%) | B (%) | Protok (mL min⁻¹) |
|--------------------------|------------------|------------------|---|
| 0 | 97 | 3 | 1 |
| 13 | 92 | 8 | 1 |
| 18 | 92 | 8 | 1 |
| 20 | 90 | 10 | 1 |
| 45 | 90 | 10 | 1 |
| 50 | 0 | 100 | 1 |
| 54 | 0 | 100 | 1 |
| 55 | 97 | 3 | 1 |

Detekcija flavanola:

Flavan-3-ol monomeri i dimeri detektirani su pri valnoj duljini ekscitacije 280 nm i valnoj duljini emisije 320 nm na fluorescentnom detektoru uz „medium“ osjetljivost. Identifikacija je provedena usporedbom retencijskog vremena spoja i standarda dok je kvantifikacija provedena primjenom metode vanjskog standarda (+)-katehina, (-)-epikatehina, procijanidina B1 i B2. Analiza svakog uzorka provedena je u paraleli, a dobivene koncentracije izražene su u mg L⁻¹. Koncentracije procijanidina B3 i B4 izražene su ekvivalentima procijanidina B1. Ukupni flavan-3-ol monomeri izračunati su kao suma koncentracija (+)-katehina i (-)-epikatehina, dok su ukupni flavan-3-ol dimeri izračunati kao suma koncentracija procijanidina B1, B2, B3 i B4.

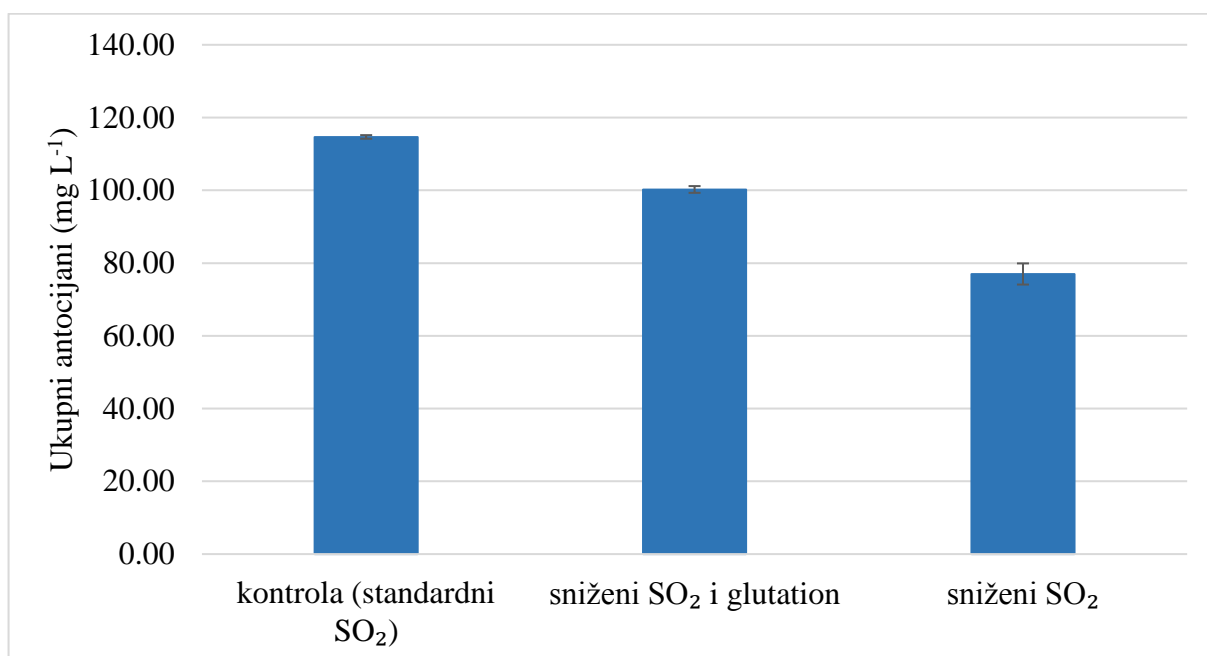
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj dodatka antioksidansa (sumpornog dioksida i glutationa) na stabilnost antocijana i tanina nakon 12 mjeseci starenja vina u bocama te istražiti mogućnosti smanjenja sumporovog dioksida u proizvodnji vina. Istraživanje je provedeno na crnom vinu sorte Cabernet Sauvignon (Erdutski vinogradi d.o.o., Erdut, Hrvatska), berba 2017. godina. Promjene u sastavu antocijana i tanina vina nakon 12 mjeseci starenja ispitane u vinima s različitim koncentracijama antioksidansa sumporovog dioksida i glutationa i to: (i) u vinu sa sniženom koncentracijom SO₂ odnosno 10 mg L⁻¹ slobodnog SO₂ te (ii) vinu sa sniženom koncentracijom SO₂ i glutationom odnosno 10 mg L⁻¹ slobodnog SO₂ uz dodatak 20 mg L⁻¹ glutationa, a dobiveni rezultati uspoređeni su kontrolno vinom sa standardnom koncentracijom SO₂ odnosno s 25 mg L⁻¹ slobodnog SO₂.

Koncentracija ukupnih tanina i antocijana određena je spektrofotometrijskom analizom, a dobiveni rezultati prikazani su slikama 3 i 7. Analiza slobodnih antocijana provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) čiji su rezultati prikazani u tablici 4 i na slikama 4 - 6. Analiza sastava flavan-3-ol monomera [(+)-katehin, (-)-epikatehin] i flavan-3-ol dimera (procijanidin B1, B2, B3 i B4) također je provedena primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5. Rezultati analize sastava ukupnih flavan-3-ol monomera prikazani su na slici 8, a ukupnih flavan-3-ol dimera na slici 9.

4.1. UTJECAJA DODATAKA ANTIOKSIDANSA NA STABILNOST ANTOCIJANA VINA

Utjecaj dodataka antioksidansa na stabilnost ukupnih antocijana vina Cabernet Sauvignon nakon 12 mjeseci starenja u boci prikazan je na slici 3. Iz priloženih rezultata vidljivo je kako tijekom starenja vina u boci došlo do smanjenja koncentracije ukupnih antocijana u vinima s nižom koncentracijom antioksidansa. Naime, u vinu sa smanjenom koncentracijom SO_2 (10 mg L^{-1} slobodnog SO_2) i glutationom (20 mg L^{-1}) te vinu s koncentracijom SO_2 (10 mg L^{-1} slobodnog SO_2) bez dodatka glutaciona utvrđene su niže koncentracije ukupnih antocijana nego u kontrolnom vinu sa standardnom koncentracijom SO_2 odnosno s 25 mg L^{-1} slobodnog SO_2 . Naime, ranija istraživanja pokazala su kako prilikom dozrijevanja i starenja vina dolazi do značajnih promjena u sastavu polifenolnih spojeva (Kallithraka i sur., 2009). Antocijani, koji su nositelji crvene boje mladih vina, se tijekom razdoblja dozrijevanja i starenja transformiraju u stabilnije oligomerne ili polimerne pigmente. Naime, antocijani direktno ili posredovanjem acetaldehida i drugih spojeva reagiraju s drugim polifenolima čime se koncentracija ukupnih antocijana u vinu smanjuje. Također, antocijani mogu ući u reakcije koje rezultiraju adicijom novog piranskog prstena na već postojeću strukturu čime se formiraju novi pigmenti, poput piroantocijana (Jackson, 2008).



