

Izrada baždarnih krivulja za analizu spojeva fermentacijske arome u vinu

Skendrović, Hanna

Undergraduate thesis / Završni 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:159:792106>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Hanna Skendrović

7566/PT

**IZRADA BAŽDARNIH KRIVULJA ZA ANALIZU SPOJEVA
FERMENTACIJSKE AROME U VINU**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Osnove prehrambenih tehnologija

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Tomašević

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Izrada baždarnih krivulja za analizu spojeva fermentacijske arome u vinu

Hanna Skendrović, 0058212327

Sažetak: Aroma je jedan od glavnih faktora koji utječu na kvalitetu vina, a čini je više od 800 hlapljivih spojeva. Cilj ovog rada bila je izrada baždarnih krivulja te identifikacija i kvantifikacija 12 aromatskih spojeva u mladom crnom vinu Portugizac. Analizirani spojevi kvantificirani su uz pomoć baždarnih krivulja izrađenih primjenom plinske kromatografije s masenom detekcijom uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS). U vinu Portugizac analizirano je 8 estera: etil acetat, etil butanoat, *n*-amil acetat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanoat, 2-feniletil acetat i dietil sukcinat te četiri viša alkohola: *n*-butanol, *n*-amil alkohol, 1-heksanol te 2-feniletanol. Od estera, *n*-amil acetat je utvrđen kao najznačajniji za aromu, a slijede ga etil butirac i etil heksanoat. Ostali esteri su određeni u koncentracijama ispod senzorskog praga osjetljivosti. Od analiziranih viših alkohola, aromi mladog crnog vina Portugizac najviše doprinose *n*-amil alkohol i 2-feniletanol, zatim *n*-butanol.

Ključne riječi: aroma vina, fermentacijska aroma, GC/MS, baždarne krivulje

Rad sadrži: 34 stranice, 14 slika, 7 tablica, 44 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Tomašević

Pomoć pri izradi: Katarina Lukić, mag. ing.

Datum obrane: 15. lipnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Development of calibration curves for the analysis of fermentation aroma compounds in wine

Hanna Skendrović, 0058212327

Abstract: Aroma is one of the main factors affecting the quality of wine, and it contains more than 800 volatile compounds. The aim of this study was to make calibration curves and to identify and quantify 12 aromatic compounds in young red wine Portugizac. The analyzed compounds were quantified using calibration curves conducted by solid-phase microextraction prior to gas chromatography coupled with mass spectroscopy (SPME-GC/MS). Eight esters: ethyl acetate, ethyl butanoate, *l*-amyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, 2-phenylethyl acetate and diethyl succinate; and four higher alcohols were analyzed in Portugizac wine: *l*-butanol, *l*-amyl alcohol, 1-hexanol and 2-phenylethanol. Among esters, *l*-amyl acetate was found to be the most important, followed by ethyl butyrate and ethyl hexanoate. Other esters were determined in concentrations lower than olfactory threshold. Among analyzed higher alcohols, the aroma of young red wine Portugizac was mostly contributed by *l*-amyl alcohol and 2-phenylethanol, followed by *l*-butanol.

Keywords: wine aroma, fermentation aroma, GC/MS, calibration curves

Thesis contains: 34 pages, 14 figures, 7 tables, 44 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Marina Tomašević, Assistant professor

Technical support and assistance: Katarina Lukić, mag. ing. preh. tech. aliment.

Defence date: June 15th 2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. AROMA VINA	2
2.1.1. Sortna aroma vina	2
2.1.2. Fermentacijska aroma vina	3
2.1.3. Aroma starenja vina	12
2.2. METODE ANALIZE AROME VINA	13
2.2.1. Ekstrakcija SPME tehnikom	14
2.3. Razvoj metode	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Uzorci vina	16
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Instrumenti i pomoćni pribor	16
3.2. METODE	17
3.2.1. Izrada baždarnih krivulja	17
3.2.2. Kromatografski uvjeti	19
3.2.3. Identifikacija i kvantifikacija	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. KALIBRACIJSKE KRIVULJE	18
4.2. UZORCI VINA PORTUGIZAC	21
5. ZAKLJUČAK	30
6. POPIS LITERATURE	31

1. UVOD

Aroma je jedan od glavnih faktora koji utječe na kvalitetu vina, a rezultat je međusobnog djelovanja brojnih hlapljivih spojeva. S obzirom na faze nastanka, spojevi arome dijele se u tri glavne kategorije: (i) sortnu aromu, koja potječe od same sirovine, odnosno grožđa; (ii) fermentacijsku aromu, koja nastaje tijekom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije; te (iii) aromu starenja, koja je rezultat čuvanja vina u drvenim bačvama ili bocama, gdje se aromatski spojevi ekstrahiraju iz drva bačve ili nastaju kao posljedica enzimskih i kemijskih reakcija. Koncentracija spojeva arome ovisi o brojnim faktorima, kao što su agroklimatski uvjeti, sama sorta i stupanj zrelosti grožđa te uvjeti vinifikacije.

Fermentacijska aroma kvantitativno je najznačajnija kategorija spojeva arome vina, s obzirom da tijekom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije nastaje preko 50 % ukupnih spojeva arome. Većina tih spojeva nastaje kao rezultat metabolizma kvasaca, iz raznih nehlapljivih i nemirisnih prekursora. Pritom koncentracija sintetiziranih spojeva arome u najvećoj mjeri ovisi o udjelu prekursora, samom soju kvasca koji provodi alkoholnu fermentaciju, temperaturi fermentacije te drugim tehnološkim postupcima, kao što je primjerice primjena postupka maceracije.

Spojevi arome vina identificiraju se i kvantificiraju primjenom tehnike plinske kromatografije (GC, engl. *gas chromatography*), gdje se smjesa hlapljivih spojeva razdvaja na pojedinačne komponente primjenom različitih stacionarnih faza (kolona), te eluiraju uz pomoć inertnog plina nosioca i odgovarajućeg temperaturnog programa.

Cilj ovog rada bila je izrada baždarnih krivulja za predstavnike fermentacijske arome vina: estere i više alkohole. Osim toga, cilj je bio i primijeniti izrađene kalibracijske krivulje za analizu fermentacijske arome mladog crnog vina Portugizac. Pritom su spojevi arome analizirani primjenom plinske kromatografije s masenom detekcijom uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. AROMA VINA

Vino je jedan od najkompleksnijih proizvoda prema sastavu hlapljivih aromatskih spojeva (Jeleń i Szczurek, 2010). Aromu vina tvori više od 800 hlapljivih spojeva, od čega samo nekoliko desetina doprinosi samom mirisu vina (Panighel i Flamini, 2014). Razlike u karakteristikama određenih aroma mogu se objasniti različitim omjerima koncentracija hlapljivih spojeva i njihovih senzorskih pragova osjetljivosti. Pritom senzorski prag osjetljivosti predstavlja najnižu koncentraciju pojedinog spoja koja stvara uočljivu razliku u aromi ili okusu (Noble, 1988). Omjer koncentracije pojedinog spoja u vinu i njegovog senzorskog praga osjetljivosti rezultira tzv. OAV (engl. *odor activity value*) vrijednosti, odnosno broju koji na vrlo lak način omogućava procjenu doprinosa svakog spoja aromi vina: u slučaju da je $OAV \geq 1$ zaključujemo da pojedini spoj utječe na miris vina, dok vrijednost manja od 1 označava spojeve koji nemaju direktan utjecaj na sam miris vina (Bosch-Fusté i sur., 2007).

Najčešća podjela hlapljivih spojeva u vinu je, prema fazama nastanka, na sljedeće kategorije:

- sortna aroma – spojevi arome koji potječu iz grožđa,
- fermentacijska aroma – spojevi arome koji nastaju metabolizmom kvasca i bakterija tijekom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije,
- aroma starenja – spojevi arome koji nastaju raznim fizikalnim i kemijskim reakcijama koje se odvijaju u drvu ili boci (Bosch-Fusté i sur., 2007).

2.1.1. Sortna aroma vina

Sortna aroma obuhvaća spojeve koji potječu iz grožđa i one koji nastaju tijekom primarne obrade grožđa (ruljanje, muljanje, maceracija i prešanje) kroz kemijske i enzimsko-biokemijske reakcije. Najznačajniji predstavnici ove skupine spojeva su monoterpeni pri čemu je nekoliko desetaka ovih spojeva identificirano u raznim sortama grožđa, kao i njihovim vinima. Od najveće važnosti su linalol, geraniol, nerol, citronelol i α -terpineol. Ovi spojevi, kao i njihovi oksidi, derivati furana i pirana, prvenstveno su nositelji sortne arome muškatih vina, gdje je utvrđen raspon njihovih koncentracija od 5 do 30 mg/L (Pisarnitskii, 2001). Nadalje, primarni aromatski spojevi koji mogu imati velik doprinos aromi vina i usko su vezani s kvalitetom bijelih

vina te se mogu koristiti za razlikovanje monosortnih vina su, osim terpena, C6 spojevi (npr. *trans*-2-heksenal, 1-heksanol, *cis*-3-heksen-1-ol i *trans*-2-heksen-1-ol) te C13-norizoprenoidi (npr. β -damaskenon, α - i β -ionon) (Zalacain i sur., 2007). Spojevi primarne arome, njihov senzorski prag osjetljivosti i koncentracije detektirane u vinima prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Popis pojedinačnih spojeva sorte arome s njihovim rasponom koncentracija u vinu, senzorskim pragom osjetljivosti i opisom arome (Zalacain i sur., 2007; Swiegers i sur., 2005; Francis i Newton, 2005; Komes i sur., 2006; Tao i Li, 2009)

Ime spoja	Raspon koncentracija u vinu ($\mu\text{g/L}$)	Senzorski prag osjetljivosti ($\mu\text{g/L}$)	Opis arome
Linalol	12,5-250	25	Cvjetna, lavanda, ruža
Geraniol	15-300	30	Ruža, slatka
Nerol	7,5-150	15	Biljna
β -citronelol	9-180	18	Citronela
α -terpineol	125-2500	250	Menta, biljna
β -damaskenon	0,025-0,5	0,05	Jabuka, ruža, med
α -ionon	1,3-26	2,6	Malina, slatka
β -ionon	0,045-0,9	0,09	Morska trava, ljubičica
<i>trans</i> -2-heksenal	0,3-6	0,6	Biljna
<i>trans</i> -2-heksen-1-ol	7,5-150	15	Zelena trava, biljna

Čimbenici koji utječu na formiranje primarnih aroma su prvenstveno agroklimatski uvjeti (svjetlo, padaline, temperatura, položaj vinograda i vrsta tla) i sama sorta grožđa te stupanj zrelosti i prinos grožđa, odnosno udio spojeva s dušikom, koji su prekursori arome. Spojevi sorte arome najčešće se opisuju kao: cvjetna, voćna, povrtna aroma odnosno miris po medu i na svježije grožđe (muškat) (Pisarnitskii, 2001).

2.1.2. Fermentacijska aroma vina

Spojevi fermentacijske arome nastaju tijekom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije. Općenito, fermentacija je oblik metabolizma u kojem se oslobađa energija, a u kojem su i supstrat (početni davatelj elektrona) i nusprodukt (konačni akceptor elektrona) organski spojevi. Od disanja se, u osnovi, razlikuje po tome što ne zahtijeva sudjelovanje molekularnog kisika (Jackson, 2008). Fermentacijski produkti pružaju pozadinu aromi svakog vina (Pisarnitskii, 2001). Iako postoje mnogi biokemijski putevi fermentacije, najčešći je onaj koji

provodi kvasac *Saccharomyces cerevisiae* – alkoholna fermentacija. U alkoholnoj fermentaciji etanol djeluje kao konačni akceptor elektrona, dok je glukoza preferirani donor elektrona. Iako *S. cerevisiae* posjeduje sposobnost disanja, pretežno fermentira, čak i u prisutnosti kisika. Većina organizama je sposobna fermentirati šećere, ali oni će to činiti samo u uvjetima nedostatka kisika. Takvo ponašanje djelomično proizlazi iz toksičnog djelovanja uobičajenih krajnjih produkata fermentacije, poput mliječne kiseline i etanola. Pored toga, fermentacija je poprilično neučinkovit način oslobađanja energije. Na primjer, alkoholna fermentacija pretvara tek oko 6 do 8 % energije kemijske veze glukoze u lako dostupnu metaboličku energiju (ATP – adenzin trifosfat). Velik dio energije ostaje vezan u krajnjem akceptoru elektrona – etanolu (Jackson, 2008).

Najvažniji predstavnici fermentacijske arome su viši alkoholi, esteri, karbonilni spojevi, hlapive masne kiseline te hlapljivi fenoli, a u nastavku će biti detaljnije opisani.

2.1.2.1. Viši alkoholi

Alkoholi s više od dva ugljikova atoma obično se nazivaju višim alkoholima. Mogu biti prisutni u zdravom grožđu, ali rijetko se pojavljuju u značajnim količinama. Pritom su iznimka heksanoli, koji doprinose mirisu po vegetativnom, a koji su prisutni u višim koncentracijama već u samom grožđu. Ostali značajni viši alkoholi koji potječu iz grožđa, a ostaju nepromijenjeni nakon alkoholne fermentacije su: 2-etil-1-heksanol, benzil alkohol, 2-feniletanol, 3-oktanol i 1-okten-3-ol. Međutim, većina viših alkohola, koji se nalaze u vinu, su nusproizvod fermentacije kvasca (Panighel i Flamini, 2014; Jackson, 2008).

