

Stabilnost antocijana i boje vina tijekom starenja u boci

Benšek, Dora

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:159:036871>

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, rujan 2020.

Dora Benšek

1227/PI

**STABILNOST ANTOCIJANA I
BOJE VINA TIJEKOM STARENJA
U BOCI**

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.

ZAHVALA

Za početak zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Natki Ćurko koja mi je svojim stručnim vodstvom, beskonačnim strpljenjem i posvećenošću nesebično prenosila svoje znanje i omogućila izradu ovog rada. Hvala asistentici Katarini Lukić, mag. ing. i cijelom Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na zadnjih par godina mog studiranja.

Hvala svim mojim dragim prijateljima i kolegama što su mi bili podrška, poticaj, motivacija te mi učinili studentski život lakšim i zabavnijim. Mojoj Ivani, na svakodnevnoj podršci i dijeljenju studentskih briga, ali i prekrasnih trenutaka od početka studiranja, od srca veliko hvala.

Posebnu zahvalnost iskazujem svom Tinu, seki Tei i cijeloj svojoj obitelji koja me uvijek podržavala i pokazivala mi pravi put.

I naravno, najveću zaslugu za postignuto pripisujem mami i tati, koji ni na tren nisu posumnjali u mene i bez kojih ne bih bila ovdje gdje sam sada. Hvala na bezuvjetnoj podršci, strpljenju, savjetima i motivaciji. Bez Vas ne bih uspjela.

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

STABILNOST ANTOCIJANA I BOJE VINA TIJEKOM STARENJA U BOCI

Dora Benšek, 1227/PI

Sažetak: Antocijani su nestabilni polifenolni spojevi koji tijekom proizvodnje, dozrijevanja i starenja vina sudjeluju u velikom broju kemijskih reakcija te utječu na kvalitetu i senzorske karakteristike vina, u prvom redu boju. Cilj ovog rada bio je ispitati promjene u sastavu ukupnih i slobodnih antocijana te boje vina Cabernet Sauvignon, odnosno njihovu stabilnost u reduktivnim uvjetima tijekom 12 mjeseci starenja u boci. Stabilnost ukupnih antocijana određena je spektrofotometrijski, dok je stabilnost slobodnih antocijana (antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata) ispitana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Kromatske karakteristike vina određene su CIElab metodom. Dobiveni rezultati ukazuju na značajno smanjenje koncentracije ukupnih i slobodnih antocijana tijekom 12 mjeseci starenja vina u boci. Najveću stabilnost među antocijan-3-*O*-glukozidima pokazao je peonidin-3-*O*-glukozid, a najmanju cijanidin-3-*O*-glukozid. Malvidin-3-*O*-glukozid acetat i *p*-kumarat pokazali su manju stabilnost od peonidin-3-*O*-glukozid acetata i *p*-kumarata. Utvrđena je vidljiva promjena boje nakon 3 mjeseca i očigledno odstupanje boje vina nakon 6 i 12 mjeseci starenja vina u boci.

Ključne riječi: antocijani, boja vina, starenje u boci, HPLC, CIElab

Rad sadrži: 45 stranica, 16 slika, 14 tablica, 90 literaturnih navoda

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. *Helga Medić*
4. Doc.dr.sc. *Nives Marušić Radovčić* (zamjena)

Datum obrane: 28. rujna 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

ANTHOCYANINS AND COLOR STABILITY OF WINE DURING BOTTLE AGING

Dora Benšek, 1227/PI

Abstract: Anthocyanins are very unstable phenolic compounds that undergo various chemical changes during wine production, maturing and aging. These changes affect wine quality and sensory characteristics, primarily wine color. The aim of this study was to examine stability of total and free anthocyanins, as well as color during 12 months of reductive aging in the bottles. The stability of total anthocyanins was determined spectrophotometrically, while stability of free anthocyanins [anthocyanin-3-*O*-glucosides, anthocyanin-3-*O*-(6-*O*-acetyl)glucosides and anthocyanin-3-*O*-(6-*O*-*p*-coumaroyl)glucosides] were determined using high performance liquid chromatography (HPLC). Chromatic changes were determined by CIElab method. The obtained results showed significant decrease in the concentration of total and free anthocyanins during 12 months of bottle aging. Among analyzed anthocyanin-3-*O*-glucosides, peonidin-3-*O*-glucosid showed the highest, while cyanidin-3-*O*-glucosid the lowest stability. Also, 3-*O*-(6-*O*-acetyl)glucoside and 3-*O*-(6-*O*-*p*-coumaroyl)glucoside of malvidin showed higher stability then those of peonidin. Visible color changes were detected after 3 months while very obvious difference of wine color was determined after 6 and 12 months of wine aging in the bottles.

Keywords: anthocyanins, color, bottle aging, HPLC, CIElab

Thesis contains: 45 pages, 16 figures, 14 tables, 90 references

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. *Helga Medić*, Full professor
4. PhD. *Nives Marušić Radovčić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 28th September 2020

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. FENOLNI SASTAV GROŽĐA I VINA..... | 2 |
| 2.1.1. Antocijani | 3 |
| 2.1.2. Flavanoli..... | 7 |
| 2.2. KEMIJSKE I SENZORSKE PROMJENE U VINU TIJEKOM PROIZVODNJE, DOZRIJEVANJA I STARENJA | 9 |
| 2.2.1. Reakcije direktne kondenzacije antocijana i flavanola | 11 |
| 2.2.2. Reakcije kondenzacije antocijana i flavanola posredovanjem acetaldehida | 13 |
| 2.2.3. Formiranje piranoantocijana..... | 14 |
| 2.3. PROMJENE POLIFENOLNOG I SENZORSKOG SASTAVA VINA TIJEKOM STARENJA U BOCI | 17 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 19 |
| 3.1. MATERIJAL..... | 19 |
| 3.1.1. Uzorci | 19 |
| 3.1.2. Kemikalije | 20 |
| 3.1.3. Aparatura | 20 |
| 3.1.4. Pribor..... | 20 |
| 3.2. METODE | 21 |
| 3.2.1. Određivanje ukupnih antocijana..... | 21 |
| 3.2.2. Određivanje slobodnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) | 22 |
| 3.2.3. Određivanje kromatskih karakteristika vina CIElab metodom | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 25 |
| 4.1. STABILNOST ANTOCIJANA VINA CABERNET SAUVIGNON TIJEKOM 12 MJESECI STARENJA U BOCI | 25 |
| 4.2. STABILNOST BOJE VINA CABERNET SAUVIGNON TIJEKOM 12 MJESECI STARENJA U BOCI.. | 35 |
| 5. ZAKLJUČCI | 36 |
| 6. LITERATURA | 37 |

1. UVOD

Antocijani i tanini su polifenolni spojevi grožđa od iznimne važnosti za kvalitetu crnih vina. Osim što utječu na antioksidacijsku aktivnost vina, također su zaslužni i za senzorske karakteristike vina kao što su boja, trpkoca i gorčina. Koncentracija navedenih spojeva u vinu, osim o sorti vinove loze, uvelike ovisi i o tehnologiji proizvodnje (prvenstveno o stupnju ekstrakcije iz grožđa u vino tijekom same prerade), kao i o kemijskim promjenama do kojih dolazi tijekom procesa dozrijevanja i starenja vina.

Naime, antocijani kao pigmenti odgovorni za boju crnog grožđa i mladog vina, izrazito su nestabilni te tijekom proizvodnje, dozrijevanja i starenja vina sudjeluju u velikom broju kemijskih reakcija. Dakle, crvena boja mladog vina posljedica je visoke koncentracije nestabilnih molekula slobodnih antocijana pri čemu tijekom dozrijevanja i starenja vina vrlo brzo dolazi do degradacije i smanjenja njihove koncentracije, no istovremeno i do stabilizacije boje vina uslijed formiranja novih, stabilnijih pigmenata. Isto tako, tanini i proantocijanidini, odnosno flavan-3-ol monomeri, oligomeri i polimeri nositelji su trpkocice i gorčine koji također u navedenim procesima ulaze u interakciju s različitim spojevima, prvenstveno s antocijanima.

Iako je u posljednjih nekoliko godina došlo do velikog napretka u razumijevanju kemijske prirode navedenih fenolnih spojeva vina te njihovih promjena tijekom dozrijevanja u bačvama i oksidativnim uvjetima, starenje vina u bocama i promjene koje se odvijaju u reduktivnim uvjetima još nisu dovoljno istražene.

U ovom radu istražiti će se promjene u sastavu antocijana i boje vina Cabernet Sauvignon, odnosno njihova stabilnost u reduktivnim uvjetima tijekom 12 mjeseci starenja u boci. Stabilnost ukupnih antocijana ispitat će se spektrofotometrijski, metodom baziranom na vezanju HSO_3^- iona na obojenu molekulu antocijana, pri čemu se molekula antocijana prevodi se iz obojenog kationa u njen bezbojni leuko oblik. Ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozidi, antocijan-3-*O*-glukozid acetati i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati u uzorcima vina odredit će se primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (*engl.* high performance liquid chromatography-HPLC), dok će se kromatske karakteristike, odnosno promjena boje vina odrediti CIELab metodom.

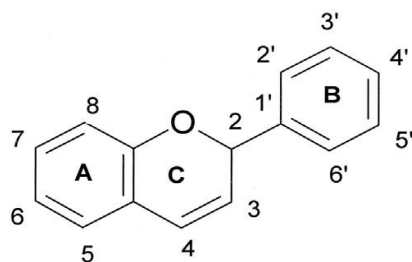
2. TEORIJSKI DIO

2.1. FENOLNI SASTAV GROŽĐA I VINA

Fenolni spojevi su široko rasprostranjeni sekundarni biljni metaboliti (Pandey i Rizvi, 2009), koji predstavljaju najveću kategoriju fitokemikalija (Giada, 2013). Navedeni spojevi važni su kao antioksidansi te nositelji sezorskih karakteristika bijelog i crnog vina, međutim od posebnog su značaja za kvalitetu crnih vina gdje ih nalazimo u mnogo višim koncentracijama. Iako prvenstveno dolaze iz sjemenke i pokožice grožđa, manje količine mogu se ekstrahirati iz hrastovih bačava, dok zanemarive količine nastaju metabolizmom kvasaca (Jackson, 2020).

Glavni fenoli prisutni u vinu dijele se na neflavonoide i flavonoide (Jackson, 2020), gdje su prvi najznačajniji fenoli bijelog, a potonji crnog vina. Glavni predstavnici flavonoida grožđa i vina su antocijani, flavan-3-oli (monomeri, oligomeri i polimeri) i flavonoli; dok su glavni predstavnici neflavonoida fenolne kiseline (Askari-Khorasgani i Pessarakli, 2019; Minussi i sur., 2003).

Flavonoide karakterizira $C_6-C_3-C_6$ struktura koja se sastoji od dva terminalna fenilna prstena (nazvana A i B) povezana središnjim piranskim C prstenom koji sadrži kisik. Stereokemijski, B prsten postoji u ravnini paralelno sa, ali iznad ili ispod ravnine A i C prstenova, a svaki se ugljik numerički identificira prema položaju na pripadajućem prstenu kao što je prikazano na slici 1 (Jackson, 2020).



Slika 1. Struktura flavonoida (Zhang i sur., 2015)

Flavonoidi mogu postojati u slobodnom obliku (monomeri) ili vezani u polimere s drugim flavonoidima, neflavonoidima, polisaharidima ili njihovim kombinacijama. Monomerni flavonoidi također mogu varirati u svojim oblicima ovisno o reakcijama hidroksilacije, metilacije, acilacije ili glikozilacije. Njihove pretpostavljene funkcije u grožđu i drugim biljkama su svakojake, a uključuju obranu od mikrobnih patogena, insekata, i

biljojeda; antioksidativno djelovanje, smanjenje učinka reaktivnih kisikovih radikala; zaštitu od UV-induciranog oštećenja nukleinske kiseline; vizualno privlačenje oprašivača i biljojeda za širenje sjemena; moduliranje transporta auksina i nekoliko enzima te potencijalnu ulogu u plodnosti polena.

Flavonoidi više od bilo koje druge značajke karakteriziraju crna vina, a čine više od 85 % njegovog sadržaj fenola (1000 mg L^{-1}). Suprotno tome, flavonoidi u bijelim vinima obično čine manje od 20 % ukupnog fenolnog sadržaja (50 mg L^{-1}). Koncentracija i sastav flavonoida u vinu mogu se značajno razlikovati ovisno o uvjetima berbe, sorte i vinograda kao i vinarske prakse, pH vrijednosti, koncentraciji sumpornog dioksida i etanola, temperaturi i trajanju maceracije i fermentacije te starenju vina (Jackson, 2020). Najčešći flavonoidi u crnom vinu su antocijani, flavan-3-oli, flavonoli, a pojavljuju se i male količine flavan-3,4-diola (leukoantocijanidina).

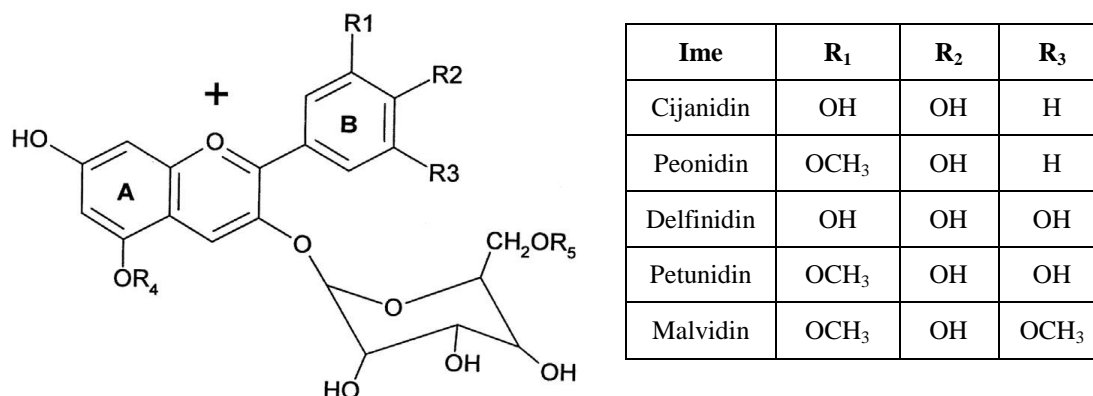
2.1.1. Antocijani

Antocijani predstavljaju grupu flavonoidnih spojeva koji su glavni nosioci prirodne boje plodova voća i povrća koje ima crvenu, ljubičastu i plavu boju. Samim time, ovi pigmenti su odgovorni za boju crnog grožđa i mladog crnog vina (Puértolas i sur., 2010), a njihova koncentracija u grožđu, između ostalog, ovisi o sorti i uvjetima uzgoja (Budić-Leto i sur., 2009).