Slika 3. Utjecaj dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijana u vinu nakon 12 mjeseci starenja.

Istraživanje provedeno na vinima Temparnillo, Cabernet Sauvignon i Graciano nakon 12 mjeseci starenja pokazalo kako tijekom starenja vina dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih antocijana, koje je u korelaciji sa sudjelovanjem monomera antocijana u brojnim reakcijama kondenzacije, kao i u korelaciji s brojnim reakcijama razgradnje i hidrolize (Monagas i sur, 2006). Također, pokazalo se da tijekom starenja vina u bačvama dolazi do smanjenje koncentracije antocijana zbog formiranja novih antocijan pigmentata, dok je tijekom starenja vina u bocama smanjenje u koncentraciji posljedica degradacije pigmentata prisutnih u vinu (Alcade-Eon i sr., 2006). Navedene kemijske promjene u sastavu antocijana reflektiraju se i na promjenu boje i nijanse vina tijekom njegovog dozrijevanja i to iz intenzivnih crvenih nijansi u smeđe, ciglaste nijanse (Alcade-Eon i sur, 2006; Monagas i sur., 2005).

Nadalje, iz rezultata prikazanih na slici 4 vidljivo je kako je najniža koncentracija ukupnih antocijana zabilježena u uzorku vina sa sniženim SO₂. Usporedbom uzorka sa sniženim SO₂ i glutationom s uzorkom sa sniženim SO₂ uočavamo da je veća koncentracija antocijana zabilježena u prvom navedenom uzorku s višom koncentracijom antioksidansa. Ovi rezultati u skladu s istraživanjem Lukić i sur. (2019) gdje su analizirani uzorci vina tretiranog ultrazvukom visokih snaga s dodatkom antioksidansa (glutacion i SO₂) nakon 6 mjeseci starenja, posljedica su sposobnosti sumporovog dioksida i reduciranog glutaciona da zaštiti lako oksidirajuće spojeve, poput polifenola, smanjenjem stope potrošnje kisika (Lukić i sur., 2019). Naime, antioksidansi, a posebice sumporov dioksid imaju sposobnost zaštite fenolnih spojeva od oksidacije i sprječavanja nepoželjnog posmeđivanja vina tijekom starenja. Jednom kad je dodan u vino, sumporov dioksid reducira kinone u njihov primarni fenolni oblik, na taj način sprječava daljnje reakcije razgradnje u kojima sudjeluju kinoni (Oliviera i sur., 2011; Waterhouse i Nikolantonaki, 2015).

Glutacion kao antioksidans ima ulogu u sprječavanju posmeđivanja vina i gubitka arome vina i predmet je sve većeg broja istraživanja. Dodatak glutaciona od 10 mg L⁻¹ u Savignon vina prilikom punjenja vina u boce rezultirao je sprječavanjem nepoželjnog posmeđivanja vina, gubitak sorte arome i očuvanjem svježine vina tijekom starenja (El Hosry i sur., 2009). Također, dodatak GSH od 20 mg L⁻¹ je dokazano spriječio gubitak terpena tijekom starenja bijelih vina (Papadopoulou i Roussis, 2008). Istraživanje El Hosry i suradnika (2009) pokazalo je da dodatak glutaciona u vino prilikom punjenja vina u boce može povećati stabilnosti vina tijekom starenja (El Hosry i sur., 2009). Nadalje, istraživanje Gambuti i suradnika (2015) potvrđuje sinergističko djelovanje sumporovog dioksida i glutaciona na stabilnost ukupnih i monomera antocijana. U potonjem istraživanju uzorci vina cabernet sauvignon s visokom i

niskom koncentracijom sumporovog disoksida i glutaciona tretirani su mikrooksigenacijom. Rezultati analize pokazali su da je u uzorcima sa smanjenom koncentracijom SO₂ (25 mg L⁻¹) i glutationom (20 mg L⁻¹) te povećanom koncentracijom SO₂ (65 mg L⁻¹) i glutationom (20 mg L⁻¹) došlo do blagog smanjenja koncentracije ukupnih i monomera antocijana, što se pripisuje brojnim reakcijama u kojima antocijani sudjeluju, poput reakcija kondenzacije i kopigmentacije. Znanstvenici su zaključili da je upotreba GSH zanimljiva nadopuna korištenju sumprovog dioksida te može imati koristi u očuvanju crvene boje vina nakon tretmana mikrooksigenacije ili tijekom starenja, no potrebno je provoditi daljnja istraživanja (Gambuti i sur., 2015).

Utjecaj dodatka antioksidansa na promjene u sastavu pojedinačnih slobodnih antocijana (antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata te antocijan-3-*O*-glukozida *p*-kumarata) prikazan je u tablici 4. U skladu s ranijim istraživanjima, malvidin-3-glukozid bio je najzastupljeniji slobodni antocijan u svim analiziranim vinima (Ortega- Regules i sur. 2006; Revilla i sur. 2001;). Neznatne razlike između kontrolnog uzorka i dvaju uzoraka sa sniženom koncentracijom SO₂ sa/ili bez dodatka glutaciona utvrđene su u sastavu cijanidin-3-glukozida,

Tablica 4. Utjecaja dodatka antioksidansa na koncentraciju antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u vinu nakon 12 mjeseci starenja.

| SLOBODNI ANTOCIJANI | UZORCI | | |
|--|---|--|-------------------------|
| | Kontrola (standardni SO ₂) | Sniženi SO ₂ i glutation | Sniženi SO ₂ |
| Antocijan-3-<i>O</i>-glukozidi (mg L⁻¹) | | | |
| Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid | 3,94 ± 0,00 | 3,50 ± 0,00 | 1,99 ± 0,02 |
| Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid | 0,63 ± 0,01 | 0,58 ± 0,01 | 0,53 ± 0,01 |
| Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid | 3,30 ± 0,02 | 2,92 ± 0,06 | 1,64 ± 0,00 |
| Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid | 2,09 ± 0,01 | 1,86 ± 0,00 | 1,15 ± 0,00 |
| Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid | 24,43 ± 0,05 | 21,52 ± 0,02 | 11,45 ± 0,02 |
| Antocijan-3-<i>O</i>-glukozid acetati (mg L⁻¹) | | | |
| Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat | 0,73 ± 0,01 | 0,66 ± 0,01 | 0,47 ± 0,00 |
| Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat | 7,48 ± 0,05 | 6,42 ± 0,05 | 3,24 ± 0,04 |
| Antocijan-3-<i>O</i>-glukozid <i>p</i>-kumarati (mg L⁻¹) | | | |
| Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat | 0,60 ± 0,00 | 0,54 ± 0,04 | 0,42 ± 0,03 |

| | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|
| Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat | 2,46 ± 0,02 | 2,24 ± 0,05 | 1,21 ± 0,01 |
|--|-------------|-------------|-------------|

iz čega proizlazi da koncentracija antioksidansa u vinu tijekom dozrijevanja nema značajan utjecaj na promjene u sastavu navedenog spoja. S druge strane, najznačajnije promjene i odnosu na kontrolni uzorak utvrđene u sastavu malvidi-3-*O*-glukoizida, upućujući na izrazitu osjetljivost navedenog spoja na sastav antioksidansa u vinu. Također, pri tom su značajno niže koncentracije ovog spoja određene u vinu sa sniženom koncentracijom SO₂ i bez dodatka glutaciona, nego u vinu sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona. Dobiveni rezultati u skladu su s ranijim istraživanjima (Ćurko i sur., 2017; Sun i Spranger, 2005).