Viši alkoholi nastaju metabolizmom šećera u kvascima (anaboličkim putem), kao i katabolički ili Ehrlichovim putem razgradnje aminokiselina (reduktivna denitrifikacija) (Jackson, 2008; Panighel i Flamini, 2014). Njihova je sinteza usko vezana s proizvodnjom etanola. Obično čine oko 50 % aromatičnih sastojaka vina, ne uključujući etanol (Panighel i Flamini, 2014). Podijeljeni su u dvije kategorije: (i) alifatski i (ii) aromatski, a izuzetno su važni u vinu i destilatima. Alifatski alkoholi uključuju propanol, izoamil alkohol, izobutanol i amil alkohol. Aromatski alkoholi se sastoje od 2-feniletanol alkohola i tirozola. Kvantitativno najvažniji viši alkoholi su: 1-propanol, 2-metil-1-propanol (izobutil alkohol), 2-metil-1-butanol i 3-metil-1-butanol (izoamil alkohol) (Swiegers i sur., 2005), a najčešće imaju snažan, opor miris (Panighel i Flamini, 2014). 2-feniletanol (fenetil alkohol) je najvažniji fenolni derivat (Panighel i Flamini, 2014). Viši alkoholi s razgranatim lancem, kao npr. *i*-amil alkohol, amil alkohol i *i*-butanol, sintetiziraju se u stanici kvasca Ehrlichovim putem, koji uključuje razgradnju aminokiselina

razgrantog lanca (leucina, izoleucina i valina) (Swiegers i sur., 2005; Jackson, 2008; Panighel i Flamini, 2014).

Na stvaranje viših alkohola tijekom fermentacije značajno utječe primijenjena vinarska praksa (Jackson, 2008). Prvenstveno, koncentracija aminokiselina (prekursora za više alkohole) u moštu utječe i na veću proizvodnju viših alkohola, gdje se ukupna proizvodnja viših alkohola povećava kako raste koncentracija odgovarajućih aminokiselina (Swiegers i sur., 2005). Nadalje, koncentracija etanola, temperatura fermentacije, pH i sastav mošta, aeracija, količina krutih čestica, sorta i zrelost grožđa te vrijeme kontakta s pokožicom grožđa također utječu na koncentraciju viših alkohola u konačnom proizvodu – vinu (Jackson, 2008; Panighel i Flamini, 2014; Swiegers i sur., 2005).

U malim koncentracijama (<300 mg/L) viši alkoholi u pravilu doprinose kompleksnosti arome vina, dok pri višim koncentracijama (> 400 mg/L) nadvladavaju sam miris vina te imaju negativan utjecaj (Jackson, 2008; Panighel i Flamini, 2014). U tablici 2 navedeni su najznačajniji viši alkoholi u vinu i njihov raspon koncentracija te opisi njihove arome.

Tablica 2. Popis pojedinačnih spojeva viših alkohola s njihovim rasponom koncentracija u vinu, senzorskim pragom osjetljivosti i opisom arome (Francis i Newton, 2005; Wang i sur., 2016; Komes i sur., 2006; Fang i Qian, 2006; Vilanova i Martínez, 2007; Pino i Queris, 2010; Makhotkina, 2011; Swiegers i sur., 2005)

Ime spoja	Raspon koncentracija u vinu (mg/L)	Senzorski prag osjetljivosti (mg/L)	Opis arome
1-heksanol	4-80	0,8	smola, cvjetna, biljna
2-etil-1-heksanol	0,0088-2,4	8	biljna, cvjetna, citrus
Benzil alkohol	1,11-2,01	0,62	prženo, tostirano
2-feniletanol	10-80	7,5	Ruža, med, ljiljan
1-propanol	9-68	500	Omamljujući, opor
Izobutil alkohol	9-100	500	Alkoholni, gorko
2-metil-1-butanol	0,001-0,01	40	alkoholni
Izoamil alkohol	16,5-472	30	Viski, slad, lak za nokte
Cis-3-heksen-1-ol	0,2-4	0,4	Biljna

Viši alkoholi također imaju neizravnu ulogu u razvoju vinskog *bouqueta*, karakterističnog za vina nakon dugog perioda starenja. Reakcijama s organskim kiselinama viši alkoholi povećavaju broj estera koji se nalaze u vinu. Tijekom fermentacije nastajanje estera odvija se

rapidno pod kontrolom enzima kvasca. Određene reakcije esterifikacije se nastavljaju odvijati tijekom starenja vina, ali mnogo sporijim, neenzimskim tempom (Jackson, 2008).

2.1.2.2. Acetali

Acetali nastaju reakcijom acetaldehida s hidroksilnom grupom etilnog alkohola, a viši acetali iz drugih alkohola i aldehida (Isac-García i sur., 2016). Obično se proizvode tijekom starenja i destilacije te doprinose senzorskom atributu nalik povrću. Iako je više od 20 acetala izolirano iz vina, njihova koncentracija i hlapljivost sugeriraju da imaju malen senzorski utjecaj u vinima (Jackson, 2008).

2.1.2.3. Esteri

U vinu se većina estera nalazi samo u tragovima, tako da su individualno prisutni u koncentracija nižim od osjetilnog praga, dok kumulativno uglavnom ne prelaze koncentracije više od 100 mg/L (Sumbly i sur., 2010; Jackson, 2008). Bez obzira na to, ova skupina spojeva je, nakon vode, etanola i viših alkohola, sljedeća najznačajnija skupina, a od velikog su značaja za profil arome vina (Sumbly i sur., 2010). Činjenica da je većina estera prisutna u koncentracijama oko njihovog senzorskog praga osjetljivosti ukazuje na to da i male promjene koncentracije mogu značajno utjecati na aromu vina (Jackson, 2008).

Esteri se formiraju kao kondenzacijski produkti između karboksilne skupine organske kiseline i hidroksilne skupine alkohola ili fenola, uz eliminaciju molekule vode (Sumbly i sur., 2010; Jackson, 2008). Od svih funkcionalnih skupina u vinu, ester i su najzastupljeniji. Identificirano je preko 160 različitih estera u vinu (Jackson, 2008). Esteri su produkt kvasaca tijekom fermentacije (metabolizam lipida i acetil-CoA), a posebno su značajni za voćnu aromu vina (Jackson, 2008; Swiegers i sur., 2005).

Esteri se mogu grupirati u ravnolančane (alifatske) ili cikličke (fenolne) kategorije. Većinu fenolnih estera karakteriziraju niski senzorski pragovi osjetljivosti. Unatoč tome, karakterizira ih i slaba hlapljivost, a vrlo često su prisutni samo u tragovima u vinu, što ih uglavnom čini senzorski zanemarivim. Alifatski ester i čine veću skupinu estera u vinu. Podijeljeni su na estere mono-, di- i tri-karboksilnih kiselina (ovisno o broju karboksilnih skupina u kiselini) i estere hidroksi- i okso-kiselina (ovisno sadrži li masna kiselina hidroksilnu ili ketonsku grupu). Od svih podjela, smatra se da samo ester i monokarboksilnih kiselina imaju aromatsku važnost, a najvažniji su oni na bazi etanola i zasićenih masnih kiselina, poput heksanske, oktanske i

dekanske kiseline, kao i oni na bazi octene kiseline i viših alkohola, poput *n*-amil i *n*-butil alkohola. Općenito je poznato da su kraći alifatski etilni esteri nositelji voćnih nota različitih vrsta (uglavnom tropskog voća, banana, ananasa, ali i jabuke, kruške itd.), a poznatiji su pod nazivom „voćni esteri“ (Jackson, 2008). Etilni esteri su grupa sa snažnim utjecajem na aromu vina, s etil acetatom kao kvalitativno najčešćim esterom u vinu, zbog brzine njegovog nastajanja iz etanola i octene kiseline. Zbog toga ovaj spoj često doprinosi aromi vina. Pri nižim koncentracijama (<100 mg/L) daje željenu i voćnu notu vinu, no pri višim koncentracijama nositelj je nepoželjne arome laka za nokte i acetona. Kako se povećava duljina ugljikovodičnog lanca, povećava se sapunasti miris, a estere nastale od C16 i C18 masnih kiselina karakterizira masna aroma (Sumbly i sur., 2010). Glavni etilni esteri koji su karakterizirani voćnim i cvjetnim notama su: etil heksanoat i etil butirac (miris ananasa i kore jabuke), etil oktanoat, etil dekanat, etil dodekanoat, *n*-amil acetat ili 3-metilbutil acetat (miris po banani), benzil acetat (miris po jabuci), heksil acetat i 2-feniletil acetat (Panighel i Flamini, 2014; Jackson, 2008). Esteri di- i trikarboksilnih masnih kiselina obično su u vinu prisutni u koncentracijama do 1 mg/L. Unatoč tome, zbog njihovog slabog mirisa, uglavnom nisu aromatski značajni. Esteri hidroksi- i okso-kiselina imaju nisku hlapljivost i, prema tome, imaju malu senzorsku ulogu (Jackson, 2008; Makhotkina, 2011).

Po završetku fermentacije, voćni esteri uglavnom prelaze svoje konstante ravnoteže. Kao rezultat toga, mnogi acetatni esteri počinju se hidrolizirati na svoje komponente: alkohole i octenu kiselinu. Hidrolizi pogoduju više temperature i niže pH vrijednosti. Za vina koja većinu svog mirisa dobivaju iz voćnih estera, starenje rezultira smanjenjem svježine i kompleksnosti arome. Suprotno tome, esteri viših alkohola se obično zadržavaju u stanicama kvasca, umjesto da se ispuštaju u okolni fermentirajući mošt. Kako je njihova koncentracija u vinu obično ispod njihove konstante ravnoteže na kraju fermentacije, dolazi do spore sinteze estera viših alkohola. To se posebno odnosi na one na bazi razgranatih, kratkolančanih masnih kiselina (Jackson, 2008).

Općenito, najznačajniji esteri u vinu su etil acetat (voćna aroma), *n*-amil acetat, *n*-butil acetat (aroma banane), etil kaproat, etil heksanoat (aroma jabuke) i 2-feniletil acetat (med, voćna, cvjetna aroma) (Swiegers i sur., 2005), a u tablici 3 navedeni su još neki predstavnici estera u vinu i njihov raspon koncentracija te opis njihove arome.

Tablica 3. Popis pojedinačnih spojeva estera s njihovim rasponom koncentracija u vinu, senzorskim pragom osjetljivosti i opisom arome (Francis i Newton, 2005; Makhotkina, 2011; Swiegers i sur., 2005)

Ime spoja	Raspon koncentracija u vinu (crveno vino) ($\mu\text{g/L}$)	Senzorski prag osjetljivosti ($\mu\text{g/L}$)	Opis arome
Etil acetat	22500-63500	12264	Ananas, lak za nokte
Izoamil acetat	118-4740	30	Banana, slatka, kruška
2-feniletal acetat	0-18500	250	Cvjetna, ruža, voćna
Izobutil acetat	1-2400	1600	Banana, voćna
Etil izobutirat	9,8-617	15	Slatka, gumena
Etil 2-metilbutirat	1,1-61	18	Jabuka
Etil izovalerat	2,2-138	3	Voćna
Etil butanoat	69,2-1118	20	Jabuka, jagoda, banana
Etil heksanoat	153-2556	14	Kora jabuke, voćna
Etil oktanoat	138-820	5	Voćna, masna, sapun
Etil dekanat	14,5-423	200	Masna, cvjetna, sapun
Dietil sukcinat	3,9-10000	200 000	Voćna

Laktoni su posebna podskupina estera formirana intraesterifikacijom između karboksilne i hidroksilne skupine matične molekule. Rezultat te reakcije je stvaranje cikličkog estera. Kao i kod ostalih estera, laktoni postoje u ravnoteži s reaktantima (hidroksi-kiselinom). Većina laktona u vinu je građena od esterificiranih ugljičnih prstena sa četiri atoma ugljika. Najčešći su γ -laktoni, gdje je C4 hidroksilna skupina uključena u esterifikaciju duž lanca. Laktoni mogu doći iz grožđa, biti sintetizirani tijekom alkoholne fermentacije i starenja vina ili se ekstrahirati iz hrastove bačve. Oni laktoni dobiveni iz grožđa uglavnom nisu uključeni u razvoj sortnih mirisa. U ovoj skupini je bitno istaknuti tzv. „vinski lakton“, kojeg karakterizira drveni, slatki miris kokosovog oraha. Poznato je 8 stereoizomera vinskog laktona koji imaju izrazito različite pragove koncentracija, od 0,00001 ng/L pa do 1000 ng/L. Većina laktona u grožđu se sintetizira tijekom fermentacije, iako se neki stvaraju u grožđu tijekom karbonske maceracije. Nastaju derivacijom iz amino ili organskih kiselina, osobito glutaminske i jantarne kiseline, a najznačajniji predstavnici su soleron (4-acetil-4-hidroksibutanska kiselina- γ -lakton) i pantolakton (2,4-dihidroksi-3,3-dimetilbutanska kiselina- γ lakton) (Jackson, 2008).

2.1.2.4. Hlapljivi fenoli

Hlapljivi fenoli nastaju iz prekursora, hidroksicimetnih kiselina, koje su prirodno prisutne u moštu i vinu, a predstavljaju relativno brojnu skupinu spojeva, od kojih neke imaju snažnu mirisnu aktivnost koja može utjecati na aromu brojnih fermentiranih pića. U moštu se nalaze tek u tragovima, a pretežno ih proizvode kvasci tijekom fermentacije (Castro Mejías i sur., 2003; Swiegers i sur., 2005). *Brettanomyces bruxellensis* odavno je prepoznat kao čest kontaminant u vinu zbog svojih produkata neuobičajenih aromatskih svojstava (konjski znoj, miris po staji i spaljenoj plastici), koji značajno smanjuju kvalitetu vina. Može koristiti nekoliko izvora ugljika, uključujući etanol. Kvasac proizvodi širok spektar metabolita, od kojih su najznačajniji octena kiselina i etilfenoli, poput 4-etilfenola i 4-etilgvajakola. 4-etilfenol i 4-etilgvajakol dva su spoja koja su posebno povezana s prisutnošću i aktivnošću ovog kvasca u vinu (Conterno i sur., 2006). Postupci za kontroliranje nastanka neželjene arome djelovanjem kvasca *B. bruxellensis* su temeljito čišćenje i održavanje higijene u vinariji, regulacija pH, korištenje sumporovog dioksida, smanjeno izlaganje mošta kisiku i korištenje nekontaminiranih bačvi (Wedral i sur., 2010).

