

Stabilnost proantocijanidina vina tijekom starenja u boci

Birovčec, Ivana

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:159:912741>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Ivana Birovčec

1228/PI

**STABILNOST
PROANTOCIJANIDINA 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.

Zahvaljujem svojoj obitelji, a osobito roditeljima na beskonačnom strpljenju, podršci i ljubavi koje su mi pružali kroz cijeli životni i obrazovni vijek. Također, zahvaljujem svima koji su mi tijekom pisanja ovog rada pružili dodatnu podršku i motivaciju.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Natki Ćurko na iskazanoj pristupačnosti, dobronamjernim kritikama i stručnim savjetima te strpljenju i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i Katarini Lukić, mag. ing. na pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

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 PROANTOCIJANIDINA VINA TIJEKOM STARENJA U BOCI

Ivana Birovčec, 1228/PI

Sažetak: Tijekom proizvodnje, dozrijevanja i starenja u vinu dolazi do brojnih kemijskih promjena u sastavu proantocijanidina, koje su ključne za kvalitetu crnog vina. Naime, navedeni spojevi su kvantitativno jedna od najzastupljenijih polifenolnih frakcija, koja utječe na senzorska svojstva trpkocće i gorčine vina. Cilj ovog rada bio je utvrditi stabilnost ukupnih proantocijanidina te pojedinačnih flavan-3-ol monomera [(+)-katehin, (-)-epikatehin] i dimera (B1, B2, B3 i B4) vina Cabernet Sauvignon u reduktivnim uvjetima tijekom 12 mjeseci starenja u bocama. Promjene u koncentraciji ukupnih proantocijanidina određene su spektrofotometrijski, dok su promjene u koncentraciji flavan-3-ol monomera i dimera određene primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC/FLUO). Dobiveni rezultati pokazali su smanjenje koncentracije ukupnih proantocijanidina i pojedinačnih flavan-3-ola tijekom starenja te značajne razlike u stabilnosti između navedenih spojeva. (+)-Katehin je pokazao značajno veću stabilnost i manju reaktivnost od (-)-epikatehina. Među procijanidin dimerima stabilnost je opadala u nizu B3, B2, B4, B1. Flavan-3-ol dimeri pokazali su veću stabilnost na kemijske promjene tijekom 12 mjeseci starenja u boci od flavan-3-ol monomera.

Ključne riječi: vino, flavan-3-oli, proantocijanidini, starenje u boci, HPLC

Rad sadrži: 44 stranica, 12 slika, 9 tablica, 81 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc.dr.sc. Natka Ćurko*

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Karin Kovačević Ganić*
2. Doc.dr.sc. *Natka Ćurko*
3. Prof.dr.sc. *Dubravka Škevin*
4. Doc.dr.sc. *Klara Kraljić* (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

STABILITY OF WINE PROANTHOCYANIDINS DURING BOTTLE AGING

Ivana Birovčec, 1228/PI

Abstract: Chemical changes of proanthocyanidins that occur during production, maturation and aging have a great impact on wine quality. Namely, proanthocyanidin fraction represents the most abundant phenolic fraction in red wine that is responsible for wine astringency and bitterness perception. This study aimed to investigate stability of total proanthocyanidins and individual flavan-3-ol monomers [(+)-catechin, (-)-epicatechin] and dimers (B1, B2, B3, B4) in Cabernet Sauvignon wine, during 12 months of aging in reductive conditions in bottles. Changes in concentrations of total proanthocyanidins were determined spectrophotometrically, while the changes in the concentration of individual flavan-3-ols were determined using high performance liquid chromatography (HPLC/FLUO). Obtained results showed decrease in the concentrations of total proanthocyanidins and flavan-3-ols during aging, as well as significant differences in the stability among analyzed compounds. (+)-Catechin showed higher stability and lower reactivity than (-)-epicatechin. Among procyanidins dimers analyzed, stability decreased in order B3, B2, B4, B1. Flavan-3-ol dimers showed higher stability on chemical changes during 12 months of aging in bottles than flavan-3-ol monomers.

Keywords: wine, flavan-3-ols, proanthocyanidins, bottle aging, HPLC

Thesis contains: 44 pages, 12 figures, 9 tables, 81 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. *Natka Ćurko*, Assistant professor

Technical support and assistance: *Katarina, Lukić*, MSc

Reviewers:

1. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full professor
2. PhD. *Natka Ćurko*, Assistant professor
3. PhD. *Dubravka Škevin*, Full professor
4. PhD. *Klara Kraljić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 28. September 2020.

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI..... | 2 |
| 2.2. SASTAV PROANTOCIJANIDINA U GROŽĐU I VINU..... | 7 |
| 2.2.1. Sastav proantocijanidina u grožđu..... | 7 |
| 2.2.2. Sastav proantocijanidina u vinu | 8 |
| 2.3. SENZORSKE KARAKTERISTIKE PROANTOCIJANIDINA GROŽĐA I VINA..... | 10 |
| 2.4. PROMJENE U SASTAVU PROANTOCIJANIDINA TIJEKOM DOZRIJEVANJA I STARENJA VINA..... | 12 |
| 2.4.1. Kemijske promjene proantocijanidina tijekom dozrijevanja i starenja vina..... | 12 |
| 2.4.2. Utjecaj kemijskih promjena proantocijanidina tijekom dozrijevanja i starenja vina na senzorske karakteristike..... | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 17 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 17 |
| 3.1.1. Uzorci vina Cabernet Sauvignon..... | 17 |
| 3.2. METODE..... | 19 |
| 3.2.1. Određivanje ukupnih proantocijanidina..... | 19 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 22 |
| 4.1. STABILNOST UKUPNIH PROANTOCIJANIDINA VINA CABERNET SAUVIGNON TIJEKOM 12 MJESECI STARENJA U BOCI..... | 22 |
| 4.2. STABILNOST FLAVAN-3-OLA VINA CABERNET SAUVIGNON TIJEKOM 12 MJESECI STARENJA U BOCI..... | 25 |
| 4.2.1. Flavan-3-ol monomeri..... | 25 |
| 4.2.2. Flavan-3-ol dimeri | 28 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 35 |
| 6. LITERATURA..... | 36 |

1. UVOD

Fenolni spojevi su jedan od glavnih čimbenika kvalitete kako grožđa, tako i vina. Fenolni sastav značajno doprinosi senzorskim karakteristikama kao i stilu vina, a također može se koristiti i za utvrđivanje podrijetla i autentičnosti sorti grožđa. Na fenolni sastav vina mogu utjecati brojni faktori kao što su sorta grožđa, agroklimatski uvjeti, te kulturološka i tehnološka praksa.

Među fenolnim spojevima, polimerni flavan-3-oli, odnosno proantocijanidini su najvažnija klasa zbog svog značajnog doprinosa u percepciji okusa i trpkocće vina, a uz njih za kvalitetu crnog vina bitni su i antocijanini. Pojam proantocijanidini uključuje veliki raspon fenolnih spojeva koji su sastavljeni od podjedinica monomera flavan-3-ola. Dokazano je da trpkocća ovisi o koncentraciji te strukturnim karakteristikama proantocijanidina poput srednjeg stupnja polimerizacije (mDP) i stupnja galoilacije (% G). Stoga je poznavanje sastava i strukture proantocijanidina od ključne važnosti za definiranje senzorskih karakteristika vina.

Nadalje, obzirom da su fenolni spojevi izrazito nestabilni, tijekom proizvodnje i starenja vina navedeni spojevi podliježu brojnim enzimatskim i kemijskim reakcijama, što dovodi do značajnih promjena u njihovom sastavu. Također, važno je za naglasiti kako su kemijske promjene koje se odvijaju tijekom „reduktivnog“ perioda starenja vina u boci u značajno manjoj mjeri istražene od onih koje se odvijaju tijekom „oksidativnog“ dozrijevanja u hrastovim bačvama. Starenjem vina se kroz različite kemijske reakcije modificiraju i njegova organoleptička svojstva, što objašnjava značajan financijski trošak u konačnoj cijeni vina. Također, današnji potrošači očekuju da će vino određene sorte i starosti imati jedinstvene kvalitete koje ga razlikuju od ostalih vina drugih vinograda.

U ovom radu istražit će se stabilnost proantocijanidina vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u bocama u kontroliranim uvjetima (u tami pri temperaturi od 14 °C). Ukupni proantocijanidini odredit će se spektrofotometrijski Bate-Smith metodom temeljenoj na kiselinskoj hidrolizi, dok će se monomeri i dimeri flavan-3-ola odrediti tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Ovo istraživanje dati će odgovor na pitanje o promjeni sastava proantocijanidina te flavan-3-ol monomera i dimera tijekom 12 mjeseci starenja vina u boci, kao i razlozima nastanka tih promjena.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOLI SPOJEVI

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti bioaktivnih značajki (Jackson, 2020), snažnog antioksidacijskog i antimikrobnog djelovanja (Wang i sur., 2017; Jackson, 2020), koji su ključni za kvalitetu prehrambenih proizvoda biljnog podrijetla i vina (Cheynier i sur. 2006). Građeni su od najmanje jedne aromatične jezgre i jedne ili više hidroksilnih skupina vezanih za ostale konstituentne (Teissedre i Jourdes, 2013).

U grožđu i vinu zastupljene su dvije glavne skupine fenolnih spojeva: neflavonoidi i flavonoidi. Neflavonoidi su jednostavnije građe od flavonoida i imaju jedan fenolni (benzenski) prsten, dok flavonoidi imaju dva fenolna prstena međusobno povezana lancem od triju ugljikovih atoma (Marković i Talić, 2013; Jackson, 2020), opće formule $C_6C_3C_6$ (Jackson, 2020). Svaka od ove dvije skupine može se nadalje dijeliti, a strukture spojeva utječu na svojstva kao što su boja i okus vina (Cheynier i sur., 2006; Jackson, 2020). Najzastupljeniji predstavnici neflavonoida u grožđu i vinu su fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne) i stilbeni, a predstavnici flavonoida su flavonoli, flavan-3-oli (katehin) i antocijani (Ribéreau-Gayon i sur., 2000). Flavonoidi mogu biti slobodni ili vezani u polimere sa drugim flavonoidima i/ili neflavonoidima (Jackson, 2020). Kompozicija polifenola u vinu ovisi o sorti grožđa i procesima vinifikacije koji određuju njihovu ekstrakciju u mošt i o kemijskim reakcijama tijekom proizvodnje, dozrijevanja i starenja. Općenito crna vina sadrže deset puta više polifenola od bijelih vina, u rasponu od 2-6 g L⁻¹ (Jackson, 2020).

Za kvalitetu crnog vina najbitnije su dvije grupe flavonoida, antocijani i flavanoli, koje se ujedno i kvantitativno najzastupljenije grupe (Fulcrand i sur., 2006). Prema Robinsonu (2006) udjel flavonoida u ukupnim fenolima crnog vina iznosi do 85 %.

Antocijani su pigmenti u pokožici crnih sorata grožđa, definirani su kao vodotopljivi pigmenti koji ovisno o pH vrijednosti mogu biti obojeni plavo, ljubičasto ili crveno. Na taj način doprinose vizualnoj komponenti vina (Cheynier i sur., 2006; Teissedre i Jourdes, 2013). Antocijani su u slobodnoj formi samo djelomično stabilni te podliježu raznim reakcijama, reagiraju s kopigmentima i drugim konstituentima vina te ulaze u reakcije polimerizacije s drugim flavonoidima kako bi postali stabilniji (Jackson, 2020). U grožđu uglavnom postoje kao glukozidi koji se vežu sa šećerom pa se tada nazivaju antocijani, a ukoliko nisu povezani sa

šećerom nazivaju se antocijanidinima. Dije se na cijanine, delphinidine, malvidine, peonine i petunidine ovisno o poziciji metilne i hidroksilne skupine na prstenu B.

Flavanoli se smatraju najšarolikijom kategorijom flavonoida (Teissedre i Jourdes, 2013). U crnom vinu često predstavljaju 25-50 % fenolnog sastava (Waterhouse, 2002). Njihov raspon seže od jednostavnih monomera, odnosno (+)-katehina i njegovog izomera (-)-epikatehina do oligomera i polimera koji se često nazivaju kondenziranim taninima ili proantocijanidinima (Cheynier i sur., 2006; Teissedre i Jourdes, 2013). Proantocijanidini se definiraju kao fenolni spojevi topljivi u vodi, koji imaju molekularnu masu između 500 i 3,000 Da. Oni pored uobičajenih fenolnih svojstava imaju mogućnost taloženja alkaloida, želatine i drugih proteina (Teissedre i Jourdes, 2013). Već u blago kiselim uvjetima dolazi do cijepanja veza između flavanolnih jedinica u polimernom lancu proantocijanidina. Tada nastaju visokoreaktivni karbokationi koji se mogu dalje oksidirati u antocijanidine pa otuda potječe njihov naziv (Fulcrand i sur., 2006). Naziv tanini se odnosi na njihovu sposobnost interakcije s proteinima (Terrier i sur., 2009).

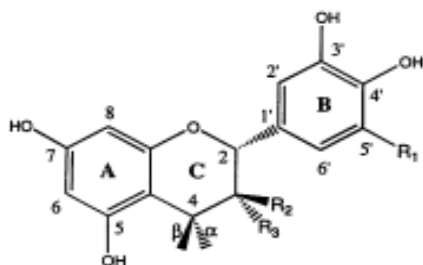
Drugi flavonoidi kao što su flavanoli prisutni su u vrlo malim količinama i čine svega 1-10 % ukupnog fenolnog sadržaja crnog vina. Oni se nalaze u vakuolama epidermalnih i hipodermalnih stanica pokožice grožđa (Jackson, 2020). Njihova uloga je da štite grožđe od UV zračenja tako da ga apsorbiraju, a izloženost suncu povećava njihovu koncentraciju (Price i sur., 1995). Dominantan flavanol u grožđu i vinu jest kvercetin, a slijede ga mircetin i kampferol. U vinu su značajni u ulozi kopigmenata jer s antocijanima formiraju stabilne komplekse (Jackson, 2020).