Delfinifin-3-*O*-glukozid u odnosu na kontrolni uzorak nije pokazao veliko odstupanje u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom, ali je u uzorku sa sniženim SO₂ uočen pad koncentracije. Nadalje, kod petunidin-3-*O*-glukozida neznačajna promjenu koncentracije uočena je u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom u odnosu na kontrolni uzorak, dok se u uzorku sa sniženim SO₂ koncentracija smanjila. Peonidin-3-*O*-glukozid je reagirao slično kao i petunidin-3-*O*-glukozid, gdje je značajniji pad koncentracije u odnosu na kontrolu zabilježen je u uzorku sa sniženim SO₂, a nešto manji u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom.

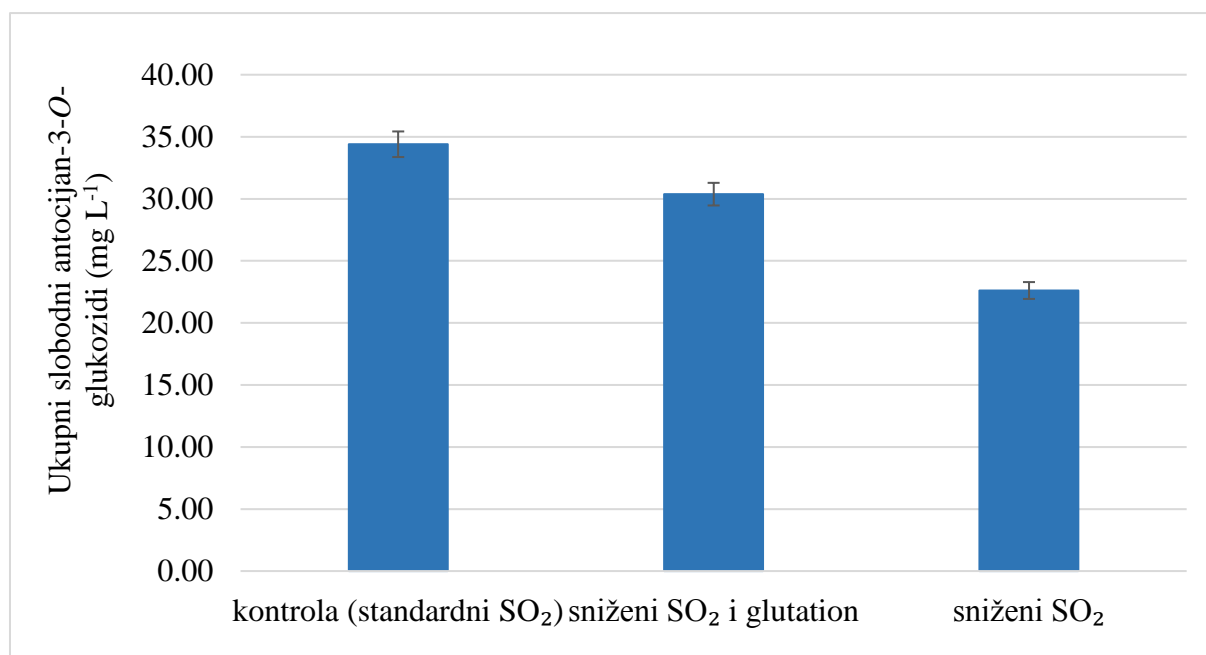
Promjene u sastavu antocijan-3-*O*-glukozid acetata (peonidin-3-*O*-glukozid acetata i malvidin-3-*O*-glukozid acetata) nakon 12 mjeseci starenja vina u boci prikazane su u tablici 4. U koncentraciji peonidin-3-*O*-glukozid acetata utvrđeno je neznatno odstupanje u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom u odnosu na kontrolni uzorak, a pad je zabilježen u uzorku sa sniženim SO₂. S druge strane, kod malvidin-3-*O*-glukozid acetata pad koncentracije zabilježen je i u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom. Međutim, značajniji pad je zabilježen u uzorku sa sniženim SO₂ koji iznosi 3,24 ± 0,04 u odnosu na kontrolni uzorak koji iznosi 7,48 ± 0,05. Dobiveni rezultati upućuju na značajno veću osjetljivost odnosno utjecaj koncentracije antioksidansa na sastav malvidin-3-*O*-glukozid acetata nego peonidin-3-*O*-glukozid acetata.

Trendovi slični onima u sastavu antocijan-3-*O*-glukozid acetata utvrđeni su i u sastavu antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (tablica 4), gdje su tek nešto niže koncentracije antocijana u odnosu na kontrolni uzorak utvrđene u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom, a značajno niže u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ kako kod malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata tako i kod peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata. Ipak, kao i kod antocijan-3-*O*-glukozid acetata, niže