Najvažniji hlapljivi fenoli koji mogu biti prisutni u vinu su vinilfenoli u bijelim vinima i etilfenoli u crnim vinima. Neki od ovih spojeva imaju neugodne mirise te mogu utjecati negativno na kvalitetu vina. Etilfenoli (4-etilfenoli i 4-etilgvajakol) su nositelji arome nalik na mokru kožu i konjski znoj, dok su vinilfenoli (4-vinilfenol i 4-vinilgvajakol) odgovorni za aromu na teške farmaceutske mirise (Castro Mejías i sur., 2003; Swiegers i sur., 2005). Hlapljivi fenoli imaju relativno nizak senzorski prag detekcije i stoga se lako otkriju (Swiegers i sur., 2005). U tablici 4 navedeni su najznačajniji hlapljivi fenoli u vinu i njihov raspon koncentracija te opis njihove arome.

Tablica 4. Popis pojedinačnih spojeva hlapljivih fenola s njihovim rasponom koncentracija u vinu, senzorskim pragom osjetljivosti i opisom arome (Farina i sur., 2007; Rapp, 1998)

Ime spoja	Raspon koncentracija u vinu (crveno vino) (µg/L)	Senzorski prag osjetljivosti (µg/L)	Opis arome
4-etilfenol	9-588	605*	Po konju
4-etilgvajakol	11-290	110*	Po dimu, vaniliji, klinčiću
4-vinilfenol	0-1150	770**	Medicinski, miris plastike
4-vinilgvajakol	0-496	440**	Po dimu, vaniliji, klinčiću

* prag osjetljivosti u crnim vinima

** prag osjetljivosti u bijelim vinima

2.1.2.5. Karbonilni spojevi (aldehidi i ketoni)

Aldehidi su važni karbonilni spojevi prisutni u raznim biološkim sustavima. Važni izvori aldehida su alkoholna fermentacija i procesi lipidne oksidacije. Neki aldehidi su važni spojevi arome jer imaju izuzetnu kvalitetu mirisa s izrazito niskim senzorskim pragovima osjetljivosti (Schmarr i sur., 2008). Ukupno su 24 različita aldehida (uglavnom alkila) identificirana u vinima. Mogu se formirati tijekom proizvodnje vina ili biti već prisutni u grožđu. Općenito su C6 aldehidi (heksanal, (E)-2-heksenal, (Z)-3-heksenal i (Z)-2-nonenal) odgovorni za zelenu, zeljastu i ponekad gorku aromu vina. Oni su uglavnom posljedica enzimskog cijepanja oksidirane linoleinske i linolenske kiseline tijekom muljanja grožđa prije fermentacije (Panighel i Flamini, 2014).

Acetaldehid je glavni karbonilni spoj koji se nalazi u vinu, a detektiran je u koncentracijama u rasponu od 10 do 75 mg/L. Karakterizira ga senzorski prag osjetljivosti od 100 mg/L. Aldehidi doprinose aromi vina s deskriptorima poput „trule jabuke“ i „orašastih plodova“, ali vrlo često su znak oksidacije vina. U vinu se količina acetaldehida može s vremenom povećati zbog oksidacije etanola, aktivnosti filma kvasca i aeracije. Koncentracija acetaldehida se također povećava s porastom temperature fermentacije. Kao posljednji prekursor prije stvaranja etanola, acetaldehid je jedan od glavnih metaboličkih intermedijera u fermentaciji kvasca. Piruvat, krajnji produkt glikolize, pretvara se u acetaldehid djelovanjem enzima piruvat dehidrogenaze. Acetaldehid se potom pretvara u etanol pomoću enzima alkohol dehidrogenaze. U crnim vinima acetaldehid može pridonijeti kompleksnosti arome, u uvjetima dok je prisutan u koncentracijama nižim od 100 mg/L (Swiegers i sur., 2005).

Drugi važan karbonilni spoj u vinu je diacetil, kojeg karakterizira aroma maslaca. Diacetil je diketon, koji vinu daje masnu aromu. U malim koncentracijama može se opisati kao orašast ili tostiran. Prag osjetljivosti diacetila iznosi 0,2 mg/L. Iako kvasci biosintetiziraju nešto diacetila (0,2-0,3 mg/L) u vinu, najveća koncentracija potječe iz metaboličke aktivnosti bakterija mliječne kiseline tijekom jabučno-mliječne fermentacije (Swiegers i sur., 2005; Francis i Newton, 2005).

2.1.2.6. Hlapive masne kiseline

Prisutnost masnih kiselina u vinu primarno dolazi iz metabolizma kvasaca i bakterija. Tijekom alkoholne fermentacije, kvasci stvaraju male količine kapronske (C6), kaprilne (C8) i kaprinske (C10) kiseline. Te masne kiseline (C6 do C10) karakterizira mliječni miris, miris na koze i obično su prisutne u koncentracijama iznad senzorskog praga osjetljivosti u slučaju

mikrobiološkog kvarenja vina (Makhotkina, 2011). Hlapive masne kiseline mogu imati pozitivne i negativne učinke na aromu i okus, ovisno o koncentraciji, vrsti i stilu vina (Swiegers i sur., 2005).

Koncentracija hlapivih kiselina u vinu obično je između 500 i 1000 mg/L (10-15% ukupnog sadržaja kiselina), a octena kiselina čini oko 90 % hlapivih masnih kiselina. Ostatak hlapivih kiselina, uglavnom propionska i kapronska, nastaju kao rezultat metabolizma masnih kiselina kvasaca i bakterija (Swiegers i sur., 2005). Octena kiselina je od posebnog značaja. U povišenim koncentracijama daje vinu karakter poput octa, a postaje nepoželjna u koncentracijama od 0,7 do 1,1 g/L, dok joj je optimalna koncentracija između 0,2 i 0,7 g/L (Swiegers i sur., 2005; Makhotkina, 2011). Koncentracije kapronske, kaprilne i kaprinske kiseline u vinu ovise o soju kvasca, uvjetima fermentacije i sastavu mošta (Panighel i Flamini, 2014). U tablici 5 su navedene hlapive masne kiseline, uz raspon koncentracija u vinu, deskriptore arome i senzorski prag osjetljivosti.

Tablica 5. Popis pojedinačnih spojeva karboksilnih kiselina s njihovim rasponom koncentracija u vinu, senzorskim pragom osjetljivosti i opisom arome (Francis i Newton, 2005; Swiegers i sur., 2005; Makhotkina, 2011)

Ime spoja	Raspon koncentracija u vinu (crveno vino) (µg/L)	Senzorski prag osjetljivosti (µg/L)	Opis arome
Izobutanska kiselina	434-7682	2300	Užeglo, maslac, sir
3-metilbutanska kiselina	305-3507	33,4	Znoj, kiselo, užeglo
Octena kiselina	69110-489370	200000	Kiselo
Butanska kiselina	434-4719	173	Užeglo, sir, zoj
Propanska kiselina	34830-113400	8100	Oporo, užeglo
Heksanska (kapronska) kiselina	853-9240	420	Znoj, užeglo, masno
Oktanska (kaprilna) kiselina	562-13000	500	Znoj, sir, užeglo
Dekanska (kaprinska) kiselina	62,1-2100	1000	Užeglo, masno

2.1.3. Aroma starenja vina

Aroma starenja ili postfermentacijska aroma javlja se kao rezultat dozrijevanja i starenja vina, a oblikuje se kroz enzimske i fizikalne reakcije vina u drvu ili u boci (Vilanova i sur., 2010; Jackson, 2008). Starenje u drvenim bačvama proces je koji se koristi za stabilizaciju boje i poboljšanje senzorskih karakteristika vina (Panighel i Flamini, 2014). Formiranje tzv. *bouqueta* vina odvija se oksidacijom već postojećih komponenti primarne ili sekundarne arome i/ili kemijskom odnosno fizikalnom ekstrakcijom sastojaka iz drveta bačve (Jackson, 2008). Mnogi spojevi se prenose iz drveta bačve u vino: polifenoli, laktoni, kumarini, polisaharidi, ugljikovodici i masne kiseline, terpeni, C13-norizoprenoidi, steroidi, karotenoidi i furani (Panighel i Flamini, 2014). Značajne su reakcije između aminokiselina i šećera u vinu, koje dovode do formiranja spojeva poput melanoida i viših aldehida, koji dijelom stupaju u reakciju s nekim alkoholima tvoreći acetale, hlapive spojeve vrlo finog mirisa (Jackson, 2008). Od značaja su i derivati vanilina i vitispirani, od kojih je najznačajniji 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN), koji je nositelj arome po kerozinu i tartufima. Koncentracija TDN-a se značajno povećava tijekom starenja vina (Silva Ferreira i Guedes de Pinho, 2004). Indirektnu ulogu u oblikovanju tzv. *bouqueta* vina imaju viši alkoholi, koji pri nižim koncentracijama (0,3 g/L ili manje) općenito doprinose kompleksnosti, a reakcijama s kiselinama povećavaju ukupni broj estera prisutnih u vinu. Masne kiseline također pridonose složenosti vinskog *bouqueta*, ali nakon određene koncentracije imaju negativan utjecaj (Jackson, 2008).

Tijekom starenja vina dolazi do značajnih promjena arome. Najveći problem predstavlja oksidacija vina tijekom koje dolazi do važnih promjena poput posmeđivanja odnosno promjene boje. No vrlo često dolazi i do narušavanja kvalitete vina, čak i prije promjene boje, zbog nastajanja nepoželjnih mirisa tijekom oksidacije. Spojevi odgovorni za aromu starih, oksidiranih vina su 2-nonenal, eugenol, benzaldehid i furfural (Escudero i sur., 2002). Kemijske promjene uzrokuju gubitak svježih i voćnih aroma vina, prvenstveno reakcije hidrolize i oksidacije. Hidrolizom dolazi do smanjenja koncentracije acetatnih i etilnih estera odgovornih za voćne karakteristike vina (Garde-Cerdán i sur., 2008).

2.2. METODE ANALIZE AROME VINA

Aromatski spojevi su često prisutni u vrlo niskim koncentracijama i karakteriziraju ih vrlo niski osjetilni pragovi (između ng/L i µg/L). Tvari arome su važne u vinu jer doprinose kvaliteti konačnog proizvoda. Kombinacija različitih tvari arome poput alkohola, estera, organskih kiselina, aldehida, ketona i terpena oblikuje karakter svakog vina i razlikuje jedno vino od drugog. Radi boljeg razumijevanja ove kompleksne problematike, bitno je poznavati koncentracije pojedinih spojeva arome, kao i njihove međusobne omjere.

Analiza spojeva arome obuhvaća primjenu plinske kromatografije (GC, engl. *gas chromatography*) s raznim detektorima, najčešće masenim detektorom (MS, engl. *mass spectrometry*). Općenito, GC/MS je sinergistička kombinacija dviju moćnih mikroanalitičkih tehnika (Sparkman i sur., 2011). Plinski kromatograf odvaja komponente smjese u vremenu, a maseni spektrometar daje informacije koje pomažu u strukturnoj identifikaciji svake komponente (Sparkman i sur., 2011; Woźniak i sur., 2020). Ova kombinacija ima nekoliko prednosti: (i) omogućuje razdvajanje komponenti složene smjese tako da se maseni spektri pojedinih spojeva mogu dobiti za kvalitativne svrhe; (ii) može dati kvantitativne informacije o tim istim spojevima (Sparkman i sur., 2011). Prema načelima „zelene analitičke kemije“, GC metoda povezana s MS detektorom najatraktivnija je metoda jer mobilna faza u GC-temeljenim metodama ne može uzrokovati onečišćenje okoliša, s obzirom da se radi o inertnom plinu. Stoga se posvećuje velika pažnja razvoju postupaka temeljenih na GC/MS metodi zbog dobre selektivnosti i osjetljivosti ove tehnike za određivanje analita prisutnog u tragovima u kompleksnim biološkim smjesama, poput vina. Također se smatra da su GC metode jeftinije i ekološki prihvatljivije od analiza temeljenih na tekućinskoj kromatografiji (LC, engl. *liquid chromatography*). Tehnike ionizacije masene spektrometrije koje zahtijevaju analite u plinskoj fazi idealne su za GC/MS jer je hlapljivost uzorka zahtjev plinske kromatografije (Woźniak i sur., 2020). GC/MS tehnika je ograničena na analite koji nisu samo hlapljivi i termalno stabilni, već mogu podnijeti i teške uvjete raspodjele plinskog kromatografa. Čak i uz ovo ograničenje, velik je broj komponenti koje se mogu odvojiti iz kompleksnih smjesa i identificirati pomoću GC/MS tehnike. Osim toga, spojevi koji postoje samo u plinskoj fazi pri temperaturama nižim od 100°C ne mogu biti odvojeni i ionizirani primjenom drugih tehnika osim GC/MS-a (Sparkman i sur., 2011). Međutim, prije same kromatografske analize nužno je provesti adekvatnu pripremu uzorka, odnosno ekstrakciju spojeva arome.