Dakle, antocijani su glikolizirani polihidroksi i polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilijskog kationa, odnosno flavilium kationa, čija je osnova aglikon koji sadrži konjugirane dvostruke veze odgovorne za apsorpciju svjetla na oko 500 nm, omogućavajući pritom pigmentima prividnu crvenu boju vidljivu ljudskom oku (Teissedre i Jourdes, 2013).

U grožđu antocijani uglavnom postoje kao glikozidi vezani sa polisaharidom, obično glukozom, što povećava njihovu stabilnost i topljivost. Ukoliko se ne veže na šećer, aglikonska (flavonoidna) komponenta naziva se antocijanidin. Kultivari vinove loze (*Vitis vinifera* L.) sintetiziraju isključivo monomerne antocijane, a razliku među njima čini položaj hidroksilnih (-OH) i metoksilnih (-OCH₃) grupa vezanih na B prsten (Jackson, 2020). Danas ih je poznato mnogo, od kojih samo neki imaju značajnu ulogu u aspektu hrane (Francis, 1989), a u sortama crnog grožđa identificirano je pet glavnih antocijana: cijanidin (narančasto crvena boja), peonidin (crvena boja), delfinidin (plavičasto crvena boja), petunidin i malvidin (plavičasto crvena boja) (slika 2) (Castillo-Munoz i sur., 2009; He i sur., 2010). U najvećoj

koncentraciji u grožđu prisutan je malvidin-3-*O*-glukozid koji se smatra glavnim pigmentom odgovornim za karakterističnu crvenu boju vina (Maletić i sur., 2009).



Slika 2. Kemijska struktura antocijanidina (Garrido i Borges, 2013).

Koncentracija svakog od njih varira među *Vitis* sortama (Acevedo i sur., 2012), a njihove proporcije uvelike utječu na nijansu i stabilnost boje vina. Navedena svojstva ovise o stupnju hidroksilacije antocijanidinskog B prstena (Revilla i sur., 2001), pri čemu se povećanjem stupnja hidroksilacije pojačavaju crveni tonovi, a povećanjem stupnja metilacije dolazi do pojačavanja plavičastih tonova (Jackson, 2020). Uobičajeno su antocijani prisutni u crvenom grožđu u količini od 500 do 3.000 mg kg⁻¹, ali dosežu i više koncentracije u određenim kultivarima. U tipičnim crnim vinima, obojana frakcija čini znatan udio ukupne fenolne frakcije te čini od 20 % do 50 % u mladim vinima, a čak i viši udio u starim vinima u koncentraciji od 0,5 g L⁻¹ i 2 g L⁻¹ ili više u nekim crnim vinima (Waterhouse i Teissedre, 1997).

Osnovna struktura svake antocijanske skupine utječe na njihove kromatografske karakteristike, a one se modificiraju u ovisnosti o mnoštvu faktora uključujući reakcije acilacije, stvaranje glukozida, reakcije s kopigmentima, kondenzacije s flavan-3-olima i njihovim polimerima. Sami po sebi, slobodni antocijani nisu stabilni pa je kondenzacija od presudne važnosti za stabilnost same boje vina (Jackson, 2020).

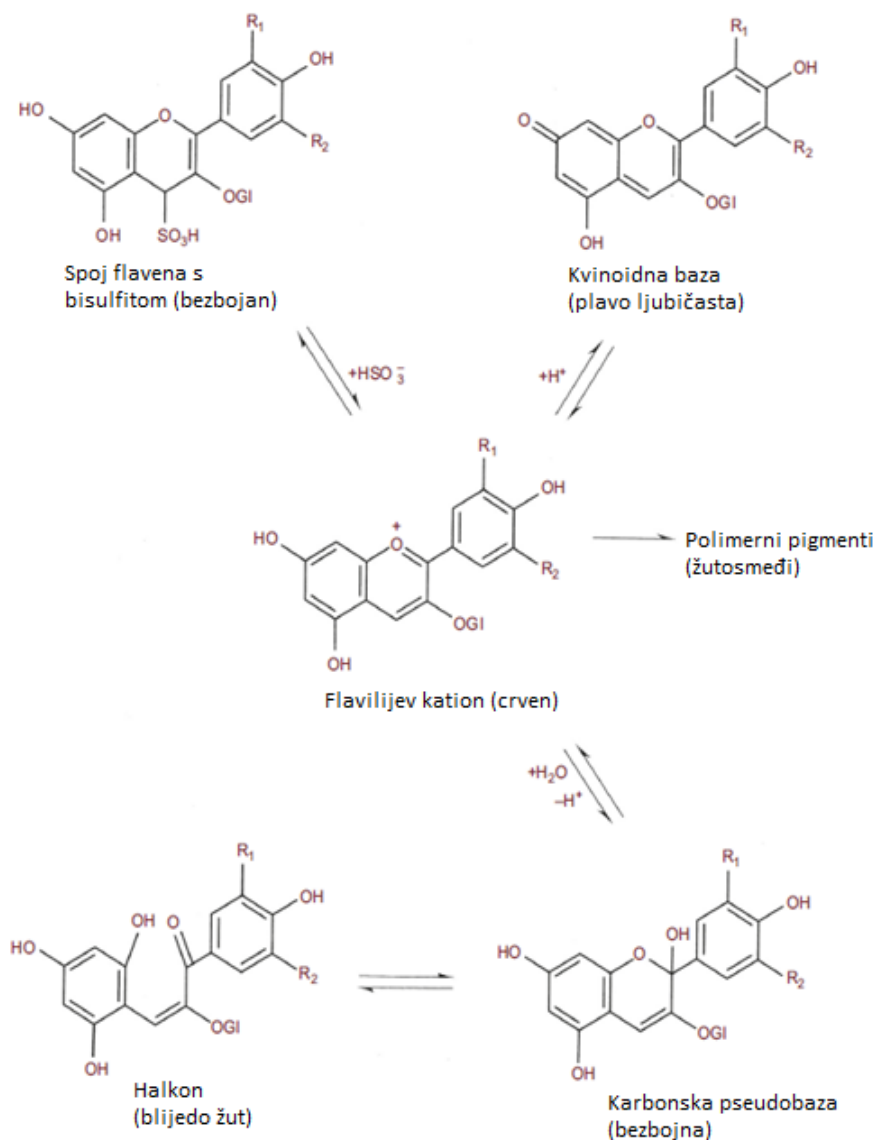
Svaki antocijan može se dodatno acilirati vezanjem na polisaharidnu skupinu s alifatskim (npr. octena kiselina) ili fenolnim kiselinama (npr. *p*-kumarinska ili kafeinska kiselina). Osim navedenih, acilacija može uključivati ferulinsku, piruvatnu, pa čak i mliječnu kiselinu, što također povećava stabilnost antocijana i modificira njihova kromatografska svojstva, što su još 1968. godine potvrdili van Buren i suradnici. U crnim vinima identificirani su 3-*O*-monoglikozidi, 3-*O*-monoglikozid acetati i 3-*O*-glukozid *p*-kumarati pet glavnih antocijana (Jackson, 2020). U vinu Cabernet Sauvignon, kao i drugim crnim vinima dobivenim iz *Vitis vinifera* grožđa, glavni monomerni antocijani su malvidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, delfinidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i petunidin-3-*O*-glukozid (Castillo- Muñoz i sur., 2009; Trouillas i sur., 2016). Ovi antocijani tako se pojavljuju i u spomenutim aciliranim oblicima sa octenom i *p*-kumarinskom kiselinom (He i sur., 2012a). Njihovi drugi derivati mogu se ekstrahirati ili formirati tijekom procesa fermentacije (Busse-Valverde i sur., 2011). Ekstrakcija i formiranje novih pigmenata ili kopigmentnih kompleksa omogućuju stabilizaciju boje crnih vina tijekom procesa starenja budući da se koncentracija monomernih antocijanina konstantno smanjuje (Boulton, 2001; Eiro i Heinonen, 2002).

Općenito, sastav i koncentracija antocijana grožđa ovisi o sorti i stupnju zrelosti grožđa (Gonzalez-San Jose i Diez, 1992; Mazza, 1995) te imaju važan utjecaj na početnu boju crnog vina. Ekstrakcija antocijana u vino ovisi o nekoliko čimbenika, kao što su vrijeme maceracije, način ekstrakcije/maceracije i primijenjena enološka praksa. Primjerice, dodavanje pektolitičkih enzima jedan je od enoloških postupaka koji utječe na povećanje koncentracije fenolnih spojeva, posebno antocijanskih pigmenata (Zent i Inama, 1992). Taj fenomen može poboljšati kromatske karakteristike vina, ali veće količine fenola neće uvijek uzrokovati porast intenziteta i crvenog tonaliteta (Servili i sur., 1992).

Tijekom proizvodnje vina antocijani prelaze u stabilnije kromofore putem kemijskih reakcija (Fulcrand i sur., 2006), a planarni oblik i hidrofobnost aromatičnih prstenova antocijana pogoduju povezivanju obojenih oblika antocijana, kopigmentaciji s drugim planarnim strukturama ili intramolekularnoj kopigmentaciji s aromatskim ostatkom spojenim na pigment (Brouillard i sur., 1989; Goto i sur., 1991; Dangles i sur., 1992a; Dangles i sur., 1992b).

Nadalje, antocijani su izuzetno osjetljivi na djelovanje temperature, posebice malvidin, dok su delfinidin, petunidin i cijanidin izrazito podložni oksidacijskim promjenama (Revilla i sur., 2001). Na njihovu osjetljivost na kisik uvelike utječe stupanj hidroksilacije B prstena (Hrazdina i sur., 1970). Antocijani koji posjeduju orto pozicionirane hidroksilne skupine, relativno su otporni na oksidaciju, dok konjugacija antocijana sa polisaharidima i drugim spojevima također povećava otpornost na oksidaciju (Robinson i sur., 1966).

U mladim crnim vinima svaki antocijan može se pojaviti u dinamičkoj ravnoteži između pet glavnih molekularnih oblika, jedan vezan sumpornim dioksidom i četiri slobodna oblika (slika 3) (Jackson, 2020).



Slika 3. Ravnoteža između 5 oblika antocijana u vinu (Jackson, 2020)

Crvena boja vina dolazi od male količine antocijana koja postoji u obliku flavilium kationa, a osim o koncentraciji, kemijskoj strukturi, sumpornom dioksidu i temperaturi, ovisi i o pH vrijednosti vina. Većina antocijana bezbojna je unutar opsega pH vrijednosti vina, dok se odmičući od nje kromatske karakteristike mijenjaju. Naime, niska pH vrijednost, odnosno kiseli uvjeti povećavaju koncentraciju flavilium oblika, pritom pojačavajući intenzitet crvenog obojenja. Osim toga, niske vrijednosti pH također usporavaju hidrolizu molekula antocijana u polisaharid i aglikon (Jackson, 2020). Flavilium struktura antocijana, deficitarna je na elektronu i zato je vrlo reaktivna. Iz tog razloga je i boja proizvoda koja potječe od sadržaja antocijana prilično nestabilna i promjene koje nastaju uglavnom su rezultat oksidacije, hidrolize ili ih uzrokuje dodatak soli ili metala (Fennema, 1985). Povećanjem pH, udio antocijana u obliku flaviliuma, a time i gustoća boje brzo se smanjuju. Primjerice, 20 % - 25 % antocijana pri pH 3.4 - 3.6, što je pH vrijednost uobičajena za crna vina, u ioniziranom je stanju flaviliuma, dok je svega oko 10 % antocijana u istom stanju pri pH 4. Dakle, u lužnatim uvjetima dolazi do smanjenja koncentracije flavilium oblika te posljedično do gubitka boje.

2.1.2. Flavanoli

Flavanoli su skupina flavonoida odgovornih za trpkocu, gorčinu i općenito okus vina (Puértolas i sur., 2010). U literaturi se najčešće spominju kao flavan-3-oli zbog hidroksilacije na C₃ ugljikovom atomu, a osim okusa sudjeluju u stvaranju mutnoće i taloga vina, kao i procesu oksidativnog posmeđivanja bijelog vina zbog čega ono poprima žućkaste tonove (Terrier i sur., 2009).

U grožđu i vinu identificirani su monomeri, oligomeri i polimeri flavan-3-ola čije podjedinice su uobičajeno (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epikatehin galat i rijeđe (+)-galokatehin i (-)-epigalokatehin (Jackson, 2020). (+)-Katehin i (-)-epikatehin glavni su predstavnici monomernih flavan-3-ola, a međusobno se razlikuju u prostornom rasporedu hidroksilnih skupina na C₃ poziciji heterocikličkog C prstena te se smatraju glavnim prekursorima u sintezi tanina (Terrier i sur., 2009).

Polimerizacijom flavan-3-ola nastaju oligomeri i polimeri koji se nazivaju proantocijanidini, odnosno kondenzirani tanini. Proantocijanidini se mogu razvrstavati na temelju niza čimbenika poput prirode njihovih flavanoidnih monomera, vrste vezanja, esterifikacije s drugim spojevima ili pak prema funkcionalnim svojstvima (Jackson, 2020), a sam naziv proizlazi iz pojave otpuštanja crvenog pigmenta antocijana pod utjecajem

temperature pri niskim pH vrijednostima. Naziv tanini odnosi se njihovu sposobnost vezanja s proteinima (Terrier i sur., 2009).

