

Changes in the composition and content of polyphenol compounds during the ripening of red grape varieties (*Vitis vinifera* L.)

Promjene u sastavu i sadržaju polifenolnih spojeva tijekom dozrijevanja crnih sorata vinove loze (*Vitis vinifera* L.)

Željko ANDABAKA¹, Matea ŽARAK², Edi MALETIĆ¹, Jasminka KAROGLAN KONTIĆ¹, Darko PREINER¹, Zvezdana MARKOVIĆ¹, Domagoj STUPIĆ¹, Marko KAROGLAN¹, Marina ANIĆ¹, Antonija TOMIĆ¹, Ivana TOMAZ¹, Iva ŠIKUTEN¹ (✉)

¹ University of Zagreb Faculty of Agriculture, Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb, Croatia

² Student at the University of Zagreb Faculty of Agriculture, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Croatia

✉ Corresponding author: isikuten@agr.hr

Received: April 4, 2022; accepted: September 27, 2022

ABSTRACT

Polyphenols are secondary plant metabolites and important organic compounds present in grapes, must and wine. The importance of polyphenolic compounds present in grapes is mainly related to the quality of the wine. Those compounds affect the colour, taste, astringency, bitterness, and potential of wine aging. Therefore, the aim of this research was to determine and compare quantitative and qualitative changes in low molecular weight polyphenol content of 11 red grapevine varieties during ripening. Samples were collected periodically from the beginning of véraison to the technological maturity. The polyphenolic compounds were analysed with high performance liquid chromatography (HPLC) with prior lyophilization and extraction. Based on the obtained results, changes in the composition and content of researched groups of polyphenolic compounds during maturation were determined.

Keywords: grape berry, red grapevine varieties, polyphenolic compounds, liquid chromatography

SAŽETAK

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti te važni organski spojevi prisutni u grožđu, moštu i vinu. Važnost polifenolnih spojeva prisutnih u grožđu uglavnom je vezana uz kakvoću vina obzirom da utječu na boju, okus, astringenciju, gorčinu te potencijal starenja vina. Cilj ovog rada je utvrditi i usporediti kvantitativne i kvalitativne promjene sadržaja polifenola male molekulske mase u kožici grožđa 11 crnih sorata vinove loze tijekom dozrijevanja grožđa. Uzorci su prikupljeni periodično od početka šare do tehnološke zrelosti. Sadržaj polifenola u kožici boba utvrđen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) uz prethodnu liofilizaciju i ekstrakciju. Temeljem dobivenih rezultata utvrđene su promjene sastava i sadržaja pojedinih grupa polifenolnih spojeva tijekom dozrijevanja.

Ključne riječi: boba grožđa, crne sorte, polifenolni spojevi, tekućinska kromatografija

DETAILED ABSTRACT

Polyphenols are secondary plant metabolites and important organic compounds present in grapes, must and wine. The importance of polyphenolic compounds in grapes is mainly related to the quality of the wine. Those compounds affect the colour, taste, astringency, bitterness, and potential of wine aging. Recently, due to numerous research of the polyphenolic composition of grapes, their nutritional value as well as many positive effects on human health have been recognized. Their beneficial effect on the organism derives from antioxidant capabilities, chelating activity, and inactivation of certain enzymes that are attributed to antitumor, antimicrobial, antiallergic, neuroprotective, anti-inflammatory and many other properties. A large group of polyphenolic compounds such as phenolic acids (hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid), flavonoid stilbenes (anthocyanins, flavonols and flavan-3-ols) have been found in grape berry. The largest proportion of polyphenolic compounds in grape berries is contained in the seeds, then skin and pulp. Phenolic compounds are particularly important in red grape wine production technology, because they greatly affect the colour and the characteristic taste of wine. Therefore, the aim of this study is to determine the changes that occur in the polyphenol profile (hydroxycinnamic acids, anthocyanins, flavonols, flavan-3-ols) of 11 red grape varieties during ripening. The research was set up in a vineyard at the location of experimental station Jazbina, viticultural region Srednjska bregovita Hrvatska, subregion Prigorje - Bilogora and vineyard area Zagreb. Samples were collected periodically, from the beginning of the vérasion to technological maturity. They were adequately stored, lyophilized, and subjected to extraction. The obtained extracts were analysed with high performance liquid chromatography. Based on the obtained results, anthocyanins are the most common polyphenol compounds in the skin of the investigated varieties, followed by flavanol glycosides, flavanol-3-ols and hydroxymethyl acids. The mass fraction of anthocyanin and flavanol glycosides in berry skin increases from the beginning of the vérasion to the technological maturity, while the mass fraction of flavan-3-ols, hydroxycinnamic acids and flavanol glycosides decreases by technological maturity.

UVOD

Grožđe predstavlja bogat izvor primarnih i sekundarnih metabolita, a koji utječu na njegovu kvalitetu. Jedan od važnih sekundarnih metabolita u crnom grožđu su polifenolni spojevi. Polifenolni spojevi zajedno s fenolnim kiselinama čine veliku i raznovrsnu grupu biljnih sekundarnih metabolita, a u grožđu se nalaze u kožici, mesu i sjemenkama. Glavni predstavnici polifenolnih spojeva su flavanoidi i stilbeni. Flavanoidi uključuju antocijane, flavonole i flavan-3-ole, te predstavljaju najznačajniju grupu polifenolnih spojeva u grožđu (Lorrain i sur., 2013). Fenolne kiseline se dijele prema strukturi na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Garrido i Borges, 2013), dok stilbeni, fitoaleksini u vinovoj lozi, postaju sve zanimljiviji zbog svog pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje (Flamini i sur., 2013).

Na sastav i sadržaj polifenola u grožđu utječu mnogi faktori, među kojima se genotip, odnosno sorta, ističe kao jedan od važnijih faktora. Drugi faktori su povezani s okolišnim uvjetima u kojima se vinova loza uzgaja, naročito svjetlost, temperatura i dostupnost vode. Nadalje, različiti agrotehnički i ampelotehnički zahvati, kao navodnjavanje,

gnojidba, kontrola prinosa, defolijacija, mogu značajno utjecati na sadržaj polifenola u grožđu (Downey i sur., 2006).