Upravo zbog toga je razvijeno nekoliko analitičkih metoda za ekstrakciju spojeva arome vina. One obuhvaćaju tzv. dinamičko *headspace* uzorkovanje, ekstrakciju tekuće-tekuće (LLE, engl. *liquid-liquid extraction*), ekstrakciju u čvrstoj fazi (SPE, engl. *solid-phase extraction*),

istodobnu ekstrakciju i destilaciju te superkrićnu fluidnu ekstrakciju. Svaki od ovih postupaka ima svoje prednosti i nedostatke. Većina ovih metoda su dugotrajne, a uključuju iscrpne korake koncentriranja, upotrebu štetnih organskih otapala, kao i plinski kromatograf opremljen s uređajima za *headspace* uzorkovanje (Demyttenaere i sur., 2003; Panighel i Flamini, 2014). Tehnike koje ne zahtijevaju niti upotrebu otapala niti dugotrajnu pripremu uzorka, kao što su mikroekstrakcija u čvrstoj fazi (SPME, engl. *solid-phase microextraction*) ili ekstrakcija pomoću sorbensa nanesenog na magnet za miješanje (SBSE, engl. *stir-bar sorptive extraction*), su uspješno primijenjene za profiliranje arome vina (Zalacain i sur., 2007).

2.2.1. Ekstrakcija SPME tehnikom

SPME su 1990. godine razvili Pawliszyn i sur., a svake godine tisuće radova opisuju različite aspekte ovog pristupa i primjene na različitim poljima (kemijska analiza, bioanaliza, znanost o hrani, znanosti o okolišu, farmaceutske i medicinske znanosti) (Panighel i Flamini, 2014). Primjena SPME u analizi vina najprije se fokusirala na analizu ostataka pesticida i ostalih kontaminanata (Demyttenaere i sur., 2003) te na studije sa standardnim otopinama (Rocha i sur., 2001). U novije vrijeme SPME se koristi za sortnu karakterizaciju vina i u analizi vinskog *bouqueta* koristeći različita vlakna. SPME se također primjenjuje za određivanje specifičnih spojeva u tragovima, poput diacetila, hlapljivih i slabo hlapljivih sulfida i disulfida, laktona od hrastovine u vinima starenim u bačvama, spoja iz čepova poput TCA (2,4,6-trikloranisol) i sl. (Demyttenaere i sur., 2003).

Prednosti SPME tehnike su brojne, a najvažnije su da je primjena otapala u potpunosti eliminirana, a vrijeme ekstrakcije može se smanjiti na svega nekoliko minuta. Od ostalih prednosti SPME metode vrijedi istaknuti: visoku osjetljivost i ponovljivost, brzinu, jednostavnost, niski trošak, mogućnost automatizacije uzorkovanja, a pogodna je za ekstrakciju i koncentriranje velikog broja hlapljivih i poluhlapljivih spojeva iz vodenih otopina (Arthur i Pawliszyn, 1990; Panighel i Flamini, 2014; Demyttenaere i sur., 2003). U ovom postupku se vlakna malog promjera, prekrivena stacionarnom fazom, stavljaju u vodeni uzorak. Analit prelazi u stacionarnu fazu i potom se termalno desorbira u injektoru plinskog kromatografa. SPME zahtjeva mali volumen uzorka, a spajanjem plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC/MS) omogućena je visoka osjetljivost detekcije spojeva. Iz tih razloga se ova tehnika koristi za proučavanje profila hlapljivosti raznih sorta voća, povrća i pića, uključujući grožđe i vino (Panighel i Flamini, 2014; Demyttenaere i sur., 2003).

2.3. Razvoj metode

Prilikom razvoja metode potrebno je uzeti u obzir samu prirodu uzorka, metodu injektiranja, tip detektora, plin nositelj i samu kolonu kao stacionarnu fazu. Analizirani spojevi moraju imati zadovoljavajuću hlapljivost i termalnu stabilnost. Također je iznimno važna i čistoća uzorka (Jones, 2010). Cilj razvoja metode je izrada kalibracijskih krivulja, odnosno mogućnost korištenja metode za kvantitativnu analizu nepoznatih uzoraka. Sama izrada kalibracijskih krivulja podrazumijeva upotrebu čistih standarda, pripremu otopina odgovarajućih koncentracija te analizu otopina s rastućim koncentracijama pojedinog uzorka, a regresijskom analizom se obrađuju dobiveni rezultati i određuje uspješnost samog postupka kalibracije.

Općenito, regresijska analiza je deterministički model, koji omogućava predviđanje vrijednosti za ovisnu varijablu (Y) kada je poznata neovisna varijabla (X). Model određuje vrstu odnosa između X i Y. Eksperimentalne vrijednosti rijetko odgovaraju matematičkom modelu, a postoje i razlike između promatranih i predviđenih vrijednosti koje daje model, a koje se nazivaju rezidualima. Zbroj kvadrata reziduala mora se svesti na što manju moguću mjeru da bi se što bolje procijenili parametri modela, a to se može učiniti upotrebom „metode najmanjih kvadrata“ (Moosavi i Ghassabian, 2018). Najjednostavniji regresijski model je linearni model u kojem je odnos X (poznat bez pogreške) i Y (poznat s pogreškom) ravna linija, $Y = aX + b$, gdje je a nagib pravca, a b odsječak na y-osi. Odnos između odgovora instrumenta i poznate koncentracije analita (standarda), koji se koristi kao kalibracijska krivulja, može se objasniti sličnim regresijskim modelom. Pretpostavka za ovaj model je da je pogreška mjerenja ista i normalno distribuirana za svaki uzorak (Moosavi i Ghassabian, 2018). Kalibracijska krivulja je regresijski model koji se koristi za predviđanje nepoznatih koncentracija analita od interesa na temelju odgovora instrumenta na poznate standarde. Linearnost kalibracijske krivulje obično se izražava koeficijentom korelacije (r) ili koeficijentom determinacije (r^2). Koeficijent korelacije blizak vrijednosti 1 ($r=1$) smatra se dokazom da je kalibracijska krivulja linearna (Moosavi i Ghassabian, 2018). Specifičan pokazatelj reprezentativnosti regresije jest koeficijent determinacije r^2 . Koeficijent determinacije je broj veći ili jednak nuli, ali manji ili jednak broju jedan. Model je to reprezentativniji, što je koeficijent determinacije bliži jedinici.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci vina

Uzorci vina Portugizac su izuzeti iz vinarija, a proizvedeni su tijekom berbe 2019. godine tradicionalnim načinom proizvodnje crnih vina (ruljanje/muljanje, maceracija i alkoholna fermentacija, prešanje, dozrijevanje).

3.1.2. Kemikalije

Za mikorekstraciju na čvrstoj fazi i izradu kalibracijskih krivulja metodom plinske kromatografije s masenom detekcijom (SPME-GC/MS), upotrijebljene su sljedeće kemikalije:

- Etil acetat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Etil butanoat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- *i*-amil acetat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Etil heksanoat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Etil oktanoat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Etil dekanat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- 2-feniletil acetat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Dietil sukcinat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- *i*-butanol, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- *i*-amil alkohol, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- 1-heksanol, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- 2-feniletanol, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- *n*-amil alkohol, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Etanol, HPLC grade, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
- Natrijev klorid, p.a., Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska

3.1.3. Instrumenti i pomoćni pribor

- Plinski kromatograf (Agilent Technologies 6890 Network Chromatograph) sa kvadrupolnim masenim detektorom (Agilent 5973 Inert Mass Selective detector), Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD

- Termoblok s magnetskom miješalicom Pierce Reacti-Therm Heating/Stirring, modul 18971, Rockford, Illinois, SAD
- Analitička vaga ($\pm 0,0001$ g), Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska
- SPME vlakno: Fiber Assembly 100 μm PDMS, Fused Silica, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, SAD
- Mikropipeta, 10-100 μL , Eppendorf, Hauppauge, New York, SAD
- Silikonski čepovi za HSS bočice Macherey-Nagel, Düren, Njemačka
- Viale
- Magneti
- Graduirana pipeta od 10 mL
- Odmjerne tikvice od 25 mL i 50 mL

3.2. METODE

Određivanje spojeva arome (esteri i viši alkoholi) provedeno je primjenom plinske kromatografije s masenom detekcijom (GC/MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME, engl. *solid-phase microextraction*), prema modificiranoj metodi opisanoj u istraživanju Tomašević i sur. (2017).

Istraživanje je provedeno u dvije faze:

- izrada baždarnih krivulja te
- primjena izrađenih baždarnih krivulja za analizu uzoraka vina.

3.2.1. Izrada baždarnih krivulja

Priprema pojedinačnih otopina standarda

Pojedinačne otopine standarda viših alkohola i estera pripremiti vaganjem određene količine pojedinog standarda u tikvicu od 25 mL te otapanjem u 50 %-tnoj otopini etanola. Navedene otopine standarda služe za pripremu zajedničke, STOCK otopine koja se koristi za izradu baždarnih krivulja. Tako su pripremljene otopine standarda bile sljedećih koncentracija: etil acetat 160 g/L; etil butanoat 7,39 g/L; *i*-amil acetat 8,86 g/L; etil heksanoat 5,05 g/L; etil oktanoat 12,49 g/L; etil dekanoat 2,12 g/L; 2-feniletal acetat 5,64 g/L; dietil sukcinat 78,84 g/L; *i*-butanol 160,18 g/L; *i*-amil alkohol 286,06 g/L; 1-heksanol 7,30 g/L te 2-feniletanol 93,70 g/L. Razlog ovog dvostrukog razrjeđivanja standarda jest njihova niska koncentracija u vinu, odnosno u modelima za izradu baždarnih krivulja.

Priprema STOCK otopine

STOCK otopina predstavlja smjesu svih 12 standarda koji se koriste za izradu baždarne krivulje, a cilj izrade STOCK otopine je, osim dodatnog razrjeđenja standarda, i pojednostavljenje samog postupka pripreme pojedinih kalibracijskih modela. Drugim riječima, primjenom STOCK otopine dovoljno je jedno pipetiranje određenog volumena da se dobije određeni nivo svih 12 ciljanih spojeva.

STOCK otopinu pripremiti pipetiranjem određenog volumena pojedinog standarda, u tikvici od 50 mL te nadopuniti 50 %-tnim etanolom do oznake. Koncentracije pojedinih standarda u pripremljenoj STOCK otopini iznosile su: etil acetat 5 g/L; etil butanoat 50 mg/L; *n*-amil acetat 100 mg/L; etil heksanoat 60 mg/L; etil oktanoat 150 mg/L; etil dekanat 30 mg/L; 2-feniletil acetat 80 mg/L; dietil sukcinat 1,1 g/L; *i*-butanol 10 g/L; *n*-amil alkohol 15 g/L; 1-heksanol 100 mg/L te 2-feniletanol 2,5 g/L.

Priprema modela za izradu kalibracijske krivulje

Modele za izradu kalibracijske krivulje pripremiti pipetiranjem određenog volumena STOCK otopine u tikvicu od 25 mL (potrebno izračunati koliki je to volumen), dodati interni standard *n*-amil alkohol u koncentraciji od 20 mg/L te nadopuniti tikvicu 12 %-tnim etanolom do oznake. 10 mL tako pripremljene otopine (modela) pipetirati u vialu od 20 mL, u koju je prethodno potrebno odvagati 2 g NaCl te staviti magnet. Nakon toga vialu zatvoriti silikonskim čepom i staviti u termoblok na adsorpciju na SPME vlakno pri 40 °C, uz konstantno miješanje, kroz 30 min. Nakon adsorpcije vlakno prenijeti u injektor plinskog kromatografa gdje se vrši desorpcija kroz 5 min. U tablici 6 su prikazane koncentracije pojedinih standarda u svih šest pripremljenih modela. Svaki model analiziran je u duplikatu.

Tablica 6. Popis spojeva, pripremljene koncentracije (mg/L)* u pojedinom modelu

Ime spoja	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6
etil acetat	10	20	40	80	160	320
etil butanoat*	50	100	200	400	800	1600
<i>i</i> -butanol	10	20	40	80	160	320
<i>i</i> -amil acetat	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2
<i>i</i> -amil alkohol	30	60	120	240	480	960
etil heksanoat	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,28
1-heksanol	0,06	0,12	0,24	0,48	0,96	1,92
etil oktanoat	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2
etil dekanoat	0,018	0,036	0,072	0,144	0,288	0,576
dietil sukcinat	0,7	1,4	2,8	5,6	11,2	22,4
2-feniletal acetat	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
2-feniletanol	5	10	20	40	80	160

*svi su izraženi u mg/L osim etil butanoata koji je izražen u µg/L.

Priprema uzoraka vina

Postupak je isti kao i u slučaju pripreme model otopine: u tikvicu od 50 mL otpipetirati dio uzorka vina te dodati *n*-amil alkohol (interni standard) u koncentraciji 20 mg/L te tikvicu nadopuniti do oznake uzorkom. U vialu odvagati 2 g NaCl te dodati 10 mL uzorka s internim standardom i zatvoriti čepom. Vialu postaviti u termoblok s magnetskom mješalicom te SPME vlakno staviti na adsorpciju 40 °C kroz 30 minuta uz konstantno miješanje. Nakon 30 minuta vlakno treba prenijeti u injektor plinskog kromatografa gdje se odvija desorpcija u trajanju od 5 minuta. Uzorci su također analizirani u duplikatu.

3.2.2. Kromatografski uvjeti

- Kolona plinskog kromatografa: BP20, dimenzije: 50 m x 0,22 mm, 0,25 µm (SGE Analytical Science, Victoria, Australija)
- Injektor plinskog kromatografa: temperatura 250 °C, tlak 1,72 bara
- Plin nosioc: helij
- Protok plina nosioca: 1,2 mL/min
- Način injektiranja: *splitless mode*

- *Scan* način rada masenog spektrometra: snimanje m/z u intervalu od 35 do 300
- Temperaturni program pećnice: 40 °C, 5 min → 200 °C, 3 °C/min → 240 °C, 30 °C/min

3.2.3. Identifikacija i kvantifikacija

Identifikacija spojeva arome provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenom zadržavanja pojedinih standarda te usporedbom masenog spektra spoja i standarda uz Nist05 knjižnicu masenih spektara (Wiley & Sons, Hoboken, NJ, SAD). Izrada baždarnih krivulja, kao i sama kvantifikacija analiziranih spojeva u uzorcima vina provedena je u programu Enhanced ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), primjenom metode internog standarda.