Većina proantocijanidina, tj. tanina u vino se ekstrahira iz pokožice i sjemenke grožđa, a ponekad i peteljke (ukoliko se peteljka ne odvaja tijekom primarne prerade grožđa). Nadalje, tanini pokožice, sjemenke te peteljke međusobno se značajno strukturno razlikuju, a također utvrđene su i značajne razlike u samoj koncentraciji među različitim kultivarima. Primjerice, tanine sjemenke karakterizira značajno manji stupanj polimerizacije od tanina pokožice što potvrđuje činjenica da sjemenke najčešće sadrže do 28 jedinica flavanola (Hayasaka i sur., 2003), dok tanini pokožice mogu imati čak i do 74 jedinica (Labarbe i sur., 1999).

U mladim vinima, većina proantocijanidina ekstrahirana je iz grožđa ili je produkt razgradnje polimera, a pojavljuje se uglavnom u obliku topljivih dimera ili trimera. Općenito, oligomerni proantocijanidini koji se sastoje od 2 do 10 katehinskih podjedinica su topivi, dok su polimeri koji sadrže više od 10 podjedinica netopivi, iako se topivost povećava tijekom maceracije/fermentacije s povećanjem udjela alkohola i vinu, kao i s pH vrijednošću vina (Vidal i sur., 2003).

Crna vina sadrže značajno veće koncentracije proantocijanidina od bijelog vina, čak oko 20 puta, što je djelomično posljedica maceracije, odnosno održavanja duljeg kontakta vina s pokožicom grožđa tijekom fermentacije (Jackson, 2020). Starenjem se proantocijanidini polako vežu s monomernim flavan-3-olima, stvarajući polimere od 8 do 14 jedinica duljine koji obično molekularno teže u rasponu od 2000 do 5000 daltona (Da). Osim polimerizacije, jednostavni proantocijanidini i njihovi veći polimeri mogu se kondenzirati s antocijanima i polisaharidima, dok prisutnost mnogih nekonjugiranih hidroksi-fenolnih skupina omogućuje taninima karakteristično proteinsko vezanje i antioksidativna svojstva. Zbog svojih jakih kovalentnih veza, vrlo su stabilni u kiselim uvjetima (Jackson, 2020). Također, sastav i kompozicija tanina utječu na trpkoću i koloidnu stabilnost vina, odnosno cjelokupnu kvalitetu vina, budući da se navedeni spojevi ulaze i u interakcije s drugim makromolekulama vina kao što su proteini i polisaharidi (Fulcrand i sur., 2006).

2.2. KEMIJSKE I SENZORSKE PROMJENE U VINU TIJEKOM PROIZVODNJE, DOZRIJEVANJA I STARENJA

Tijekom proizvodnje i dozrijevanja vina dolazi do brojnih kemijskih promjena u sastavu flavonoida odnosno antocijana i tanina koje za posljedicu imaju promjene senzorskih karakteristika vina u prvom redu stabilizaciju boje i smanjenje trpkoće (Jackson, 2020).

Naime, crvena boja mladog vina posljedica je visoke koncentracije slobodnih antocijana ekstrahiranih tijekom maceracije i fermentacije (Joscelyne-Louise, 2009). Budući da su molekule monomernih (slobodnih) antocijana izrazito nestabilne, tijekom dozrijevanja i starenja vina vrlo brzo dolazi do degradacije i smanjenja njihove koncentracije, no istovremeno i do stabilizacije boje vina uslijed formiranja novih, stabilnijih pigmenata (Revilla i Gonzalez-San Jose, 2001; Santos-Buelga i De Freitas, 2009; Sarni-Manchado i sur., 1996; Somers i Evans, 1986). Navedeni novonastali pigmenti odgovorni su za boju odležanih vina (García-Puente Rivas i sur., 2006), a odlikuje ih povećana stabilnost boje pri promjenama pH i izbjeljivanju s SO₂ (Bakker i Timberlake, 1997; Romero i Bakker, 1999; Francia-Aricha i sur., 1997). Jedan od ključnih procesa koji nam pomažu u razumijevanju povezanosti boje mladog i odležanog vina reakcije su kopigmentacije obojanih oblika antocijana i drugih molekula (González-Manzano i sur., 2009; Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Kopigmentacija uzrokuje pojačavanje intenziteta crvene boje i pomak boje prema plavkastim nijansama (Gutiérrez i sur., 2005). Također, reakcije kojima nastaju piroantocijani, jednako su važne za stabilizaciju boje s obzirom da nastali spojevi štite molekule antocijanidina od oksidacije (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). U konačnici, navedene reakcije rezultiraju karakterističnom promjenom potpuno crvene do narančasto-smeđe boje kod odležanih vina (Mazza, 1995).

Nadalje, kemijske promjene tijekom dozrijevanja i starenja vina osim promjene boje, za posljedicu imaju i promjenu trpkoće vina, zbog čega odležana vina imaju manje izraženu trpkoću od mladih. Razlog tome reakcije su polimerizacije i depolimerizacije tanina tijekom starenja vina, kao i reakcije izravne kondenzacije ili one posredovane acetaldehidom s antocijanima, što rezultira smanjenjem ukupnih tanina, a time i smanjenjem trpkoće (Saucier, 2010; Sun i sur., 2016).

Intenzitet navedenih kemijskih promjena tijekom proizvodnje i starenja vina ovisi o brojnim čimbenicima, poput koncentracije antocijana i tanina, acetaldehida i drugih

metabolita kvasaca, kao i pH vrijednosti, temperature, a između ostalog i prisutnosti kisika i sumporovog dioksida (Fulcrand i sur., 2006). Naime, u navedenim kemijskim promjenama, kisik ima neizbježnu ulogu u formiranju spojeva dobivenih iz antocijana, a samim time i presudnu ulogu u stabilnosti boje vina (Pérez-Magariño i Gonzalez-San José, 2004; Wirth i sur., 2010).

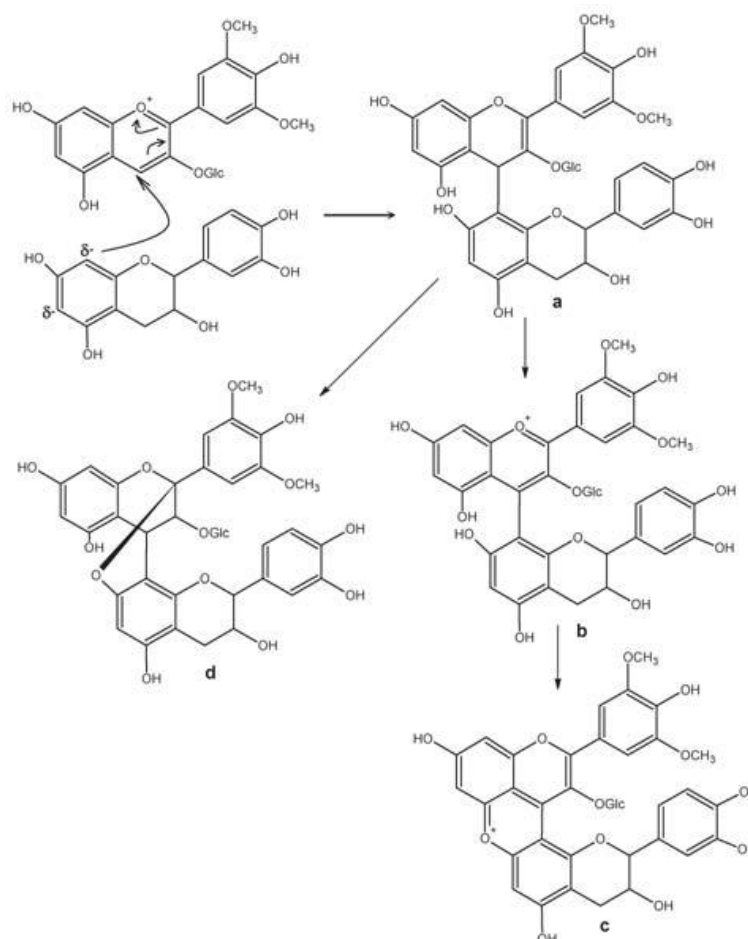
Struktura flavonoida koju čine dva polihidroksilna A i B prstena povezana središnjim piranskim C prstenom igra ključnu ulogu u gore navedenim kemijskim promjenama. Spomenuti C prsten flavonoida može biti više ili manji zasićen, a nezasićenost, odnosno broj dvostrukih veza određuje vrstu flavonoida. Potpuno nezasićeni C prsten predstavlja strukturu crvenih pigmenata grožđa, antocijana, dok vrstu flavonoida koja uključuje i monomerne i polimerne strukture, odnosno proantocijanidine, predstavlja potpuno zasićeni C prsten. Cijepanje interflavanskih veza između jedinica flavanola polimernog lanca, pod čak i blago kiselim uvjetima dovodi do porasta vrlo reaktivnih karbokationa. Oni mogu dalje oksidirati u antocijanidine, odakle i naziv proantocijanidini, ili mogu biti zahvaćeni kemikalijama bogatim elektronima, poznatim kao nukleofili. Antocijani su u svojim flavilium oblicima pozitivno nabijeni. Taj pozitivan naboj prisutan na C prstenu antocijana ili stvoren kod proantocijanidina, uzrokuje reagiranje C prstena kao elektron deficitarne vrste, odnosno elektrofila. Antocijani i proantocijanidini mogu reagirati ili kao nukleofili ili kao elektrofil, ovisno o pH vrijednosti, što dokazuje činjenica da se kod antocijana pozitivan naboj može izgubiti hidracijom, dok se kod proantocijanidina može dobiti cijepanjem kataliziranim kiselinom (Fulcrand i sur., 2006).

Pojava kopigmentacije karakterizirana je pojavom hidrofobne interakcije između B prstena antocijana i kopigmenta, npr. fenolnog spoja, odnosno stvaranjem "sendvič kompleksa" gdje gornje i donje slojeve formiraju antocijani (Boulton, 2001). Navedena struktura štiti flavilium kation kompleks od nukleofilnih napada vodom, izbjegavajući stvaranje bezbojnog poluacetalata (Santos-Buelga i de Freitas, 2009). Kod pH vrijednosti vina, kopigmentacija primarno uključuje antocijane u njihovom stanju flaviliuma (Somers i Evans, 1986), što pomiče ravnotežu slobodnih antocijana prema obojenom stanju flaviliuma, pritom pojačavajući obojenje i preusmjeravajući boju prema ljubičastoj. Gotovo planarna struktura kompleksa čini interakciju između njih i drugih antocijanskih molekula ili kopigmenata vjerojatnijom i jednostavnijom (Jackson, 2020). U konačnici dolazi do stvaranja novih pigmenata koji uzrokuju veliku raznolikost pigmenata (He i sur., 2012b).

Novonastale pigmente možemo podijeliti u nekoliko glavnih skupina: (i) direktni flavanol-antocijan adukti, (ii) flavanol-antocijan adukti nastali posredovanjem acetaldehida i (iii) piranoantocijani.

2.2.1. Reakcije direktne kondenzacije antocijana i flavanola

Kod ovog tipa reakcija pozitivno nabijeni C prsten flavonoida prolazi kroz izravne reakcije. Pozitivan naboj antocijana i flavanola ovisi o pH vrijednosti, pa su tako i njihove reakcije cijepanja interflavanskih veza i dehidracije također su ovisne o pH. To dovodi do flavanol-antocijan adukata ($F-A^+$) pri nižim pH vrijednostima i antocijan-flavanol adukata (A^+-F) pri pH vrijednostima iznad 3.8 (Fulcrand i sur., 2006).



Slika 4. Formiranje (A^+-F) dimera: flaven (a); flavilium kation (b); ksantilijev kation (c); (A^+-F) dimer (d) (Fulcrand i sur., 2006).

Dva su mehanizma predložena za izravne reakcije antocijana i flavanola, što dovodi do flavanol-antocijana ($F-A^+$) i antocijan-flavanola (A^+-F). Kako bi došlo do formiranja antocijan-flavanola, antocijan u svom flavilium obliku reagira kao elektrofil s nukleofilnim

flavanolom kroz djelomično negativno nabijene C₈/C₆ atome A prstena (slika 4) (Fulcrand i sur., 2006). Prvi dodatni korak dovodi do nastanka bezbojnog flavenskog intermedijara (slika 4a), koji zatim može oksidirati u crveno obojeni flavilium oblik (slika 4b), a zatim dehidriranjem nastaje ksantilijev kation (slika 4c) (Somers, 1971; Liao i sur., 1992).

Do nastanka flavanol-antocijana dolazi kada su nukleofil i elektrofil u reakciji zamijenjeni, odnosno hidratizirani hemiketalni oblik antocijana (AOH) reagira kao nukleofil s flavanol karbokationom nastalim interflavanskim cijepanjem molekule tanina. Kao produkt ove reakcije nastaje bezbojni dimer (F-AOH), koji može djelomično dehidrirati do odgovarajućeg crvenog flaviliuma (F-A⁺), ovisno o pH vina i vlastitoj pK_h. S obzirom da su za proizvodnju A⁺ i F⁺ kationa potrebni kiseli uvjeti, oba mehanizma ovisna su o pH (Fulcrand i sur., 2006).

Studije naglašavaju učinke pH vrijednosti i temperature na reakcije flavanol-antocijana i na ulogu veličine flavanola (stupanja polimerizacije) u određivanju ksantilijevih i flavilijevih produkata. Cijepanje interflavanskih veza je povezano sa veličinom molekula tanina, ali to više ovisi o samoj strukturi molekule tanina i prirodi njegovih konstitutivnih jedinica. Slijedom toga, obje vrste oligomera, A⁺-F i F-A⁺, formiraju se pri pH vrijednosti vina. Vrijednost hidratacijske konstante, pK_h, od 2.5 za katehin-malvidin-3-glukozid (cat-Mv-3-glc) dimer označava svojstva boje slična roditeljskom antocijanu (Salas i sur., 2004). Međutim, veći oligomeri mogu imati različita svojstva boje zbog presavijanja, što sprječava hidrataciju jezgre flaviliuma.