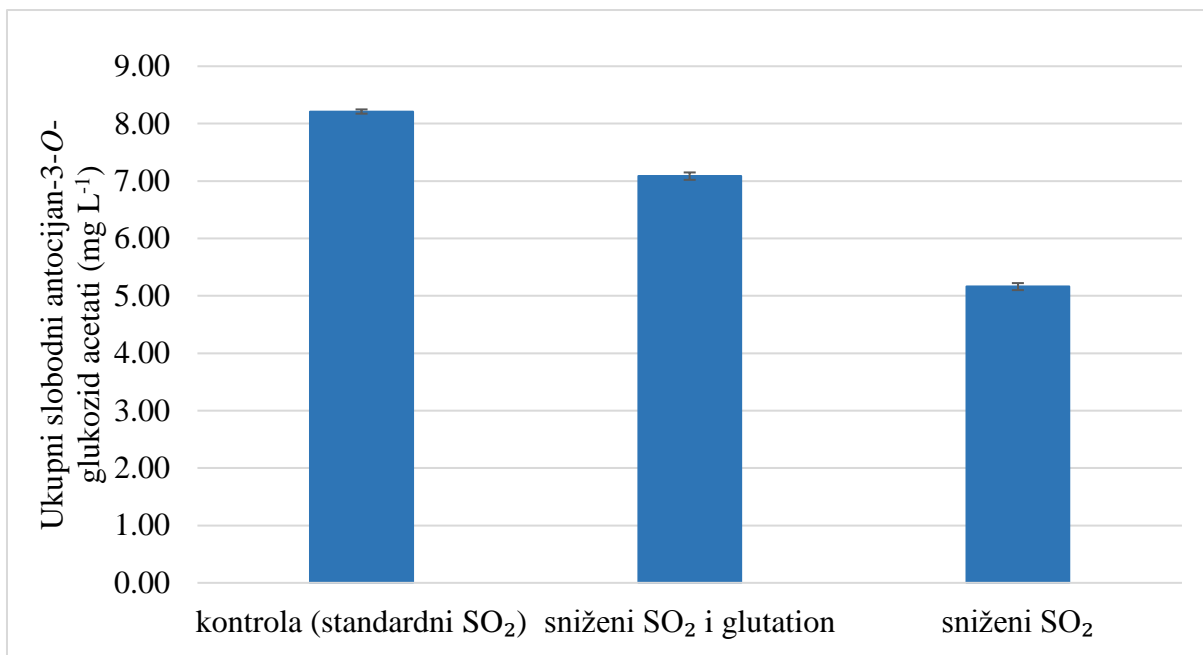
koncentracije antioksidansa pridonijele su značajnijem smanjenju koncentracije malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata nego peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.

Utjecaj dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida u vinu nakon 12 mjeseci starenja prikazan je na slici 4. Iz dobivenih rezultata vidljive su tek blage razlike u koncentraciji između kontrolnog uzoraka sa standardnim SO₂ i uzorka sa sniženim SO₂ i glutationom. S druge strane, značajno veći pad koncentracije antocijan-3-*O*-glukozida zabilježen je u uzorku sa sniženim SO₂. Kako je već ranije istaknuto, koncentracija antioksidansa igra ključnu ulogu na promjene u sastavu kako ukupnih tako i pojedinačnih antocijana (Alcade-Eol i sur. 2006), pri čemu više koncentracije antioksidansa prilikom dozrijevanja i starenja vina mogu značajno usporiti samo smanjenje koncentracije kako ukupnih tako i slobodnih antocijana (Burin i sur., 2011; Ćurko i sur., 2017; Sun i Spranger, 2005). Dobiveni rezultati upućuju na zaštitno djelovanje SO₂ i glutationa, kao i potencijalni sinergistički učinak ova dva antioksidansa (Lukić i sur., 2019).

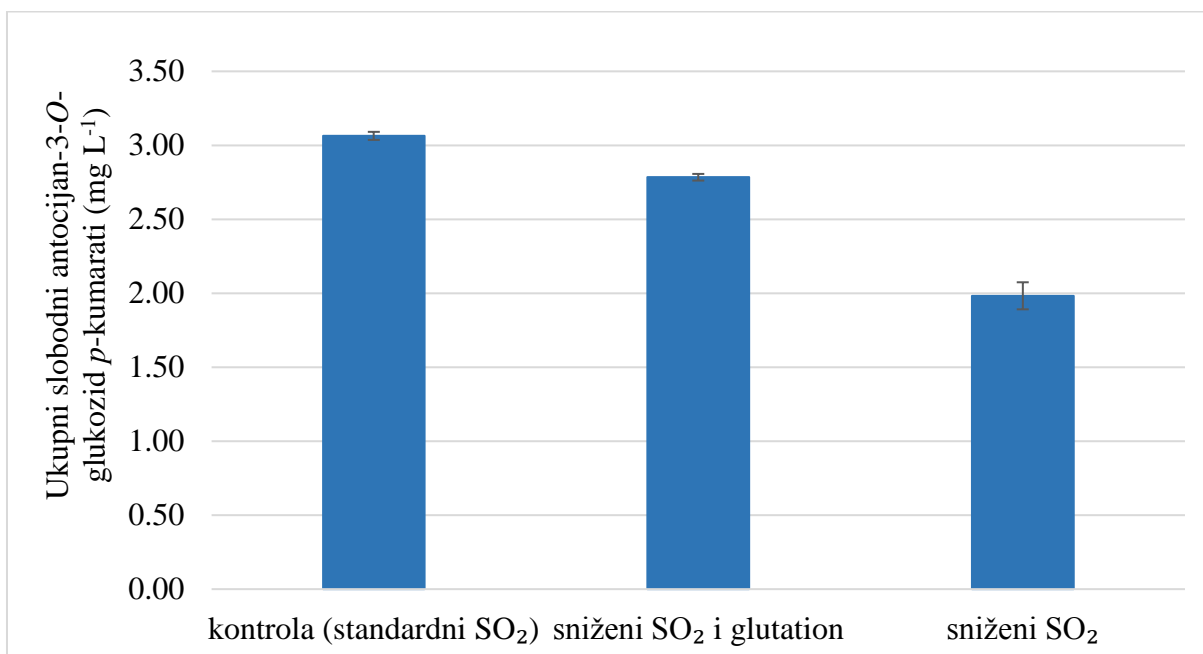
Na slici 5 prikazan je utjecaj dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata u vinu nakon 12 mjeseci starenja. Ranije istraživanje Alcade-Eol i sur. (2006), pokazalo kako je kako su kemijske promjene u sastavu antocijan-3-*O*-glukozid-acetata i antocijan-3-*O*-glukozid-*p*-kumarata identične onima u sastavu antocijan-3-



Slika 4. Utjecaj dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida u vinu nakon 12 mjeseci starenja.



Slika 5. Utjecaj dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijan-3-O-glukozid acetata u vinu nakon 12 mjeseci starenja.