4. REZULTATI I RASPRAVA

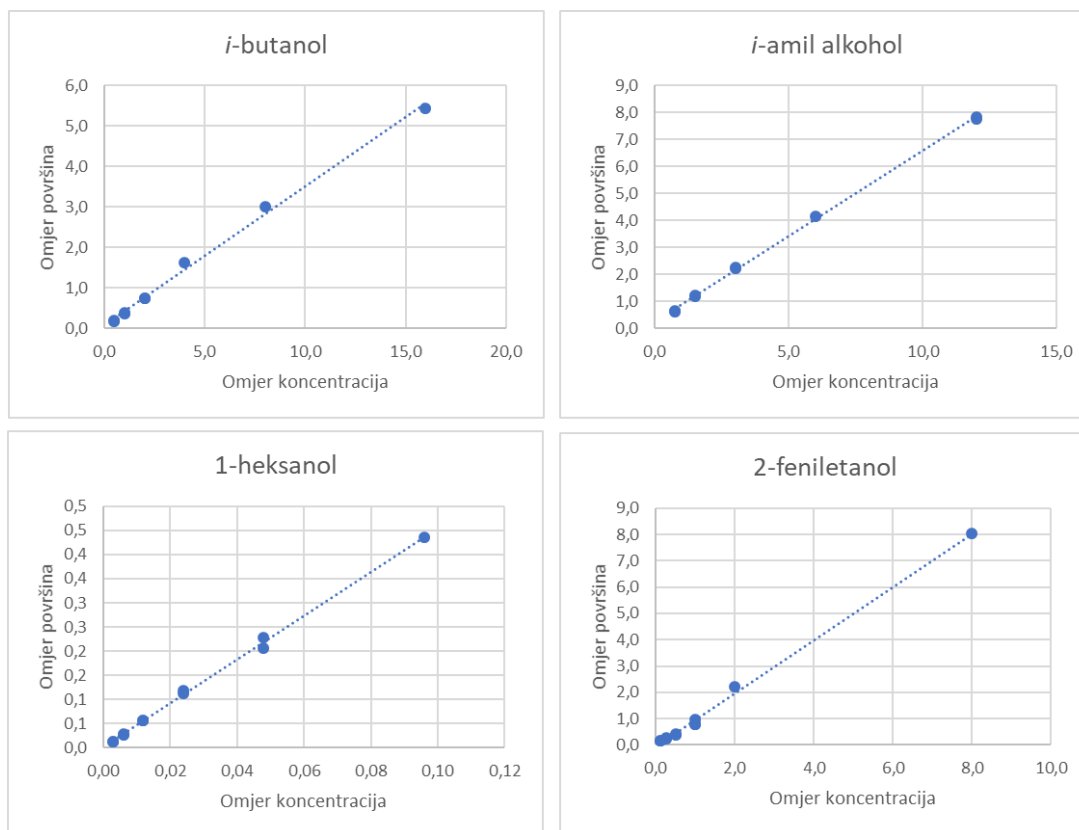
4.1. KALIBRACIJSKE KRIVULJE

Prva faza ovog istraživanja obuhvatila je izradu baždarnih krivulja za analizu fermentacijske arome, odnosno estera i viših alkohola. Pritom je korišteno ukupno 12 različitih standarada, odnosno izrađene su kalibracijske krivulje za 12 različitih spojeva: osam estera (etil acetat, etil butanoat, *n*-amil acetat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat, 2-feniletal acetat te dietil sukcinat) te četiri viša alkohola (*n*-butanol, *n*-amil alkohol, 1-heksanol te 2-feniletanol). Izrada kalibracijskih krivulja sastojala se od injektiranja otopine 12 %-tnog etanola sa šest rastućih koncentracija pojedinih spojeva te uvijek istom koncentracijom internog standarda (*n*-amil alkohol u koncentraciji 20 mg/L), pri čemu je svaki model injektiran u duplikatu. Baždarne krivulje su izrađene softverski, pri čemu vrijednosti na osi x predstavljaju omjere koncentracija pojedinog spoja s koncentracijom internog standarda, a vrijednosti na osi y omjere površina spojeva s površinom internog standarda. U tablici 7 su prikazani dobiveni rezultati, odnosno jednadžbe pravaca pojedinih spojeva, dok su na slikama 1 i 2 prikazani izgledi navedenih pravaca viših alkohola (slika 1) i estera (slika 2). Kao što se može vidjeti u tablici, sve jednadžbe su linearne, obzirom da ih karakterizira jednadžba pravca oblika $y = ax + b$. Nadalje, uz podatke o linearnosti krivulje, u tablici je prikazan i koeficijent determinacije. Koeficijent determinacije (r^2) je zapravo specifičan pokazatelj reprezentativnosti regresije, odnosno linearnosti kalibracijske krivulje (Moosavi i Ghassabian, 2018). To je broj koji je veći ili jednak nuli, ali manji ili jednak broju jedan. Model je reprezentativniji što je njegova vrijednost bliže jedinici (Moosavi i Ghassabian, 2018). Kao što se može vidjeti u tablici 7, koeficijenti determinacije svih spojeva su relativno visoki i blizu broja jedan. Ipak, postoje razlike među spojevima, odnosno pojedine kalibracijske krivulje su reprezentativnije tj. linearnije od drugih. Pritom je važno istaknuti one krivulje koje karakterizira koeficijent determinacije od 0,999, kao što su *n*-amil alkohol i dietil sukcinat, te one sa vrijednosti r^2 od 0,988 (etil acetat, etil butanoat, *n*-amil acetat, etil heksanoat, 1-heksanol, 2-feniletal acetat te 2-feniletanol). S druge strane, spoj čiju kalibracijsku krivulju karakterizira relativno nizak koeficijent determinacije je etil dekanat sa vrijednosti r^2 od 0,992. Obzirom da je većina kalibracijskih krivulja karakterizirana vrlo visokom koeficijentima determinacije (0,998 i 0,999), možemo zaključiti kako je faza izrade kalibracijskih krivulja uspješno provedena te su dobivene krivulje pouzdane za daljnje korištenje, odnosno primjenu na realnim uzorcima vina. Osim linearnosti, na slikama je jasno vidljivo kako je sama SPME-GC/MS metoda pogodna za analizu viših alkohola i estera, s

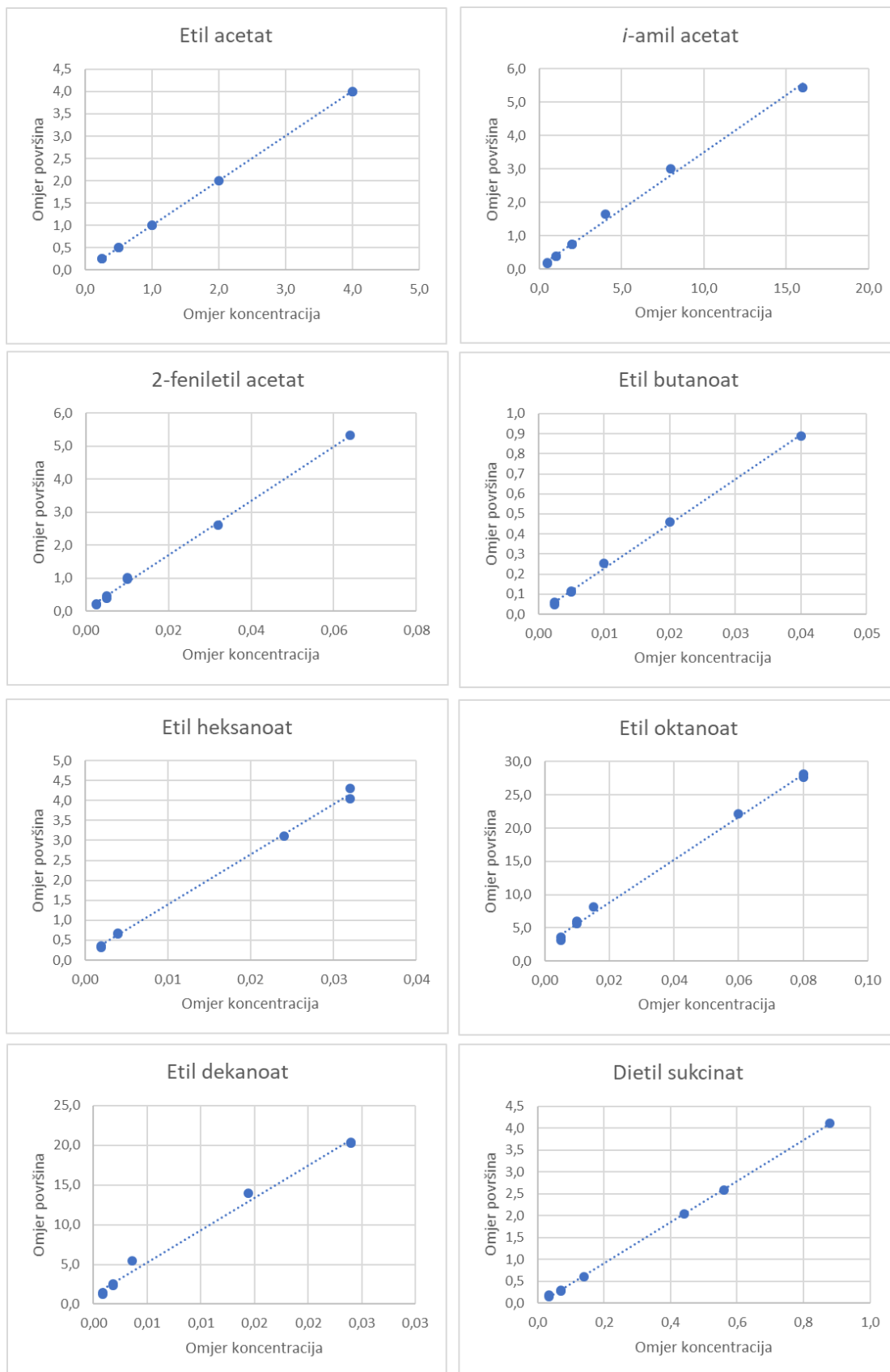
obzirom da nema značajnih odstupanja između paralela pojedinog nivoa kalibracije, tj. točke koje predstavljaju pojedine nivoe su praktički preklapljene.

Tablica 7. Linearna jednadžba pravca ($y=ax + b$) i koeficijenti determinacije (r^2) za svaki spoj

Ime spoja	a	b	r^2
etil acetat	2,379	-0,001363	0,998
etil butanoat*	22,49	0	0,998
<i>i</i> -butanol	0,3424	0,07949	0,996
<i>i</i> -amil acetat	44,72	0,1602	0,998
<i>i</i> -amil alkohol	0,6317	0,2666	0,999
etil heksanoat	126,1	0,128	0,998
1-heksanol	4,524	0,002061	0,998
etil oktanoat	321,6	2,403	0,997
etil dekanoat	813,5	1,205	0,992
dietil sukcinat	4,6888	-0,0205	0,999
2-feniletal acetat	82,18	0,05276	0,998
2-feniletanol	1,009	-0,004153	0,998