Polifenolni spojevi imaju važnu ulogu u kvaliteti crnog vina te su odgovorni za senzorna svojstva vina (Xia i sur., 2010). Primjerice, hidroksicimetne kiseline, iako mogu uzrokovati posmeđenje boje u bijelim vinima (Conde i sur., 2007), u crnim vinima mogu imati pozitivan utjecaj. Naime, mogu djelovati kao kopigmenti s antocijanima time utječući na stabilnost boje (Zhang i sur., 2015; Zhang i sur., 2017). Nadalje, zahvaljujući svom antioksidativnom i antimikrobnom djelovanju, hidroksicimetne kiseline mogu doprinijeti očuvanju vina od mikrobiološkog kvarenja (Pastorkova i sur., 2013; Sabel i sur., 2017). Flavan-3-oli katehin i epikatehin su glavne strukturne jedinice tanina i proantocijanidina. Tanini utječu na senzorna svojstva vina, doprinoseći astringenciji, gorčini i osjećaju suhoće vina (Watrelet i sur., 2020). Međutim, zbog svojih antioksidativnih, protuupalnih i drugih pozitivnih svojstava, tanini postaju predmet brojnih istraživanja (Unusan, 2020).

Stoga je cilj ovoga rada ustanoviti promjene u sadržaju pojedinih grupa polifenolnih spojeva kod 11 autohtonih crnih sorata tijekom dozrijevanja. Uzorci grožđa su prikupljeni na vinogradarsko-vinarskom pokušalištu 'Jazbina', u periodu od početka šare do tehnološke zrelosti.

MATERIJALI I METODE

Pokusni nasad

Istraživanje je provedeno 2017. godine na sortama Babić, Dobričić, Lasina, Ljutun, Ninčuša, Plavac mali crni, Plavini, Rudežuša, Teran, Tribidrag, Vranac te Merlot kao standardna sorta. Sorte su posađene u kolekcijskim nasadima na Vinogradarsko-vinarskom pokušalištu Jazbina u Zagrebu. Vinogradarsko-vinarsko pokušalište Jazbina je znanstveno-nastavni poligon Agronomskog fakulteta, a nalazi se na blagim padinama planine Medvednice s južnom i jugozapadnom ekspozicijom. Najviša točka nalazi se na 302 m nadmorske visine. Pokusni nasad podizan je od 2001. do 2005. godine na podlozi *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* SO₄ s razmakom sadnje između redova od 2,1 m, a unutar reda 1,1 m. Uzgojni oblik je jednostrani kordonac. Sorta Merlot nalazi se nasadu podignutom 2005. godine (sklop 2,1 x 1,2 m) u kojem je uzgojni oblik dvostrani Guyot. Bobe 11 crnih sorta prikupljene su s trsova na način da su uzete s različitih položaja na grozdu kako bi rezultati bili reprezentativni. Za svaku sortu u pokus je uzeto tri trsa te je sa svakoga trsa uzeto 10 boba sa tri grozda na trsu, što ukupno čini 90 boba za svaku sortu. Prikupljene bobice činile su jedan reprezentativan uzorak koji je podijeljen u tri poduzroka od 30 boba, koja su činila ponavljanja. Poduzorci su korišteni za određivanje mase boba i analize polifenolnih spojeva. Uzorkovanje se provodilo u razdoblju od početka šare (8. kolovoza 2017.) pa sve do tehnološke zrelosti (24. rujna 2017.).

Podaci o dnevnoj temperaturi dobiveni su s meteorološke stanice (Pinova Meteo, Pinova d.o.o., Čakovec, Hrvatska) smještene u vinogradu, dok su podaci o UV zračenju dobiveni pomoću Kipp & Zonene UV radiometra.

Metode analiza

Nakon uzorkovanja bobice su vagane da bi se utvrdila masa pojedine bobice. Kožice boba (egzokarp) nakon prikupljanja odvojene od mesnatog dijela bobice (mezokarp i endokarp) i spremljene u PVC vrećicu te zamrznute u zamrzivaču na -20 °C do trenutka ekstrakcije i same analize polifenolnih spojeva. Prije analize polifenolnih spojeva, kožice boba su liofilizirane. Trajanje postupaka sušenja liofilizacijom ovisi o udjelu vode u uzorku, a u našem slučaju kod kožica grožđa trajao je 2 do 3 dana. Liofilizator koji je korišten tijekom istraživanja je Alpha 1-2 LDPlus (Martin Christ, Njemačka). Nakon liofilizacije i usitnjavanja uzoraka, postupak ekstrakcije provodio se prema metodi Tomaz i sur. (2016). U posudice za ekstrakciju volumena 15 mL izvagano je 160 ± 1 mg usitnjenih kožica, stavljeno je 10 mL ekstrakcijskog otapala (20% acetonitril, 1% mravlja kiselina, 79% voda, v/v/v) te mali magnetički za miješanje. Ekstrakcijska smjesa ostavljena je na magnetskoj miješalici pri temperaturi od 50 °C u trajanju od jednog sata. Nakon završetka ekstrakcije, dobiveni ekstrakt je filtriran primjenom membranskog filtra (PTFE, 0,45 µm). Za svrhu ovoga istraživanja dobiveni profiltrirani ekstrakt analiziran je na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti - Agilent 1100 series. Kromatograf se sastoji od automatskog uzorkivača 1100, detektora s nizom dioda 1100, binarne pumpe 1100, Agilent 1200 fluorescentnog detektora, boce za pokretnu fazu i računala preko kojeg se upravlja programom za HPLC. U istom programu se nakon analize obrađuju dobiveni podaci. Za razdvajanje pojedinih polifenola koristila se kolona Luna Phenyl-Hexyl (4,6 × 250 mm; 5 µm veličina čestica (Phenomenex, Torrance, SAD) uz gradijentno eluiranje korištenjem 0,5% (v/v) vodene otopine fosforne kiseline kao otapalo A, dok se kao otapalo B koristila otopina koja sadržava acetonitril: vodu: fosfornu kiselinu (50:49,5:0,5; v/v/v) s brzinom protoka od 0,9 mL/min. Tijekom analize koristio se volumen ubrizganog uzorka od 20 µL te temperatura kolone 50 °C. Flavonoli su određeni pri valnoj duljini od 360 nm te antocijani pri valnoj duljini od 518 nm, a flavan-3-oli određeni su primjenom fluorescencijskog detektora pri λ_{ex} = 225 nm i λ_{em} = 320 nm.