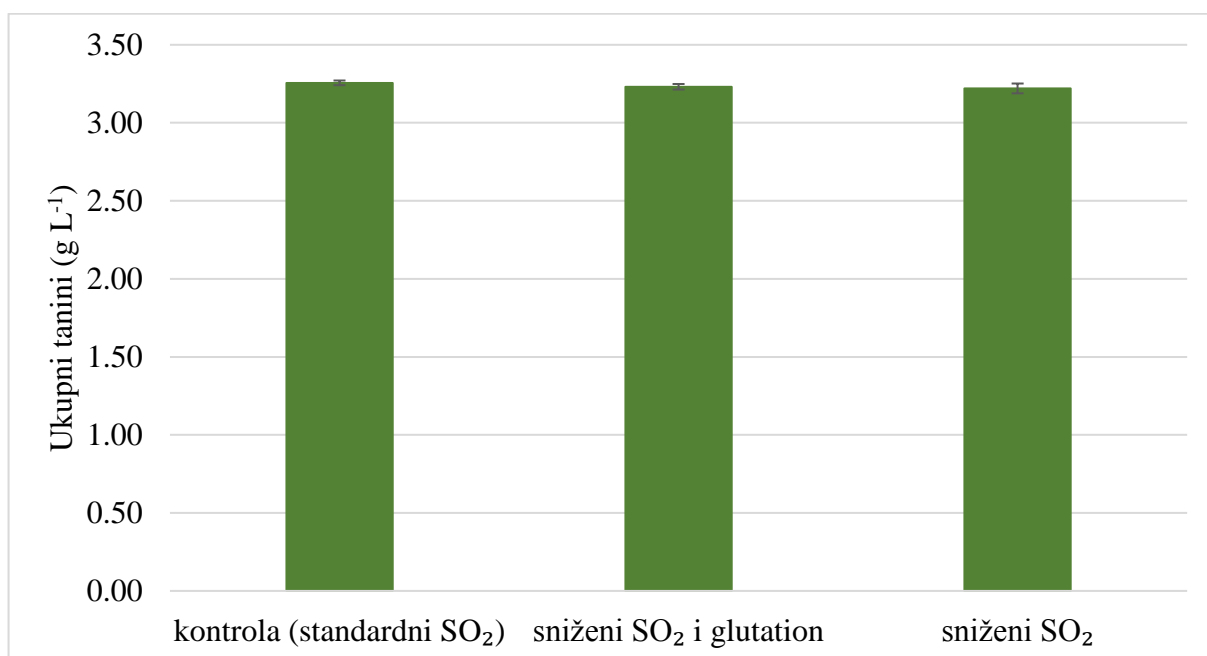
Slika 6. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijan-3-O-glukozid p-kumarata u vinu nakon 12 mjeseci starenja.

glukozid-acetata i antocijan-3-*O*-glukozid-*p*-kumarata identične onima u sastavu antocijan-3-*O*-glukozida. Trendovi vidljivi na slici identični su onima ranije opisanim kod malvidin-3-*O*-glukozid acetata s obzirom na prevlast navedenog spoja u ukupnoj sumi. Sniženje koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata u odnosu na kontrolni uzorak utvrđeno je u uzorku vina sa sniženom koncentracijom SO₂ i glutaciona, a posebno u uzorku sa sniženim SO₂.

Utjecaj dodataka antioksidansa na sastav ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u vinu nakon 12 mjeseci starenja prikazan je na slici 6. Kako je ranije primijećeno kod antocijan-3-*O*-glukozid acetata, dobiveni rezultati reflektiraju ranije opisane trendove zamijećene kod malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata. Pad koncentracije navedenih spojeva uočen je slijedu: kontrolno vino, vino sa sniženom koncentracijom SO₂ i glutationom, vino sa sniženom koncentracijom SO₂. Dobiveni rezultati ukazuju na važnost koncentracije antioksidansa na stabilnost ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.

4.2. UTJECAJA DODATAKA ANTIOKSIDANSA NA STABILNOST TANINA VINA

Rezultati utjecaja dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih tanina u vinu nakon 12 mjeseci starenja prikazani su na slici 7. Tanini predstavljaju 25 – 50 % ukupnih polifenola u vinu, a s obzirom na to da su nositelji senzorskog svojstva trpkooće i okusa gorčine (Chira i sur., 2012), njihova koncentracija kao i promjene u njihovom sastavu direktno utječu na samu kvalitetu crnih vina. Prilikom dozrijevanja i starenja vina u sastavu tanina (proantocijanidina) dolazi do brojnih kemijskih promjena, između ostalog i do promjene stupnja polimerizacije proantocijanidina (Saucier, 2010). Također, tijekom starenja vina uslijed oksidacije etanola dolazi do proizvodnje acetaldehida, spoja koji također utječe na formiranje etilno vezanih polimera. Nadalje, proantocijanidini ili kondenzirani tanini zbog reakcija s antocijanima imaju veliki doprinos u stabilizaciji boje vina tijekom starenja. Naime, povezivanjem A prstenova antocijana i tanina direktno ili uz posredovanje acetaldehida doći će do formiranja obojenih polimernih spojeva (Saucier, 2010). Navedene kemijske reakcije uzrokuju promjene senzorskih svojstava vina tijekom dozrijevanja i starenja, a u prvom redu smanjenje trpkooće te kako je to ranije istaknuto stabilizaciju boje (Alcalde-Eon i sur., 2006; Jackson, 2008). Iz slike 7 vidljivo je kako uzorak sa sniženim SO₂ i glutationom i uzorak sa sniženim SO₂ ne pokazuju značajnije odstupanje od kontrolnog uzorka sa standardnom koncentracijom SO₂. Dobiveni rezultati



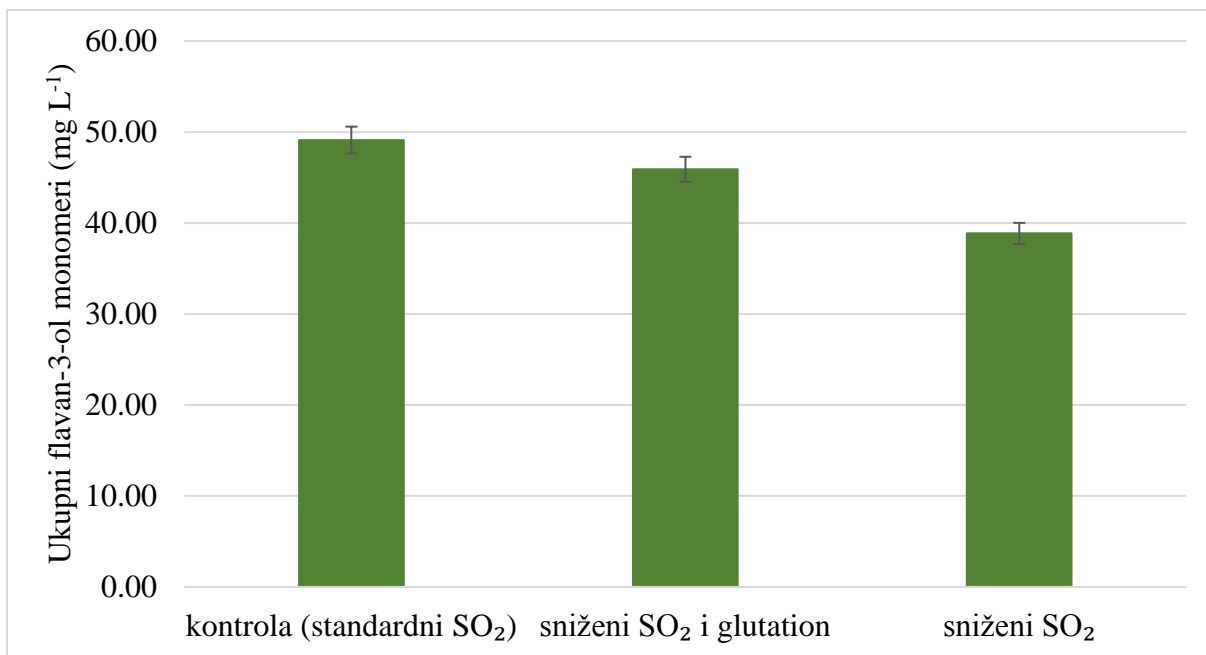
Slika 7. Utjecaj dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih tanina u vinu nakon 12 mjeseci starenja.