Slika 1. Izgled linearnih pravaca viših alkohola

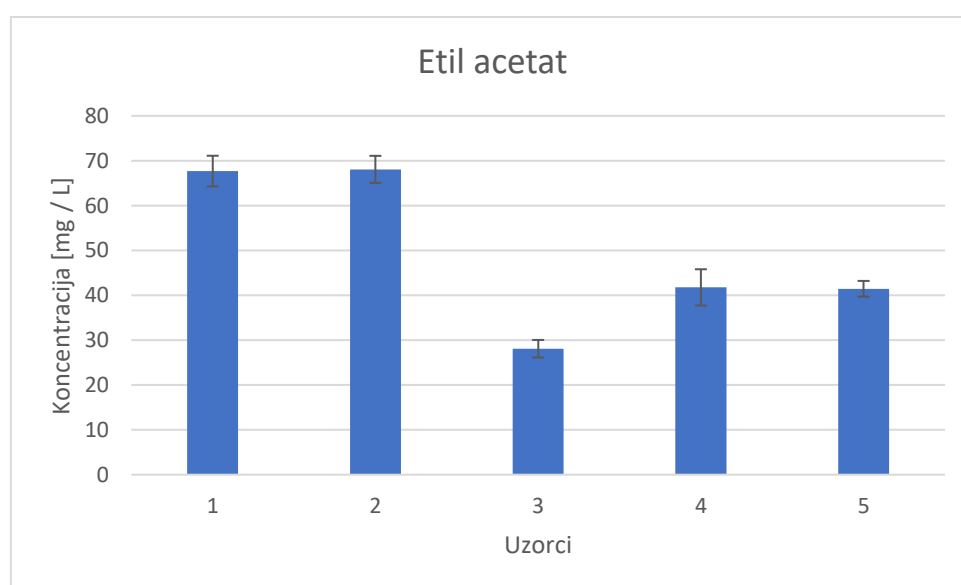


Slika 2. Izgled linearnih pravaca estera

4.2. UZORCI VINA PORTUGIZAC

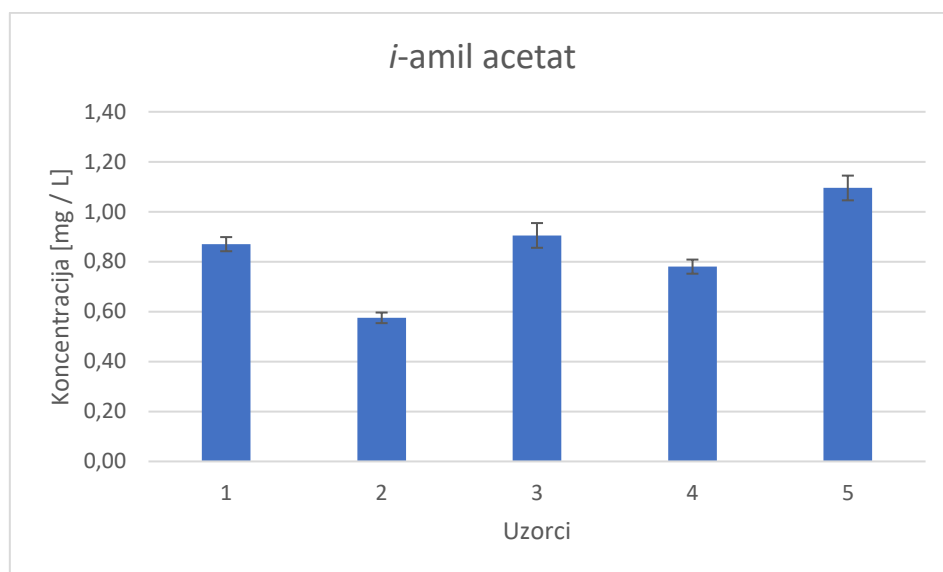
Drugi dio ovog istraživanja vezan je uz samu primjenu kalibracijskih krivulja, odnosno analizu viših alkohola i estera u realnim uzorcima, odnosno vinu. Pritom je korišteno mlado crno vino Portugizac, proizvedeno tijekom berbe 2019. godine konvencionalnim načinom proizvodnje crnih vina, koji uključuje postupke ruljanja/muljanja, maceracije i fermentacije, prešanja te dozrijevanja. Ukupno je analizirano pet uzoraka vina, koji su jednostavno numerirani brojevima 1 do 5. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 3 do 14, pri čemu se slike 3 do 10 odnose na koncentracije estera, a slike 11 do 14 na koncentracije viših alkohola u analiziranim uzorcima. Ukupno je osam različitih estera identificirano i kvantificirano u analiziranim uzorcima vina Portugizac, a pripadaju sljedećim kategorijama: (i) acetatni esteri (etil acetat, *l*-amil acetat i 2-feniletil acetat), (ii) etilni esteri (etil butirat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat i dietil sukcinat).

Na slici 3 prikazane su koncentracije etil acetata određene u uzorcima vina Portugizac. Kao što se može vidjeti, najviše koncentracije utvrđene su uzorcima 1 i 2, dok je najniža koncentracija određena u uzorku 3. Etil acetat predstavlja koncentracijom najznačajniji ester u vinu, a ovisno o prisutnoj koncentraciji značajno može utjecati na senzorske karakteristike vina. Prema Ribéreau-Gayon i sur. (2006) senzorski prag osjetljivosti etil acetata iznosi 160-180 mg/L, a nositelj je negativnih, oštrih nota te arome po laku za nokte i ljepilu. Također, poznato je da pri nižim koncentracijama (60-90 mg/L) ovaj spoj doprinosi kompleksnosti arome (Ribéreau-Gayon i sur., 2006), što je slučaj u ovom istraživanju.



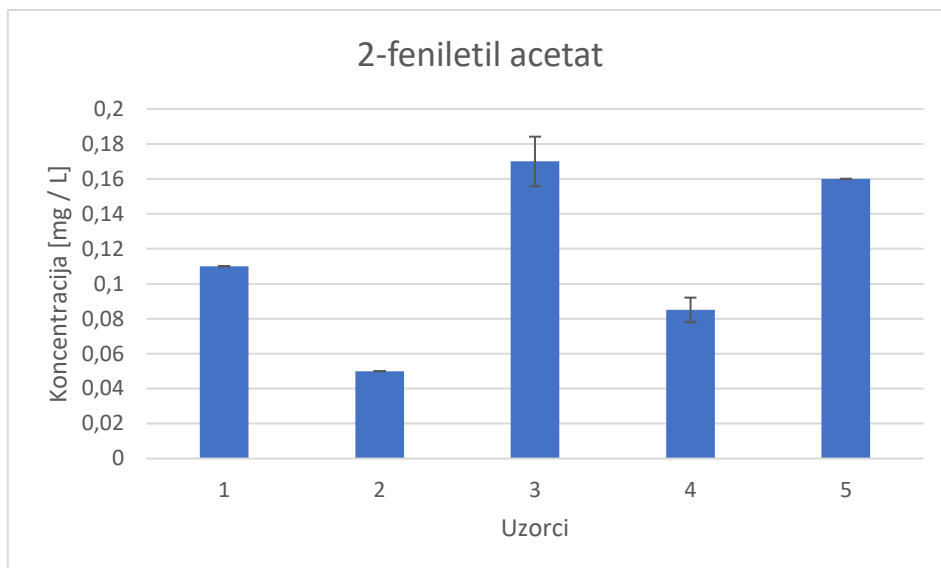
Slika 3. Koncentracija etil acetata (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

Koncentracije *i*-amil acetata u vinima Portugizac prikazane su na slici 4, pri čemu je najniža koncentracija utvrđena u uzorku 2, a najviša u uzorku 5. Senzorski prag osjetljivosti *i*-amil acetata je 0,26 mg/L, a nositelj je poželjnih nota po banani i kruški (Lambrechts i Pretorius, 2000). Obzirom na navedeno, jasno je da ovaj spoj utječe na aromu analiziranih vina obzirom da je u svim uzorcima određen u koncentracijama iznad senzorskog praga osjetljivosti. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima u kojima su, analizom spojeva arome mladog crnog vina, utvrđene koncentracije *i*-amil acetata u rasponu od 0,1-4,3 mg/L (Francis i Newton, 2005).



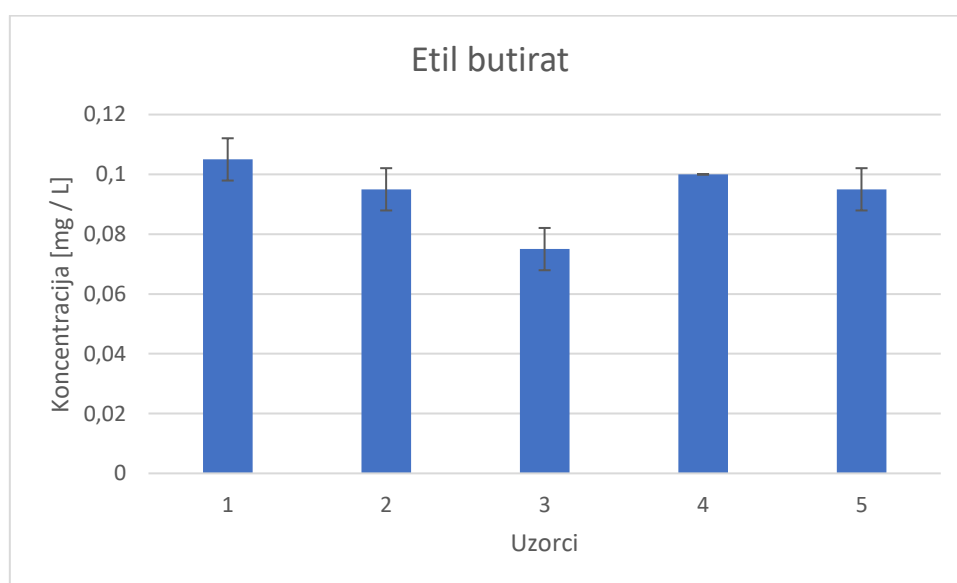
Slika 4. Koncentracija *i*-amil acetata (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

Koncentracije 2-feniletil acetata prikazane su na slici 5. Pritom je jasno vidljivo kako je uzorak 3 karakteriziran njegovom najvišom koncentracijom, dok je slično prethodnom spoju, najniža koncentracija utvrđena u uzorku 2. Općenito, 2-feniletil acetat je nositelj voćne arome te mirisa po ruži sa senzorskim pragom osjetljivosti od 0,25 mg/L (Swiegers i sur., 2005) te je jasno da ne doprinosi aromi analiziranih vina. Kvantificirane koncentracije 2-feniletil acetata u skladu su s istraživanjem koje su proveli Wang i suradnici (2016), a koji su utvrdili raspon koncentracija 2-feniletil acetata u iznosu od 0,97 μ /L do 0,675 mg/L.



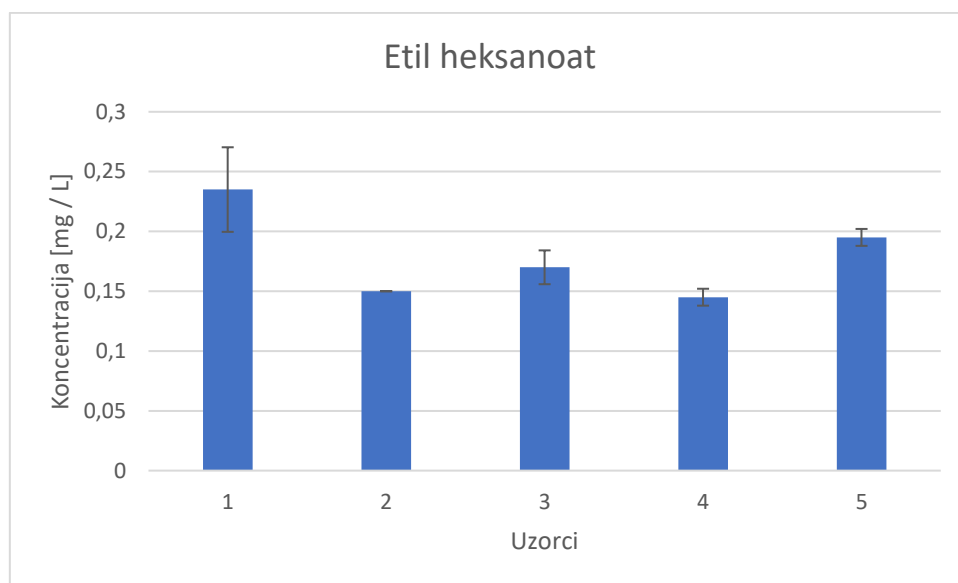
Slika 5. Koncentracija 2-fenil acetata (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

Na slici 6 prikazane su koncentracije etil butirata. Kao što se može vidjeti, koncentracije etil butirata ne mijenjaju se značajno u uzorcima, a u uzorku 3 je utvrđena najniža koncentracija. Senzorski prag osjetljivosti etil butirata iznosi 0,02 mg/L (Swiegers i sur., 2005), a vinu daje notu jagode, jabuke i banane (Song i sur., 2013). S obzirom da je koncentracija u svim uzorcima viša od senzorskog praga osjetljivosti, može se sa sigurnošću tvrditi da je etil butirata od važnosti za aromu analiziranog vina. Dobiveni rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjem u kojem su, analizom crnog vina, utvrđeni rasponi koncentracije etil butirata od 0,01 do 1,8 mg/L (Swiegers i sur., 2005).



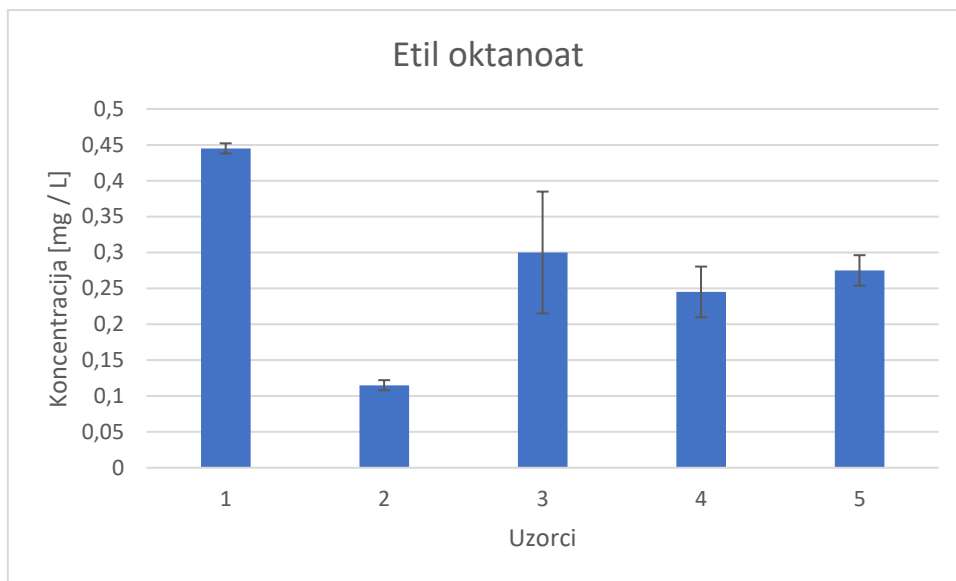
Slika 6. Koncentracija etil butirata (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

Koncentracije etil heksanoata prikazane su na slici 7, pri čemu je najviša koncentracija utvrđena u uzorku 1. Općenito, etil heksanoat je nositelj voćnih aroma po jabuci i banani sa senzorskim pragom osjetljivosti od 0,08 mg/L (Lambrechts i Pretorius, 2000). Prema slici 7 vidljivo je kako su koncentracije etil heksanoata više od senzorskog praga osjetljivosti u svim uzorcima te je jasno da ovaj spoj utječe na aromu analiziranog vina Portugizac. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem su u skladu s istraživanjem koje su proveli Francis i Newton (2005), u kojem je utvrđeno da je etil heksanoat, u mladom crnom vinu, prisutan u koncentracijama od 0,15 do 0,62 mg/L (Francis i Newton, 2005).