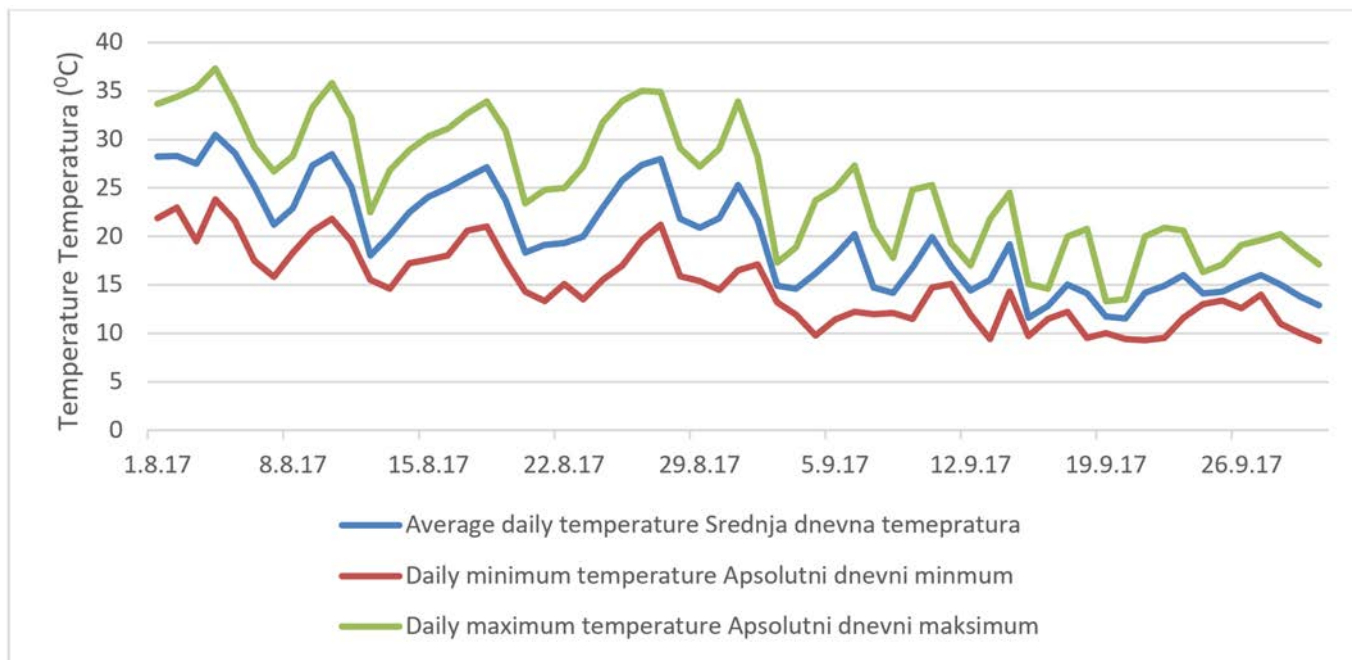


Figure 1. Daily air temperature (°C)

Slika 1. Dnevna temperatura zraka (°C)

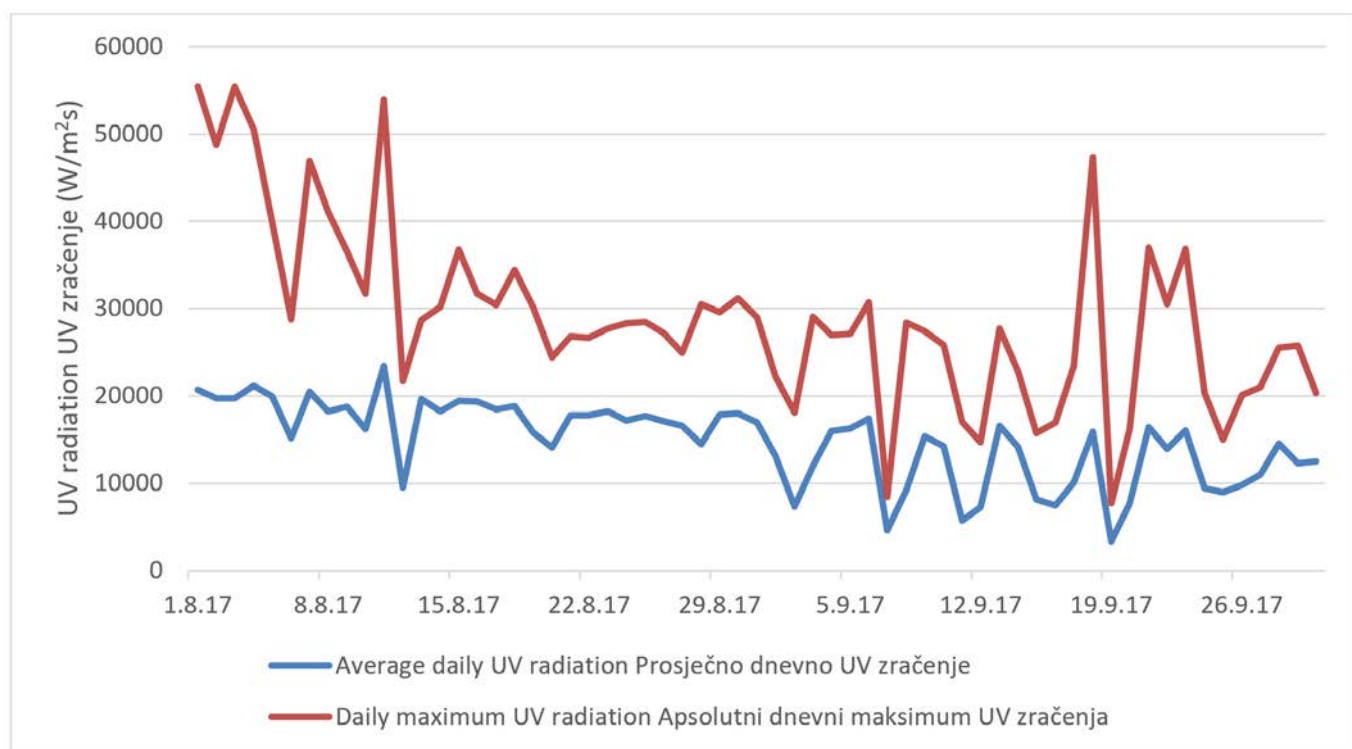


Figure 2. Intensity of UV radiation (W/m²s)

Slika 2. Intenzitet UV zračenja (W/m²s)

Za prikaz rezultata korišteni su maseni udjeli: delfinidin-3-O-glukozida, cijanidin-3-O-glukozida, peonidin-3-O-glukozida te malvidin-3-O-glukozida izraženi kao njihov ukupan zbroj (ukupan maseni udio antocijana); miricetin-3-O-glukozida, rutina, kvercetin-3-O-glukunorida, kvercetin-3-O-glukozida te kemferol-3-O-glukunorida izraženi kao njihov ukupan zbroj (ukupan maseni udio flavonol-glikozida) te galokatehina, epigalokatehina, katehina, epikatehina, procijanidina B1 i B2 izraženi kao njihov ukupan zbroj (ukupan maseni udio flavan-3-ola). Maseni udio kaftarinske, kafeinske, ferulinske, kutarinske, kumarinske i sinapinske kiseline kao njihov ukupan zbroj (ukupne hidroksicimetne kiseline).