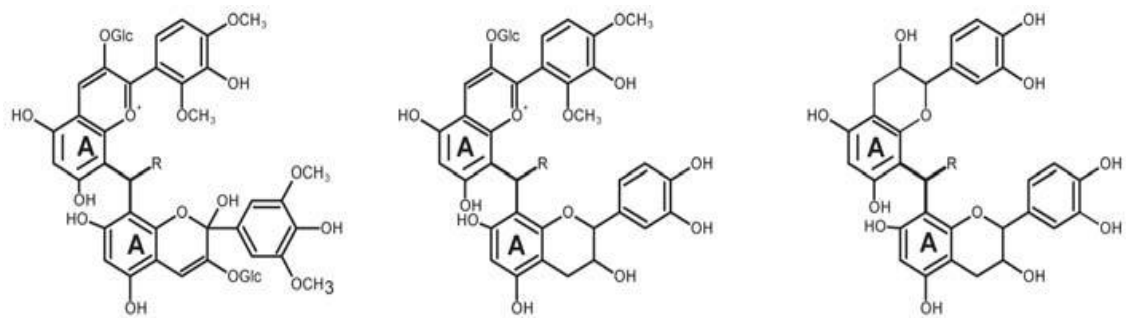
Na prirodu i veličinu pigmenata utječu udjeli antocijana i flavanola u grožđu koji iako su podložni promjenama ovisno o okolišnim uvjetima, prvenstveno ovise o sorti. Uz omjer antocijana i flavanola, pH vrijednost i dostupnost kisika uvjeti su koji variraju tijekom uzgoja vinove loze i proizvodnje vina. Kod suviška antocijana značajno se povećava koncentracija antocijanskih polimera, koji su stabilniji nego njihovi prekursori. Također, visoka koncentracija tanina može pogodovati izravnim reakcijama antocijana i flavanola, natječući se s neprekidnim reakcijama stvaranja i cijepanja veza u samim taninima. Temperatura i struktura flavanola također utječu na proizvode izravnih reakcija. Osim toga, izravna reakcija provedena s monomernim flavanolima dovela je i do ksantilijevih pigmenata umjesto antocijanin-flavanola, koji su dobiveni s većim flavanolima (dimeri i trimeri) (Fulcrand i sur., 2006).

2.2.2. Reakcije kondenzacije antocijana i flavanola posredovanjem acetaldehida

Reaktivnost polifenola nastaje zbog položaja hidroksilnih skupina na njihovim aromatskim jezgrama. Orto-hidroksilne skupine potiču oksidaciju dok meta-hidroksilne skupine induciraju elektrofilnu aromatsku supstituciju. Oba oblika hidroksilacije provode se u flavonoidnim strukturama, na B i A prstenima. Uz dodatak oksidacije i elektrofilne aromatske supstitucije, flavonoidi su podvrgnuti nukleofilnom napadu na središnjem C prstenu kada je on pozitivno nabijen. Reakcije A i C prstenova ovise o pH vrijednosti (Fulcrand i sur., 2006).

Spojevi poput acetaldehida, glioksilne kiseline, furfurala i hidroksimetil furfurala, koji su proizvodi dehidracije šećera nastali tijekom tostiranja hrasta i ekstrahirani tijekom starenja bačve, reagiraju sa flavanolima i hidratiziranim oblicima antocijana. Reakcija se provodi mehanizmom tipa Friedel-Crafts. Protonirani aldehid vrlo je moćan elektrofil, a prisutnost malih količina tog spoja omogućuju kiseli uvjeti reakcije. Rezorcinol tip A prstena flavonoidne strukture podvrgnut je elektrofilnoj aromatskoj supstituciji, pri čemu su C₈ i C₆ vodikovi atomi zamijenjeni nastalim produktom protoniranog aldehida, odnosno odgovarajućeg alkohola. Ovaj intermedijarni produkt dehidrira stvarajući novi karbokation koji zatim reagira s drugom nukleofilnom skupinom flavonoida. Reakcija ponovno počinje od novoformiranog dimera, vodeći u konačnici do formiranja polimera (slika 5) (Fulcrand i sur., 2006).

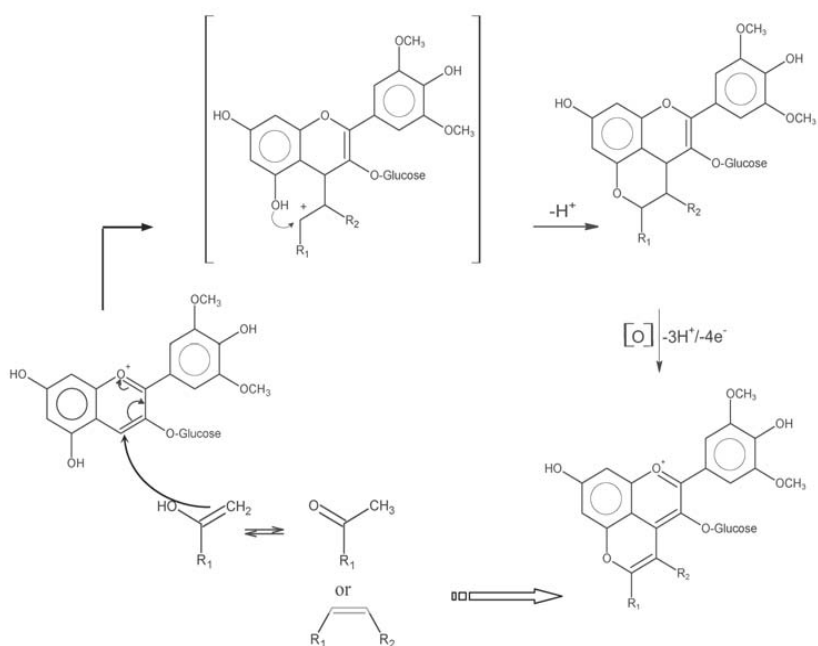
Dakle, A prsten flavonoida prolazi reakciju polikondenzacije posredovanu aldehidom, pri čemu kao produkti nastaju antocijani i polimeri flavanola te kopolimeri sastavljeni od oba navedena spoja (Fulcrand i sur., 2006). Ako su u reakciju uključeni antocijani, stvaraju se polimerni ljubičasti pigmenti. Također, etilne veze nastale u polikondenziranim polimerima flavanola posredovanim acetaldehidom, vrlo su nestabilne i cijepaju se u ksantilijske pigmente i vinilflavanol oligomere, koji tada mogu reagirati s pozitivno nabijenim C prstenom antocijana dajući pritom flavanil-piranoantocijane. Stupanj oksidacije i kasnija polimerizacija ovise o nizu čimbenika uključujući dostupnost kisika te omjer antocijana i flavanola. Ostale reakcije mogu konkurirati oksidaciji, uključujući izravne reakcije između antocijana i flavanola (Fulcrand i sur., 2006).



Slika 5. Produkti reakcije polikondenzacije (Fulcrand i sur., 2006)

2.2.3. Formiranje piranoantocijana

Reakcijama određenih sastojaka vina i metabolita kvasaca sa elektrofilnim dijelom flavilium kationa dolazi do formiranja novih, stabilnih pigmenta. Formira se dodatni piranski prsten između hidroksilne skupine vezane na C₅ i C₄ atome antocijana, omogućujući pritom stvaranje piranoantocijana (slika 6) (Fulcrand i sur., 2006).



Slika 6. Formiranje piranoantocijana (Fulcrand i sur., 2006)

Piranoantocijani su spojevi koji se formiraju u vinima tijekom procesa fermentacije i starenja te su spojevi odgovorni za postupnu promjenu crveno-ljubičaste boje prema narančastim nijansama. Iako se u vinu pojavljuju u mnogo nižim koncentracijama od ostalih pigmentata, uslijed manje osjetljivosti na pH i izbjeljivanje sa SO₂ sudjeluju u formiranju boje vina (Zamora, 2003).

Nukleofil za ovu reakciju mora sadržavati polariziranu dvostruku vezu, aktiviranu elektron donorskom grupom. Primjerice, u grožđu *p*-hidroksi-supstituirana cimetna kiselina reagira s antocijanima (Schwarz i sur., 2003b; Schwarz i Winterhalter, 2003), dajući pritom niz hidroksifenil-piranoantocijana, nazvanih vinilfenoli ili vinilalkoholni adukti, odnosno pinotin A, prvenstveno nastalih iz odgovarajućih derivata vinila (Fulcrand i sur., 1996; Sarni-Manchado i sur., 1996). Druga vrsta reaktanata ima enolizirane dvostruke veze. Kvašćevi metaboliti, poput acetaldehida i piruvata tvore piroantocijan tipove pigmentata (Benabdeljalil i sur., 2000; Mateus i sur., 2001), nazvane vitisin A i vitisin B (Romero i Bakker, 2000b; Schwarz i sur., 2003a). Formiranje određenih piroantocijana ovisi o sorti grožđa (Pozo-Bayon i sur., 2004; Schwarz i sur., 2004) i uvjetima proizvodnje kao što je soj kvasaca (Romero i Bakker, 2000a; Morata i sur., 2003).

U vinu su pronađeni i spojevi složenijih struktura, poput flavanil piranoantocijana (Francia-Aricha i sur., 1997; Mateus i sur., 2002a; Mateus i sur., 2002b) za čiju su formaciju potrebni flavanol, antocijan i acetaldehid, a predložena su dva reakcijska puta njihova nastanka. Ovi spojevi mogli bi biti rezultat reakcije flavanola s piroantocijanom prethodno formiranim od acetaldehida i antocijana. Druga mogućnost mogla bi biti reakcija vinil-flavanola sa antocijanom (Fulcrand i sur., 2006).

2.3. PROMJENE POLIFENOLNOG I SENZORSKOG SASTAVA VINA TIJEKOM STARENJA U BOCI

Starenje vina u boci, nasuprot „oksidativnog“ dozrijevanja u hrastovim bačvama, „reduktivan“ je proces je u kojem dolazi do niza reakcija u kojima sudjeluju polifenolni spojevi (antocijani i tanini) prisutni u vinu, a kao posljedica nastaju promjene organoleptičkih svojstava vina (boje i okusa) (Santos-Buelga i De Freitas, 2009; Teissedre i Jourdes, 2013). Intenzitet navedenih kemijskih i senzorskih promjena ovisi o vremenu skladištenja vina u boci, pristupu kisika i naravno, o samom sastavu vina prije punjenja u boce. S obzirom na vrijeme provedeno u boci, zakonski propisi o označavanju podrijetla obično određuju vrijeme skladištenja u boci koje je potrebno kako bi se postigle određene senzorske karakteristike (Avizcuri i sur., 2016).

Ranija istraživanja pokazala su kako na sastav antocijana i boje vina te intenzitet njihovih promjene tijekom perioda starenja u bocama značajno utječe izloženost vina kisiku za vrijeme punjenja. Naime, kao što je već spomenuto, spojevi u vinu podložni su oksidacijskim reakcijama. Umjerena izloženost crnih vina kisiku može doprinijeti poboljšanju organoleptičkih karakteristika vina, no dugotrajno izlaganje zraku rezultirat će smanjenjem kvalitete vina (Oliveira i sur., 2011). Prema Wirthu i suradnicima (2010) umjerena izloženost crnog vina Grenache kisiku u bocama pokazala je veće koncentracije vitisina A pigmenta, a samim time i veći intenzitet boje. Ovi rezultati u skladu su s onima dobivenim senzorskom analizom u kojoj je razina kisika povezana s većom pojavom intenziteta narančaste boje (Caille i sur., 2010).

Tijekom procesa starenja vina u bocama postoje dva ključna trenutka u kojima dolazi do „oksidacije“ vina: tijekom punjenja u boce i prijenosa kisika kroz čep. Kisik sudjeluje u složenim reakcijama, uključujući one do kojih dolazi zbog fenolnog sastava vina. Sporne reakcije imaju značajnu ulogu u promjeni senzorskih karakteristika kao što su smanjenje trpkosti i stabilizacija boje, a navedeni procesi posljedica su već ranije spomenutih reakcija antocijana i tanina tijekom dozrijevanja i starenja vina (Avizcuri i sur., 2016).

Tijekom skladištenja crnih vina, postoje dokazi progresivne razgradnje ili transformacija fenola vina koja je u korelaciji s stvaranjem kondenziranih ili polimernih pigmenta, a formiranje navedenih spojeva glavni je uzrok promjena u sastavu boje vina. Ranija istraživanja pokazala su kako su određeni polimerni pigmenti stabilniji od originalnih

spojeva i mogu činiti do 50 % intenziteta boje vina nakon 12 mjeseci starenja u bocama (Somers i Evans, 1986). U konačnici, progresivnom stvaranju novih, stabilnih pigmenata, već spomenutih piranoantocijana, do kojeg dolazi uslijed reakcija nestabilnih antocijana s drugim spojevima, pripisuje se promjena boje od crveno-ljubičaste do ciglasto crvene do koje dolazi tijekom starenja vina u boci (Atanasova i sur., 2002; Quagliari i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Istraživanje je provedeno na uzorcima crnog vina, sorte Cabernet Sauvignon (Erdutski vinogradi d.o.o., Erdut, Hrvatska), proizvedenog 2017. godine. Vino je izuzeto nakon provedene jabučno-mliječne fermentacije. Osnovni fizikalno-kemijski parametri mladog vina 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) | 50 |
| Slobodni sumporov dioksid (mg L ⁻¹) | 25 |

Vino je napunjeno u tamne staklene boce volumena 0,75 L. Neposredno prije punjenja, boce su propuhane dušikom (tijekom 1,5 min.) kako bi se iz njih uklonio zrak. Boce s napunjenim vinom zatvorene su plutenim čepovima pomoću ručne čepilice, nakon čega je vino stavljeno na starenje. Vino u bocama skladišteno je u vodoravnom položaju pri kontroliranim uvjetima, pri 14 °C. Kako bi se ispitala stabilnost antocijana i boje tijekom starenja vina, analize su provedene u trenutku punjenja vina u boce (0 mjeseci) te nakon 3, 6 i 12 mjeseci starenja vina u bocama.