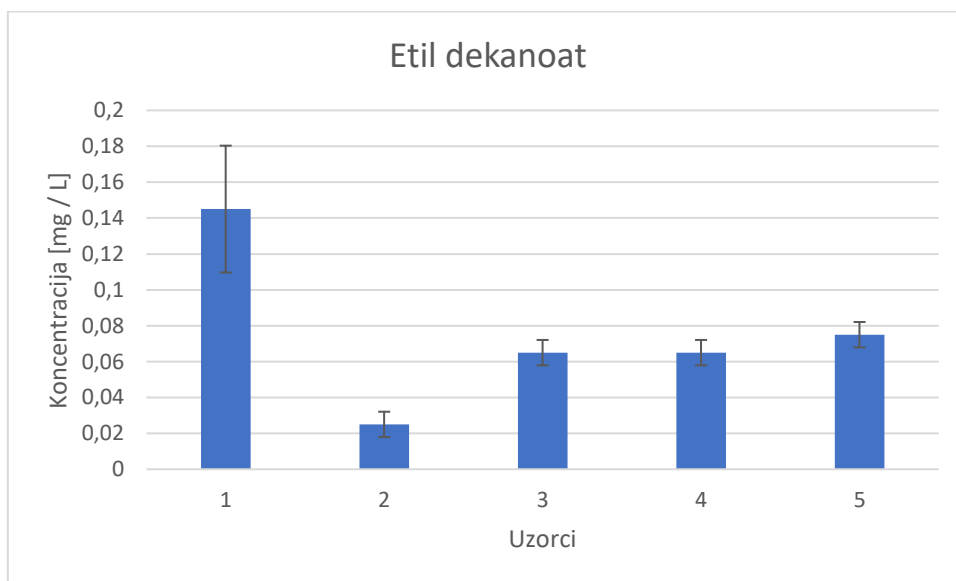
Slika 7. Koncentracija etil heksanoata (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

Slika 8 prikazuje koncentracije etil oktanoata u analiziranim uzorcima mladog crnog vina Portugizac. Najviša koncentracija je utvrđena u uzorku 1, a najniža u uzorku 2. Poput prethodnih estera, etil oktanoat je nositelj voćne aromu, po ananasu i krušci, sa senzorskim pragom osjetljivosti od 0,58 mg/L (Lambrechts i Pretorius, 2000). S obzirom da je u uzorku 1, u kojem je utvrđena najviša koncentraciju etil oktanoata, prisutna količina manja od senzorskog praga osjetljivosti, može se zaključiti da ovaj spoj nije od važnosti za aromu analiziranog vina. U prethodnim istraživanjima, provedenim na crnim vinima, etil oktanoat je određen u raspon koncentracija od 0,2 do 3,9 mg/L (Ferreira i sur., 1998), što je u skladu s dobivenim podacima analize crnog vina Portugizac.



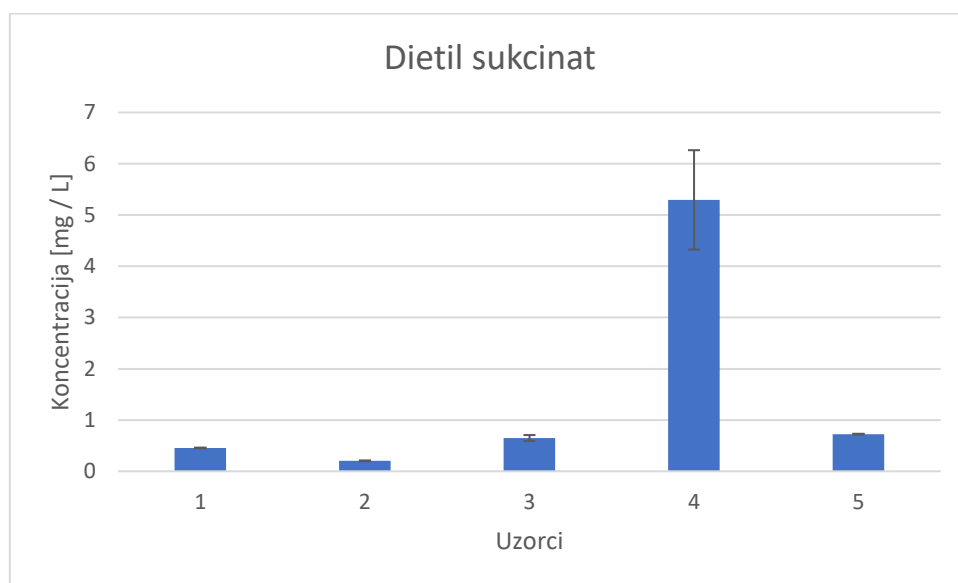
Slika 8. Koncentracija etil oktanoata (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

Na slici 9 prikazane su koncentracije etil dekanooata određene u uzorcima vina Portugizac. Kao što se može vidjeti, uzorak 1 pokazuje najvišu koncentraciju, a uzorak 2 najnižu. Senzorski prag osjetljivosti etil dekanooata iznosi 0,2 mg/L (Tao i Li, 2009), a vinu daje ugodnu cvjetnu notu (Lambrechts i Pretorius, 2000; Tao i Li, 2009). Etil dekanooat nije od značaja za aromu analiziranog vina Portugizac, s obzirom da je u svim uzorcima prisutan u koncentracijama i do četiri puta nižim od senzorskog praga osjetljivosti. Prema istraživanju, koje su proveli Tao i Li (2009), koncentracije etil dekanooata u crnim vinima su do 0,1 mg/L (Tao i Li, 2009).



Slika 9. Koncentracija etil dekanooata (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

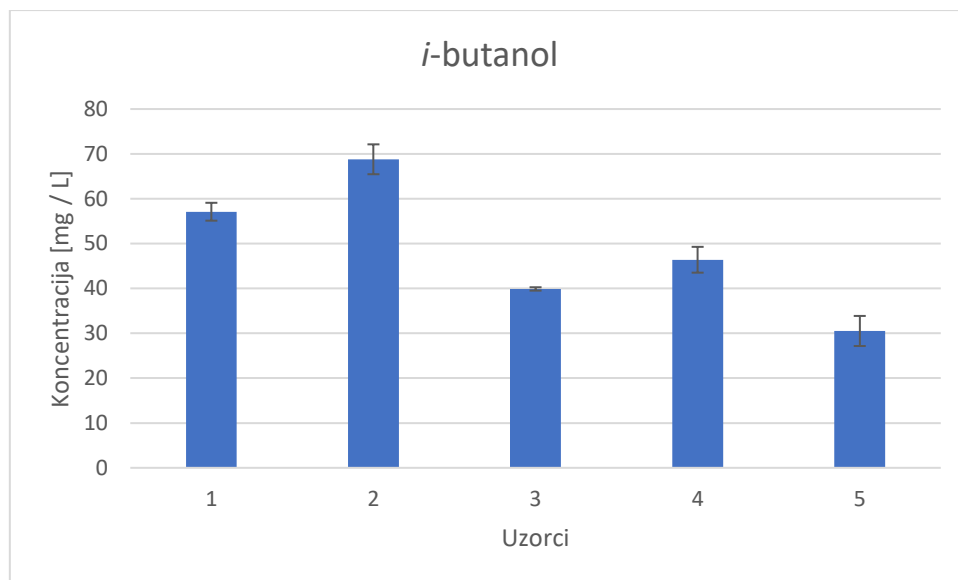
U analiziranim uzorcima vina Portugizac određene su koncentracije dietil sukcinata, što je vidljivo iz slike 10. Uzorak 4 karakterizira najviša koncentraciju dietil sukcinata u usporedbi s preostala četiri uzorka. Dietil sukcinat je jedan od glavnih spojeva odgovornih za voćnu aromu crnih vina, a nastaje tijekom alkoholne fermentacije (Ivanova i sur., 2013). Senzorski prag osjetljivosti dietil sukcinata iznosi 200 mg/L (Makhotkina, 2011), što upućuje na to da nije od važnosti za aromu analiziranog mladog crnog vina Portugizac. Dobivene vrijednosti u skladu su s istraživanjem koje su proveli Cabredo-Pinillos i sur. (2008) u kojem je određen raspon koncentracije dietil sukcinata u crnim vinima od 0,1 do 220 mg/L (Cabredo-Pinillos i sur., 2008).



Slika 10. Koncentracija dietil sukcinata (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

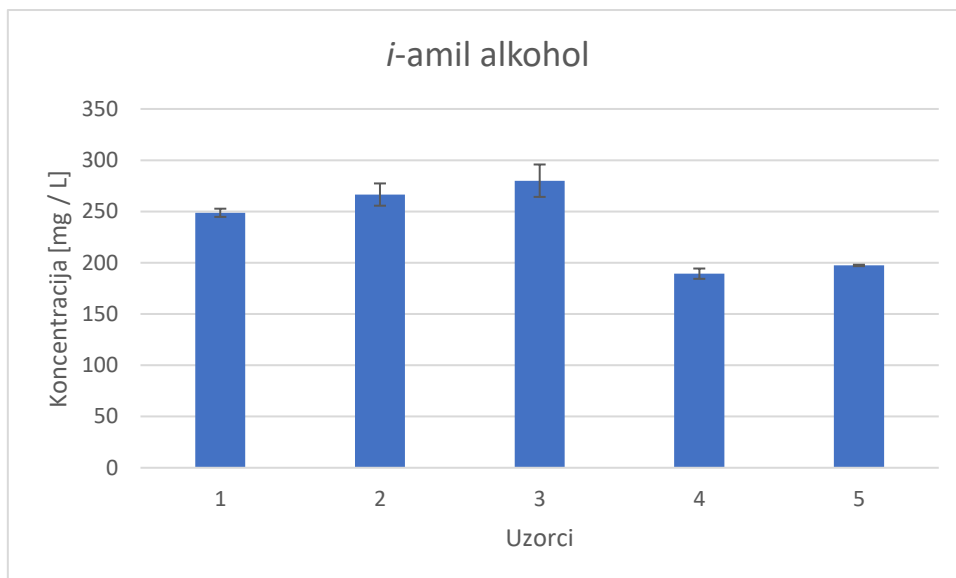
Koncentracije *i*-butanola, određene u analiziranim uzorcima vina Portugizac, prikazane su na slici 11. Najveća koncentracija utvrđena je uzorku 2, a najmanja u uzorku 5. *i*-Butanol u vinu nastaje kataboličkim putem, iz aminokiselina valin i metionin, tijekom fermentacije (Ivanova i sur., 2013). Senzorski prag osjetljivosti *i*-butanola iznosi 40 mg/L (Francis i Newton, 2005), a vinu daje miris po alkoholu (Song i sur., 2013). *i*-Butanol je jedan od četiri alkohola koji su određivani u ovom istraživanju. Općenito se, za više alkohole, smatra da u koncentracijama ispod 300 mg/L doprinose kompleksnosti arome vina, dok koncentracije iznad 400 mg/L djeluju negativno na aromu (Swiegers i sur., 2005). *i*-Butanol je u većini uzoraka prisutan u koncentraciji višoj od senzorskog praga osjetljivosti te je jasno da doprinosi kompleksnosti arome vina Portugizac. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim

istraživanjima, u kojima je analizirano mlado crno vino, a gdje je koncentracija *i*-butanola bila u rasponu 25,7-86,9 mg/L (Francis i Newton, 2005).



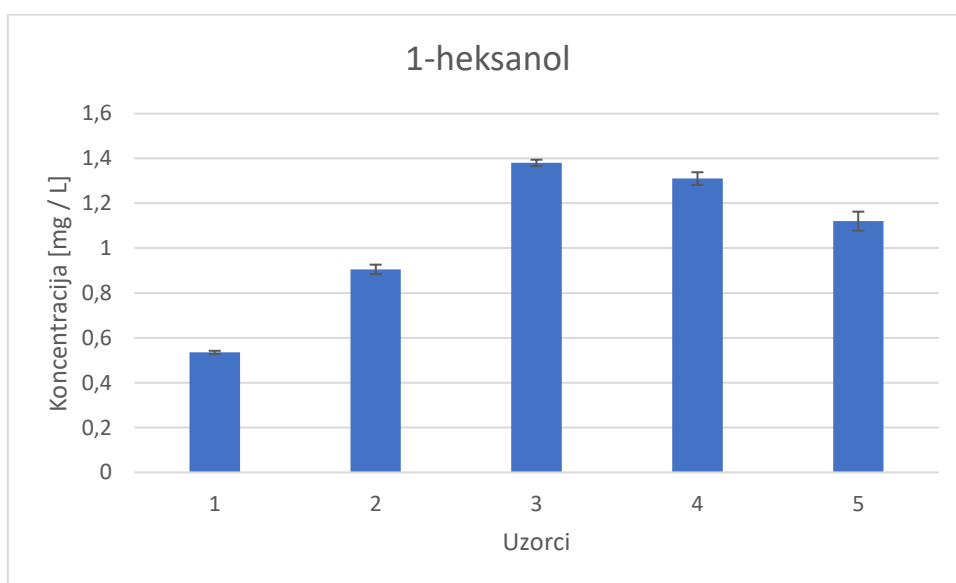
Slika 11. Koncentracija *i*-butanola (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

Slika 12 prikazuje koncentracije *i*-amil alkohola kvantificirane u uzorcima vina Portugizac. Uzorak 3 pokazuje najvišu koncentraciju *i*-amil alkohola, a uzorci 4 i 5 najnižu. *i*-Amil alkohol jedan je od četiri najčešće prisutnih viših alkohola u vinima, uz 1-propanol, *i*-butanol i 2-feniletanol, a najčešće je prisutan u koncentracijama od 10 do 500 mg/L (Peinado i sur., 2004). *i*-Amil alkohol vinu daje aromu viskija i laka za nokte (Song i sur., 2013), a senzorski prag osjetljivosti iznosi 30 mg/L (Swiegers i sur., 2005). Koncentracije prisutne u uzorcima mnogo su više od senzorskog praga osjetljivosti *i*-amil alkohola te se može zaključiti da je ovaj spoj od velike važnosti za aromu mladog crnog vina Portugizac. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem koje su proveli Francis i Newton (2005), a u kojem su koncentracije ovog višeg alkohola u mladim crnim vinima iznosile 84-333 mg/L (Francis i Newton, 2005).