pokazuju kako koncentracija antioksidansa u vinu tijekom starenja u bocama nije značajnije utjecala na promjene u sastavu ukupnih tanina, odnosno da su ukupni tanini značajno manje osjetljivi na djelovanje antioksidansa od ukupnih i slobodnih antocijana. Dobiveni rezultati mogu se objasniti činjenicom da starenje u bocama, suprotno od samog dozrijevanja u bačvama predstavlja manje oksidativne uvjete, gdje kontakt vina i kisika u najvećoj mjeri ovi su o korištenom tipu čepa, odnosno njegovoj propusnosti za kisik (Chira i sur, 2012). Također, dobiveni rezultati mogu se usporediti i s rezultatima Bindon i sur. (2014), gdje tijekom 42 mjeseca starenja vina Cabernet Sauvignon nije došlo do značajnije promjene u koncentraciji tanina, međutim istovremeno je zabilježeno povećanje koncentracije novih pigmenata, bilo polimernih ili nepolimernih, otpornih na djelovanje SO₂, kao i stabilizacije boje vina (Bindon i sur., 2014).

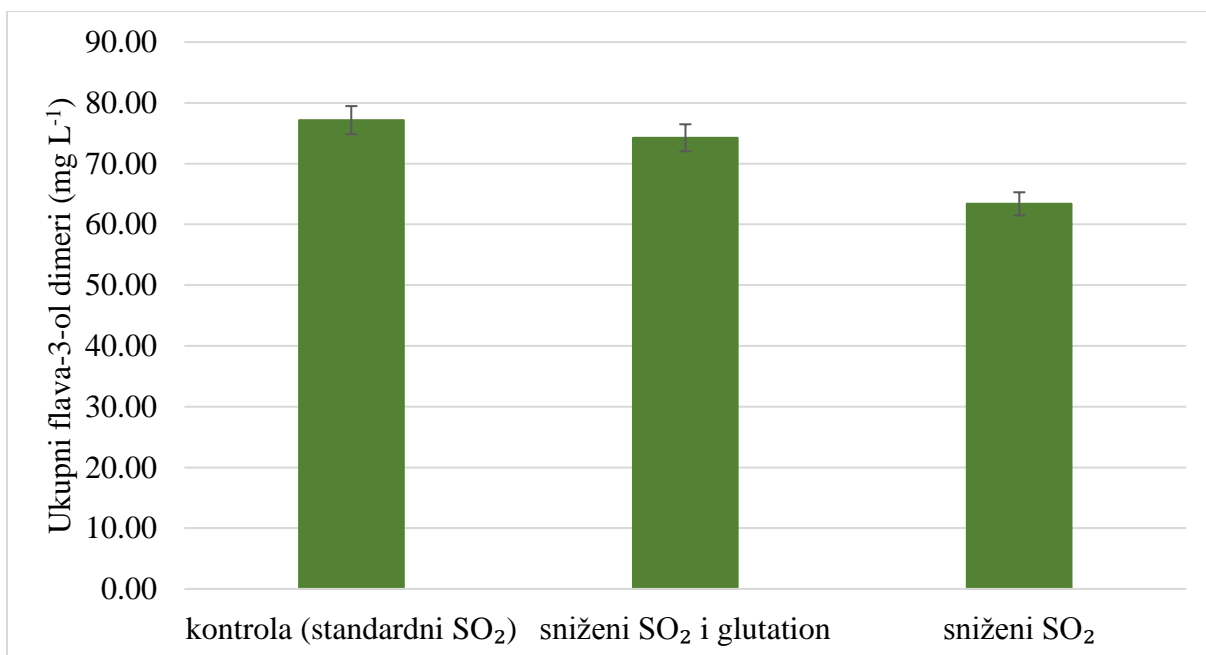
Utjecaj dodatka antioksidansa na koncentraciju pojedinačnih flavan-3-ol monomera i dimera u vinu nakon 12 mjeseci starenja prikazan je u tablici 5. Flavan-3-oli su polifenolni spojevi primarno odgovorni za trpkocu, gorčinu i strukturu crnih vina, međutim također igraju i ključnu ulogu u stabilizaciji boje vina tijekom starenja (Puertolas i sur., 2010). Ranija istraživanja pokazala su kako tijekom dozrijevanja i starenja vina dolazi do smanjenja koncentracije monomera i dimera. Primjerice, istraživanje provedeno na sortama Merlot, Syrah i Tempranillo pokazalo je kako tijekom 12 mjeseci dozrijevanja dolazi do značajnog smanjenja

Tablica 5. Utjecaja dodatka antioksidansa na koncentraciju flavan-3-ol monomera i dimera u vinu nakon 12 mjeseci starenja.

| FLAVAN-3-OLI | UZORCI | | |
|---|---|--|-------------------------|
| | Kontrola (standardni SO ₂) | Sniženi SO ₂ i glutation | Sniženi SO ₂ |
| Flavan-3-ol monomeri (mg L⁻¹) | | | |
| (+)-Katehin | 34,11 ± 0,05 | 31,66 ± 0,08 | 26,78 ± 0,01 |
| (-)-Epikatehin | 15,01 ± 0,00 | 14,24 ± 0,01 | 12,07 ± 0,00 |
| Flavan-3-ol dimeri (mg L⁻¹) | | | |
| Procijanidin B1 | 27,93 ± 0,25 | 27,14 ± 0,47 | 22,80 ± 0,55 |
| Procijanidin B2 | 32,23 ± 0,06 | 30,92 ± 0,12 | 26,49 ± 0,02 |
| Procijanidin B3 | 8,68 ± 0,24 | 8,20 ± 0,50 | 6,83 ± 0,09 |
| Procijanidin B4 | 8,31 ± 0,02 | 7,99 ± 0,03 | 7,26 ± 0,04 |



Slika 8. Utjecaj dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih flavan-3-ol monomera u vinu nakon 12 mjeseci starenja.



Slika 9. Utjecaj dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih flavan-3-ol dimera u vinu nakon 12 mjeseci starenja.

koncentracije flavan-3-ola kao posljedica sudjelovanja ovih spojeva u reakcijama s antocijanima i formiranju polimernih pigmenata (Marquez i sur., 2013). Iz rezultata prikazanih u tablici 4 vidljivo je kako je koncentracija (+)-katehin i (-)-epikatehina znatno niža u uzorcima sa sniženom koncentracijom SO₂ u odnosu na kontrolni uzorak, dok je neznatan pad u koncentraciji uočen u uzorcima sa sniženom koncentracijom SO₂ i glutationom. Naime, antioksidansi, sumporov dioksid i glutation, imali su zaštitu ulogu, te je viša koncentracija ovih antioksidansa usporila smanjenje koncentracije flavan-3-ol monomera tijekom starenja vina. Također, među analiziranim flavan-3-olima, najintenzivnije promjene tijekom starenja uočene su u sastavu (+)-katehina u skladu s ranijim istraživanjima (Gómez-Cordovés i González-SanJosé, 1995). Najznačajniji pad koncentracije uočen je kod (+)-katehina u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂. Nadalje, u sastavu flavan-3-ol dimera najveći pad koncentracije u odnosu na kontrolni uzorak uočen je kod procijanidina B2 u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂. Koncentracije ostalih flavan-3-ol dimera procijanidina B1, B3 i B4 pokazuju također pad koncentracije u uzorcima sa sniženom koncentracijom SO₂ i glutationom potom u uzorcima sa sniženom koncentracijom SO₂, što je u skladu s rezultatima Marquez i sur. (2013).