REZULTATI I RASPRAVA

Kako je već prethodno navedeno, cilj ovoga rada bio je prikazati promjenu sadržaja pojedinih polifenolnih spojeva u kožicama bobica crnih sorata tijekom razdoblja od početka šare pa do tehnološke zrelosti. Rezultati su prikazani u mjernoj jedinici mg/kg suhe kožice te u vremenskom periodu od 8. kolovoza 2017. godine, kada započinje šara kod pojedinih sorata do 24. rujna 2017. godine. Iz prikazanih tablica je vidljivo da su 8. kolovoza prikupljeni uzorci za samo nekoliko sorata poput Merlot-a, Tribidraga, Lasine, Plavine, Ninčuše, te Rudežuše, dok kod sorata kasnijeg razdoblja dozrijevanja, kao što su Teran, Plavac mali, Dobričić, Babić, Vranac i Ljutun uzorci nisu bili prikupljeni iz razloga što period šare još nije započeo.

Ukupan sadržaj flavonol-glikozida u kožici boba

Prema rezultatima dobivenim u ovom istraživanju vidljivo je da maseni udio flavonol-glikozida blago raste kod većine sorata do 23. kolovoza, a zatim se njihov udio u kožicama bobica grožđa kod nekih sorata počinje smanjivati, a kod nekih nastavlja rasti prema tehnološkoj zrelosti. Stoga, možemo reći da se rezultati ovoga istraživanja djelomično poklapaju s navodima Flamini-a i sur. (2013) te Downey-a i sur. (2003; 2004). Naime, Downey i sur. (2003), isto tako, navode da se flavonoli sintetiziraju u bobici u vrijeme cvatnje, a njihov sadržaj raste tijekom dozrijevanja grožđa. Nadalje, Flamini i sur. (2013) ističu da visoke dnevne temperature (30 do 35

°C) tijekom dozrijevanja bobice grožđa mogu negativno utjecati na ekspresiju gena koji su odgovorni za sintezu flavonola. Također, prema njihovom istraživanju, optimalne dnevne temperature za sintezu većih količina flavonola u bobicama kreću se od 15 do 20 °C, a noćne 10 do 20 °C. Isto tako, iako je poznato da je polifenolni sastav sorata u najvećoj mjeri određen njihovim genotipom (Mattivi i sur., 2006), ipak možemo pretpostaviti da je na smanjenje masenog udjela flavonolnih spojeva utjecala i povišena dnevna temperatura, koja je 14. kolovoza 2017. godine iznosila 28 °C, dok je noćna iznosila 18 °C, kao i 23. kolovoza 2017. godine kada je dnevna temperatura iznosila 26 °C, dok je noćna bila 17 °C. Također, iz tablice 1 vidljivo je da sorte Trnjak, Lasina, Dobričić, Teran, Plavac mali crni, Babić te Tribidrag imaju manje masene udjele ukupnih flavonol-glikozida u odnosu na sortu Merlot. Stoga se može pretpostaviti da grozdovi tih sorta tijekom dozrijevanja nisu bili izloženi dovoljnoj količini sunčeve svjetlosti. Ovakvo opažanje je možebitna je posljedica različitih genotipova, kao i različite ekspresije gena za sintezu navedenih spojeva. No, za razliku od navedenih sorata maseni udio ukupnih flavonol-glikozida kod sorata Ljutun i Vranac veći je nego kod referentne sorte Merlot, što je i vidljivo u tablici 1. Nadalje, valja istaknuti da je najveći maseni udio flavonol-glikozida pronađen 8. rujna kod sorte Ljutun i iznosi 4683,74 mg/kg suhe mase kožice, što je daleko veći maseni udio u odnosu na prethodno navedena istraživanja.

Ukupan sadržaj flavan-3-ola u kožici boba

U tablici 2 prikazani su rezultati ukupnog masenog udjela flavan-3-ola u kožicama bobica navedenih sorata. Maseni udjeli flavan-3-ola kod prvog uzorkovanja (8. kolovoz 2017.) sorata Merlot, Tribidrag, Lasina, Plavina, Ninčuša i Trnjak daleko su niži u odnosu na maseni udio flavonol-glikozida istih sorata u istom periodu. Isto tako, iz tablice 2 je vidljivo da sorta Babić ima najveći maseni udio ukupnih flavan-3-ola (971,16 mg/kg suhe mase kožice) u početku šare (14. kolovoza), zatim ju slijede sorta Dobričić (813,13 mg/kg suhe mase kožice) te Teran (633,33 mg/kg suhe mase kožice), dok su sorte Lasina (187,31 mg/kg suhe mase kožice), Plavina (243,75 mg/kg suhe mase

kožice) i Trnjak (254,66 mg/kg suhe mase kožice) imale najmanje udjele istih spojeva. Tijekom tehnološke zrelosti (24. rujan) sorte koje su imale najmanje udjele flavan-3-ola su Vranac (132,17 mg/kg suhe mase kožice), Lasina (139,03 mg/kg suhe mase kožice) te Ninčuša (139,20 mg/kg suhe mase kožice), dok su sorte Teran (403,77 mg/kg suhe mase kožice), Ljutun (371,26 mg/kg suhe mase kožice) te Plavac mali (295,59 mg/kg suhe mase kožice) imale najveći udio. Prema Kennedy-u (2006) nakupljanje flavan-3-ola u kožici bobice započinje prije početka šare, odnosno već tijekom cvatnje, zatim traje tijekom rane faze rasta i razvoja bobica te se počinje smanjivati tijekom šare.