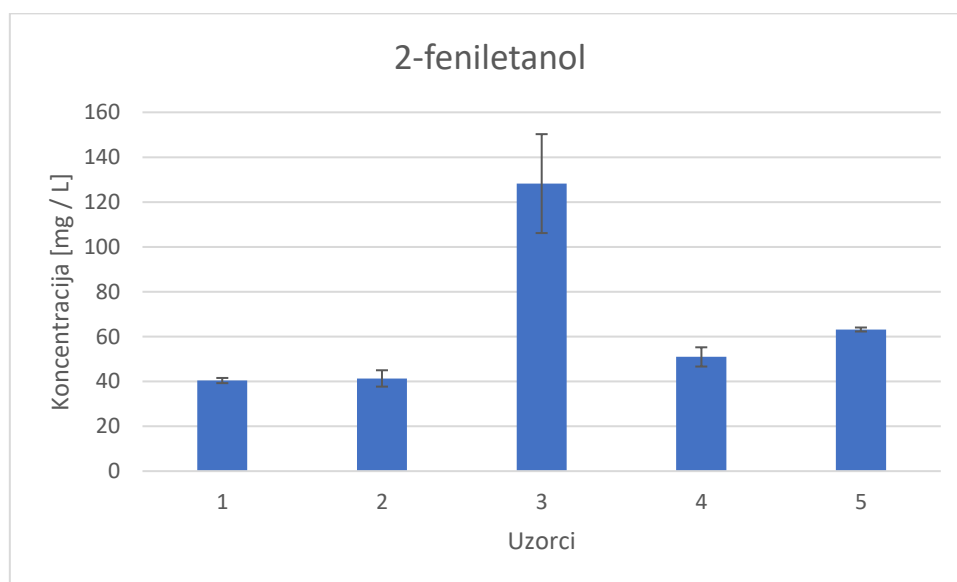
Slika 12. Koncentracija *i*-amil alkohola (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

Na slici 13 prikazane su koncentracije 1-heksanola u pet uzoraka mladog crnog vina Portugizac. Najviša koncentracija utvrđena je u uzorku 3, a najniža u uzorku 1. Sa senzorskim pragom osjetljivosti 1-heksanola od 8 mg/L (Culleré i sur., 2004), može se zaključiti da ne doprinosi aromi ispitivanog crnog vina Portugizac s obzirom da detektirane koncentracije u svih pet uzoraka ne prelaze 1,4 mg/L. 1-heksanol vinu doprinosi sa zelenom travnatom aromom (Tao i Li, 2009). Koncentracije, dobivene ovim istraživanjem malo su niže od onih utvrđenih prethodnim istraživanjem arome mladih crnih vina, a u kojima su određene koncentracije 1-heksanola u rasponu od 2,1 do 13,2 mg/L (Francis i Newton, 2005).



Slika 13. Koncentracija 1-heksanola (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

Posljednji viši alkohol, a ujedno i aromatski spoj određivan u ovom istraživanju, je 2-feniletanol. Koncentracije 2-feniletanola, određene u uzorcima mladog crnog vina Portugizac, prikazane su na slici 14. U uzorku 3 prisutna je najviša koncentracija, a u ostala četiri uzorka vidljivo je da se koncentracija ne mijenja značajno. 2-feniletanol je najznačajniji fenolno derivirani viši alkohol prisutan u vinima. Formira se tijekom fermentacije, uslijed djelovanja kvasca, iz šećera i aminokiselina (Ivanova i sur., 2013). Senzorski prag osjetljivosti 2-feniletanola iznosi 14 mg/L (Culleré i sur., 2004), a vinu daje cvjetnu aromu ruže (Swiegers i sur., 2005). S obzirom na koncentracije 2-feniletanola u analiziranim uzorcima (slika 14), jasno se može zaključiti da je ovaj spoj značajan za aromu mladog crnog vina Portugizac. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima u kojima su, analizom spojeva arome mladog crnog vina, utvrđene koncentracije 2-feniletanola u rasponu od 9,0-153,3 mg/L (Francis i Newton, 2005; Cabredo-Pinillos i sur., 2008).



Slika 14. Koncentracija 2-feniletanola (mg/L) u analiziranim uzorcima vina Portugizac

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju, možemo zaključiti sljedeće:

1. Uspješno je provedena prva faza istraživanja, odnosno izrada baždarnih krivulja, obzirom da su svi dobiveni kalibracijski pravci karakterizirani visokim koeficijentima determinacije, odnosno visokom linearnošću.
2. Provedena je kvantifikacija 12 spojeva arome (osam estera i četiri viša alkohola) u mladim crnim vinima Portugizac
3. *n*-Amil acetat je pritom utvrđen kao najznačajniji ester za aromu ispitivanog mladog crnog vina Portugizac, obzirom da je su svim uzorcima utvrđen u koncentracijama znatno višim od senzorskog praga osjetljivosti. Osim navedenog, za aromu analiziranih vina bitni su etil butirat i etil heksanoat koji su također prisutni u visokim koncentracijama. Ostali esteri su određeni u koncentracijama ispod senzorskog praga osjetljivosti i ne smatraju se značajnima za aromu analiziranih uzoraka.
4. Od analiziranih viših alkohola, aromi mladog crnog vina Portugizac najviše doprinose *n*-amil alkohol i 2-feniletanol, koji su u svim uzorcima prisutni u visokim koncentracijama. Aromatskom profilu vina Portugizac također doprinosi i *n*-butanol, prisutan u uzorcima u koncentraciji višoj od senzorskog praga osjetljivost, dok se četvrti analizirani viši alkohol, 1-heksanol, nije pokazao značajnim za aromu analiziranog vina.

6. POPIS LITERATURE

Arthur C. L. i Pawliszyn J. (1990) Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry* **62**: 2145 – 2148.

Bosch-Fusté J., Riu-Aumatell M., Gaudayol J. M., Caixach J., López-Tamames E., Buxaderas S. (2007) Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry* **105**: 428 – 435.

Cabredo-Pinillos S., Cedrón-Fernández T., Sáenz-Barrio C. (2008) Differentiation of “Claret”, Rosé, Red and Blend wines based on the content of volatile compounds by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *European Food Research and Technology* **226**: 1217 – 1323.

Castro Mejías R., Natera-Marín R., García-Moreno M. V., García-Barroso C. (2003) Optimisation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine. *Journal of Chromatography A* **995**: 11 – 20.

Conterno L., Joseph C. M. L., Arvik T. J., Henick-Kling T., Bisson L. F. (2006) Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **57 (2)**: 139 – 147.

Culleré L., Escudero A., Cacho J., Ferreira V. (2004) Gas Chromatography–Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 1653 – 1660.

Demyttenaere J. C. R., Dagher C., Sandra P., Kallithraka S., Verhé R., De Kimpe N. (2003) Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **985**: 233 – 246.

Escudero A., Asensio E., Cacho J., Ferreira V. (2002) Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry* **77**: 325 – 331.

Fang Y. i Qian M. C. (2006) Quantification of Selected Aroma-Active Compounds in Pinot Noir Wines from Different Grape Maturities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 8567 – 8573.

Farina L., Boido E., Carrau F., Dellacassa E. (2007) Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography–mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* **1157**: 46 – 50.

- Ferreira V., López R., Escudero A., Cacho J. F. (1998) Quantitative determination of trace and ultratrace flavour active compounds in red wines through gas chromatographic–ion trap mass spectrometric analysis of microextracts. *Journal of Chromatography A* **806**: 349 – 354.
- Francis I. L. i Newton J. L. (2005) Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**: 114 – 126.
- Garde-Cerdán T., Marsellés-Fontanet A. R., Arias-Gil M., Ancín-Azpilicueta C., Martín-Belloso O. (2008) Influence of SO₂ on the evolution of volatile compounds through alcoholic fermentation of must stabilized by pulsed electric fields. *European Food Research and Technology* **227**:401 – 408.
- Isac-García J., Dobado J. A., Calvo-Flores G. G., Martínez-García H. (2016) Chapter 13: Green Chemistry Experiments. U: Experimental Organic Chemistry: Laboratory Manual. Academic press. str. 417 – 484.
- Ivanova V., Stefova M., Vojnoski B., Stafilov T., Bíró I., Bufa A., Felinger A., Kilár F. (2013) Volatile Composition of Macedonian and Hungarian Wines Assessed by GC/MS. *Food Bioprocess Technology* **6**: 1609 – 1617.
- Jackson, R. S. (2008) Wine Science: principles and applications, 3.izd., Academic press, Canada. str. 270 – 323.
- Jeleń H. H. i Szczurek A. (2010) Solid Phase Microextraction for Profiling Volatile Compounds in Liqueured White Wines. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* **9(1)**: 23 – 32.
- Jones S. (2010) GC Method Development. Agilent Technologies, < <http://www.agilent.com> > Pristupljeno 20. svibnja 2020.
- Komes D., Ulrich D., Lovric T. (2006) Characterization of odor-active compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje. *European Food Research and Technology* **222**: 1 – 7.
- Lambrechts M. i Pretorius I. S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma. *South African Journal for Enology and Viticulture* **21**: 97 – 129.
- Makhotkina O. (2011) Stability of New Zealand Sauvignon Blanc Aroma Compounds: Oxidation versus Hydrolysis. The University of Auckland.
- Moosavi S. M. i Ghassabian S. (2018) Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. U: Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches, Stauffer M., ur., IntechOpen. str. 109 – 124.

- Noble A. C. (1988) Analysis of Wine Sensory Properties. U: Modern Methods of Plant Analysis Volume 6: Wine Analysis, Linskens H. F. i Jackson J. F., ur., Springer-Verlag. str. 9 – 28.
- Panighel A. i Flamini R. (2014) Applications of Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME-GC/MS) in the Study of Grape and Wine Volatile Compounds. *Molecules* **19**: 21291 – 21309.
- Peinado R. A., Moreno J. A., Munoz D., Medina M., Moreno J. (2004) Gas Chromatographic Quantification of Major Volatile Compounds and Polyols in Wine by Direct Injection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 6389 – 6393.
- Pino J. A. i Queris O. (2010) Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques. *Food Chemistry* **122**: 1241 – 1246.
- Pisarnitskii A. F. (2001) Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* **37**: 552 – 560.
- Rapp A. (1998) Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung* **42**: 351 – 363.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006) Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2. izd., John Wiley & Sons, Inc. str. 51 – 64.
- Rocha S., Ramalheira V., Barros A., Delgadillo I., Coimbra M. A. (2001) Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 5142 – 5151.
- Schmarr H., Sang W., Ganß S., Fischer U., Köpp B., Schulz C., Potouridis T. (2008) Analysis of aldehydes *via* headspace SPME with on-fiber derivatization to their *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oxime derivatives and comprehensive 2D-GC-MS. *Journal of Separation Science* **31**: 3458 – 3465.
- Silva Ferreira A. C. i Guedes De Pinho, P. (2004) Norisoprenoids profile during port wine ageing—influence of some technological parameters. *Analytica Chimica Acta* **513**: 169 – 176.
- Song J.-Q., Li H., Liang Y.-Y., Tao Y.-S., Mi C.-Q., Qian M. C., Wang H. (2013) Characterisation of volatile components of red and sparkling wines from a new wine grape cultivar 'Meili' (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* **52 (1)**: 41 – 48.

- Sparkman O. D., Penton Z. E., Kitson F. G. (2011) Gas Chromatography and Mass Spectrometry: Chapter 1, 2. izd., Academic press. str. 3 – 13.
- Sumby K. M., Grbin P. R., Jiranek V. (2010) Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry* **121**: 1 – 16.
- Swiegers J. H., Bartowsky E. J., Henschke P. A., Pretorius I. S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**: 139 – 173.
- Tao Y.-S. i Li H. (2009) Active volatiles of cabernet sauvignon wine from Changli County. *Health* **1 (03)**: 176 – 182.
- Tomašević M., Gracin L., Čurko N., Kovačević Ganić K. (2017) Impact of pre-fermentative maceration and yeast strain along with glutathione and SO₂ additions on the aroma of *Vitis vinifera* L. Pošip wine and its evaluation during bottle aging. *LWT-Food Science and Technology* **81**: 67 – 76.
- Vilanova M. i Martínez C. (2007) First study of determination of aromatic compounds of red wine from *Vitis vinifera* cv. Castañal grown in Galicia (NW Spain). *European Food Research and Technology* **224**: 431 – 436.
- Vilanova M., Genisheva Z., Masa A., Maria Oliveira J. (2010) Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. *Microchemical Journal* **95**: 240 – 246.
- Wang J., Capone D. L., Wilkinson K. L., Jeffery D. W. (2016) Chemical and sensory profiles of rosé wines from Australia. *Food Chemistry* **196**: 682 – 693.
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. (2010) The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT-Food Science and Technology* **43**: 1474 – 1479.
- Woźniak M. K., Banaszkiwicz L., Wiergowski M., Tomczak E., Kata M., Szpiech B., Namieśnik J., Biziuk M. (2020) Development and validation of a GC–MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood. *Forensic Toxicology* **38**: 42 – 58.
- Zalacain A., Marín J., Alonso G. L., Salinas M. R. (2007) Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta* **71**: 1610 – 1615.

Izjava o izvornosti

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

Hanna Stendrović