Utjecaj dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih flavan-3-ol monomera u vinu nakon 12 mjeseci starenja prikazan je na slici 8. Neznačajan pad u koncentraciji ukupnih flavan-3-ol monomera u odnosu na kontrolni uzorak uočen je u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i glutationom. S druge strane, značajan pad koncentracije u odnosu na kontrolni uzorak zabilježen je u uzorku sa sniženim SO₂. Nadalje, vrlo sličan trend uočen je i u sastavu ukupnih flavan-3-ol dimera prikazanih na slici 9, gdje je u odnosu na kontrolni uzorak utvrđen blagi pad u koncentraciji flavan-3-ol dimera u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom. S druge strane, značajan pad koncentracije flavan-3-ol dimera u odnosu na kontrolni uzorak, identično kao i kod flavan-3-ol monomera, zabilježen je u uzorku sa sniženim SO₂. Iako je smanjenje koncentracije flavan-3-ol monomera i dimera tijekom dozrijevanja i starenja vina u skladu s ranijim istraživanjima (Drinkine i sur. 2007) dobiveni rezultati potvrđuju zaštitno djelovanje glutaciona u vinima sa sniženim udjelom sumporovog dioksida.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata o utjecaju dodataka antioksidansa (sumporovog dioksida i glutaciona) na stabilnost antocijana i tanina u vinu Cabernet Sauvignon nakon 12 mjeseci starenja u bocama možemo zaključiti sljedeće:

1. Koncentracija antioksidansa (sumporovog dioksida i glutaciona) značajno je utjecala na kemijske promjene u sastavu antocijana i flavan-3-ol monomera i dimera tijekom starenja vina.
2. Više koncentracije antioksidansa tijekom starenja imale su zaštitno djelovanje te pozitivan učinak na stabilnost antocijana i flavan-3-ol monomera i dimera, usporavajući njihovo smanjenje koncentracije.
3. Dodatak glutaciona pokazao je zaštitno djelovanje u vinu sa sniženim koncentracijom SO₂.
4. Najviša koncentracija ukupnih antocijana zabilježena u kontrolnom uzorku, zatim u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona, dok je najveći pad koncentracije zabilježen u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂.
5. U uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona zabilježena je viša koncentracija slobodnih antocijana (antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata) u odnosu na uzorak sa sniženom koncentracijom SO₂.
6. Koncentracija antioksidansa nije značajnije utjecala na promjene u sastavu ukupnih tanina tijekom starenja.
7. U uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona zabilježena je viša koncentracija flavan-3-ol monomera i dimera u odnosu na uzorak sa sniženom koncentracijom SO₂.

6. LITERATURA

Adams, D. O. (2006) Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Viticult.* **57**, 249-256.

Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C. (2006) Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta.* **563**, 238-254.

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

Arapitsas, P., Guella, G., Mattivi, F. (2018) The impact of SO₂ on wine flavanols and indoles in relation to wine style and age. *Sci. Rep.* **8**, 1-13.

Arnous, A., Makris, D. P., Kefalas, P. (2001) Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. *J. Food Compos. Anal.* **15**, 655-665.

Askari-Khorasgani, O., Pessarakli, M. (2019) Fruit quality and nutrient composition of grapevines: a review. *J. Plant Nutr.* **42**, 2133-2150.

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.

Bindon, K. A., McCarthy, M. G., Smith, P. A. (2014) Development of wine colour and non-bleachable pigments during the fermentation and ageing of (*Vitis vinifera* L. cv.) Cabernet Sauvignon wines differing in anthocyanin and tannin concentration. *LWT-Food Sci. Technol.* **59**, 923-932.

Boulton, R. (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the colour of red wine:
A critical review. *Am. J. Enol. Viticult.* **52**, 67-87.

Bradshaw, M. P., Scollary, G. R., Prenzler, P. D. (2004) Examination of the sulfur dioxide–ascorbic acid anti-oxidant system in a model white wine matrix. *J. Sci. Food Agr.* **84**, 318-324.

- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
- Burin, V. M., Costa, L. L. F., Rosier, J. P., Bordignon-Luiz, M. T. (2011) Cabernet Sauvignon wines from two different clones, characterization and evolution during bottle ageing. *LWT-Food Sci. Technol.* **44**, 1931-1938.
- Chira, K., Jourdes, M., Teissedre, P. L. (2012) Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 253-261.
- Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., Teissedre, P. L. (2011) Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chem.* **126**, 1971-1977.
- Ćurko, N., Kelšin, K., Jambrak, R. A., Tomašević, M., Gracin, L., Poturica, V., Ružman E., Ganić, K. K. (2017) The effect of high power ultrasound on phenolic composition, chromatic characteristics, and aroma compounds of red wines. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **9**, 136-144.
- De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W. C. A., Manley, M. (2002) Phenolic Compounds: A Review of Their Possible Role as *In vivo* Antioxidants of Wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **23**, 48-61.
- De Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. (2000) Prodelphinidins and related flavanols in wine. *Int. J. Food Sci. Tech.* **35**, 33-40.
- Drinkine, J., Lopes, P., Kennedy, J. A., Teissedre, P. L., Saucier, C. (2007) Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age. *J. Agr. Food Chem.* **55**, 6292-6299.
- El Hosry, L., Auezova, L., Sakr, A., Hajj- Moussa, E. (2009) Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. *Int. J. Food Sci. Tech.* **44**, 2459-2463.
- Gambutì, A., Han, G., Peterson, A. L., Waterhouse, A. L. (2015) Sulfur dioxide and glutathione alter the outcome of microoxygenation. *Am. J. Enol. Viticult.* **66**, 411-423.