Iz rezultata je vidljivo da je najveći sadržaj flavan-3-ola kod sorata u prvim tjednima šare, odnosno u periodu od 8. do 14. kolovoza 2017., a nakon toga navedeni spojevi počinju se smanjivati. Stoga, dobiveni rezultati mogu se poistovjetiti sa rezultatima prethodno navedenog autora.

U odnosu na referentnu sortu Merlot veće udjele flavan-3-ola imaju sorte Plavac mali crni, Teran, Dobričić, Plavina, Ljutun i Babić, dok manje udjele imaju sorte Trnjak, Vranac, Tribidrag, Ninčuša te Lasina.

Nadalje, sorta Babić sadrži 996,06 mg/kg suhe kožice flavan-3-ola u početku šare, što predstavlja ujedno i najveći maseni udio ovih spojeva, dok sorta Ninčuša sadrži najmanji maseni udio tih spojeva (87,05 mg/kg suhe mase kožice) nekoliko tjedana prije tehnološke zrelosti. Valja istaknuti sortu Tribidrag kod koje se može primijetiti nestabilno kretanje sadržaja flavan-3-ola kroz period dozrijevanja bobice. Iz navedenih rezultata vidljivo je da je maseni udio flavan-3-ola kod sorte Tribidrag u početku šare (8. kolovoz) povišen, zatim se smanjuje do 14. kolovoza, potom se opet povećava, da bi se naposljetku u periodu tehnološke zrelosti (24. rujan) opet počeo smanjivati.

Table 1. Mean values of total flavonol-glycosides (mg/kg dry weight) in analysed grape varieties

Tablica 1. Prosječne vrijednosti ukupnih flavonol-glikozida (mg/kg suhe mase kožice) u analiziranim sortama

Variety/ Sorta Date/ Datum	August 8 th 8. kolovoza	August 14 th 14. kolovoza	August 23 th 23. kolovoza	September 8 th 8. rujna	September 24 th 24. rujna
Polyphenolic compounds Polifenolni spoj	Total flavonol glycosides Ukupni flavonol glikozidi				
Merlot	1581,050 ^{b*}	1324,440 ^c	2232,126 ^c	3096,054 ^c	2569,554 ^c
Teran	0,000 ^e	1025,388 ^{ef}	n.a.	1622,381 ^{ef}	1880,151 ^f
Tribidrag	880,201 ^c	946,832 ^f	1471,928 ^e	1005,781 ^h	712,218 ⁱ
Plavac mali	n.a.**	1259,252 ^c	n.a.	1588,431 ^f	1664,725 ^g
Dobričić	n.a.	1095,520 ^{de}	n.a.	1786,951 ^e	851,048 ^{hi}
Lasina	2204,397 ^a	2254,610 ^a	2174,708 ^c	1731,668 ^{ef}	2140,164 ^e
Plavina	538,483 ^d	1131,917 ^d	1187,550 ^f	n.a.	1006,259 ^h
Babić	n.a.	1012,031 ^{ef}	n.a.	1393,850 ^g	957,255 ^h
Ninčuša	2184,185 ^a	n.a.	1665,544 ^d	2508,539 ^d	4413,942 ^a
Vranac	n.a.	n.a.	1464,509 ^e	3550,599 ^b	3024,245 ^b
Trnjak	2141,812 ^a	2030,496 ^b	3009,016 ^b	n.a.	2360,153 ^d
Ljutun	n.a.	n.a.	4111,614 ^a	4683,744 ^a	2362,133 ^d
Pr > F	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

*Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$); **n.a. represents samples that were not yet in véraison or were unavalable

*Prosječne vrijednosti s različitim slovima u istom stupcu se značajno razlikuju ($P < 0,05$); **n.a. predstavlja uzorke čija šara nije još počela ili uzorci nisu bili dostupni

Table 2. Mean values of total flavan-3-ols (mg/kg dry weight) in analysed grape varieties**Tablica 2.** Prosječne vrijednosti ukupnih flavan-3-ola (mg/kg suhe mase kožice) u analiziranim sortama

Variety/ Sorta Date/ Datum	August 8 th 8. kolovoza	August 14 th 14. kolovoza	August 23 th 23. kolovoza	September 8 th 8. rujna	September 24 th 24. rujna
Polyphenolic compounds Polifenolni spojevi	Total flavan-3-ols Ukupni flavan-3-oli				
Merlot	382,132 ^{a*}	351,878 ^e	282,623 ^{bc}	260,696 ^e	239,265 ^e
Teran	n.a.**	633,331 ^c	n.a.	344,282 ^c	403,767 ^a
Tribidrag	275,330 ^b	169,991 ^s	305,994 ^b	158,243 ^s	208,260 ^f
Plavac mali	n.a.	443,108 ^d	n.a.	320,268 ^d	295,591 ^c
Dobričić	n.a.	813,131 ^b	n.a.	371,972 ^b	269,051 ^d
Lasina	228,472 ^d	187,307 ^{fs}	124,313 ^d	114,875 ^h	139,035 ^h
Plavina	243,750 ^{cd}	366,425 ^e	269,705 ^c	n.a.	191,636 ^f
Babić	n.a.	971,159 ^a	n.a.	269,705 ^e	165,945 ^s
Ninčuša	257,030 ^c	n.a.	140,303 ^d	84,884 ⁱ	139,201 ^h
Vranac	n.a.	n.a.	146,796 ^d	195,117 ^f	132,171 ^h
Trnjak	254,660 ^c	217,718 ^f	261,856 ^c	n.a.	168,412 ^s
Ljutun	n.a.	n.a.	894,319 ^a	681,613 ^a	371,261 ^b
Pr > F	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

*Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$); **n.a. represents samples that were not yet in véraison or were unavailable

*Prosječne vrijednosti s različitim slovima u istom stupcu se značajno razlikuju ($P < 0,05$); **n.a. predstavlja uzorke čija šara nije još počela ili uzorci nisu bili dostupni

Ukupni sadržaj antocijana u kožici bobica

U tablici 3 prikazani su rezultati ukupnog masenog udjela antocijana u kožicama bobica navedenih sorata. Pokazalo se kako su antocijani najzastupljeniji polifenolni spojevi u odnosu na druge analizirane spojeve.