2.1.1. Flavan-3-ol monomeri, oligomeri i polimeri

Specifični naziv flavan-3-ola potječe od položaja alkohola (R3), odnosno -OH grupe na C prstenu. Flavan-3-oli su najreduciraniji flavonoidi, jer su kod njih položaji 2 i 3 C prstena zasićeni (Teissedre i Jourdes, 2013). U grožđu se flavanoli nalaze kao monomeri, oligomeri i polimeri (Cheynier i sur., 2006).

Monomere flavan-3-ola predstavlja (+)-katehin [2R:3S] u *trans* formi i njegov dijastereoizomer (-)-epikatehin [2R:3R] u *cis* formi (slika 1). R i S položaji naglašavaju stereoizomersku razliku hidroksilne skupine na poziciji 3 prstena C, koja ispoljava i različita

svojstva ovih dvaju monomera (Gawel, 1998; Teissedre i Jourdes, 2013). Nazivaju se i procijanidinima jer su zbog hidroksilacije na položajima 3' i 4' B prstena *o*-difenoli (Gawel, 1998). Nalazimo ih u pokožici i sjemenci grožđa, a također i u vinu (Garrido i Borges, 2013).



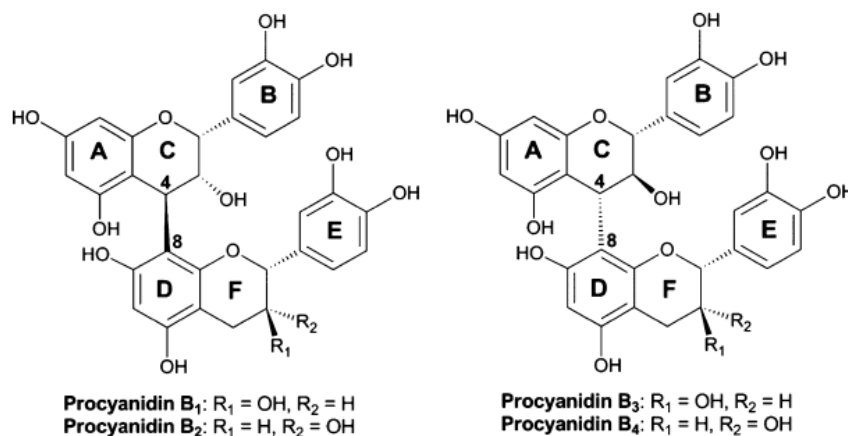
| | Funkcionalna grupa | | |
|----------------|--------------------|----------------|----------------|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
| (+)-Katehin | H | OH | H |
| (-)-Epikatehin | H | H | OH |

Slika 1. Strukture (+)-katehina i (-)-epikatehina (Fulcrand i sur., 2006)

Koncentracija ukupnih monomernih flavan-3-ola u crnim vinima iznosi oko 40 do 120 mg L⁻¹, te osim o sastavu samog grožđa u velikoj mjeri ovisi i o duljini i temperaturi maceracije (Ritchey i Waterhouse, 1999). U grožđu i vinu, (+)-katehin je najčešće zastupljeniji od (-)-epikatehina, ali potonji pokazuje veći maksimalni intenzitet i trajanje podražaja gorčine i trpkocće u odnosu na (+)-katehin (Ćurko i sur., 2014). Osim navedenih spojeva, u sastavu grožđa i vina identificirani su sljedeći flavan-3-ol monomeri: (-)-epigalokatehin, (+)-galokatehin u manjim količinama te (+)-galokatehin galat i (-)-epikatehin galat. (-)-Epigalokatehin i (+)-galokatehin se od (-)-epikatehina i (+)-katehina razlikuju po tome što na B prstenu sadrže tri hidroksilne skupine (Teissedre i Jourdes, 2013). Kod navedenih estera galna kiselina acilira (-)-epikatehin na poziciji 3 (Jackson, 2020). Flavan-3-ol monomeri prvenstveno utječu na okus gorčine, a povećanjem srednjeg stupnja polimerizacije (mDP > 5) trpkocća raste znatno više nego gorčina (Vidal i sur., 2003; Lorrain i sur., 2011). Istraživanja provedena na vinima i model otopinama vina dokazala su da (+)-katehin utječe na okus gorčine i osjet trpkocće (Gonzalo-Diago i sur., 2014). Također, u istraživanju Chira i sur. (2009) istražena su svojstva fenolnih spojeva (+)-katehina i galne kiseline pri čemu je utvrđeno da su ove molekule više gorke nego trpkocće.

Dimeri flavan-3-ola se građeni su od jedinica (+)-katehina i/ili (-)-epikatehina koje su povezane linearnom vezom između atoma C4 na centralnom pirano C prstenu i atoma C8 na prstenu A susjednog flavonoida oksidativnom kondenzacijom (Gawel, 1998; Vidal i sur., 2003; Jackson, 2020).

Najzastupljeniji flavan-3-ol dimeri su B1, B2, B3 i B4 i njih karakterizira C4-C8 veza, iako postoje i njihovi izomeri B5-B8, ali su oni vezani C4-C6 vezom (Teissedre i Jourdes, 2013). Strukture dimera B1-B4 mogu se vidjeti na slici 2, a razlikuju se u rasporedu početne i krajnje podjedinice koja može biti (+)-katehin ili (-)-epikatehin (Jackson, 2020). U brojnim sortama crnog i bijelog grožđa i vina procijanidini B tipa pronađeni su kao glavni flavan-3-ol dimeri (Jackson, 2020; Ricardo-da-Silva i sur., 1992). U sjemenkama nezrelih bobica grožđa najzastupljeniji je procijanidin B3, no kako bobice dozrijevaju naglo raste količina procijanidina B2 (Santos-Buelga i sur., 1995; Gawel, 1998). Generalno, pokožica grožđa najčešće ima nešto nižu koncentraciju dimera u odnosu na sjemenke (Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019). Vezano uz organoleptička svojstva, flavan-3-ol dimeri i trimeri imaju znatno veću trpkooću od monomera, dok između dimera i trimera nisu uočene veće razlike u percepciji trpkooće (Chira i sur., 2009).



Slika 2. Strukture procijanidin dimera B1-B4 (Teissedre i Jourdes, 2013)

Polimerizacija flavan-3-ola u grožđu dovodi do stvaranja oligomera i polimera proantocijanidina, odnosno kondenziranih tanina, koji imaju veliku molekulsku masu (Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019; Jackson, 2020). Oni pokazuju veliku raznolikost struktura od jednostavnih dimera do ekstremno kompleksnih molekula, a sastoje se od nekoliko strukturnih jedinica koje mogu biti povezane na različitim pozicijama konstruirajući lance različitih dužina (Cheynier i sur., 2006). Stupanj polimerizacije je bitna karakteristika strukture proantocijanidina jer njegovim povećanjem dolazi do formiranja dimera, trimera, oligomera koji se sastoje od 2 do 5 podjedinica i polimerima koji imaju više od 6 podjedinica (Fine, 2000; Landrault i sur., 2001). Najčešća struktura proantocijanidina sastoji se od kovalentne ugljikove veze između dvaju flavonoidnih podjedinica (Jackson, 2020).

Koncentracija, struktura i stupanj polimerizacije proantocijanidina ovisi o njihovom smještaju u tkivima grožđa (Jordao i sur., 2001). Ovi fenolni spojevi nađeni su u svim frakcijama grožđa, osobito u sjemenkama, ali i u pokožici te peteljki, dok pulpa sadrži nešto manju koncentraciju proantocijanidina (Monagas i sur., 2003; Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019). Identificirane su i dvije podklase proantocijanidina (procijanidini i prodelfinidini), ovisno o tome da li iz njih kao derivati kiselinske hidrolize nastaju cijanidini ili delfinidini (Jackson, 2020). Tretman kiselinske hidrolize uključuje tretiranje proantocijanidina kiselinama i alkoholom na visokim temperaturama pri čemu se cijepaju interflavanske C-C veze (Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019). Procijanidini i prodelfinidini su poznati kao najzastupljeniji kondenzirani tanini u grožđu i vinu (Garrido i Borges, 2013).

Flavan-3-ol polimeri imaju značajnu ulogu u senzorskim svojstvima crnih vina, ali pridonose i boji (Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019). Primarno su odgovorni za trpkocu crnih vina, dok monomeri značajno pridonose njegovoj gorčini (Gawel, 1998; Lorrain i sur., 2011). Stupanj polimerizacije proantocijanidina utječe na njihovo svojstvo taloženja proteina (Vermerris i Nicholson, 2006). Kompleksne strukture proantocijanidina međusobno djeluju i talože proteine uključene u percepciju trpkocē (Cheynier i sur., 2006). Oligomeri proantocijanidina (2-10) podjedinica (+)-katehina manje pridonose trpkocē, slabije se vežu za proteine i topljiviji su odnosu na polimere (Teissedre i Jourdes, 2013; Jackson, 2020).

Koncentracija oligomera i polimera proantocijanidina u crnim vinima obično iznosi između 20-50 % ukupnog fenolnog sastava, dok je u starijim vinima postotak i viši. Koncentracije se kreću od oko 0,5-4 g L⁻¹ ovisno o sorti crnog grožđa (Teissedre i Jourdes, 2013).

2.2. SASTAV PROANTOCIJANIDINA U GROŽĐU I VINU

2.2.1. Sastav proantocijanidina u grožđu

Sastav proantocijanidina grožđa varira zavisno od kultivara, agroekoloških faktora (sastav tla, klime, zemljopisnog podrijetla, prakse kultivacije), godine berbe, stupnja zrelosti ili izloženosti bolesti poput gljivičnih infekcija (Bruno i Sparapano, 2007; Hernandez-Jimenez i sur. 2009; Garrido i Borges, 2013). Najzastupljeniji proantocijanidini u grožđu su procijanidini, odnosno dimeri B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 i B8 te trimeri C1 i C2 koji se uglavnom sastoje od (+)-katehina, (-)-epikatehina i (-)-epikatehin galatnih podjedinica (Gawel, 1998; Vidal i sur., 2004; Teissedre i Jourdes, 2013). Iako proantocijanidine nalazimo u sjemenci, pokožici i peteljci grožđa, njihova koncentracija i struktura [srednji stupanj polimerizacije (mDP), postotak galoilacije (% G)] značajno se razlikuju ovisno o njihovoj lokalizaciji u tkivu grožđa (Fernández i sur., 2007; Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019; Lorrain i sur., 2011; Vidal i sur., 2003).

Proantocijanidini iz sjemenke grožđa sastoje se samo od procijanidina, a sadrže podjedinice (+)-katehina koji je najdominantniji, zatim (-)-epikatehina i (-)-epikatehin galata (Fernández i sur., 2007; Chira i sur., 2009; Lorrain i sur., 2011; Quijada-Morín i sur., 2012; Teissedre i Jourdes, 2013). U odnosu na pokožicu sadrže veće koncentracije monomernih flavan-3-ola (Gawel, 1998; Monagas i sur., 2003), a vrlo često i proantocijanidina (Cosme i sur., 2009). Podjedinice su međusobno povezane C4-C8 i C4-C6 vezama oksidativnom kondenzacijom (Genebra i sur., 2014). Teissedre i Jourdes (2013) navode kako se esterifikacija (-)-epikatehina i procijanidina B2 galnom kiselinom može pojaviti samo u ekstraktu sjemenki grožđa. Proantocijanidini sjemenke su manje polimerizirani nego oni iz pokožice grožđa (Jackson, 2020). Veličina stupnja polimerizacije (mDP) proantocijanidina sjemenke je između 2 i 17, a stupanj galoilacije iznosi oko 15-30 % te je neovisan o mDP (Vidal i sur., 2003; Cosme i sur. 2009; Teissedre i Jourdes, 2013).

Za razliku od proantocijanidina sjemenki, proantocijanidini pokožice sastoje se od procijanidina i prodelfinidina, točnije uz (+)-katehin i (-)-epikatehin sadrže još i podjedinice (-)-epigalokatehina (oko 20 %) i u manjem udjelu (+)-galokatehina (Vidal i sur., 2004; Cheynier i sur., 2006; Quijada-Morín i sur., 2012; Teissedre i Jourdes, 2013; Čurko i sur., 2014; Jackson, 2020). Kao posljedica toga (-)-epigalokatehin je identifikator proantocijanidina pokožice, dok je (-)-epikatehin galat identifikator proantocijanidina sjemenki (Cheynier i sur., 2006). Udio prodelfinidina se kreće od 17- 31 % te blago raste s povećanjem mDP (Cosme i sur., 2009).

Proantocijanidini pokožice imaju viši srednji stupanj polimerizacije (> 30 mDP) i niži udio stupnja galoilacije do 5 % (Downey i sur., 2003b; Chira i sur., 2009; Cosme i sur., 2009; Lorrain i sur., 2011; Jackson, 2020). Polimerna frakcija iznosi 94-98 % ukupnih flavan-3-ola (Monagas i sur., 2003; Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019). Prosječan DP tanina pokožice Cabernet Sauvignona iznosi između 24 i 33 (Bindon i Kennedy, 2011). Prema Boido i sur. (2011) 40 % ukupnih flavan-3-ola koji su kvantificirani u sjemenkama grožđa su galoilirani, dok su flavan-3-oli iz pokožice karakterizirani s odsustvom galoiliranih formi. Pored toga, prodelfinidini se u pokožici nalaze s udjelom od 30-35 %, s vrlo niskim vrijednostima za epigalokatehin (Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019).