- Gambutì, A., Rinaldi, A., Ugliano, M., Moio, L. (2013) Evolution of phenolic compounds and astringency during aging of red wine: Effect of oxygen exposure before and after bottling. *J. Agr. Food Chem.* **61**, 1618-1627.
- Garrido, J., Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Res. Int.* **54**, 1844-1858.
- Gawel, R. (1998) Red wine astringency: a review. *Austr. J. Grape Wine Res.* **4**, 74-95.
- Gomez-Cordoves, C., Gonzalez-SanJose, M. L. (1995) Interpretation of color variables during the aging of red wines: relationship with families of phenolic compounds. *J. Agr. Food Chem.* **43**, 557-561.
- González-Manzano, S., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C. (2009) Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression in red wine. *Food Chem.* **114**, 649-656.
- Gutiérrez, I. H., Lorenzo, E. S. P., Espinosa, A. V. (2005) Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chem.* **92**, 269-283.
- Jackson, R. S. (2008) Wine science: principles and application, 3. izd., Academic press, New York, str. 28-317.
- Jordão, A. M., Ricardo-da-Silva, J. M. (2019) Evolution of Proanthocyanidins During Grape Maturation, Winemaking, and Aging Process of Red Wines. U: Red Wine Technology, (Morata, A., ured.), Academic Press, New York, str. 177-193.
- Joscelyne-Louise, J. (2009) Consequences of extended maceration for red wine colour and phenolics. Doctoral thessis, University of Adelaide, Adelaide.
- 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. Agr. Food Chem.* **55**, 1612-1619.

- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., Du Toit, W. J. (2013) Role of glutathione in winemaking: a review. *J. Agr. Food Chem.* **61**, 269-277.
- Li, H., Guo, A., Wang, H. (2008) Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.* **108**, 1-13.
- Liao, H., Cai, Y., Haslam, E. (1992) Polyphenol interactions. Anthocyanins: Copigmentation and colour changes in red wines. *J. Sci. Food Agr.* **59**, 299-305.
- 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.
- Lukić, K., Brnčić, M., Čurko, N., Tomašević, M., Valinger, D., Denoya, G. I., Barba, F. J., Ganić, K. K. (2019) Effects of high power ultrasound treatments on the phenolic, chromatic and aroma composition of young and aged red wine. *Ultrason. Sonochem.* **59**, 104725.
- Maletić, E., Kontić, J. K., Preiner, D., Jeromel, A., Patz, C. D., Dietrich, H. (2009) Anthocyanin profile and antioxidative capacity of some autochthonous Croatia red wines. *J. Food Agric. Environ.* **7**, 48-51.
- Marquez, A., Serratos, M. P., Merida, J. (2014) Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chem.* **146**, 507-514.
- Mingshu, L., Kai, Y., Qiang, H., Dongying, J. (2006) Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *J. Basic Microb.* **46**, 68-84.
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., Duran, N. (2003) Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem.* **82**, 409-416.
- Monagas, M., Bartolomé, B. (2009) Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Compounds. U: Wine Chemistry and Biochemistry, (Moreno-Arribas, M., Polo, M. C., ured.), Springer, New York, str. 437-591.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo da Silva, J. M. (2003) Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes

from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 6475-6481.

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.

Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., Silva, A. M. (2011) Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res. Int.* **44**, 1115-1126.

Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., Gómez-Plaza, E. (2006) Anthocyanin fingerprint of grapes: environmental and genetic variations. *J. Sci. Food Agr.* **86**, 1460-1467.

Oszmianski, J., Sapis, J. C. (1989) Fractionation and identification of some low molecular weight grape seed phenolics. *J. Agr. Food Chem.* **37**, 1293-1297.

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

Papadopoulou, D., Roussis, I. G. (2008) Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine. *Int. J. Food Sci. Tech.* **43**, 1053-1057.

Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., Raso, J. (2010) Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chem.* **119**, 1063-1070.

Raposo, R., Chinnici, F., Ruiz-Moreno, M. J., Puertas, B., Cuevas, F. J., Carbú, M., Guerro, R. F., Ortiz-Somovilla, V., Moreno-Rojas, J. M., Cantos-Villar, E. (2018) Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots: Impact on the wine quality. *Food Chem.* **243**, 453-460.

Renaud, S. D., de Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet.* **339**, 1523-1526.

- Revilla, E., García-Beneytez, E., Cabello, F., Martín-Ortega, G., Ryan, J. M. (2001) Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr. A*. **915**, 53-60.
- Ribéreau-Gayon, P. (1974) The Chemistry of Red Wine Color. U: Chemistry of Winemaking, (Webb, D., ured.), American Chemical Society, Washington, str. 50-87.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdien, D. (2006) Handbook of Enology, 2. izd, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, str. 141-199.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965) Determination of Anthocyanins in Red Wine. *B. Soc. Chim. Fr.* **9**, 2649-2652.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal-Paris.* **48**, 188-196.
- Ricardo- da- Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J. M., Moutounet, M., Cabanis, J. C., Bourzeix, M. (1991) Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *J. Sci. Food Agric.* **57**, 111-125.
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. and Technol.* **234**, 1-12.
- Santos-Buelga, C., De Freitas, V. (2009) Influence of phenolics on wine organoleptic properties. U: Wine chemistry and biochemistry, (Moreno-Arribas, M., Polo, M. C., ured.), Springer, New York, str. 529-570.
- Saucier, C. (2010) How do wine polyphenols evolve during wine ageing?. *Cerevisia.* **35**, 11-15.
- Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N. (2001) Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Ttech.* **91**, 21-40.
- Silva, M. A., Ky, I., Jourdes, M., Teissedre, P.L. (2012) Rapid and simple method for the quantification of flavan-3-ols in wine. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 361-365.

- Soleas, G. J., Dam, J., Carey, M., Goldberg, D. M. (1997) Toward the fingerprinting of wines: cultivar-related patterns of polyphenolic constituents in Ontario wines. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 3871-3880.
- Sonni, F., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Riponi, C., Scollary, G. R. (2011) Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *J. Agr. Food Chem.* **59**, 3940-3949.
- Styger, G., Prior, B., Bauer F.F. (2011) Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 1145-1159.
- Sun, B., Spranger, M. I. (2005) Changes in phenolic composition of Tinta Miúda red wines after 2 years of ageing in bottle: effect of winemaking technologies. *Eur. Food Res. Technol.* **221**, 305-312.
- Sun, X., Li, L., Ma, T., Zhao, F., Yu, D., Huang, W., Zhan, J. (2016) High hydrostatic pressure treatment: An artificial accelerating aging method which did not change the region and variety non-colored phenolic characteristic of red wine. *Innov. Food Sci. Emerg.* **33**, 123-134.
- Terrier, N., Poncet-Legrand, C., Cheynier, V. (2009) Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. U: Wine chemistry and Biochemistry, (Moreno-Arribas, M., Polo, M. C., ured.), Springer, New York, str. 463-496.
- Ugliano, M., Kwiatkowski, M., Vidal, S., Capone, D., Siebert, T., Dieval, J. B., Aagaard, O., Waters, E. J. (2011) Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *J. Agr. Food Chem.* **59**, 2564-2572.
- Vally, H., Thompson, P. (2003) Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Addict. biol.*, **8**, 3-11.
- Van Wyk, S., Farid, M. M., Silva, F. V. (2018) SO₂, high pressure processing 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.*, **48**, 204-211.

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

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

Waterhouse, A. L., Nikolantonaki, M. (2015) Quinone reactions in wine oxidation. U: *Advances in wine research*, (Ebeler, S. B., Sacks, G., Vidal, S., Winterhalter, P., ured.), American Chemical Society, California, str. 291-301.

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

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ana Marušić