Iz tablice 3 vidljivo je da sorta Ninčuša sadržava 61 881,79 mg/kg suhe mase kožice antocijana u kožici bobice u periodu tehnološke zrelosti (24. rujna), što ujedno predstavlja najveći maseni udio tih spojeva. Zatim ju slijedi sorta Vranac (48 555,87 mg/kg suhe mase kožice) i Trnjak (28 972,85 mg/kg suhe mase kožice), dok sorte Lasina (10 076,95 mg/kg suhe mase kožice), Babić (10 604,39 mg/kg suhe mase kožice) i Plavina (12 561,12 mg/kg suhe mase kožice) sadrže najmanji maseni antocijana u istom periodu. Isto tako, u početku šare, najmanji udio antocijana sadržavaju sorte Lasina (113,28 mg/kg suhe mase kožice), Babić (704,71 mg/kg suhe

mase kožice) te Plavac mali crni (2 255,95 mg/kg suhe mase kožice), a za razliku od njih sorte Trnjak (9 315,61 mg/kg suhe mase kožice), Ninčuša (9 104,85 mg/kg suhe mase kožice) i Merlot (8 594,51 mg/kg suhe mase kožice) sadrže najviši udio istih spojeva u istom periodu. Kako navode Castellarin i sur. (2012.) te Flamini i sur. (2013.) sinteza antocijana u mesu bobica (kod određenih sorata) i kožici bobica crnih sorata započinje u periodu šare, a nakupljanje se nastavlja do pune zrelosti, te nakon toga sadržaj antocijana počinje opadati. Kennedy i sur. (2002.) isto tako navode da nakon što antocijani dostignu maksimalne koncentracije, njihova koncentracija može i lagano opadati u kasnijim stadijima razvoja bobice.

Castellarin i sur. (2012.) ističu da ekološki uvjeti, prije svega svjetlost i temperatura, a i vlažnost, uvelike utječu na akumulaciju antocijana u bobici. Boss i Davies (2009.)

navode da povišene temperature (iznad 30 °C) ne utječu značajno na biosintezu antocijana, ali uzrokuju redukciju nakupljanja antocijana u kožici bobice, najvjerojatnije kroz povećanje kemijske degradacije antocijana. Tarara i sur. (2008.) iznose da slaba izloženost sunčevoj svjetlosti ne smanjuje akumulaciju antocijana, ali kombinacija slabe osvjetljenosti i izrazito visokih temperatura vodi do smanjivanja koncentracije ukupnih antocijana u bobici. Nadalje, navode da umjerene temperature bobice, bez obzira na osvjetljenje, uzrokuju porast koncentracije antocijana u bobici.

Obzirom na provedeno istraživanje prema dobivenim rezultatima može se uočiti da maseni udio antocijana općenito raste kod svih sorata kako se približava tehnološka zrelost, što se poklapa sa rezultatima prethodno navedenih autora (Flamini i sur., 2013.; Castellarin i sur., 2012.; Kennedy i sur., 2002.). Iz rezultata

je također vidljiv kontinuirani rast sadržaja antocijana od šare do tehnološke zrelosti kod sorte Ninčuše, koja ujedno sadržava i najveći maseni udio tih spojeva (61 881,79 mg/kg suhe kožice) u periodu tehnološke zrelosti. Iako je kod sorte Lasine vidljiv kontinuirani porast antocijana, ta sorta u početku šare sadržava ukupno najmanji maseni udio antocijana (113,38 mg/kg suhe mase kožice). Zanimljivo je istaknuti i sortu Vranac kod koje je zabilježen kontinuirani rast sadržaja antocijana do 8. rujna, a nakon toga je uočen nagli pad.

Ukupan sadržaj hidroksicimentih kiselina u kožici boba

U tablici 4 prikazani su rezultati ukupnog masenog udjela hidroksicimetnih kiselina u kožicama bobica navedenih sorata. Tijekom prvog uzorkovanja, odnosno u početku šare sorte koje su imale najmanji udio hidroksicimetnih kiselina u kožicama su Tribidrag (118,44

Table 3. Mean values of total anthocyanins (mg/kg dry weight) in analysed grape varieties

Tablica 3. Prosječne vrijednosti ukupnih antocijana (mg/kg suhe mase kožice) u analiziranim sortama

Variety/ Sorta Date/ Datum	August 8 th 8. kolovoza	August 14 th 14. kolovoza	August 23 th 23. kolovoza	September 8 th 8. rujna	September 24 th 24. rujna
Polyphenolic compounds Polifenolni spojevi	Total anthocyanins Ukupni antocijani				
Merlot	8594,508 ^{b*}	11934,068 ^b	16972,069 ^d	21506,784 ^e	20438,594 ^e
Teran	n.a.**	5450,162 ^d	n.a.	25311,244 ^d	28057,322 ^c
Tribidrag	3420,700 ^c	6237,017 ^c	12496,712 ^e	15358,590 ^f	13724,168 ^f
Plavac mali	n.a.	2255,945 ^f	n.a.	13355,657 ^g	18271,364 ^e
Dobričić	n.a.	5140,220 ^{de}	n.a.	29224,991 ^c	23852,303 ^d
Lasina	113,383 ^e	2219,714 ^f	2497,541 ^g	5818,732 ^h	10076,947 ^h
Plavina	1463,027 ^d	4594,142 ^e	10654,829 ^f	n.a.	12561,120 ^{fg}
Babić	n.a.	704,711 ^g	n.a.	12630,891 ^g	10604,393 ^{gh}
Ninčuša	9104,852 ^a	n.a.	26841,779 ^b	35302,976 ^b	61881,797 ^a
Vranac	n.a.	n.a.	23950,280 ^c	55956,839 ^a	48557,876 ^b
Trnjak	9315,608 ^a	23379,077 ^a	31855,678 ^a	n.a.	28972,847 ^c
Ljutun	n.a.	n.a.	9930,317 ^f	25012,319 ^d	23102,937 ^d
Pr > F	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

*Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$); **n.a. represents samples that were not yet in véraison or were unaivalable.