Kompozicija proantocijanidina peteljke varira između onih koji se nalaze u pokožici i sjemenkama, ali na njih otpada samo 5-10% ukupnih fenola grožđa (Makris i sur., 2008; Vidal i sur., 2004). Tanini peteljke imaju mDP oko 10 te se on nalazi između tanina sjemenki i pokožice, a sastoje se uglavnom od (-)-epikatehina dok je stupanj galoilacije oko 15 % (Cheynier i sur., 2006; Jackson, 2020). Također, strukturne razlike ovise i o tipu i o koncentraciji između sorata grožđa (Jackson, 2020).

Tijekom dozrijevanja grožđa dolazi do značajnih promjena mDP (Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019). U istraživanju Bordiga i sur. (2011) dokazalo se kako mDP polimernih frakcija proantocijanidina sjemenki opada tijekom dozrijevanja grožđa s maksimalnih 16 do 7.8. Vezano uz sortu Cabernet Sauvignon mDP se konstantno kretao od 6.4 do 7.1 (Obrique-Siler i sur., 2010). Kennedy (2008) navodi kako se mDP proantocijanidina pokožice grožđa povećava tijekom dozrijevanja grožđa.

2.2.2. Sastav proantocijanidina u vinu

Vino sadrži proantocijanidine sjemenke i pokožice (Monagas i sur. 2003; Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019). Sastav proantocijanidina vina ovisi o sorti grožđa i procesima vinifikacije koji određuju njihovu ekstrakciju u mošt i o kemijskim reakcijama tijekom proizvodnje, dozrijevanja i starenja (Jackson, 2020). Kemijske promjene povezane s proizvodnjom vina započinju selektivnom ekstrakcijom sastojaka grožđa u mošt tijekom maceracije i prešanja (Cheynier i sur., 2006; Quijada-Morín i sur., 2012). Njihova ekstrakcija ovisi o njihovom smještaju u bobici i njihovoj topljivosti (Teissedre i Jourdes, 2013). Na učinak same ekstrakcije utječu različiti faktori kao što su pH mošta, koncentracija SO_2 , sadržaj etanola i temperatura fermentacije. Da bi povećali ekstrakciju proantocijanidina i drugih fenolnih

spojeva, vinari najčešće koriste termovinifikaciju koja se provodi oko 10 minuta do 2 sata na 60 °C (Morel-Salmi i sur., 2006; Petravić-Tominac i sur., 2017). Dodatak SO₂ i pektolitičkih enzima prije fermentacije uzrokuje porast intenziteta i stabilnosti boje, ukupne razine fenola te sadržaja antocijanina, (+)-katehina, (-)-epikatehina (Lomolino i sur., 2010; Teissedre i Jourdes, 2013). Proantocijanidini iz čvrstih dijelova grožđa, točnije pokožice, sjemenki i peteljki ekstrakcijom tijekom maceracije prelaze u vino (Vidal i sur., 2004; Cosme i sur., 2009; Gonzalo-Diago i sur., 2013). Poslijedično, proantocijanidini vina sadrže i procijanidine i prodelfinidine (González-Manzano i sur., 2004). Difuzija antocijanina i proantocijanidina pokožice u mošt crnog grožđa brža je od ekstrakcije proantocijanidina sjemenki (Monagas i sur., 2003; Cheynier i sur., 2006). Za razliku od grožđa, omjer proantocijanidina pokožice i sjemenki vina značajno varira, te se povećava trajanjem maceracije. Nije rijetkost da 40 % proantocijanidina vina potječe iz pokožice, a razlog tome je voštana kutikula koja oblaže sjemenke te otežava ekstrakciju proantocijanidina prilikom maceracije (Jackson, 2020). Također, one za ekstrakciju zahtijevaju višu koncentraciju alkohola i temperature (Cheynier i sur., 2006).

Generalno, frakcije proantocijanidina progresivno se povećavaju tijekom procesa maceracije, nakon čega se pri kraju ovog procesa zamjećuje blagi pad vrijednosti koje se prvenstveno odnose na oligomerne i polimerne frakcije. Monomerni proantocijanidini se kontinuirano ekstrahiraju u vino (Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019). U istraživanju Poklar Urih i sur. (2020) navodi se da koncentracije ukupnih flavonoida i antocijanina rastu tijekom produžene maceracije, a počinju se smanjivati nakon 250 dana dozrijevanja. U istraživanju Cheynier i sur. (2006) ističe se razlika u udjelima (-)-epikatehin galata odnosno (-)-epigalokatehina prije i nakon fermentacije. Tako je udio (-)-epikatehin galata prije fermentacije iznosio 5 % dok je udio (-)-epigalokatehina iznosio 18 %. Nakon fermentacije koja se odvijala tri tjedna udio (-)-epikatehin galata iznosi 10 %, a udio (-)-epigalokatehina se smanjio na 10 %. Naime, tijekom i nakon fermentacije sastav proantocijanidina se mijenja te često nakon porasta u ranim fazama fermentacije slijedi pad u koncentraciji koji je uzrokovan vezanjem i taloženjem navedenih spojeva s ostacima stanica grožđa, kvasaca, različitih polisaharida i topljivih proteina. Tijekom dozrijevanja koncentracija proantocijanidina i dalje opada zbog polimerizacije (Garrido i Borges, 2013; Jackson, 2020). Ne postoje jednostavni ili izravni načini za precizno predviđanje sastava i strukture proantocijanidina u vinu iz sastava grožđa (Adams i Scholz, 2008). Prema tome, iskustvo je najbolji vodič vinara. Tijekom starenja vina

proantocijanidini se polako polimeriziraju s monomernim (+)-katehinima stvarajući polimere od 8-14 podjedinica, a molarna masa im iznosi od 2000 do 5000 Da (Jackson, 2020).

2.3. SENZORSKE KARAKTERISTIKE PROANTOCIJANIDINA GROŽĐA I VINA

Senzorska svojstva proantocijanidina uvjetovana s njihovom strukturom odnosno kemijskim karakteristikama (Vidal i sur., 2003). Ovi spojevi značajni su za senzorsku kvalitetu crnog vina kao nositelji senzorskih svojstava gorčine i trpkocē, ali i uloge u dugotrajnoj stabilnosti boje vina koja je omogućena kemijskim reakcijama stabilizacije s antocijaninima (Chira i sur., 2009; Lorrain i sur., 2011; Teissedre i Jourdes, 2013).

Naime, gorčina i trpkocā su dva osjeta od ključne važnosti za opisivanje senzorskih svojstava vina. Gorčina je okus posredovan senzorskim receptorima i uzrokovan taninima s najmanjom molarnom masom, a trpkocā je taktilni osjet (Vidal i sur., 2003; Teissedre i Jourdes, 2013; Fontoin i sur., 2008). Također, gorčina je ograničena na male molekule s posebnim strukturnim značajkama koje im upravo omogućuju da uđu u receptor i aktiviraju proces transdukcije signala, dok trpkocā ovisi o broju mjesta za interakcije proteina u molekuli i povećava se njegovom veličinom (Cheynier i sur., 2006).

Trpkocā se u prvom redu pripisuje proantocijanidinima veće molekulske mase (Vidal i sur., 2004). Proantocijanidini svojim hidroksilnim skupinama vežu za glikoproteine sline i time se ispoljava osjećaj suhoće, hrapavosti i stezanja u ustima, uzrokovan gubitkom vlažnosti (Lee i Lawless, 1991; Vidal i sur., 2003). Ovo svojstvo mogu ispoljiti zbog svoje sposobnosti da se snažno vežu za proteine (Teissedre i Jourdes, 2013). Također, u opsežnom pregledu Gawel i sur. (1998) navode kako se složeni fenomen percepcije trpkocē pripisuje taloženju ili stvaranju kompleksa proteina sline koji dovode do manjeg vlaženja slinom i povećanog trenja između površine usta.

Bez obzira na strukturne razlike, proantocijanidini pokožice i sjemenki pridonose percepciji trpkocē vina (Downey i sur., 2003a; Kennedy, 2008). Srednji stupanj polimerizacije (mDP) je najznačajnija strukturalna varijabla koja utječe na trpkocū, ali i gorčinu (Monagas i sur., 2003; Chira i sur., 2009; Kennedy, 2008; Lorrain i sur., 2011). Proantocijanidini s niskim mDP gorčiji od onih s visokim mDP, dok monomeri ipak imaju najveću gorčinu (Peleg i sur., 1999; Landon i sur., 2008; McRae i Kennedy, 2011; Gonzalo-Diago i sur., 2014). Trpkocā većih polimera proantocijanidina (mDP od 3 do 20) ovisi o molekularnoj masi, stupnju

galoilacije i trihidroksilaciji B prstena (Vidal i sur., 2003). Prema istraživanju Vidal i sur. (2003) viši stupanj galoilacije je odgovoran za povećanje „grubosti“, dok ju trihidroksilacija B prstena može smanjiti. Nadalje, oligomeri proantocijanidina su manje trpki od velikih polimera, slabije se vežu za proteine i topljiviji su (Teissedre i Jourdes, 2013), dok se topljivost polimernih proantocijanidina povećava se pod utjecajem etanola i pH (Vidal i sur., 2003).

Složene interakcije proantocijanidina i ostalih makromolekula u vinu, primjerice sposobnost stvaranja kompleksa s peptidima i proteinima (Sarni-Manchado i Cheynier, 2002), utječu na mijenjanje percepcije osjećaja u ustima (Teissedre i Jourdes, 2013). Također, na percepciju trpkocće u vinu mogu utjecati i mnoge komponente koje se nalaze u njemu uključujući etanol, kiselost, viskoznost, jednostavne šećere, polisaharide i antocijanine (Fontoin i sur., 2008). Štoviše proantocijanidini i kiseline se uravnotežuju etanolom, šećerima i polisaharidima vina, a optimalna kvaliteta crnog vina postiže se upravo balansom navedenih komponenata (Teissedre i Jourdes, 2013).

2.4. PROMJENE U SASTAVU PROANTOCIJANIDINA TIJEKOM DOZRIJEVANJA I STARENJA VINA

2.4.1. Kemijske promjene proantocijanidina tijekom dozrijevanja i starenja vina

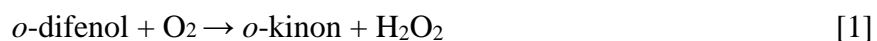
Tijekom proizvodnje vina te dalje njegovog dozrijevanja i starenja, dolazi do brojnih kemijskih promjena u sastavu fenolnih spojeva, gdje su u proizvodnji crnog vina, za njegovu kvalitetu, najznačajnije promjene u sastavu proantocijanidina i antocijana (Garrido i Borges, 2013; Jackson, 2020). Navedene kemijske promjene obuhvaćaju reakcije poput kopigmentacije, polimerizacije i oksidacije (Garrido i Borges, 2013; Pérez-Magariño i González-San José, 2004; Monagas i sur., 2006). Ove enzimatske i nenzimatske reakcije započinju odmah nakon prerade grožđa i nastavljaju se tijekom fermentacije i dozrijevanja, doprinoseći bitnim promjenama u senzorskim svojstvima vina (Guadalupe i sur., 2010; Sun i Spranger, 2005). Naime, promjena boje od ljubičaste nijanse mladih crnih vina do tona nijanse starijih vina pripisuje se reakcijama antocijana grožđa s proantocijanidinima odnosno formiranju novih polimernih pigmenata (Somers, 1971). Slično tome, smanjenje trpkooće tijekom dozrijevanja i starenja vina proizlazi iz polimerizacije proantocijanidina i/ili stvaranja polimernih pigmenata (Cheynier i sur., 2006).

Proantocijanidini su reaktivne molekule, koje sudjeluju u reakcijama oksidacije, enzimatskog posmeđivanja, interakcijama s proteinima i reakcijama kondenzacije tijekom starenja vina (Monagas i sur., 2003; Vidal i sur., 2003). Naime, tijekom starenja se proantocijanidini polako povezuju s monomernim flavan-3-olima, stvarajući polimere dužine od 8 do 14 jedinica. Kako se veličina polimera povećava, oni postaju sve netopljiviji, formiraju talog svojstven za starija crna vina i na kraju više ne mogu učinkovito reagirati (Jackson, 2020; Vidal i sur., 2004; Teissedre i Jourdes, 2013). Stoga su te promjene uglavnom vezane za smanjenje koncentracije proantocijanidina do kojeg dolazi zbog njihova taloženja, povezivanja s antocijanima (direktno ili indirektno) i smanjenja mDP uzrokovanog cijepanjem podjedinica (Cheynier i sur., 2006; Chira i sur., 2012). Međutim, paralelno s formiranjem, dolazi i do cijepanje dijela interflavanskih veza. Formiranje i cijepanje interflavanskih veza određuje raspodjelu tanina po veličini u vinima (Haslam, 1980). Posljedično raspodjela veličine frakcije tanina ovisi o omjeru flavanol monomera i polimera. U istraživanju Vidal i sur. (2003) navode kako se u uzorku vina koji ima višak monomera smanjio mDP. Ova reakcija cijepanja i vezanja odvija se pri niskom pH (2-3,2), ali ne može se dogoditi iznad pH 3,8 (Salas i sur., 2003).