3.1.2. Kemikalije

- 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
- Metanol (100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Acetonitril (100 %), HPLC čistoće, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska
- Malvidin-3-*O*-glukozid klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.3. Aparatura

- Spektrofotometar (Specord 50 Plus), AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD
- HPLC Agilent Technologies 1200 Series, Santa Clara, CA, SAD sastavljen iz sljedećih komponenti:
 - Binarna Pumpa (Bin Pump SL) G1312B
 - Degazer G1379B
 - Autosampler (HiP-ALS) G1367B
 - Termostat Autosampler-a (FC/ALS Term) G1330B
 - Termostatirani odjeljak za kolonu (TCC SL) G1316B
 - Diode Array Detector (DAD SL) G1315C
 - Agilent Chemstation Softver

3.1.4. Pribor

- Mikropipete od 100 i 1000 μ L, Eppendorf, Hauppauge, 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
- Staklene kivete od 1 cm

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje ukupnih antocijana

Princip određivanja:

Ukupna količina antocijana u uzorcima vina određena je metodom baziranom na vezanju HSO_3^- iona, iz otopine natrij hidrogensulfita dodane u uzorak, na 2' položaj obojene molekule antocijana. Na taj način, molekula antocijana prevodi se iz obojenog kationa u njen bezbojni leuko oblik. Istovremeno, paralelni uzorak vina tretiran je destiliranom vodom, pri čemu ne dolazi ni do kakve promjene na strukturi molekula antocijana. Razlika spektrofotometrijski određenih apsorbancija u oba uzorka, mjera je količine prisutnih antocijana (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1965).

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetiran je 1 mL uzorka, 1 mL 96 %-tnog etanola zakiseljenog 0,1 (v/v) klorovodičnom kiselinom i 20 mL 2 % vodene otopine klorovodične kiseline. U dvije odmjerne tikvice otpipetirano je po 10 mL napravljene smjese, te je u prvu tikvicu dodano 4 mL destilirane vode, a u drugu 4 mL 15 % otopine natrij hidrogensulfita. Nakon 15 minuta izmjerena je apsorbancija oba uzorka na 520 nm, u uređaju nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Udio antocijana u ispitivanom uzorku vina izračunat je prema formuli:

$$A_c \left(\frac{mg}{L} \right) = 875 \cdot (D_1 - D_2) \quad [1]$$

gdje je:

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

875 – faktor preračunavanja

D_1 - apsorbancija uzorka kojemu je dodana destilirana voda

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

3.2.2. Određivanje slobodnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Princip određivanja:

Sastav ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata, antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u uzorcima vina određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Identifikacija je provedena usporedbom retencijskog vremena spoja i standarda, dok je kvantifikacija analiziranih spojeva provedena primjenom metode vanjskog standarda malvidin-3-glukozid klorida kao najzastupljenijeg slobodnog antocijana. Dobivene koncentracije slobodnih antocijana izražene su u mg L⁻¹.

Postupak određivanja:

Kromatografska analiza provedena je na Agilent1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module binarne pumpe, degazera, autosampler-a, modula kolone te uz detekciju na DAD detektoru. Priprema uzorka za HPLC analizu obuhvatila je filtriranje uzorka vina kroz celuloza acetatni filtar promjera 25 mm i veličine pora 0,45 μm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 μL pripremljenog uzorka vina.

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 2 uz protok mobilne faze od 1 mL min⁻¹. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu.

Tablica 2. Gradijent korišten za razdvajanje slobodnih antocijana

| t (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 provedena je snimanjem spektra od 280 do 600 nm pomoću DAD detektora. Identifikacija i kvantifikacija slobodnih antocijana provedena je na 520 nm, usporedbom retencijskog vremena (R_t) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar spoja. Koncentracije pojedinačnih slobodnih antocijana izražene su kao ekvivalent malvidin-3-*O*-glukozid klorida (mg L^{-1}). Ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozidi izračunati su kao suma koncentracija delphinidin-3-*O*-glukozida, cijanidin-3-*O*-glukozida, petunidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3-*O*-glukozida 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. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.

3.2.3. Određivanje kromatskih karakteristika vina CIELab metodom

Princip određivanja:

CIELab prostorni model boja trodimenzionalni je sustav boja temeljen na percepciji standardnog promatrača kojeg predstavlja statistički podatak dobiven nizom mjerenja i najbliži je vizualnoj percepciji (CIE, 1986). Koordinate CIELab sustava boja temelje se na Heringovoj teoriji suprotnih parova boja, koje ujedno predstavljaju i osi sustava. Prema CIELab sustavu, kromatske karakteristike vina opisuju sljedeći parametri: akromatska os L (svjetlina) sa vrijednostima u rasponu od 0 % do 100 %, pri čemu je 0 % crna, a 100 % bijela; raspon boja crveno-zeleno za os a (vrijednost a); raspon boja žuto-plavo za os b (vrijednost b), C_{ab} (kromatičnost) te h_{ab} (kut tona boje).

Postupak određivanja:

Mjerenje transmisije provedeno je skeniranjem valnih duljina na svakih 5 nm, unutar raspona od 380 do 780 nm, uz D65 iluminant i kut promatrača 10° , u kivetu od 1 cm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Prema CIELab sustavu, ukupna promjena boje između referentnog (netretiranog) uzorka odnosno standarda i ostalih uzoraka izračunava se sljedećom formulom:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad [2]$$

$$\Delta L^* = L_1^* - L_2^* \quad [3]$$

$$\Delta a^* = a_1^* - a_2^* \quad [4]$$

$$\Delta b^* = b_1^* - b_2^* \quad [5]$$

gdje se veličine L_1^* , a_1^* i b_1^* odnose na boju kojoj se mjeri odstupanje (uzorak), a veličine L_2^* , a_2^* i b_2^* na referentnu boju (standard), pri čemu pozitivne vrijednosti pojedinih razlika (ΔL^* , Δa^* i Δb^*) znače da uzorak ima više te varijable u odnosu na standard. Na primjer, ako je razlika u svjetlini pozitivna vrijednost ($\Delta L^* > 0$), to znači da je uzorak svjetliji od standarda, i obrnuto.

Ovisno o izmjerenim vrijednostima parametra ΔE^* u odnosu na standard, u tablici 3 su prikazane sljedeće mogućnosti (Schläpfer, 1993):

Tablica 3. Ovisnost očitavanja razlike boje u odnosu na vrijednost ukupne promjene boje (ΔE^*)

| | |
|------------------------|--|
| $\Delta E^* < 1$ | Razlika boja se ne vidi golim okom |
| $\Delta E^* = (1 - 3)$ | Razlika boja uočljiva je temeljitim promatranjem |
| $\Delta E^* = (3 - 6)$ | Razlika boja se dobro vidi |
| $\Delta E^* > 6$ | Očigledna odstupanja boja |

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati stabilnost antocijana i boje vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u bocama, pri kontroliranim uvjetima skladištenja u tami i pri temperaturi od 14 °C. Analiza uzoraka vina provedena je nakon 3, 6 i 12 mjeseci skladištenja, a dobiveni rezultati prikazani su grafički i tablično.

Stabilnost ukupnih antocijana ispitana je spektrofotometrijski, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 7 te u tablici 4. Nadalje, primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti ispitana je stabilnost slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-*O*-glukozid), antocijan-3-*O*-glukozid acetata (peonidin-3-*O*-glukozid acetat, malvidin-3-*O*-glukozid acetat) i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat), a dobiveni rezultati prikazani su na slikama 8-16 te u tablicama 5-13. Kromatske karakteristike vina tijekom 12 mjeseci starenja određene su kolorimetrijskom analizom te prikazane u tablici 14.

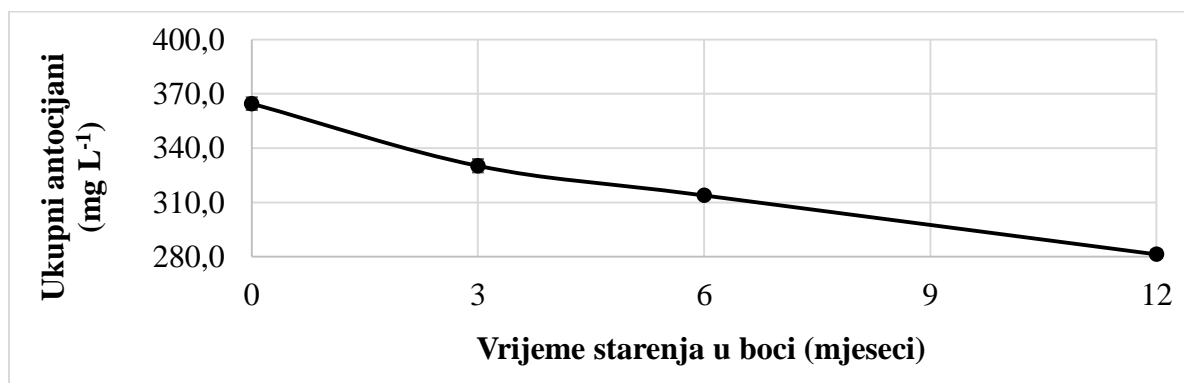
4.1. STABILNOST ANTOCIJANA VINA CABERNET SAUVIGNON TIJEKOM 12 MJESECI STARENJA U BOCI

Tijekom perioda starenja vina u boci dolazi do brojnih kemijskih promjena u sastavu polifenonih spojeva, a posebice antocijana i tanina, koje za posljedicu imaju promjene senzorskih karakteristika vina, u prvom redu boje i okusa (Jackson, 2020). Kemijske promjene sastava antocijana u prvom redu utječu na stabilizaciju boje vina, odnosno karakterističnu promjene boje vina od crvene do narančasto-smeđe (Mazza, 1995). Naime, mlado vino uglavnom je bogato nestabilnim monomernim (slobodnim) antocijanima ekstrahiranim tijekom maceracije i fermentacije iz pokožice bobica grožđa (Joscelyne-Louise, 2009), a tijekom perioda dozrijevanja i starenja dolazi do degradacije i smanjenja koncentracije slobodnih antocijana uslijed formiranja stabilnijih oligomernih i polimernih pigmenata koji su odgovorni za boju odležanih vina (García-Puente Rivas i sur., 2006).

Promjene u koncentraciji ukupnih antocijana vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci prikazane su na slici 7 te je sama dinamika smanjenja njihove koncentracije tijekom navedenog perioda prikazana u tablici 4 u skladu s ranije provedenim istraživanjima (Revilla i sur., 2001; Santos-Buelga i De Freitas, 2009). Naime, dobiveni rezultati

(slika 7 i tablica 4) pokazuju kako su najviše koncentracije ukupnih antocijana određene u mladom vinu neposredno prije postavljanja samog pokusa starenja u bocama (0 mjeseci). Nadalje, tijekom 12 mjeseci starenja utvrđeno je daljnje postepeno smanjenje koncentracije ukupnih antocijana, pri čemu su promjene tijekom zadnjih 6 mjeseci starenja bile tek blago izraženije od onih zamijećenih tijekom prvih 6 mjeseci, u konačnici rezultirajući sa oko 22 % nižom koncentracijom ukupnih antocijana nakon 12 mjeseci dozrijevanja u boci.

Rezultati istraživanja Pérez-Magariño i Gonzalez-San José (2004) o promjenama u sastavu flavanola, antocijana i njihovih derivata tijekom starenja crnih vina, također su u skladu s vrijednostima prikazanim na slici 7 i tablici 4. Spomenutim istraživanjem utvrđeno je kako mlada vina sadrže visoku koncentraciju ukupnih i slobodnih antocijana, dok se tijekom starenja njihov sadržaj smanjuje uz istovremeno povećanje koncentracije derivata antocijana, odnosno novih pigmenata, odgovornih za intenzitet boje vina, te pojavu crveno-narančastih nijansi u dozrelim starim vinima. Naime, antocijani izravno ili posredovanjem acetaldehida i drugih spojeva reagiraju s drugim fenolnim spojevima čime se koncentracija ukupnih antocijana u vinu smanjuje. Također, smatra se kako antocijani mogu ući u reakcije koje rezultiraju formiranjem novih pigmenata, poput piranoantocijana (Jackson, 2020).



Slika 7. Promjene u koncentraciji ukupnih antocijana (mg L^{-1}) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 4. Dinamika smanjenja koncentracije ukupnih antocijana ($\Delta \text{mg L}^{-1}$ te $\Delta \%$) tijekom 12 mjeseci starena u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

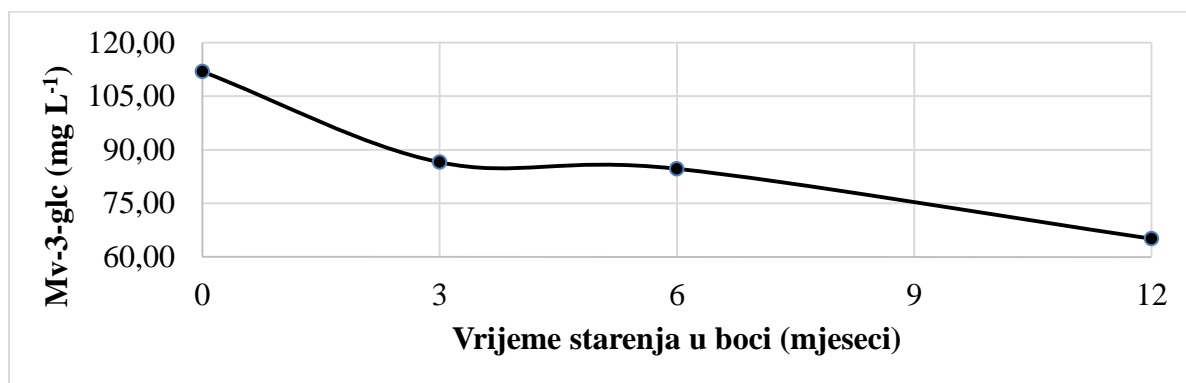
| Ukupni antocijani | | |
|-------------------|---------------------------|-------------|
| | $\Delta \text{mg L}^{-1}$ | $\Delta \%$ |
| 3 mjeseca | -34,34 | -9,42 |
| 6 mjeseci | -50,71 | -13,91 |
| 12 mjeseci | -83,26 | -22,84 |

Također, Ivanova-Petropulos i sur. (2015) pokazali su kako tijekom 1-2 godine dozrijevanja i starenja vina dolazi do značajnog smanjenja koncentracije ukupnih i slobodnih antocijana koji su odgovorni za crveno-ljubičastu nijansu mladih crnih vina, i to čak do 88 %. Uspoređujući rezultate na slici 7 i tablici 4 s navedenim istraživanjem, jasno je kako je u slučaju predloženog istraživanja (Ivanova-Petropulos i sur., 2015), došlo do značajno veće degradacije antocijana. Dobivena značajna razlika dvaju istraživanja može se pripisati načinu odležavanja vina koje se u odvijalo u boci suprotno od samog dozrijevanja u bačvama te predstavlja manje oksidativne uvjete pri čemu kontakt vina i kisika u ovom slučaju u najvećoj mjeri ovisi o korištenom tipu čepa, odnosno njegovoj propusnosti za kisik (Chira i sur., 2012). Također, istraživanje Alcalde-Eon i sur. (2006) pokazalo je da različiti načini starenja vina različito utječu na samu dinamiku smanjenja koncentracije ukupnih antocijana, pri čemu sama sorta kao i cjelokupni polifenolni sastav vina također mogu imati važan utjecaj. Primjerice, tijekom starenja vina u bačvama dolazi do smanjenja koncentracije antocijana zbog intenzivnog formiranja novih pigmenata, dok je smanjenje koncentracije antocijana tijekom starenja vina u bocama dolazi do nešto manjeg intenziteta formiranja novih pigmenata te intenzivnijih procesa degradacije pigmenata prisutnih u vinu.