*Prosječne vrijednosti s različitim slovima u istom stupcu se značajno razlikuju ($P < 0,05$); **n.a. predstavlja uzorke čija šara nije još počela ili uzorci nisu bili dostupni

mg/kg suhe mase kože), Merlot (120,43 mg/kg suhe mase kože) te Plavac mali crni (192,22 mg/kg suhe mase kože), dok su sorte Lasina (1135,18 mg/kg suhe mase kože), Teran (538,32 mg/kg suhe mase kože) i Babić (508,87 mg/kg suhe mase kože) imale najveći maseni udio istih spojeva u istom periodu. Isto tako, tijekom posljednjeg uzorkovanja, odnosno u periodu tehnološke zrelosti, sorte Plavac mali crni (101,81 mg/kg suhe mase kože), Tribidrag (119,22 mg/kg suhe mase kože) i Merlot (123,97 mg/kg suhe mase kože) sadrže najmanji maseni udio hidroksicimetnih kiselina, dok sorte Ninčuša (317,58 mg/kg suhe mase kože), Ljutun (232,62 mg/kg suhe mase kože) te Vranac (233,73 mg/kg suhe mase kože) sadrže najveći udio istih spojeva u istom periodu. Također, u usporedbi s ostalim analiziranim polifenolnim spojevima, ukupan maseni udio hidroksicimetnih kiselina u kožicama bobica navedenih sorta vidljivo je najmanji.

Kennedy i sur. (2006) navode da nakupljanje hidroksicimetnih kiselina počinje kod zametanja bobice i raste sve do pojave šare. Romayer i sur. (1983) u svom istraživanju su istaknuli promjene tijekom razvoja i dozrijevanja bobica koje se odnose na hidroksicimetne kiseline. Esteri hidroksicimetnih kiselina i vinske kiseline počinju se nakupljati u bobici tijekom i nakon cvatnje, a najviše koncentracije postižu netom prije šare. Nakon toga, njihova koncentracija opada i na toj se razini zadrži tijekom dozrijevanja bobice, sve do berbe. Smatra se da do pada koncentracije hidroksicimata tijekom dozrijevanja dolazi zbog njihovog katabolizma, te zbog njihovog korištenja u biosintezi drugih polifenolnih spojeva. Općenito prikazani rezultati pokazuju kako je u trenutku početka šare povišen maseni udio hidroksicimetnih kiselina kod većine sorata te se potom smanjuje prema tehnološkoj zrelosti (26. rujna), što se poklapa sa prethodno navedenim

Table 4. Mean values of total hydroxycinnamic acids in analysed (mg/kg dry weight) in analysed grape varieties

Tablica 4. Prosječne vrijednosti ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg/kg suhe mase kože) u analiziranim sortama

Variety/ Sorta Date/ Datum	August 8 th 8. kolovoza	August 14 th 14. kolovoza	August 23 th 23. kolovoza	September 8 th 8. rujna	September 24 th 24. rujna
Polyphenolic compounds Polifenolni spojevi	Total hydroxycinnamic acids Ukupne hidroksicimetne kiseline				
Merlot	120,432 ^e	102,385 ^h	231,046 ^e	159,042 ^e	123,971 ^e
Teran	n.a.**	538,327 ^a	n.a.	293,680 ^c	198,481 ^c
Tribidrag	118,443 ^e	232,050 ^e	191,861 ^f	203,873 ^d	119,223 ^e
Plavac mali	n.a.	192,221 ^f	n.a.	116,318 ^f	101,810 ^f
Dobričić	n.a.	314,057 ^c	n.a.	212,706 ^d	129,548 ^e
Lasina	1135,183 ^a	265,951 ^d	462,248 ^b	292,968 ^c	232,616 ^b
Plavina	278,041 ^c	543,670 ^a	172,419 ^f	n.a.	168,295 ^d
Babić	n.a.	508,872 ^b	n.a.	154,947 ^e	164,707 ^d
Ninčuša	489,382 ^b	n.a.	413,039 ^c	346,193 ^b	317,577 ^a
Vranac	n.a.	n.a.	136,549 ^s	458,377 ^a	233,737 ^b
Trnjak	207,012 ^d	154,713 ^s	315,052 ^d	n.a.	158,106 ^d
Ljutun	n.a.	n.a.	539,185 ^a	357,737 ^b	248,440 ^b
Pr > F	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

*Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$); **n.a. represents samples that were not yet in véraison or were unavalable

*Prosječne vrijednosti s različitim slovima u istom stupcu se značajno razlikuju ($P < 0,05$); **n.a. predstavlja uzorke čija šara nije još počela ili uzorci nisu bili dostupni

istraživanjem Romayera i sur. (1983). Sorta Lasina se upravo ističe u najvećem početnom masenom udjelu ovih kiselina sa 1164,29 mg/kg suhe mase kože, dok su sorte Teran, Tribidrag, Dobričić, Lasina, Plavina, Babić, Ninčuša, Vranac, Trnjak i Ljutun pokazale veće masene udjele u odnosu na sortu Merlot. Naime, jedino sorta Plavac mali crni ima manji masni udio hidrokscimetnih kiselina u usporedbi s referentnom sortom Merlot.

ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem u 2017. godini o promjeni sadržaja polifenolnih spojeva sadržanih u 11 crnih sorata utvrđeno je postojanje razlike između sastava i sadržaja polifenolnih spojeva u kožicama bobice grožđa, što se može pripisati specifičnom genotipu svake sorte. Antocijani su najzastupljeniji polifenolni spojevi u kožicama bobica istraživanih sorata, zatim ih slijede flavanol-glikozidi, potom flavanol-3-oli te naposljetku najmanje su zastupljene hidrokscimetne kiseline. Maseni udio antocijana u kožicama bobica kod većine sorata raste od početka šare prema tehnološkoj zrelosti. Najveći maseni udio ukupnih antocijana (61 881,79 mg/kg suhe kože) sadržava sorta Ninčuša, dok sorta Lasina sadržava najmanji udio tih spojeva (10 076,95 mg/kg suhe mase kože). Maseni udio flavanol-glikozida kod većine sorata blago raste nekoliko tjedana nakon šare, a zatim se njihov udio u kožicama bobica grožđa počinje smanjivati, dok kod nekih sorata nastavlja rasti prema tehnološkoj zrelosti. Sorta Ljutun sadržava najveći maseni udio ukupnih flavanol-glikozida (2362,13 mg/kg suhe mase kože), dok sorta Tribidrag sadržava najmanji maseni udio tih spojeva (712,22 mg/kg suhe mase kože). Maseni udio flavan-3-ola najveći je u kožicama bobica početkom šare kod većine sorata, a zatim se počinje smanjivati prema tehnološkoj zrelosti. Sorta Babić sadržava najveći maseni udio ukupnih flavan-3-ola (971,16 mg/kg suhe mase kože), dok sorta Ninčuša sadržava najmanji maseni udio tih spojeva (84,88 mg/kg suhe kože). Maseni udio hidrokscimetnih kiselina u kožicama bobica je povišen na početku šare kod većine sorata, a potom se smanjuje prema tehnološkoj zrelosti. Sorta Lasina sadržava najveći maseni udio ukupnih hidrokscimetnih kiselina (1135,18

mg/kg suhe mase kože), a sorta Plavac mali crni sadržava najmanji maseni udio tih spojeva (192,22 mg/kg suhe mase kože).