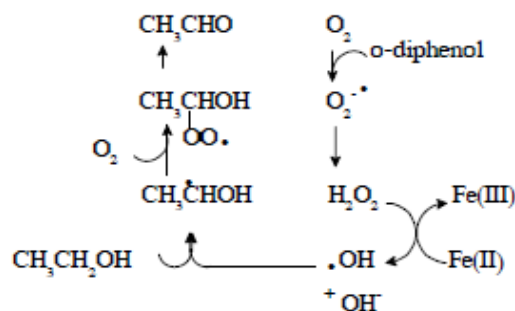
Nadalje, proantocijanidini i njihovi veći polimeri mogu se kondenzirati s antocijanima i polisaharidima. Proantocijanidini mogu sudjelovati u stvaranju višestrukih vodikovih veza, ali i u hidrofobnim interakcijama s polisaharidima grožđa i staničnih stijenki kvasaca i proteinima (Jackson, 2020). Temperatura ima značajan utjecaj na postupnu razgradnju proantocijanidina, dok ju prisutnost SO₂ usporava (Dallas i sur., 1995). Istovremeno, tijekom starenja crnog vina dolazi do pada koncentracije antocijana odgovornih za početne ljubičaste nijanse mladog vina i formiranja stabilnijih obojenih polimernih pigmenta (Somers, 1971). Novonastali pigmenti rezultat su reakcije kondenzacija antocijana s drugim fenolinim spojevima kao što su (+)-katehin ili procijanidini, a mogu se odvijati direktno ili posredstvom aldehida (Jurd, 1967). U skladu s tim njihove strukturne modifikacije rezultiraju navedenom karakterističnom varijacijom boje, od ljubičasto-crvene boje u mladim vinima do ciglasto-crvene nijanse u starijim vinima (Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019).

Tijekom proizvodnje, dozrijevanja i starenja vina proantocijanidini prolaze kroz kemijske reakcije slijedeći dva glavna reakcijska puta (Vidal i sur., 2004). Prvi uključuje kondenzaciju posredovanu acetaldehidom između flavanola pri čemu nastaju etil povezani flavanoli (Atanasova i sur., 2002). Ova vrsta kondenzacije se može pojaviti i između antocijanina ili između antocijanina i flavanola. U potonjem slučaju mogu nastati etil povezani flavanol-antocijanini i piranoantocijanin-flavanoli (Es-Safi i sur., 1996; Revilla i González-San-José, 2001). Drugi reakcijski put uključuje izravne reakcije između flavanola i antocijanina pri čemu mogu nastati antocijanin-flavanol i flavanol-antocijanin adukti (Vidal i sur., 2004).

Kondenzacijske reakcije posredovanjem acetaldehida karakteristične su za oksidativne uvjete dozrijevanja i starenja. Oksidacijom nastaju dvije kemijske vrste koje reagiraju s polifenolima. Proizvodi izravne oksidacije poput semikinona ili kinona i aldehidi poput acetaldehida. Oksidacije i naknadna polimerizacija ovise o nekoliko čimbenika, uključujući dostupnost kisika i omjer antocijanina i flavanola (Cheynier i sur., 2006). Sumarna reakcija oksidacije je sažeta u sljedećoj reakciji:



Dalje, vodikov peroksid može oksidirati etanol u acetaldehid (Wildenradt i Singleton, 1974) u prisutnosti Fe (II) (slika 3).



Slika 3. reakcija oksidacije etanola u acetaldehid (Fulcrand i sur., 2006)

Izravne reakcije između kisika i organskih molekula poput polifenola nisu kemijski moguće, ali se one učinkovito kataliziraju tragovima metalnih iona, posebno željeza u kiseloj otopini (Jackson, 2020). Usljed navedenog, polimerizacija flavanola i polikondenzacija antocijana i flavanola posredovana aldehidom (Fulcrand i sur., 2006; Drinkine i sur., 2007; Teissedre i Jourdes, 2013) odvijaju se oksidativnim uvjetima. Prethodna istraživanja pokazala su da dodatak acetaldehida povećava brzinu kopolimerizacije antocijanin-flavan-3-ola (Picinelli i Bakker, 1994). Isto tako Dallas i sur (1996b) navode kako je prisutnost acetaldehida od velike važnosti za ubrzavanje kemijske transformacije fenolnih spojeva i induciranje nastanka novih produkata. Povećana koncentracija acetaldehida dovodi do povećane reaktivnosti procijanidina (Dallas i sur., 2003). Polimeri dobiveni polikondenzacijom posredstvom aldehida su nestabilni i bezbojni te podliježu drugim reakcijama (Fulcrand i sur., 2006; Jackson, 2020). Na ovu reakciju utječe niz parametara kao što su fenolni sastav, temperatura, pH, koncentracija sumpornog dioksida i prodiranje svjetlosti (Teissedre i Jourdes, 2013). Ako se kopolimeri nastave razvijati u tvari s višim stupnjem kondenzacije, tada se posljedično talože (Es-Safi i sur., 1999). U vinu kao kiselom mediju flavanoli podliježu i cijepanju (Vidal i sur., 2003). Kada reakcija krene u smjeru, depolimerizacije ili dehidracije, etilne veze nastale u polikondenziranom polimeru flavanola posredstvom acetaldehida, vrlo su labilne i cijepaju se u vinilflavanol oligomere (Drinkine i sur., 2007). Ti oligomeri tada mogu reagirati s antocijanima pri čemu nastaju flavanil piranoantocijanini (Fulcrand i sur., 2006; Cheynier i sur., 2006). Slijedeća reakcija koja se može dogoditi s polikondenziranim polimerima flavonoida je kondenzacija između dva A prstena polimera pri čemu nastaju ksantilijevi pigmenti (Fulcrand i sur., 2006). Krajnji proizvodi oksidacije flavanola drugim flavanolima ili aldehidima mnogo su stabilniji od matičnih flavanola.

Pored reakcija posredovanih kisikom odnosno acetaldehidom, u vinu se mogu odvijati i reakcije direktne kondenzacije flavanola i antocijanina (pojedinačno ili međusobno) koje ne uključuju kisik, a također su i dosta sporije (Fulcrand i sur., 2006; Tiessedre i Jourdes, 2013). Flavan-3-oli i proantocijanidini počinju se polimerizirati međusobno i sa slobodnim antocijaninima jer su topljivi i prema tome lako dostupni (Jackson, 2020). Postavljena su dva mehanizma za izravne reakcije antocijanina i flavanola koji dovode do adukata flavanol-antocijanin (F-A+) i antocijanin-flavanol (A+-F) (Fulcrand i sur., 2006). Ovi novi kompleksi posebno su važni za starenje vina. Oni stabiliziraju i zadržavaju crvenu boju antocijanina, te utječu na osjet povećanjem topljivosti flavonoidnih polimera koji kao takvi obično nisu trpki. Polimerizacija štiti antocijane od oksidacije i drugih kemijskih modifikacija kao što je sulfitna dekoloracija. Oko 25 % antocijana može biti polimerizirano (kovalentno vezano) s flavonoidnim ili neflavonoidnim fenolima do kraja fermentacije. Ovaj udio može porasti na 40 % ili više unutar jedne godine (Somers, 1982). Nakon toga, polimerizacija se nastavlja sporijim tempom sve dok se ne približi razini od 100 % nakon nekoliko godina. Zbog toga su polimeri (+)-katehina i proantocijanidina veoma bitni za dugoročnu stabilnost crnih vina (Jackson, 2020).

2.4.2. Utjecaj kemijskih promjena proantocijanidina tijekom dozrijevanja i starenja vina na senzorske karakteristike

Dozrijevanje i starenje vina je proces u kojem se organoleptička svojstva mijenjaju kao rezultat niza kemijskih reakcija čiji je cilj jačanje određenih željenih karakteristika te istovremeno smanjenje ili uklanjanje onih nepoželjnih (Tiessedre i Jourdes, 2013).

Tijekom dozrijevanja i starenja dolazi do promjene koncentracije te molarne mase proantocijanidina uslijed reakcija oksidacije, polimerizacije, međutim također i do formiranja novih polimernih pigmenta uslijed reakcija kondenzacije s antocijaninima (Cheynier i sur., 2006). Ove kemijske promjene proantocijanidina primarno utječu na promjene trpkocće vina, međutim isto tako pridonose i promijeni boje (Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019).

Naime, tijekom dozrijevanja i starenja u molekulama proantocijanidina dolazi do cijepanja i formiranja interflavanskih veza koje za posljedicu imaju formiranje bilo velikih polimernih kompleksa koji nakon određenog vremena percipitiraju ili manjih molekula koje ostaju otopljene u vinu (Cheynier i sur., 2006). Navedene reakcije odgovorne su za smanjenje koncentracije kao i stupnja polimerizacije proantocijanidina, a poznato je kako su upravo

koncentracija proantocijanidina te njihova struktura (stupanj polimerizacije i galoilacije) u pozitivnoj korelaciji sa samom percepcijom trpkooće. Dakle, smanjenjem koncentracije te molekulske mase proantocijanidina tijekom dozrijevanja i starenja dolazi i do smanjenja trpkooće. (Teissedre i Jourdes, 2013). Mlada crna vina koja sadrže veće koncentracije poantocijanidina veće molekulske mase, zbog navedenog se primarno opisuju kao trpka, dok dozrijevanjem i starenjem vina dolazi do smanjenja trpkooće te mekšanja i zaokruživanja okusa uslijed smanjene koncentracije proantocijanidina, kao i njihove molekulske mase (Chira i sur., 2011; González-Neves i sur., 2004; Pérez-Magariño i González-San José, 2004). Prema rezultatima Chira i sur. (2012) dobivenim analizom vina Cabernet Sauvignon, blagi intenzitet trpkooće kod starih vina povezan je sa mDP vrijednostima od 2-4, dok je značajno veći intenzitet trpkooća kod mladih crnih vina povezan sa mDP vrijednošću od oko od 7.6.

Nadalje, smanjenje trpkooće tijekom dozrijevanja i starenja vina također proizlazi i iz reakcija kondenzacije proantocijanidina i antocijana. Naime, polimerni pigmenti koji se formiraju navedenim reakcijama, nastali bilo direktnom kondenzacijom ili posredovanjem acetaldehidom, mogu dovesti do smanjene trpkooće u crnom vinu, pod uvjetom da su prisutni u dovoljnim količinama (Vidal i sur, 2004). Istovremeno, novonastali polimerni pigmenti pridonose promjeni, ali i stabilizaciji same boje, pri čemu su antocijan-flavanol adukti crvene boje (Salas i sur., 2004) ili bezbojni (Cheynier i sur., 2006), dok su etilno vezani adukti ljubičastog obojenja (Atanasova i sur., 2002).

Također, osim sastava i strukture proantocijanidina važno je napomenuti da percepcija trpkooće vina ovisi o interakciji s drugim sastojcima vina poput etanola, glicerola, soli, kiselina i makromolekula (Cheynier i sur., 2006) te je svakako potrebno uložiti daljnje napore u razumijevanje kompleksnih mehanizama koji se odvijaju tijekom dozrijevanja i starenja vina i njihovom utjecaju na senzorske karakteristike, a posebice trpkooću vina.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci vina Cabernet Sauvignon

U ovom radu korišteni su uzorci mladog crnog vina Cabernet Sauvignon (Erdutski vinogradi d.o.o., Erdut, Hrvatska), proizvedeno 2017. godine. Vino je punjeno u boce koje su prethodno propuhane dušikom (1,5 min) kako bi se iz njih uklonio kisik. Napunjene boce su zatvorene plutenim čepom uz pomoć ručne čepilice te su skladištene u vodoravnom položaju pri kontroliranim uvjetima (u tami, pri 14 °C). Uzorci vina analizirani su na početku eksperimenta (0 mjeseci) te nakon 3, 6 i 12 mjeseci starenja u bocama. Osnovni fizikalno-kemijski parametri 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 |

3.1.2. Kemikalije

- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Etanol (96 %), Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- Destilirana voda
- Mravlja kiselina (98-100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Acetonitril (100 %), HPLC čistoće, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska

- Metanol (100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- (+)-Katehin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- (-)-Epikatehin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Procijanidin dimer B1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Procijanidin dimer B2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Spektrofotometar (Specord 50 Plus), AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD
- HPLC Agilent Technologies 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
 - Temostatirani odjeljak za kolonu (TCC SL) G1316B
 - FL detektor (FLD) G7121B
 - Agilent Chemstation Softver

Pribor:

- Mikropipete od 100 i 1000 μ L, Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD
- Staklene tube za hidrolizu, Pirex, Corning, NY, SAD
- Pipete volumena 10, 20, 25 mL
- Odmjerne tikvice volumena 10, 25, 50, 100 i 1000 mL
- Staklene epruvete
- Plastična ladica za vaganje
- Staklene kivete od 1 cm

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje ukupnih proantocijanidina

Princip:

Ukupni proantocijanidini (kondenzirani tanini) određeni su Bate-Smith metodom temeljenoj na kiselinskoj hidrolizi na temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1966). Razlika obojenja između zagrijanog, hidroliziranog i nehidroliziranog uzorka držanog na sobnoj temperaturi određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 550 nm, a pokazuje količinu ukupnih antocijanidina u uzorku.

Postupak:

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

Račun:

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

$$\text{Proantocijanidini (g L}^{-1}\text{)}=19,33 \times (D_1-D_2) \quad [2]$$

gdje je:

19,33- faktor preračunavanja

D₁- optička gustoća hidroliziranog uzorka

D₂-optička gustoća nehidroliziranog uzorka

3.2.2. Određivanje flavan-3-ol monomera i dimera primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Princip:

Flavan-3-ol monomeri i dimeri određeni su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). 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 fluorescentnom detektoru. Identifikacija je provedena usporedbom retencijskih vremena standarda i spojeva, a kvantifikacija pomoću kalibracijskih krivulja vanjskih standarda.