Promjene u koncentraciji slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-*O*-glukozid), antocijan-3-*O*-glukozid acetata (peonidin-3-*O*-glukozid acetat, malvidin-3-*O*-glukozid acetat) i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat) tijekom 12 mjeseci starenja u bocama prikazani su na slikama 8-16, a dinamika smanjenja koncentracije navedenih spojeva u tablicama 5-13.

Dobiveni rezultati pokazuju značajnu promjenu koncentracije antocijan-3-*O*-glukozida tijekom prvih 6 mjeseci starenja u bocama, dok je navedena promjena tijekom zadnjih 6 mjeseci starenja bila značajno manje izražena. Navedeni rezultati podudaraju se s istraživanjem Revilla i Gonzalez-San Jose (2001) provedenim pri sličnim temperaturnim uvjetima, na 15 °C tijekom 2 godine, gdje je također utvrđeno značajno smanjenje udjela antocijan-3-*O*-glukozida za vrijeme skladištenja prvih 6 mjeseci, nakon čega je primijećeno nešto sporije smanjenje, te stabilizacija nakon 12 mjeseci starenja. Također, isto istraživanje pokazalo je veći intenzitet kemijskih promjena u vinima s višom koncentracijom antocijan-3-*O*-glukozida obzirom da je u ovim vinima došlo i do intenzivnijeg smanjenja koncentracije navedenih spojeva. Nadalje, važno je istaknuti kako je istovremeno zabilježen porast koncentracije novonastalih derivata, odnosno

novih pigmentata, pri čemu je utvrđeno značajno povećanje tijekom prvih 6 mjeseci starenja, nakon čega su razine bile manje ili više konstantne, s blagim smanjenjima. Naime, povezivanjem A prstenova antocijana i tanina direktno ili uz posredovanje acetaldehida dolazi do formiranja obojenih polimernih spojeva (Saucier, 2010). Iako koncentracija novonastalih pigmentata u ovom istraživanju nije određena, ranije studije pokazale su kako se koncentracija slobodnih antocijana uslijed formiranja novih pigmentata povezivanjem antocijana i tanina smanjuje, dok se koncentracija novonastalih derivata povećava (Jackson, 2020).

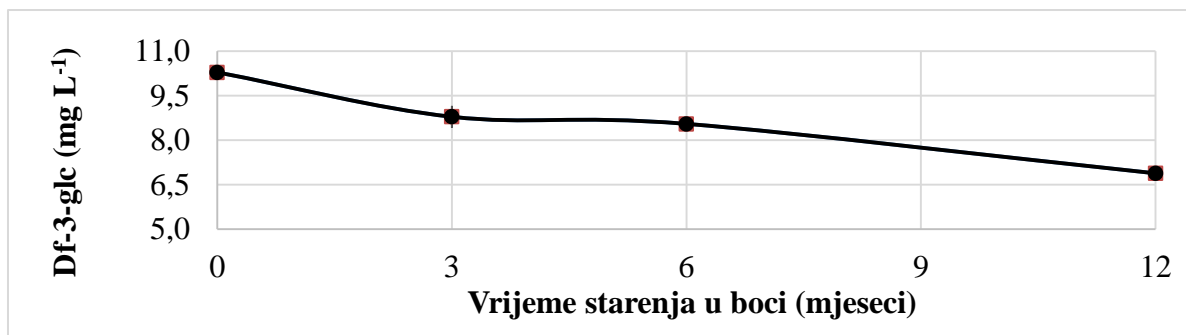


Slika 8. Promjene u koncentraciji malvidin-3-O-glukozida (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 5. Dinamika smanjenja koncentracije malvidin-3-O-glukozida (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

| Malvidin-3-O-glukozid | | |
|------------------------------|-----------------------------|------------|
| | Δ mg L ⁻¹ | Δ % |
| 3 mjeseca | -25,38 | -22,68 |
| 6 mjeseci | -27,21 | -24,31 |
| 12 mjeseci | -46,79 | -41,81 |

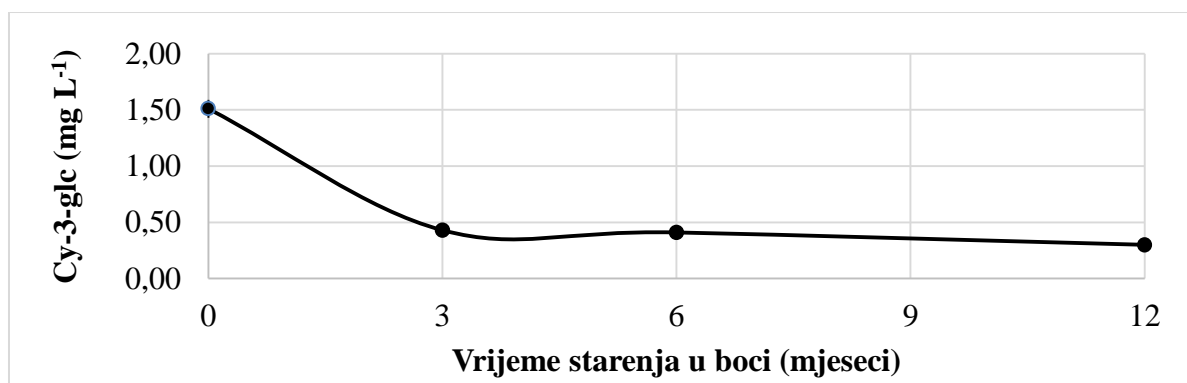
Nadalje, dobiveni rezultati mogu se usporediti i s rezultatima Blanco-Vega i sur. (2014), čijim istraživanjem je utvrđeno kako tijekom 42 mjeseca starenja vina Cabernet Sauvignon nije došlo do značajnije promjene u koncentraciji tanina, međutim istovremeno je zabilježeno povećanje koncentracije novih pigmentata, polimernih ili nepolimernih. Naime, navedene kemijske reakcije antocijana i tanina uzrokuju promjene senzorskih svojstava vina tijekom dozrijevanja i starenja, a u prvom redu smanjenje trpkocće te stabilizaciju boje (Alcalde-Eon i sur., 2006; Jackson, 2020).



Slika 9. Promjene u koncentraciji delfinidin-3-*O*-glukozida (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 6. Dinamika smanjenja koncentracije delfinidin-3-*O*-glukozida (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

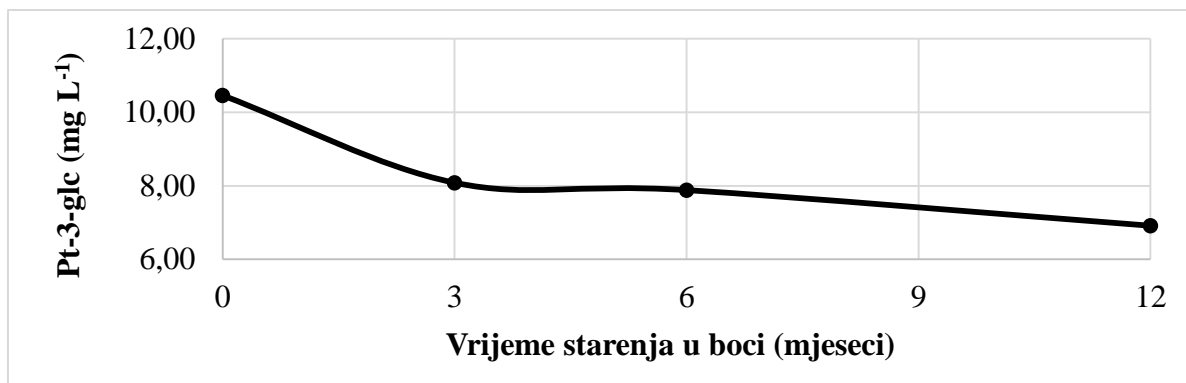
| Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid | | |
|----------------------------------|-----------------------------|------------|
| | Δ mg L ⁻¹ | Δ % |
| 3 mjeseca | -1,50 | -14,57 |
| 6 mjeseci | -1,74 | -16,87 |
| 12 mjeseci | -3,41 | -33,16 |



Slika 10. Promjene u koncentraciji cijanidin-3-*O*-glukozida (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 7. Dinamika smanjenja koncentracije cijanidin-3-*O*-glukozida (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

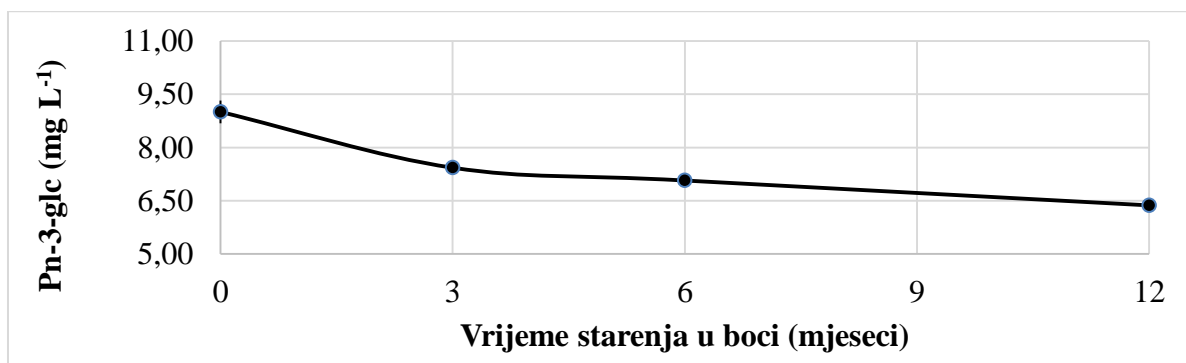
| Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid | | |
|---------------------------------|-----------------------------|------------|
| | Δ mg L ⁻¹ | Δ % |
| 3 mjeseca | -1,08 | -71,34 |
| 6 mjeseci | -1,10 | -72,99 |
| 12 mjeseci | -1,22 | -80,39 |



Slika 11. Promjene u koncentraciji petunidin-3-*O*-glukozida (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 8. Dinamika smanjenja koncentracije petunidin-3-*O*-glukozida (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

| Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid | | |
|---------------------------------|-----------------------------|------------|
| | Δ mg L ⁻¹ | Δ % |
| 3 mjeseca | - 2,38 | -22,71 |
| 6 mjeseci | -2,58 | -24,63 |
| 12 mjeseci | -3,54 | -33,89 |



Slika 12. Promjene u koncentraciji peonidin-3-*O*-glukozida (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 9. Dinamika smanjenja koncentracije peonidin-3-*O*-glukozida (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

| Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid | | |
|--------------------------------|-----------------------------|------------|
| | Δ mg L ⁻¹ | Δ % |
| 3 mjeseca | -1,57 | -17,44 |
| 6 mjeseci | -1,92 | -21,39 |
| 12 mjeseci | -2,63 | -29,17 |

Slično kao kod ukupnih antocijana, najviše koncentracije antocijan-3-*O*-glukozi (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-*O*-glukozid), antocijan-3-*O*-glukozid acetata (peonidin-3-*O*-glukozid acetat, malvidin-3-*O*-glukozid acetat) i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat) utvrđene su na početku pokusa starenja (slike 8-16). Naime, istraživanje provedeno na vinima Temparnillo, Cabernet Sauvignon i Graciano pokazalo je kako je smanjenje koncentracije monomernih antocijana nakon 12 mjeseci starenja povezano sa sudjelovanjem ovih spojeva u reakcijama kondenzacije, razgradnje i hidrolize (Monagas i sur., 2003). Ipak, iako je tijekom navedenog perioda starenja u bocama utvrđeno smanjenje koncentracije slobodnih antocijana, važno je naglasiti kako su uočene značajne razlike u dinamici degradacije navedenih spojeva, odnosno u stabilnosti između pojedinih slobodnih antocijana na promjene uvjetovane starenjem u boci (tablice 5-13).