ZAHVALA

Istraživanje je obavljeno u sklopu HRZZ projekta "VITCLIC - Klimatske promjene I vinogradarstvo na području Hrvatske".

LITERATURA

- Bašić, M., Vibovec, H. (2013) Usporedba učinkovitosti ekstrakcije antocijana i tanina iz pokožice grožđa Plavac mali ionskim tekućinama i klasičnim postupcima ekstrakcije. Rad za Rektorovu nagradu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Bouby, L., Figueiral, I., Bouchette, A., Rovira, N., Ivorra, S., Lacombe, T., Pastor, T., Picq, S., Marinval, P., Terral, J-F. (2013) Bioarchaeological Insights into the Process of Domestication of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) during Times in Southern France. PLOS ONE, 8 (5) e63195. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063195>
- Castellarin, S.D., Bavaresco, L., Falginella, L., Goncavles, M. I. V. Z., Di Gaspero, G. (2012) Phenolics in Grape Berry and Key Antioxidants: In Geros, H., Chaves, M. M., Delrot, S. ed. The Biochemistry of the Grape Berry. Sharja, Bentham Science Publishers, 89- 110.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S. Geros, H. (2007) Biochemical Changes Throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. Food, 1-22.
- Downey, M. O., Dokoozlian, N. K. Krstic, M. P. (2006) Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. American Journal of Enology and Viticulture, 57, 257-268.
- Downey, M. O., Harvey, J., Robinson, S. (2004) The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. Australian Journal of Grape and Wine Research, 10 (1), 55-73. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00008.x>
- Downey, M., Harvey J., Robinson S. (2003) Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). Australian Journal of Grape and Wine Research, 9 (2), 110-121. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2003.tb00261.x>
- Flamini, R., Mattivi, F., De Rosso, M., Arapitsas, P. Bavaresco, L. (2013). Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. International Journal of Molecular Sciences, 14, 19651-19669. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms141019651>
- Garrido, J. Borges, F. (2013) Wine and Grape Polyphenols - a Chemical Perspective (Vol 44, Pg 3134, 2011). Food Research International, 54, 1843-1858.
- Karoglan Kontić, J., Rendulić Jelušić, I., Tomaz, I., Preiner, D., Marković, Z., Stupić, D., Andabaka, Ž., Maletić, E. (2016) Polyphenolic composition of the berry skin of six fungus-resistant red grapevine varieties. International Journal of Food Properties, 19, 1809-1824. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1107844>
- Kennedy, A. J., Matthews, A. M., Waterhouse, L. A. (2000) Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. Phytochemistry, 55 (1), 77-85. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00196-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00196-5)

- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.I. (2002) Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53 (4), 268-274.
- Kennedy, J.A., Saucier, C., Glories, Y. (2006) Grape and wine phenolics: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3), 239-248.
- Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L. Teissedre, P. L. (2013). Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts. *Molecules*, 18, 1076-1100.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R. (2006) Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (20), 7692-7702. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf061538c>
- Mirošević, N., Karoglan-Kontić, J. (2008) *Vinogradarstvo*. Zagreb: Nakladni zavod Globus.
- Pastorkova, E., Zakova, T., Landa, P., Novakova, J., Vadlejch, J. Kokoska, L. (2013). Growth Inhibitory Effect of Grape Phenolics against Wine Spoilage Yeasts and Acetic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 209-213.
- Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Goiffon, J.P., Reminiac, C.C., Sapis, J.C. (1983) The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31 (2), 346-349. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00116a040>
- Sabel, A., Bredefeld, S., Schlander, M. Claus, H. (2017) Wine Phenolic Compounds: Antimicrobial Properties against Yeasts, Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria. *Beverages*, 3, 14.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., Kakuda, Y. (2004) Polyphenolics in Grape Seeds-Biochemistry and Functionality. *Journal of Medical Food*, 6 (4), 291-299. DOI: <https://doi.org/10.1089/109662003772519831>
- Tarara, J.M., Lee, J., Spayd, S.E., Scagel, C.F. (2008) Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59 (3), 235-247.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., Gerós, H. (2013) Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (9), 18711-18739. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms140918711>
- Tomaz, I. (2016) Optimiranje pripreve uzoraka za analizu polifenolnih spojeva u kožici grožđa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Tomaz, I., Maslov, L., Stupic, D., Preiner, D., Asperger, D. Kontic, J. K. (2016) Solid-Liquid Extraction of Phenolics from Red Grape Skins. *Acta Chimica Slovenica*, 63, 287-297. DOI: <http://dx.doi.org/10.17344/acsi.2015.2181>
- Tomaz, I., Štambuk, P., Andabaka, Ž., Preiner, D., Stupić, D., Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Ašperger, D. (2017) The Polyphenolic Profile of Grapes. In: Thomas, S. ed. *Grapes: Polyphenolic Composition, Antioxidant Characteristics and Health Benefits*. New York, Nova Science Publishers, 1-70.
- Unusan, N. (2020) Proanthocyanidins in Grape Seeds: An Updated Review of Their Health Benefits and Potential Uses in the Food Industry. *Journal of Functional Foods*, 67, 11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103861>
- Watrelet, A. A., Heymann, H. Waterhouse, A. L. (2020) Red Wine Dryness Perception Related to Physicochemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 2964-2972. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01480>
- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J. Li, H. B. (2010) Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 622-646. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms11020622>
- Zhang, B., He, F., Zhou, P. P., Liu, Y. Duan, C. Q. (2015) Copigmentation between Malvidin-3-O-Glucoside and Hydroxycinnamic Acids in Red Wine Model Solutions: Investigations with Experimental and Theoretical Methods. *Food Research International*, 78, 313-320. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.026>
- Zhang, B., Yang, X. S., Li, N. N., Zhu, X., Sheng, W. J., He, F., Duan, C. Q. Han, S. Y. (2017) Colorimetric Study of Malvidin-3-O-Glucoside Copigmented by Phenolic Compounds: The Effect of Molar Ratio, Temperature, Ph, and Ethanol Content on Color Expression of Red Wine Model Solutions. *Food Research International*, 102, 468-477. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.034>