Postupak:

Sastav flavan-3-ol monomera [(+)-katehin i (-)-epikatehin] i dimera (dimer B1, B2, B3 i B4)] u vinima određen je prema metodi Ćurko i sur. (2014) uz manje modifikacije. Razdvajanje je provedeno na LiChrosphere RP-18 koloni, dimenzija 250 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Njemačka) uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 99,5:0,5; v/v) i otapalo B (acetonitril/mravlja kiselina; 99,5:0,5; v/v). Pripremljene mobilne faze su filtrirane i odzračene kako bi došlo do ravnomjernog razdvajanja na koloni. Razdvajanje flavan-3-ol monomera i dimera provedeno je pri protoku od 1 mL min⁻¹ i temperaturi od 35 °C, a gradijent korišten za razdvajanje naveden je u tablici 2. Injektirani volumen uzorka vina kod svake analize iznosio je 20 µL. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu.

Tablica 2. Gradijent korišten za razdvajanje flavan-3-ola monomera i dimera

| t (min) | A (%) | B(%) | Protok (mL min⁻¹) |
|----------------|--------------|--------------|-------------------------------------|
| 0 | 97 | 3 | 1 |
| 13 | 92 | 8 | 1 |
| 18 | 92 | 8 | 1 |
| 20 | 90 | 10 | 1 |
| 45 | 90 | 10 | 1 |
| 50 | 0 | 100 | 1 |
| 54 | 0 | 100 | 1 |
| 55 | 97 | 3 | 1 |
| 60 | 97 | 3 | 1 |

Detekcija je provedena na fluorescentnom detektoru uz valnu duljinu ekscitacije $\lambda_{Ex} = 280$ te valnu duljinu emisije $\lambda_{Em} = 320$. Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena (vremena zadržavanja) spoja s retencijskim vremenom standarda te usporedbom s metodom Čurko i sur. (2014). Kvantifikacija je provedena koristeći kalibracijske krivulje vanjskih standarda (katehin, epikatehin, dimer B1, dimer B2). Otopina svakog standarda pripravljena je u 5 različitih koncentracija (5, 10, 25, 50, 100 mg/L). S obzirom na ovisnost površine pikova o masenoj koncentraciji standarda nacrtan je baždarni pravac, na osnovu kojega je izračunata pripadajuća jednadžba pravca. Iz jednadžbe baždarnog pravca standarda izračunate su kvantitativne vrijednosti pojedinačnih procijanidina (flavan-3-ol monomera i dimera) u mg L^{-1} . Koncentracije dimera B3 i dimera B4 izražene su ekvivalentima dimera B1 kao najzastupljenijeg dimera (mg L^{-1}). Ukupni flavan-3-ol monomeri izračunati su kao suma koncentracije (+)-katehina i (-)-epikatehina, a ukupni flavan-3-ol dimeri kao suma koncentracije procijanidin dimera B1, B2, B3 i B4.

4. REZULTATI I RASPRAVA

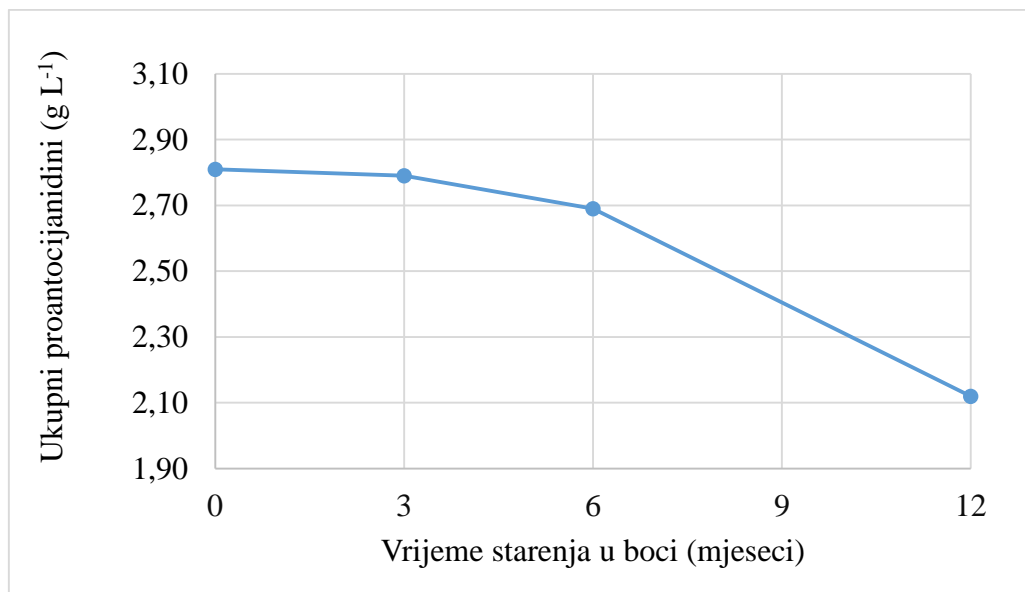
U ovom diplomskom radu istražena je stabilnost proantocijanidina vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci u kontroliranim uvjetima (u tami pri temperaturi od 14 °C). Uzorkovanje je provedeno nakon 3, 6 i 12 mjeseci starenja u bocama, a dobiveni rezultati uspoređeni su s onima prije postavljanja pokusa starenja (0 mjeseci).

Promjene u sastavu ukupnih proantocijanidina određene su spektrofotometrijski, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 4 i tablici 3. Promjene u sastavu flavan-3-ol monomera [(+)-katehin i (-)-epikatehin] te flavan-3-ol dimera (procijanidin B1, B2, B3 i B4) određene su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC/DAD), a dobiveni rezultati prikazani su na slikama 5-12 te u tablicama 4-9.

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

Tijekom proizvodnje, a tako i tijekom dozrijevanja i starenja vina dolazi do brojnih kemijskih promjena u koncentraciji, ali i samoj strukturi polifenolnih spojeva. Među navedenim promjenama, one u sastavu proantocijanidina ključne su za kvalitetu crnog vina obzirom da su navedeni spojevi kvantitativno jedna od najzastupljenijih polifenolnih frakcija. Naime, udio oligomera i polimera proantocijanidina u crnom vinu iznosi između 20-50 % ukupnog fenolnog sastava (Teissedre i Jourdes, 2013). Također, proantocijanidini vina važni su i kao nositelji senzorskog svojstva trpkocće i okusa gorčine (Chira i sur., 2012), a sve kemijske promjene u sastavu ovih spojeva odražavaju se na promjene dviju navedenih senzorskih karakteristika.

Promjene u koncentraciji ukupnih proantocijanidina vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci prikazane su na slici 4. Rezultati na slici iskazani su u g L^{-1} zbog bolje preglednosti. Iz rezultata je vidljivo da koncentracija proantocijanidina opada tijekom vremena. U prva tri mjeseca starenja utvrđen je tek neznatan pad koncentracije ukupnih proantocijanidina. S druge strane, nakon šest mjeseci starenja pad koncentracije bio je nešto veći, dok je najznačajniji pad u koncentraciji proantocijanidina uočen nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Koncentracija ukupnih proantocijanidina na početku pokusa (0 mjeseci) iznosila je $2,81 \text{ g L}^{-1}$, dok u uzorku vina koje je dozrijevalo 12 mjeseci iznosila $2,12 \text{ g L}^{-1}$. Nadalje, dinamika smanjenja koncentracije ukupnih proantocijanidina ($\Delta \text{ mg L}^{-1}$ i $\Delta \%$) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početnu koncentraciju proantocijanidina



Slika 4. Promjene u koncentraciji ukupnih proantocijanidina (g L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 3. Dinamika smanjenja koncentracije ukupnih proantocijanidina (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

| Ukupni proantocijanidini | | | |
|---------------------------------|-----------|-----------|------------|
| | 3 mjeseca | 6 mjeseci | 12 mjeseci |
| Δ mg L ⁻¹ | -19,67 | -125,13 | -689,72 |
| Δ % | -0,7 | -4,5 | -24,5 |

prije postavljanja pokusa starenja prikazana je u tablici 3. Dobiveni rezultati pokazuju značajno manje promjene u sastavu ukupnih proantocijanidina vina tijekom prvih 6 mjeseci starenja od onih tijekom posljednjih 6 mjeseci. Naime, nakon 12 mjeseci starenja vina u boci došlo je do ukupnog smanjenja koncentracije od 689,72 mg L⁻¹, što je za 24,5 % niže od koncentracije proantocijanidina utvrđene na početku postavljanja pokusa.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s istraživanjem Cosme i sur. (2009), gdje je tijekom prvih 6 mjeseci kod sorti Touriga Nacional, Trincadeira, Castelão, Syrah i Cabernet Sauvignon također utvrđen pad koncentracije proantocijanidina. Naime, proantocijanidini su reaktivne molekule koje tijekom dozrijevanja i starenja sudjeluju u brojnim kemijskim

reakcijama, kao što su reakcije oksidacije i polimerizacije te kondenzacije s drugim polifenolnim spojevima, posebice antocijanima. (Monagas i sur., 2003; Vidal i sur., 2003). U kiselom mediju kao što je vino tijekom starenja dolazi do cijepanja i formiranja novih interflavanskih veza, a time i do promjene u koncentraciji, kao i u stupnju polimerizacije proantocijanidina. Primjerice, polimeri flavan 3-ola povezuju se s monomerima i dimerima, nakon čega velike molekule precipitiraju. Naime, povezivanjem molekula, veličina polimera raste, oni postaju netopljivi, ne mogu više učinkovito reagirati i na kraju formiraju talog svojstven za crna vina (Jackson, 2020). S druge strane, flavan-3-oli srednjeg i manjeg stupnja polimerizacije ostaju otopljeni vinu. Na ovaj način zapravo dolazi do smanjenja koncentracije kao i smanjenja stupnja polimerizacije (mDP vrijednosti) proantocijanidina, koji za posljedicu imaju smanjenje trpkocće i zaokruženje samog okusa tijekom dozrijevanja i starenja (Cheynier i sur., 2006). Nadalje, na smanjenje koncentracije proantocijanidina, a time i trpkocće vina također utječu i reakcije kondenzacije proantocijanidina i antocijana. Osim navedenog, novonastali polimerni pigmenti također značajno pridonose stabilizaciji boje vina tijekom starenja te uzrokuju promjenu boje od ljubičaste nijanse mladih crnih vina do tona ciglaste nijanse starijih vina (Somers, 1971). Također, prilikom dozrijevanja i starenja vina, izloženost vina kisiku ima značajan utjecaj na kemijske promjene u sastavu i proantocijanidina i antocijana. Naime, u oksidativnim uvjetima tijekom dozrijevanja i starenja vina uslijed oksidacije etanola dolazi do proizvodnje acetaldehida, odnosno formiranja etilno vezanih polimera proantocijanidina, ali i obojenih polimernih pigmenta (Saucier, 2010). S druge strane, reduktivni uvjeti favoriziraju formiranje direktnih adukata proantocijanidina i antocijana (Cheynier i sur., 2006) .

Iako su rezultati ovog istraživanja komparabilni s onima dobivenih u studiji Cosme i sur. (2009), ipak u spomenutoj studiji tijekom prvih 6 mjeseci dozrijevanja utvrđen je nešto intenzivniji pad koncentracije. Razlog ovog odstupanja mogao bi se objasniti činjenicom starenja vina u različitim uvjetima. Naime, proantocijanidini kao fenolni spojevi posjeduju svojstvo antioksidacijskog djelovanja. Tijekom starenja u bačvi vino je izloženo kisiku pa se koncentracija proantocijanidina brže smanjuje kako bi stabilizirala vino. Starenje u bocama, suprotno od samog dozrijevanja u bačvama predstavlja manje oksidativne uvjete, gdje kontakt vina i kisika u najvećoj mjeri ovisi o korištenom tipu čepa, odnosno njegovoj propusnosti za kisik (Chira i sur., 2012). Nadalje, istraživanje Recamales i sur., 2006 također je pokazalo smanjenje koncentracije fenolnih spojeva tijekom 12 mjeseci starenja u boci, a također utvrđeno

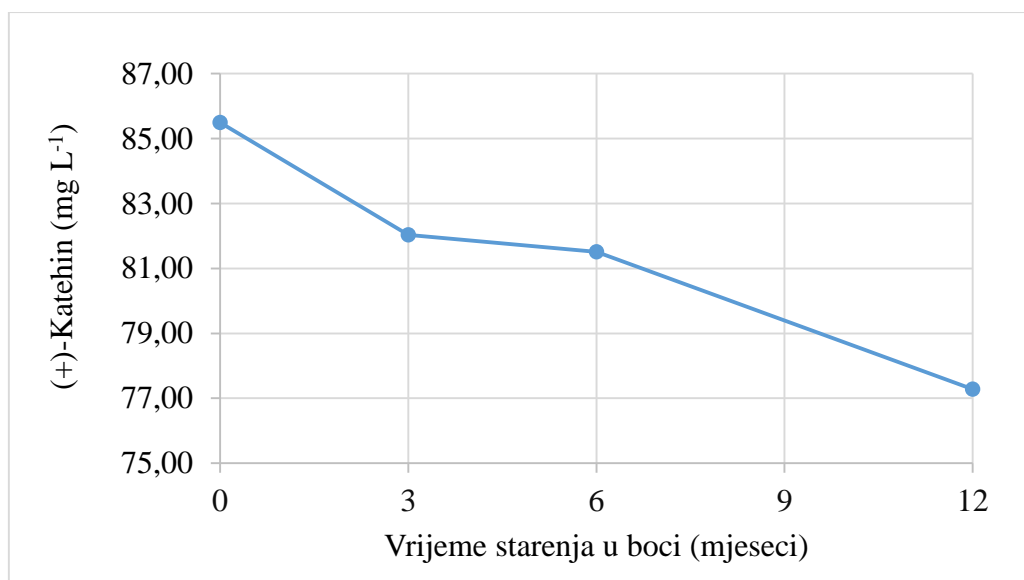
je kako izloženost vina svjetlosti, temperatura kao i položaj boce tijekom starenja imaju značajan utjecaj na intenzitet navedenih kemijskih promjena.