Uspoređujući rezultate svakog pojedinog antocijan-3-*O*-glukozi, vidljivo je kako su najviše koncentracije tijekom starenja dobivene za malvidin-3-*O*-glukozid s vrijednostima od 111,90 mg L⁻¹ prije pokusa dozrijevanja, do 65,11 mg L⁻¹ nakon 12 mjeseci starenja (slika 8). Naime, poznato je kako je upravo malvidin-3-*O*-glukozid najzastupljeniji antocijan u grožđu *Vitis vinifera* sorti (Budić-Leto i sur., 2009; Lorrain i sur., 2011; Jackson, 2020; Maletić i sur., 2009; Revilla i sur., 1999). Također, mehanizmi formiranja polimernih pigmenata u vinu tijekom dozrijevanja i starenja u najvećoj mjeri istraženi su upravo na ovom antocijan glukozidu, kao najzastupljenijem slobodnom antocijanu. Naime, još 1997. godine utvrđeno je kako malvidin-3-*O*-glukozi sudjeluje u formiranju piranoantocijana, vitisina A (Bakker i sur., 1997), kao jednog od najzastupljenijih piranoantocijana u vinu (Morata i sur., 2006).

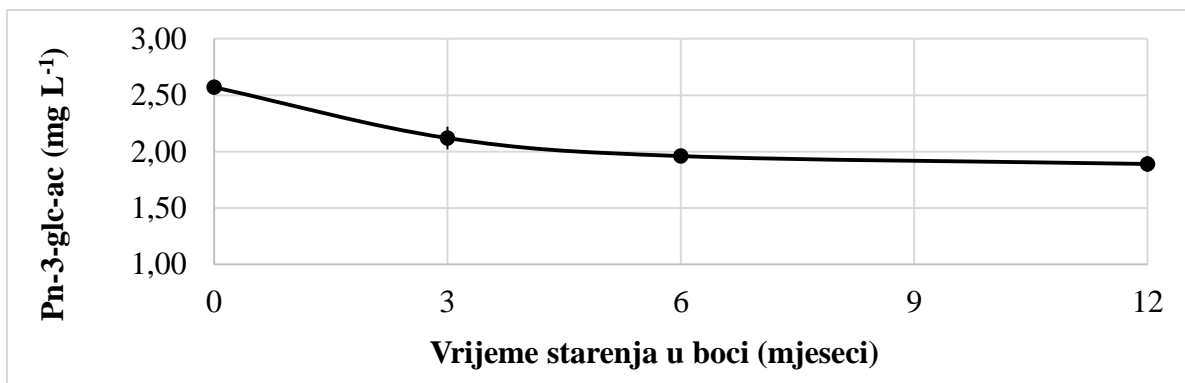
Suprotno tome najniže koncentracije izmjerene su u sastavu cijanidin-3-*O*-glukozi od svega 1,51 mg L⁻¹ prije pokusa dozrijevanja do 0,30 mg L⁻¹ nakon 12 mjeseci starenja (slika 10). Također, najveće odstupanje od početne vrijednosti, pri mjerenju nakon 12 mjeseci starenja ima cijanidin-3-*O*-glukozid, gdje je utvrđeno smanjenje koncentracije od čak 80,39 % (tablica 4). S druge strane, najveću stabilnost, odnosno najmanje smanjenje koncentracije pokazao je peonidin-3-*O*-glukozid od tek 2,63 mg L⁻¹, odnosno 29,17 % nakon 12 mjeseci starenja u boci (tablica 8).

Nadalje, tijekom istraživanja Revilla i sur. (1999) zaključeno je kako su slobodni antocijani, a posebice malvidin-3-*O*-glukozid, izuzetno osjetljivi na djelovanje temperature. Ipak, obzirom da je samo starenje u bocama tijekom 12 mjeseci provedeno u strogo kontroliranim uvjetima, pri temperaturi od 14 °C, može se zaključiti kako navedeni parametar nije značajnije utjecao na dobivene rezultate. S druge strane, delphinidin, petunidin i cijanidin izrazito su podložni oksidacijskim promjenama (Revilla i sur., 1999), što također u konkretnom istraživanju starenja u bocama ne predstavlja značajan faktor budući da je pristup kisika u tim „reduktivnim“ uvjetima minimalan.

Antocijan-3-*O*-glukozid acetati i *p*-kumarati, premda relativno malo zastupljeni, prirodno su prisutni u mladim i odležanim vinima (Revilla i Gonzalez-San Jose, 2001). Promatrajući acilirane derivate, vidljivo je kako je najniža koncentracija među navedenim spojevima dobivena za peonidin-3-*O*-glukozid acetat, odnosno navedeni spoj je bio najmanje zastupljen. Istovremeno, interesantno je za naglasiti kako je navedeni spoj također pokazao i najveću stabilnost na kemijske promjene tijekom dozrijevanja vina u boci. Naime, ovaj je spoj tijekom prvih 6 mjeseci starenja pokazao pad koncentracije od 23,74 % odnosno 0,61 mg L⁻¹ te nakon 12 mjeseci starenja pad koncentracije od 26,53 %, odnosno 0,68 mg L⁻¹ (tablica 10).

S druge strane, malvidin-3-*O*-glukozid acetat nakon 12 mjeseci starenja pokazao je smanjenje od gotovo 45 %, od čega nešto više od polovice tijekom prvih 6 mjeseci (tablica 11). Navedene promjene u sastavu malvidin-3-*O*-glukozid acetata u skladu su s istraživanjem Revilla i Gonzalez-San Jose (2001) koje je pokazalo značajno smanjenje koncentracije antocijan glukoziida i aciliranih derivata antocijana te povećanje koncentracije novih polimernih pigmenta.

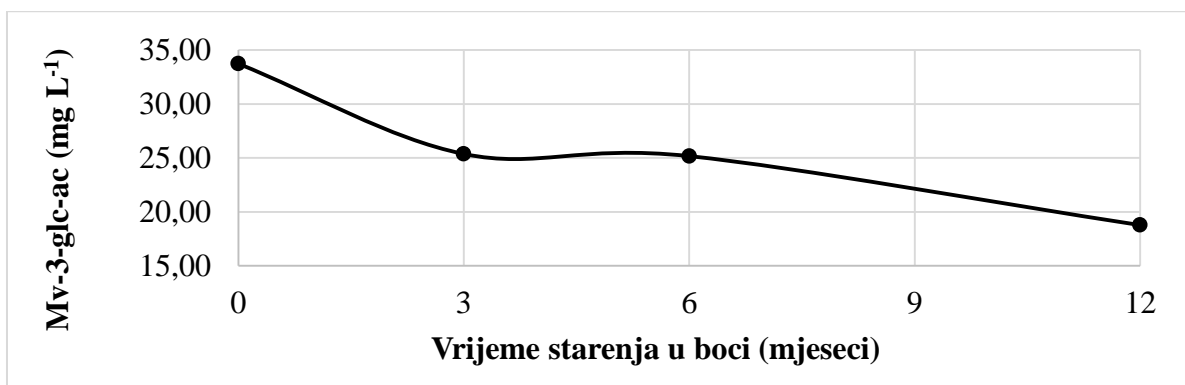
Također, u sastavu antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata utvrđeno je značajno smanjenje koncentracije tijekom prve polovice 12-omjesečnog razdoblja starenja, pri čemu peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat s početnom koncentracijom od tek 1 mg L⁻¹ pokazuje smanjenje od 32,97 % nakon 6 mjeseci starenja, a tek 0,05 mg L⁻¹ nakon 12 mjeseci, odnosno samo 4,2 % (tablica 12). Malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat pokazuje nešto veće ukupno smanjenje, 43,90 %, od čega većinu, 30,36 % nakon 6 mjeseci starenja (tablica 13). Smanjenje kumaroilnih pigmenta tijekom starenja potvrđuje i istraživanje Blanco-Vega i sur. (2014) gdje je smanjenje koncentracije od gotovo 50 % utvrđeno nakon par godina starenja.



Slika 13. Promjene u koncentraciji peonidin-3-*O*-glukozid acetata (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 10. Dinamika smanjenja koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid acetata (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

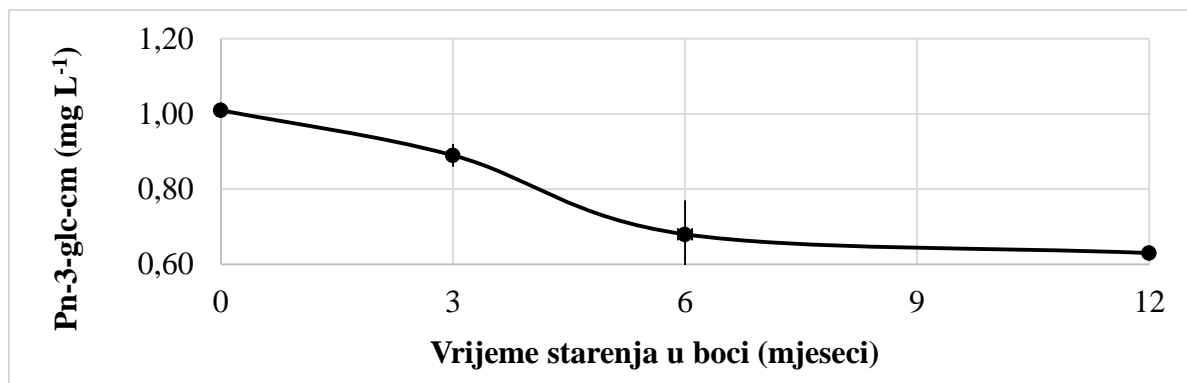
| Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|------------|
| | Δ mg L ⁻¹ | Δ % |
| 3 mjeseca | -0,46 | -17,74 |
| 6 mjeseci | -0,61 | -23,74 |
| 12 mjeseci | -0,68 | -26,53 |



Slika 14. Promjene u koncentraciji malvidin-3-*O*-glukozid acetata (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 11. Dinamika smanjenja koncentracije malvidin-3-*O*-glukozid acetata (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

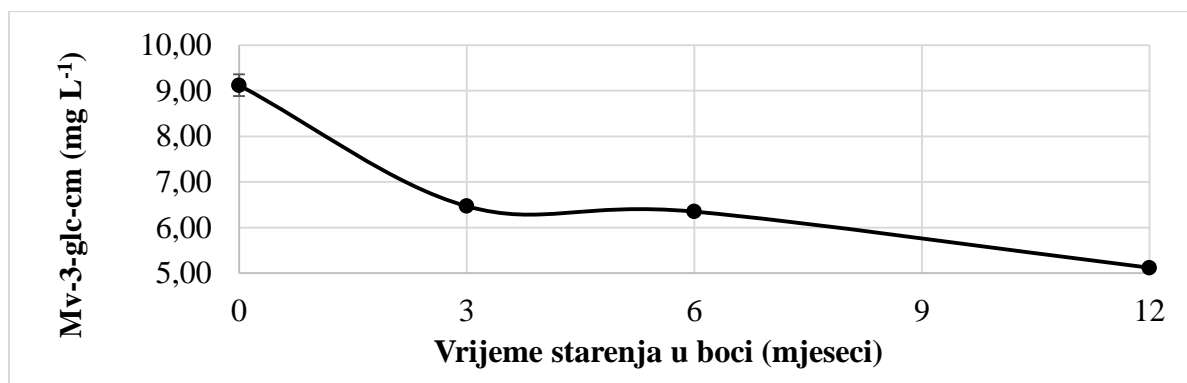
| Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|------------|
| | Δ mg L ⁻¹ | Δ % |
| 3 mjeseca | -8,39 | -24,86 |
| 6 mjeseci | -8,57 | -25,40 |
| 12 mjeseci | -14,97 | -44,37 |



Slika 15. Promjene u koncentraciji peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 12. Dinamika smanjenja koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

| Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat | | |
|--|-----------------------------|------------|
| | Δ mg L ⁻¹ | Δ % |
| 3 mjeseca | -0,12 | -11,83 |
| 6 mjeseci | -0,33 | -32,97 |
| 12 mjeseci | -0,38 | -37,17 |



Slika 16. Promjene u koncentraciji malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 13. Dinamika smanjenja koncentracije malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

| Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat | | |
|--|-----------------------------|------------|
| | Δ mg L ⁻¹ | Δ % |
| 3 mjeseca | -2,65 | -29,03 |
| 6 mjeseci | -2,77 | -30,36 |
| 12 mjeseci | -4,01 | -43,90 |

4.2. STABILNOST BOJE VINA CABERNET SAUVIGNON TIJEKOM 12 MJESECI STARENJA U BOCI

Kemijske promjene u sastavu antocijana tijekom starenja vina direktno utječu i na promjenu boje i nijanse vina (Jackson, 2020). Naime, crvena boja mladog vina posljedica je visoke koncentracije slobodnih antocijana. Međutim, obzirom da su navedeni spojevi izrazito nestabilni, tijekom dozrijevanja i starenja vina vrlo brzo dolazi do njihove degradacije kao i formiranja novih polimernih pigmenata te promjene boje crvene prema crveno-ciglastoj (Alcalde-Eon i sur., 2006; García-Puente Rivas i sur., 2006; Monagas i sur., 2005; Revilla i Gonzalez-San Jose, 2001).

Promjene u sastavu kromatskih karakteristika vina tijekom 12 mjeseci starenja vina Cabernet Sauvignon određene su kolorimetrijskom analizom te prikazane u tablici 14.