4.2. STABILNOST FLAVAN-3-OLA VINA CABERNET SAUVIGNON TIJEKOM 12 MJESECI STARENJA U BOCI

4.2.1. Flavan-3-ol monomeri

(+)-Katehin i (-)-epikatehin su glavni predstavnici flavan-3-ol monomera grožđa i vina te se smatraju prekursorima u sintezi proantocijanidina (Terrier i sur., 2009). Navedeni flavan-3-ol monomeri prvenstveno utječu na okus gorčine (Lorrain i sur., 2011).

Promjene u koncentraciji flavan-3-ol monomera (+)-katehina i (-)-epikatehina vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u bocama prikazane su na slikama 5 i 6, dok je

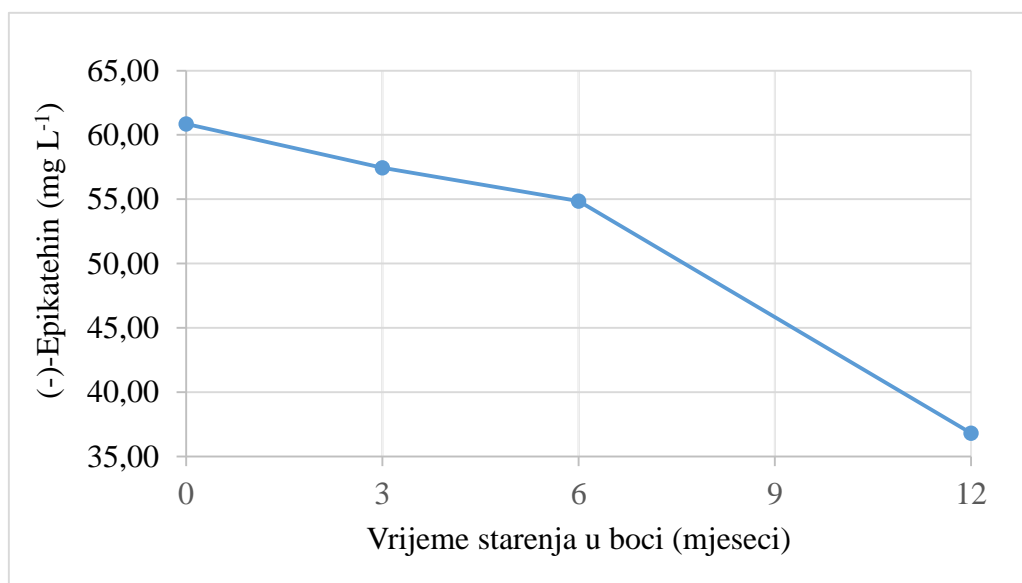


Slika 5. Promjene u koncentraciji (+)-katehina (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 4. Dinamika smanjenje koncentracije (+)-katehina (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

| (+)-Katehin | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|------------|
| | 3 mjeseca | 6 mjeseci | 12 mjeseci |
| Δ mg L ⁻¹ | -3,46 | -3,98 | -8,21 |

| | | | |
|------------|------|------|------|
| Δ % | -4,1 | -4,7 | -9,6 |
|------------|------|------|------|



Slika 6. Promjene u koncentraciji (-)-epikatehina (mg L^{-1}) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 5. Dinamika smanjenja koncentracije (-)-epikatehina ($\Delta \text{mg L}^{-1}$ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

| (-)-Epikatehin | | | |
|---------------------------|-----------|-----------|------------|
| | 3 mjeseca | 6 mjeseci | 12 mjeseci |
| $\Delta \text{mg L}^{-1}$ | -3,41 | -6,00 | -24,03 |
| Δ % | -5,6 | -9,9 | -39,5 |

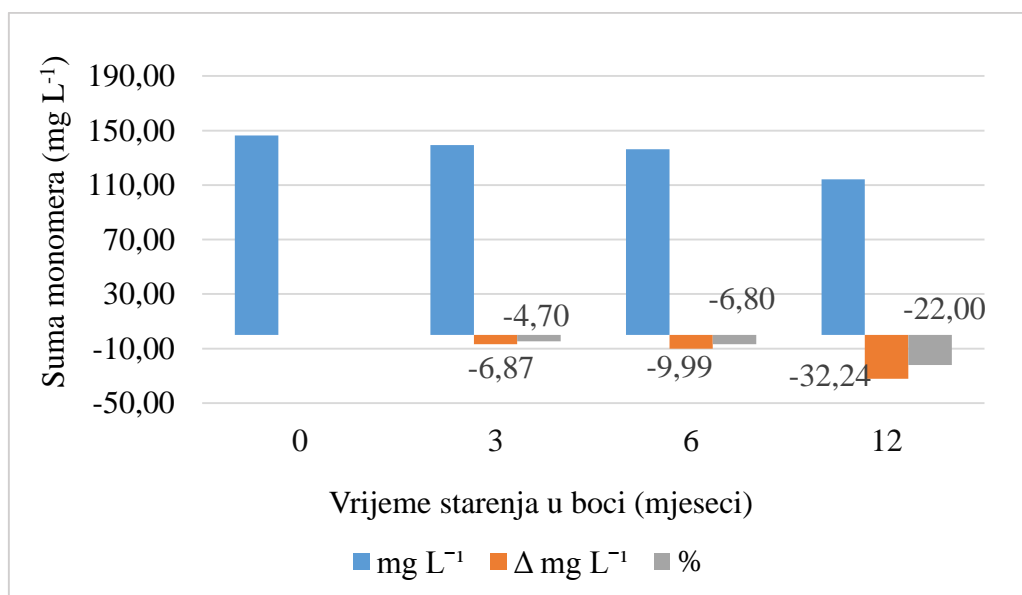
dinamika smanjenja koncentracije dvaju spojeva u $\Delta \text{mg L}^{-1}$ te Δ % u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci) prikazana u tablicama 4. i 5. U skladu s ranijim istraživanjima, u analiziranom vinu utvrđene su veće koncentracije (+)-katehina nego (-)-epikatehina, a navedeni trend između dva flavan-3-ola zadržan je i tijekom cijelog perioda starenja u bocama (Ćurko i sur., 2014). Ipak, iako je (-)-epikatehin bio prisutan u nešto nižoj koncentraciji, važno je napomenuti kako navedeni spoj ima veći maksimalni intenzitet i trajanje podražaja gorčine i trpkoće u odnosu na (+)-katehin, uslijed čega jednako pridonosi senzorskim karakteristikama vina (Vidal i sur., 2004).

Značajan pad koncentracije (+)-katehina i (-)-epikatehina (slika 5 i 6) utvrđen tijekom 12 mjeseci starenja u boci u skladu je s ranijim istraživanjem Pérez-Magariño i González-San José (2004), gdje je također potvrđen identičan trend tijekom starenja posebice u vinu sorte Cabernet Sauvignon. Naime, tijekom starenja se proantocijanidini polako povezuju s monomernim flavan-3-olima stvarajući polimere od 8 do 14 jedinica, a kao posljedica navedenih kemijskih promjena dolazi do smanjivanja koncentracije monomera flavan-3-ola (Teissedre i Jourdes, 2013).

Nadalje, istraživanje Marquez i sur. (2014) pokazalo je kako se koncentracija flavan-3-ola male molekulske mase tijekom starenja smanjuje uslijed efekta njihove konverzije u tanine većih molekulskih masa, a također, monomeri flavan-3-ola sudjeluju i u reakcijama kondenzacije s antocijaninima pri čemu dolazi do stabilizacije boje vina (Jackson, 2020).

Iako je sastavu oba flavan-3-ola zamijećen pad koncentracije tijekom dozrijevanja, usporedbom rezultata u tablici 4 i 5 uočene su značajne razlike u samoj dinamici pada koncentracije, posebice s vremenom dozrijevanja. Primjerice, nakon 6, a posebice nakon 12 mjeseci starenja u sastavu (-)-epikatehina uočen je značajan pad koncentracije od čak 39,5 % od onog u sastavu (+)-katehina gdje je dobivena vrijednost iznosila svega 9,6 %. Dobiveni rezultati upućuju na značajno veću stabilnost (+)-katehina tijekom navedenog perioda starenja od one (-)-epikatehina. Također, iz priloženog može se zaključiti kako je (-)-epikatehin tijekom 12 mjeseci starenja u bocama (posebice tijekom posljednjih 6 mjeseci) pokazao značajno veću reaktivnost od (+)-katehina.

Nadalje, stabilnost ukupnih flavan-3-ol monomera vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci izraženih kao suma (+)-katehina (-)-epikatehina prikazana je na slici 7. Rezultati upućuju na pad koncentracije flavan-3-ola tijekom dozrijevanja, dok promjene u sastavu (Δ) monomera izražene koncentracijom (mg L^{-1}) i postotcima (%) sugeriraju kako (-)-epikatehin, iako prisutan u manjoj koncentraciji također značajno pridonosi dobivenom trendu, posebice nakon 6 i 12 mjeseci istraživanja obzirom da je utvrđen pad koncentracije od 6,80 % odnosno 22,00 %. Također, dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Dallas i sur. (1996a), u kojem je također potvrđena visoka reaktivnost flavan-3-ol monomera, koji reagiraju brže od flavan-3-ol dimera.

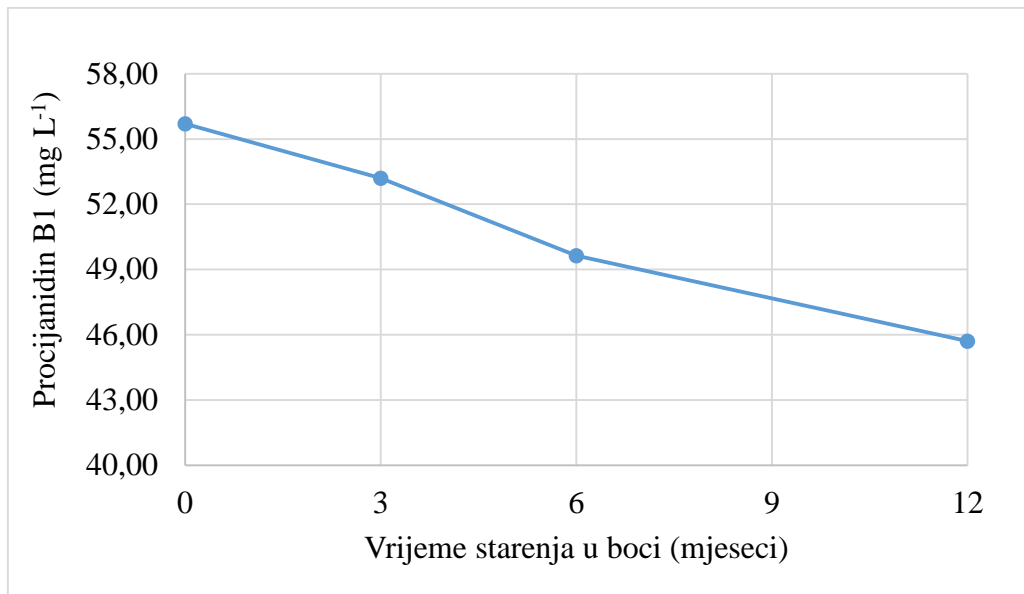


Slika 7. Stabilnost ukupnih flavan-3-ol monomera vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

4.2.2. Flavan-3-ol dimeri

U ovom radu ispitana je stabilnost flavan-3-ol dimera B1, B2, B3 i B4 kao najzastupljenijih dimera vinu koji su važni za njegovu kvalitetu kao nositelji senzorskog svojstva trpkocće te okusa gorčine. Navedene procijanidin dimere karakterizira C4-C8 veza, a razlikuju se u rasporedu početne i krajnje podjedinice koja može biti (+)-katehin ili (-)-epikatehin (Jackson, 2020). Obzirom da dimere karakterizira i veći srednji stupanj polimerizacije (mDP) od monomera, ovi spojevi istodobno imaju i veću trpkocću, ali istodobno i nešto nižu gorčinu (Chira i sur., 2009). Promjene u koncentraciji pojedinačnih flavan-3-ol dimera (B1, B2, B3 i B4) tijekom 12 mjeseci starenja u boci prikazani su na slikama 8-11, dok je dinamika smanjenja njihove koncentracije u Δ mg L⁻¹ te Δ % odnosu na početnu vrijednost prije postavljanja pokusa (0 mjeseci) prikazana u tablicama 6-9.

Među analiziranim dimerima, procijanidin dimer B1 bio je najzastupljeniji procijanidin u mladom vinu. Ranija istraživanja također su pokazala kako je drugim sortama upravo dimer B1 dominantan dimer (Katalinić i sur. 2010). Nadalje, koncentracije dimera B2 u mladom vinu prije postavljanja pokusa starenja bile su neznatno niže od odnosu na B1, a slijedi ih dimer B4, dok je najniža koncentracija utvrđena u sastavu procijanidin dimera B3. Ipak, nakon 12 mjeseci



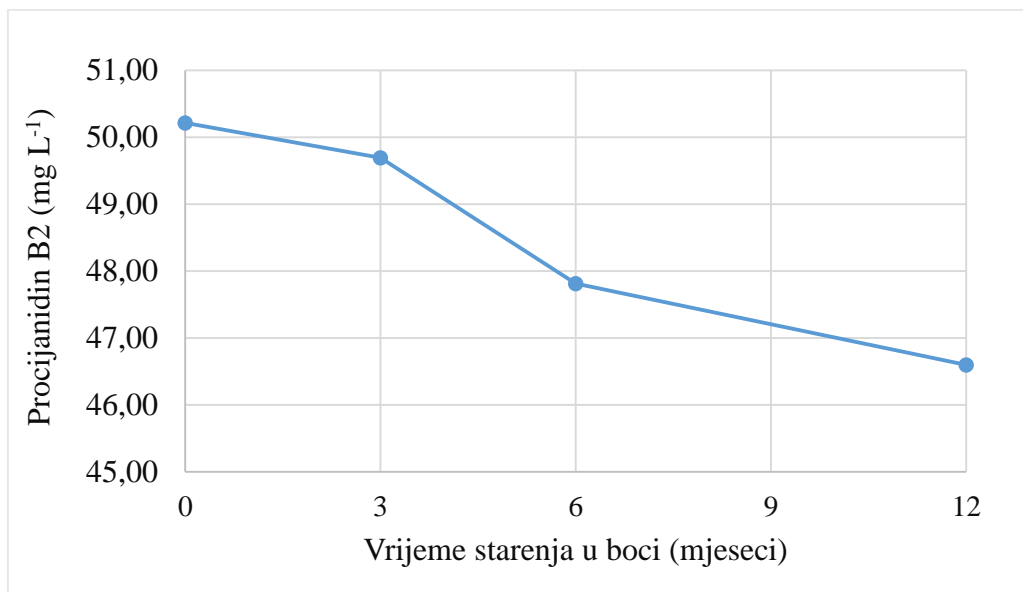
Slika 8. Promjene u koncentraciji procijanidina B1 (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 6. Dinamika smanjenja koncentracije procijanidina B1 (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

| Procijanidin B1 | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|------------|
| | 3 mjeseca | 6 mjeseci | 12 mjeseci |
| Δ mg L ⁻¹ | -2,5 | -6,06 | -9,98 |
| Δ % | -4,5 | -10,9 | -17,9 |

starenja između procijanidin dimera B1 i B2 zamijećen je suprotan trend, obzirom da je koncentracija dimera B2 bila nešto veća od one dimera B1, što bi se moglo objasniti činjenicom da je procijanidin B1 bio značajno reaktivniji.

Nadalje, uspoređujući slike 8-11 zamijećen je zajednički trend smanjenja koncentracije svih pojedinačnih flavan-3-ol dimera tijekom 12 mjeseci starenja u boci. Dobiveni rezultati u skladu su s ranijim istraživanjima koja su također utvrdila smanjenje koncentracije flavan-3-ol monomera i dimera tijekom perioda bilo dozrijevanja ili starenja vina (Chira i sur., 2012;



Slika 9. Promjene u koncentraciji procijanidina B2 (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 7. Dinamika smanjenja koncentracije procijanidina B2 (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

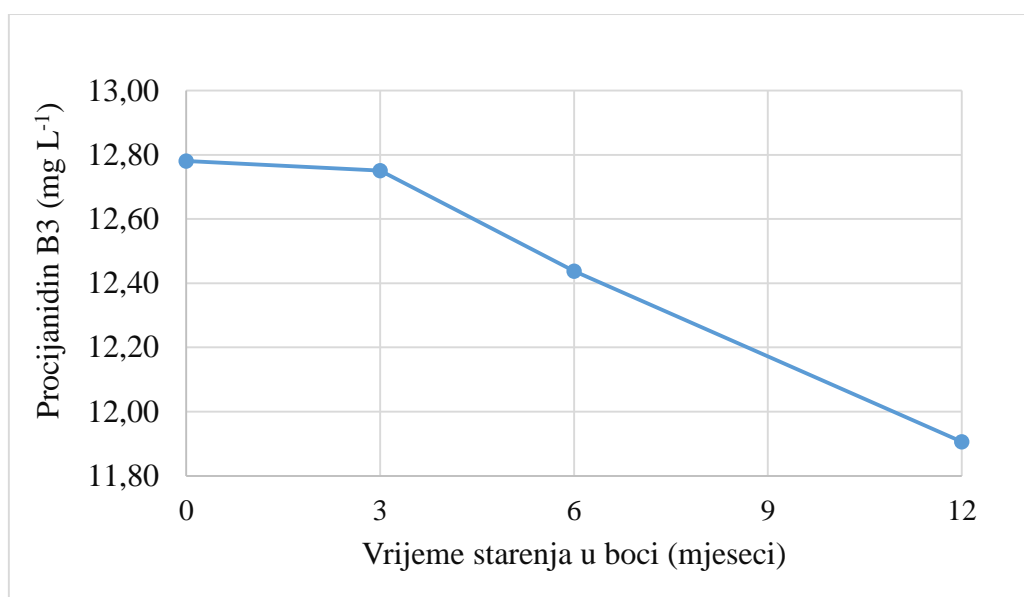
| Procijanidin B2 | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|------------|
| | 3 mjeseca | 6 mjeseci | 12 mjeseci |
| Δ mg L ⁻¹ | -0,5 | -2,04 | -3,62 |
| Δ % | -1,1 | -4,8 | -7,2 |

Marquez i sur., 2014; Teissedre i Jourdes, 2013). Primjerice, istraživanje provedeno na sortama Merlot, Syrah i Tempranillo pokazalo je kako tijekom 12 mjeseci dozrijevanja dolazi do značajnog smanjenja koncentracije flavan-3-ola kao posljedice sudjelovanja ovih spojeva u reakcijama polimerizacije i depolimerizacije flavanola te reakcijama kondenzacije s antocijanima i formiranja polimernih pigmenta (Marquez i sur., 2014).

Nadalje, iako su dobiveni rezultati pokazali zajednički trend smanjenja koncentracije kod svih pojedinačnih flavan-3-ol dimera tijekom starenja, značajne razlike utvrđene su u samoj dinamici smanjenja koncentracije (tablice 6-9). Procijanidin dimer B1 pokazao je gotovo linearan pad koncentracije tijekom analiziranog perioda dozrijevanja, implicirajući visoku

reaktivnost ovog spoja. Uistinu, usporedbom s ostalim flavan-3-ol dimerima, vidljivo je kako je upravo kod ovog spoja utvrđen najveći pad koncentracije u Δ % u svim pojedinačnim točkama analize, dakle nakon 3, 6 i 12 mjeseci starenja, s ukupnim smanjenjem koncentracije od čak 17,9 %.

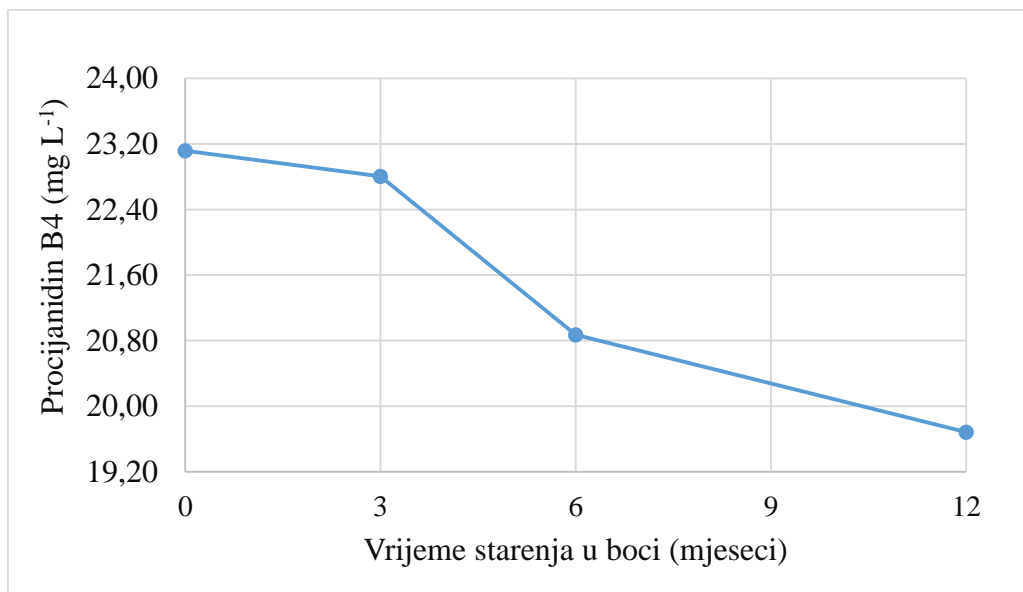
Promjene u sastavu procijanidin dimera B2 (tablica 7), a posebice dimera B3 (tablica 8) bile su značajno manje izražene od onih kod dimera B1. Naime, upravo kad procijanidina B3



Slika 10. Promjene u koncentraciji procijanidina B3 (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 8. Dinamika smanjenja koncentracije procijanidina B3 (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

| Procijanidin B3 | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|------------|
| | 3 mjeseca | 6 mjeseci | 12 mjeseci |
| Δ mg L ⁻¹ | -0,03 | -0,34 | -0,87 |
| Δ % | -0,2 | -2,7 | -6,8 |



Slika 11. Promjene u koncentraciji procijanidina B4 (mg L⁻¹) vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Tablica 9. Dinamika smanjenja koncentracije procijanidina B4 (Δ mg L⁻¹ te Δ %) tijekom 12 mjeseci starenja u boci u odnosu na početne vrijednosti (pri 0 mjeseci)

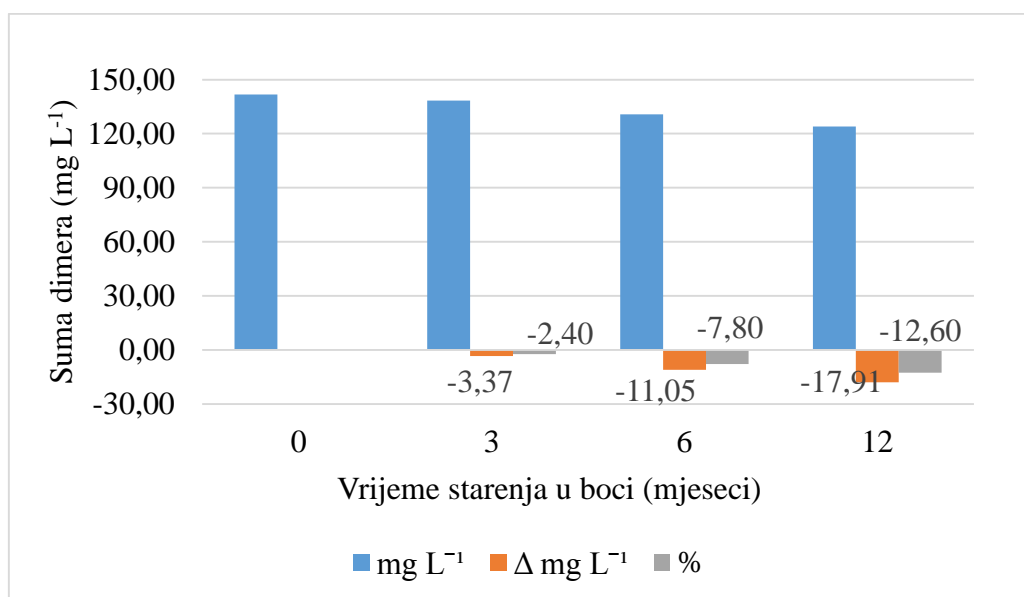
| Procijanidin B4 | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|------------|
| | 3 mjeseca | 6 mjeseci | 12 mjeseci |
| Δ mg L ⁻¹ | -0,31 | -2,25 | -3,44 |
| Δ % | -1,4 | -9,7 | -14,9 |

utvrđen je najmanji pad koncentracije u Δ % u svim pojedinačnim točkama analize, dakle nakon 3, 6 i 12 mjeseci starenja, s ukupnim smanjenjem koncentracije od 6,8 %.

S druge strane, iako su koncentracije procijanidin dimera B4 tijekom starenja bile značajno manje od dimera B1, trendovi uočeni u Δ % tijekom starenja (tablica 9) bili su međusobno vrlo slični, posebice tijekom posljednjih 6 mjeseci kad je izmjeren značajan pad koncentracije ovog dimera s vrijednošću od 14,9 % nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Dobiveni rezultati pokazuju kako je uz procijanidin dimer B1, dimer B4 također pokazao visoku reaktivnost tijekom perioda starenja u bocama.

Stabilnost ukupnih flavan-3-ol dimera vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci izraženih kako suma procijanidin dimera B1, B2, B3 i B4 prikazana je na slici 12. Dobiveni rezultati pokazuju pad koncentracije ukupnih flavan-3-ol dimera tijekom perioda starenja u boci, kao i dinamiku navedenih promjena ($\Delta \text{ mg L}^{-1}$, $\Delta \%$). Dobiveni rezultati upućuju na nešto slabiji intenzitet navedenih promjena tijekom prvih 3 mjeseca, kao i blago izraženiji intenzitet tijekom posljednjih 6 mjeseci s ukupnim smanjenjem koncentracije od 12,6 % nakon 12 mjeseci starenja u boci.