Tablica 14. Ukupna kolorimetrijska razlika boje tijekom dozrijevanja vina Cabernet Sauvignon

| | ΔL | Δa | Δb | ΔE | Očitanje boje |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|----------------------------|
| 3 mjeseca | 0,88 | 1,71 | 1,90 | 3,65 | Razlika boja se dobro vidi |
| 6 mjeseci | 1,41 | 3,13 | 2,07 | 8,02 | Očigledna odstupanja boja |
| 12 mjeseci | 1,76 | 3,46 | 2,25 | 10,06 | |

Dobiveni rezultati (tablica 14) ukazuju na značajno povećanje vrijednosti kromatskih parametara ΔL , Δa , Δb te ΔE nakon 3 mjeseca starenja, odnosno na vidljivu promjenu boje nakon 3 mjeseca starenja vina u boci, kao i očigledno odstupanje boje odležanog vina u odnosu na početnu nijansu prije starenja nakon 6 i 12 mjeseci starenja. Ranija istraživanja također su pokazala promjene u sastavu kromatskih karakteristika tijekom perioda dozrijevanja i starenja vina uvjetovane smanjenjem koncentracije slobodnih antocijana te formiranjem polimernih pigmenta (direktnih antocijan-flavanol adukata, antocijan-flavanol adukata povezanih etilnim mostovima te piranoantocijana) (Gambutti i sur., 2013; Pérez-Magariño i González-San José, 2004). Također, nešto intenzivnije promjene u sastavu kromatskih karakteristika uočene su tijekom prvih šest mjeseci starenja od onih tijekom zadnjih šest mjeseci starenja.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata o stabilnosti antocijana i boje vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u bocama možemo zaključiti sljedeće:

1. Tijekom starenja vina u bocama došlo je do značajnog smanjenja koncentracije ukupnih, kao i slobodnih antocijana vina (antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata), posebice tijekom prvih 6 mjeseci starenja.
2. Među analiziranim antocijan-3-*O*-glukozidima, cijanidin-3-*O*-glukozid pokazao je najmanju stabilnost, odnosno najveće smanjenje koncentracije nakon 12 mjeseci starenja, dok je najveću stabilnost, odnosno najmanje smanjenje koncentracije pokazao peonidin-3-*O*-glukozid.
3. Kemijske promjene u sastavu malvidin-3-*O*-glukozid acetata bile su izraženije od onih u sastavu peonidin-3-*O*-glukozid acetata koji je pokazao manje smanjenje koncentracije, odnosno veću stabilnost.
4. Kemijske promjene u sastavu malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata bile su izraženije od onih u sastavu peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata koji je pokazao manje smanjenje koncentracije, odnosno veću stabilnost.
5. Tijekom starenja vina u bocama došlo je do povećanja vrijednosti kromatskih parametara ΔL , Δa , Δb te ΔE te je utvrđena vidljiva promjena boje vina nakon 3 mjeseca starenja, kao i očigledno odstupanje boje odležanog vina nakon 6 i 12 mjeseci starenja.

6. LITERATURA

Acevedo De la Cruz, A., Hilbert, G., Riviere, C., Mengin, V., Ollat, N., Bordenave, L., Decroocq, S., Delaunay, J. C., Delrot, S., Merillon, J. M., Monti, J. P., Gomes, E., Richard, T. (2012) Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by LC-MS and LCNMR. *Anal. Chim. Acta.* **732**, 145-152.

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.

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

Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. (2002) Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Anal. Chim. Acta.* **428**, 15-27.

Avizcuri, J. M., Sáenz-Navajas, M. P., Echávarri, J. F., Ferreira, V., Fernández-Zurbano, P. (2016) Evaluation of the impact of initial red wine composition on changes in color and anthocyanin content during bottle storage. *Food Chem.* **213**, 123-134.

Bakker, J., Bridle, P., Honda, T., Kuwano, H., Saito, N., Terahara, N., Timberlake, C. (1997) Identification of an anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry* **44**, 1375–1382.

Bakker, J., Timberlake, C. F. (1997) Isolation, identification and characterization of new colour-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 35–43.

Benabdeljalil, C., Cheynier, V., Fulcrand, H., Hakiki, A., Mosaddak, M., Moutounet, M. (2000) Mise en évidence de nouveaux pigments formés par réaction des anthocyanes avec des métabolites de levures. *Sci. Aliments* **20**, 203-220.

Blanco-Vega, D., Gomez-Alonso, S., Hermosín-Gutierrez, I. (2014) Identification, content and distribution of anthocyanins and low molecular weight anthocyanin-derived pigments in Spanish commercial red wines. *Food Chem.* **158**, 449-458.

Boulton, R. B. (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine. A critical review. *Am. J. Enol. Viticult.* **52**, 7-87.

Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A. M., Cheminat, A. (1989) The copigmentation reaction of anthocyanins: A microprobe for the structural study of aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 2604-2610.

Budić-Leto, I., Vrhovšek, U., Gajdoš Kljusurić, J., Lovrić, T. (2009) Anthocyanin pattern of skin extracts from the Babić and Plavac mali grapes and anthocyanin pattern of the produced wine. *Acta Aliment.* **38**, 67–75.

Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., Bautista-Ortín, A. B. (2011) The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. *J. Agr. Food Chem.* **59**, 5450–5455.

Caille, S., Samson, A., Wirth, J., Dieval, J. B., Vidal, S., Cheynier, V. (2010) Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling. *Analy. Chim. Acta* **660**, 35-42.

Castillo-Muñoz, N., Fernandez-Gonzalez, M., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Hermosin-Gutierrez, I. (2009) Structure elucidation of peonidin 3,7-O-b-diglucoside isolated from Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 7883-7891.

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.

CIE, central bureau of the commission internationale de l'ectarge (1986) Colorimetry, Publication CIE No. 15.2., Vienna, Austria.

Dangles, O., Brouillard, R. (1992a) Polyphenol interactions. The copigmentation case: Thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect. *J. Chem.* **70**, 2174-2189.

Dangles, O., Brouillard, R. (1992b) A spectroscopic method based on the anthocyanin copigmentation interaction and applied to the quantitative study of molecular complexes. *J. Chem. Soc.* **2**, 247-257.

- Eiro, M. J., Heinonen, M. (2002) Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 7461–7466.
- Fennema, O. R. (1985) *Food Chemistry*, 1. izd., Marcel Dekker, Inc., New York, str. 557-564.
- Francia-Aricha, E. M., Guerra, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. (1997) New anthocyanin pigments formed aer condensation with flavanols. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 2262–2266.
- Francis, F. J. (1989) Food colorants: anthocyanins. *Food Sci. Nutr.* **28**, 273–314.
- Fulcrand, H., Cameira dos Santos, P. J., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Favre-Bonvin, J. (1996) Structure of new anthocyanin derived wine pigments. *J. Chem. Soc.* **7**, 735-739.
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., Cheynier, V. (2006) Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 289-297.
- Gambutì, A., Rinaldi, A., Ugliano, M., Moio, L. (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.
- García-Puente Rivas, E., Alcalde-Eon, C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T. (2006) Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. *Anal. Chim. Acta* **563**, 215-222.
- Garrido, J., Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols – A chemical perspective. *Food Res. Int.* **54**, 1844–1858.
- Giada, M. de L. R. (2013) *Oxidative stress and chronic degenerative diseases: A role for antioxidants*, 1. izd., Intech Open Limited, London, str. 87-112.
- 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.
- Gonzalez-San Jose, M. L., Diez, C. (1992) Compuestos fenolicos en el hollejo de uva tinta durante la maduracion. *Agrochimica* **36**, 63–70.

- Goto, T., Kondo, T. (1991) Structure and molecular stacking of anthocyanins. Flower color variation. *Angew. Chem., Int. Edit* **30**, 17-33.
- 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.
- Hayasaka, Y., Waters, E. J., Cheynier, V., Herderich, M. J., Vidal, S. (2003) Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **17**, 9-16.
- He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., Duan, C.Q. (2012a) Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* **17**, 1571-1601.
- He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., Duan, C. Q. (2012b) Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules* **17**, 1483–1519.
- He, J., Carvalho, A. R. F., Mateus, N., De Freitas, V. (2010) Spectral features and stability of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments isolated from red wines. *J. Agr. Food Chem.* **58**, 9249-9258.
- Hrazdina, G., Borzell, A. J., Robinson, W. B. (1970) Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. *Am. J. Enol. Viticult.* **21**, 201-204.
- Ivanova-Petropulos, V., Hermosín-Gutierrez, I., Boros, B., Stefova, M., Stafilov, T., Vojnoski, B., Dornyei, A., Kilar, F. (2015) Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *J. Food Compos. Anal.* **41**, 1-14.
- Jackson (2020) Chemical Constituents of Grapes and Wine. U: Wine science, (Carr, H., ured.), 5. izd., Academic Press, Cambridge, str. 375-459.
- Joscelyne-Louise, J. (2009) Consequences of extended maceration for red wine colour and phenolics. Doctoral thesis, University of Adelaide, Adelaide.

- Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J. M., Moutounet, M. (1999) Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agr. Food Chem.* **47**, 2719-2723.
- Liao, H., Cai, Y., Haslam, E. (1992) Polyphenol interactions. Anthocyanins: Co-pigmentation 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.
- 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.
- Mateus, N., De Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J., Santos-Buelga, C., De Freitas, V. (2002b) Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. *Food Chem.* **76**, 335-342.
- Mateus, N., Silva, A. M. S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., De Freitas, J. (2002a) Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 2110-2116.
- Mateus, N., Silva, A. M. S., Vercauteren, J., De Freitas, V. (2001) Occurrence of anthocyanin-derived pigments in red wines. *J. Agr. Food Chem.* **49**, 4836-4840.
- Mazza, G. (1995) Anthocyanins in grapes and grape products. *Food Sci. Nutr.* **3**, 341-371.
- 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., 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.

- Morata, A., Gómez Cordovés, M. C., Colomo, B., Suarez, J. A. (2003) Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with vitisin A and B formation in red wines. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 7402- 7409.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Calderón, F., Suárez, J. A. (2006) Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 123–129.
- 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.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270-278.
- Pérez-Magariño, S., Gonzalez-San José, M. L. (2004) Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 1181-1189.
- Pozo-Bayon, M., Monagas, M., Polo, M., Gómez Cordovés, C. (2004) Occurrence of pyranoanthocyanins in sparkling wines manufactured with red wine varieties. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 1300-1306.
- 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.
- Quagliari, C., Jourdes, M., Waffo-Teguo, P., Teissedre, P. L. (2017) Updated knowledge about pyranoanthocyanins: Impact of oxygen on their contents, and contribution in the winemaking process to overall wine color. *Trends Food Sci. Tech.* **67**, 139-149.
- Revilla, I., Gonzalez-San Jose, M. L. (2001) Evolution during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: New anthocyanin pigment formation. *Journal of Wine Research* **12**, 183-197.
- Revilla, I., Pérez-Magariño, S., Gonzalez-San Jose, M. L., Beltran, S. (1999) Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **847**, 83-90.

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) Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.* **9**, 2649–2652.

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

Romero, C., Bakker, J. (1999) Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model solutions. *J. Agr. Food Chem.* **47**, 3130–3139.

Romero, C., Bakker, J. (2000a) Effect of storage temperature and pyruvate on kinetics of anthocyanin degradation, vitisin A derivate formation and colour characteristics of model solution. *J. Agr. Food Chem.* **48**, 2135-2141.

Romero, C., Bakker, J. (2000b) Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin and colour evolution. *J. Food Sci. Tech.* **34**, 129-140.

Salas, E., Le Guernevé, C., Fulcrand, H., Poncet-Legrand, C., Cheynier, V. (2004) Structure determination and color properties of a newly synthesized direct-linked flavanol-anthocyanin dimer. *Tetrahedron Lett.* **45**, 8725-8729.

Santos-Buelga, C., De Freitas, V. (2009) Influence of phenolics on wine organoleptic properties. U: Wine Chemistry and Biochemistry, (Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., ured.), Springer, New York, str. 529–570.

Sarni-Manchado, P., Fulcrand, E., Souquet, J. M., Cheynier, V., Moutounet, M. (1996) Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *J. Food Sci.* **61**, 938-941.

Saucier, C. (2010) How do wine polyphenols evolve during wine ageing?. *Cerevisia* **35**, 11-15.

Schläpfer, K. (1993) Farbmatrik in der reproduktionstechnik und im mehrfarbendruck, 2. izd, Ugra, St. Gallen.

Schwarz, M., Hofmann, G., Winterhalter, P. (2004) Investigations on anthocyanins in wines from *Vitis vinifera* cv. Pinotage: Factors influencing the formation of pinotin A and its correlation with wine age. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 498-504.

Schwarz, M., Quast, P., von Baer, D., Winterhalter, P. (2003a) Vitisin A content in Chilean wines from *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon and contribution to the color of aged red wines. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 6261-6267.

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

Schwarz, M., Winterhalter, P. (2003) A novel synthetic route to substituted pyranoanthocyanins with unique colour properties. *Tetrahedron Lett.* **44**, 7583-7587.

Servili, M., Begliomini, A. L., Montedoro, G., Petruccioli, M., Federici, F. (1992) Utilisation of a yeast pectinase in olive oil extraction and red wine winemaking processes. *J. Food Sci. Agr.* **58**, 253-260.

Somers, T. C. (1971) The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* **10**, 2175-2186

Somers, T. C., Evans, M. E. (1986) Evolution of red wines I. Ambient influences on colour composition during early maturation. *Vitis* **25**, 31-39.

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.

Teissedre, P. L., Jourdes, M. (2013) Tannins and anthocyanins of wine: Phytochemistry and organoleptic properties. U: Natural Products, (Ramawat, K., Mérillon, J. M., ured.), Springer, Berlin, str. 2255-2274 .

Terrier, N., Poncet-Legrand, C., Cheynier, V. (2009) Flavanols, flavonols and dihydrolavonols. U: Wine Chemistry and Biochemistry, (Moreno-Arribas, M., Polo, M. C., ured.), Springer, Berlin, str. 463-496.

Trouillas, P., Sancho-Garcia, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., Dangles, O. (2016) Stabilizing and modulating color by copigmentation: insights from theory and experiment. *Chem. Rev.* **116**, 4937-4982.

Van Buren, J. P., Bertino, J. J., Robinson, W. B. (1968) The stability of wine anthocyanins on exposure to heat and light. *Am. J. Enol. Vitic.* **19**, 147-154.

Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., J. Waters, E. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agr.* **83**, 564-573.

Waterhouse, A. L., Teissedre, P. L. (1997) Levels of phenolics in California varietal wines. *ACS Sym. Ser.* **661**, 12-23.

Wirth, J., Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Dieval, J. B., Aagaard, O., Vidal, S., Fulcrand, H., Cheynier, V. (2010) The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines. *Food Chem.* **123**, 107-116.

Zamora, F. (2003) *Elaboracion y crianza del vino Tinto. Aspectos cientificos y practicos*, 1.izd., Antonio Madrid Vicente, Madrid.

Zent, J. B., Inama, S. (1992) Influence of macerating enzymes on the quality and composition of wines obtained from red Valpolicella wine grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 311.

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

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.

Dora Benšek

Dora Benšek