Usporedbom rezultata ukupnih flavan-3-ol monomera i dimera (slika 7 i 12) utvrđen je značajno veći intenzitet promjena ($\Delta \%$) u sastavu monomera, posebice tijekom zadnjih 6 mjeseci dozrijevanja, implicirajući veću reaktivnost flavan-3-ol monomera od dimera u skladu s ranije istaknutim literaturnim podacima (Dallas i sur. 1996a). Primjerice, u sastavu monomera smanjenje koncentracije iznosilo je 22,0 %, a u sastavu dimera 12,6 %, što čini razliku od skoro 10 %. Također, promjene u sastavu ukupnih proantocijanidina s vrijednošću od 24,5 % bile su značajno veće od onih u sastavu flavan-3-ol monomera i dimera,



Slika 12. Stabilnost ukupnih flavan-3-ol dimera vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci

Smanjenje koncentracija proantocijanidina odnosno monomera i dimera flavan-3-ola uslijed reakcija polimerizacije i reakcija s kondenzacije s antocijaninima vina Cabernet

Sauvignon tijekom starenja 12 mjeseci u boci ključno je za njegovu stabilnost i kvalitetu. Promjene koje dovode do smanjenja koncentracije potiču u crnom vinu važne senzorske promjene, posebno utječući na intenzitet trpkooće (Jordao i Ricardo-da-Silva, 2019). Trpkooća i gročina se smanjuju, boja vina se stabilizira, a vino postaje zaokruženo i mekše (Pérez-Magariño i González-San José, 2004; Chira i sur., 2011).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata o stabilnosti proantocijanidina vina Cabernet Sauvignon tijekom 12 mjeseci starenja u boci možemo zaključiti slijedeće:

1. Tijekom 12 mjeseci starenja u boci utvrđeno je smanjenje koncentracije ukupnih proantocijanidina te pojedinačnih flavan-3-ol monomera [(+)-katehin, (-)-epikatehin] i dimera (B1, B2, B3 i B4).
2. Najmanji intenzitet kemijskih promjena zabilježen je tijekom prva tri mjeseca starenja, dok su najintenzivnije promjene u sastavu proantocijanidina i pojedinačnih flavanola zamijećene nakon 12 mjeseci.
3. Utvrđene su značajne razlike u stabilnosti između ukupnih proantocijanidina, pojedinačnih flavan-3-ol monomera te dimera, odnosno u intenzitetu smanjenja koncentracije između navedenih spojeva.
4. Među analiziranim flavan-3-ol monomerima, (+)-katehin je pokazao značajno veću stabilnost i manju reaktivnost od (-)-epikatehina.
5. Među analiziranim flavan-3-ol dimerima, najznačajnije smanjenje koncentracije tijekom starenja utvrđeno je u sastavu procijanidin dimera B1, zatim procijanidina B4 i B2, a najmanje smanjenje utvrđeno u sastavu procijanidin dimera B3.
6. Flavan-3-ol dimeri pokazali su veću stabilnost na kemijske promjene tijekom 12 mjeseci starenja u boci od flavan-3-ol monomera kod kojih je tijekom zadnjih 6 mjeseci uočen značajan pad koncentracije.

6. LITERATURA

Atanasova, V., Fulcrand, H., Le Guerneve, C., Cheynier, V., Moutounet, M. (2002) Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Lett.* **43**, 6151–6153.

Adams, D. O., Scholz, R. C. (2008) Tannins-the problem of extraction. Proceedings of the 13th Australian Wine Industry Technical conference. 13th AWITC, Adelaide, str. 160-164.

Bindon, K. A., Kennedy, J. A. (2011) Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 2696-2707.

Boido, E., García-Marino, M., DellaCassa, E., Carrau, F., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T. (2011) Characterization and evolution of grape polyphenol profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat during ripening and vinification. *Aust. J. Grape Wine Res.* **17**, 383-393.

Bordiga, M., Travaglia, F., Locatelli, M., Coísson, J. D., Arlorio, M. (2011) Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chem.* **127**, 180-187.

Bruno, G., Sparapano, L. (2007) Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiol. Mol. Plant P.* **71**, 210-229.

Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Chantal, M., Souquet J.-M., Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H. (2006) Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 298-303.

Chira, K., Jourdes, M., Teissedre, P. L. (2012) Cabernet Sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 253-261.

Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., Teissedre, P.-L. (2011) Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chem.* **126**, 1971-1977.

- Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., Teissedre P.-L. (2009) Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007) *J. Agric. Food Chem.* **57**, 545-553.
- Cosme, F., Ricardo-Da-Silva, J. M., Laureano, O. (2009) Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chem.* **119**, 197-204.
- Ćurko, N., Kovačević Ganić, K., Gracin, L., Đapić, M., Jourdes, M., Teissedre, P. L. (2014) Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium. *Food Chem.* **145**, 15-22.
- Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (1995) Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation. *Vitis* **34**, 51-56.
- Dallas, C., Hipólito-Reis, P., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (2003) Influence of acetaldehyde, pH, and temperature on transformation of procyanidins in model wine solutions. *Am. J. Enol. Vitic* **54**, 119-124.
- Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (1996a) Interactions of oligomeric procyanidins in model wine solutions containing malvidin-3-glucoside and acetaldehyde. *J. Sci. Food Agric.* **70**, 493-500.
- Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (1996b) Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2 and acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2402-2407.
- Downey, M.O., Harvey, J. S., Robinson, S. P. (2003a) Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* **9**, 15-27.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., Robinson, S. P. (2003b) Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* **9**, 110-121.
- Drinkine, J., Lopes, P., Kennedy, J. A., Teissedre. P.-L., Saucier, C. (2007) Analysis of ethylidenebridged flavan-3-ols in wine. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1109-1116.

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

Es-Safi, N., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M., Hmamouchi, M., Essassi, E. M. (1996) Kinetic studies of acetaldehyde-induced condensation of flavan-3-ols and malvidin-3-glucoside in model solution systems. Proceedings of the 18th International conference on polyphenols. Polyphenols communications 96, Bordeaux, str. 279–280.

Fernández, K., Kennedy, J. A., Agosin, E. (2007) Characterization of *Vitis vinifera* L. Cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. *J.Agric. Food Chem.* **55**, 3675-3680.

Fine, A. M. (2000) Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern. Med. Rev.* **5**, 144-151.

Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre P.-L., Glories, Y. (2008) Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Qual. Pref.* **19**, 286-291.

Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., Cheynier, V. (2006) Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 289-296.

Gawel, R. (1998) Red wine astringency: a review. *Aust. J. Grape Wine R.* **4**, 74-95.

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

Genebra, T., Santos, R. R., Francisco, R., Pinto-Marijuan, M., Brossa, R., Serra, A. T., Duarte, C. M. M., Chaves, M. M., Zarrouk, O. (2014) Proanthocyanidin accumulation and biosynthesis are modulated by the irrigation regime in Tempranillo seed. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 11862-11877.

González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. (2004). Extraction of flavan-3-ols from grapes and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta* **513**, 283-289.

González-Neves, G., Charamelo, D., Balado, J., Barreiro, L., Bochicchio, R., Gatto, G., Gil, G., Tessore, A., Carbonneau, A., Moutounet, M. (2004) Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Chim. Anal.* **513**, 191–196.

Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., Fernández-Zurbano, P. (2014) Contribution of low molecular weight phenols to bitter taste and mouthfeel properties in red wines. *Food Chem.* **154**, 187-198.

Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., Fernández-Zurbano, P. (2013) Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8861-8870.

Guadalupe, Z., Martínez, L., Ayestarán, B. (2010) Yeast mannoproteins in red winemaking. Effect on polysaccharide, polyphenolic and colour composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **61**, 191-200.

Haslam, E. (1980) In vino veritas: oligomeric procyanidins and the aging of red wines. *Phytochemistry* **19**, 1577-1582.

Hernandez-Jimenez, A., Gomez-Plaza, E., Martinez-Cutillas, A., Kennedy, J. A. (2009) Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell × Syrah grapes. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10798-10803.

Jackson R. (2020) Wine Science Principles and Applications, 5 izd., Academic Press, Cambridge.

Jordao, A. M., Ricardo-da-Silva, J. M. (2019) Evolution of proanthocyanidins during grape maturation, winemaking, and aging process of red wines. U: Red wine technology, (Morata, A., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 177-193.

Jordao, A. M., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (2001) Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* **40**, 17-22.

Jurd, L. (1967) Anthocyanidins and related compounds—XI: Catechin-flavylium salt condensation reactions. *Tetraherdon Lett.* **23**, 1057-1064.

Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinč, P., Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* **119**, 715-723.

Kennedy, J. A. (2008) Grape and wine phenolic: Observations and recent findings. *Cienc. Investig. Agrar.* **35**, 107-120.

Landon, J. L., Weller, K., Harbertson, J. F., Ross, C. F. (2008) Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington state red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **59**, 153-158.

Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G., Teissedre P.-L. (2001) Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3341-3348.

Lee, C. B., Lawless, H. T. (1991) Time-course of astringent sensations. *Chem Senses* **16**, 225-238.

Lomolino, G., Zocca, F., Spettoli, P., Zanin, G., Lante, A. (2010) A preliminary study on changes in phenolic content during Bianchetta Trevigiana winemaking. *J. Food Comp. Anal.* **23**, 575-579.

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 vitages. *Food Chem.* **126**, 1991-1999.

Makris, D. P., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K., Kefalas, P. (2008) Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera*) stems by liquid chromatography–mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* **226**, 1075-1079.

Marković, M., Talić, S. (2013) Antioxidant activity of selected Herzegovinian wines. *Kem. Ind.* **62**, 7-12.

Marquez, A., Serratosa, M. P., Merida, J. (2014) Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chem.* **146**, 507-514.

McRae, J. M., Kennedy, J. A. (2011) Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: a review of current research. *Molecules* **16**, 2348- 2364.

Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (2006) Effect of the modifier (Graciano vs. Cabernet Sauvignon) on blends of Tempranillo wine during ageing in the bottle. I. Anthocyanins, pyranoanthocyanins and non-anthocyanin phenolics. *LWT-Food Sci. Technol.* **39**, 1133-1142.

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. Agric. Food Chem.* **51**, 6475-6481.

Morel-Salmi, C., Souquet, J.-M., Bes, M., Cheynier, V. (2006) Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4270-4276.

Obreque-Slier, E., Pena-Neira, A., Lopez-Solis, R., Zamora-Martin, F., Ricardo-da-Silva, J.M., Laureano, O. (2010) Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet-Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3591-3599.

Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., Noble A. C. (1999) Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci Food Agric.* **79**, 1123-1128.

Pérez-Magariño, S., González-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. Agric. Food Chem.* **52**, 1181-1189.

Petravić-Tominac, V., Mujadžić, S., Zechner - Krpan, V., August, H., Velić, D. i Velić, N. (2017). Selected biotechnological factors affecting alcoholic fermentation in winemaking. *Croatian journal of food technology, biotechnology and nutrition* **12**, 100-106.

Picinelli A, Bakker J. P. B. (1994) Model wine solutions: effect of sulphur dioxide on colour and composition during aging. *Vitis* **33**, 31-35.

Poklar Ulrih, N., Opara, R., Skrt, M., Košmerl, T., Wondra, M., Abram, V. (2020) Part I. Polyphenols composition and antioxidant potential during ‘Blaifränkisch’ grape maceration

and red wine maturation, and the effects of trans-resveratrol addition. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 111-122.

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

Quijada-Morín, N., Regueiro, J., Simal-Gándara, J., Tomás, E., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T. (2012) Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 12355-12361.

Recamales, A. F., Sayago, A., Gonzales-Miret, M. L., Hernanz, D. (2006) The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Res. Int.* **39**, 220-229.

Revilla, I.; González-San-José, M. L. (2001) Effect of different oak woodson aged wine color and anthocyanin composition. *Eur. FoodRes. Technol.* **213**, 281-285.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdiou, D. (2000) The chemistry of wine stabilization and treatments, 2. izd., John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken.

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Le dosage des tanins dans le vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* **48**, 188-192.

Ricardo-da-Silva, J.M., Rosec, J.P., Bourzeix, M., Mourgues, J., Moutounet, M. (1992) Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvèdre grapes and red wines. *Vitis* **31**, 55-63.

Ritchey, J. G., Waterhouse, A. L. (1999) A standard red wine: monomeric phenolic analysis of commercial Cabernet Sauvignon wines. *Am J Enol Vitic* **50**, 91-100.

Salas, E., Fulcrand, H., Meudec, E., Cheynier, V. (2003) Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7951-7961.

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., Francia-Aricha, E. M., Escribano-Bailon, M. T. (1995) Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chem.* **53**, 197-201.

Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. (2002) Study of noncovalent complexation between catechin derivatives and peptide by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). *J. Mass Spectrom.* **37**, 609-616.

Somers, T. C. (1982) Pigment phenomena-from grapes to wine. Proceedings of the U. C. D. grape and wine centennial symposium 1980, University of California, Davis, str 254-257.

Somers, T. C. (1971) The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* **10**, 2175-2184.

Sun, B., Spranger, M. I. (2005). Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *Ciência Téc. Vitiv.* **20**, 59-89.

Teissedre, P.-L., Jourdes, M. (2013) Phenolics: Biological activity and bioavailability. U: Natural products phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes, (Ramawat, K. G., Merillon, J.-M., ured.), Springer, Berlin, str. 2256-2271.

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.

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

Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., Waters, E. J. (2004) Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal. Chim. Acta.* **513**, 57-65.

Wang, L., Yamashita, Y., Saito, A., Ashida., H. (2017) An analysis method for flavan-3-ols using high performance liquid chromatography coupled with a fluorescence detector. *J. Food Drug Anal.* **25**, 478-487.

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

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

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.

Ivana Birovčec

Ivana Birovčec