

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Lejla Joukhadar

6287/PT

**Analiza arome bijelog vina proizvedenog
primjenom različitih tehnologija**
ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija vina

Mentor: Prof.dr. sc. *Karin Kovačević Ganić*

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno- tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

ANALIZA AROME BIJELOG VINA PROIZVEDENOG PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNOLOGIJA

Lejla Joukhadar, 6287/PT

Sažetak: *Aroma vina rezultat je kombinacije brojnih hlapivih spojeva koji potječu iz grožđa ili nastaju tijekom fermentacije i dozrijevanja vina pri čemu se kvantitativno najznačajniji spojevi sintetiziraju tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem metabolizma kvasaca. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj alkoholne te jabučno-mliječne fermentacije i dodatka hrastovog „čipsa“ tijekom odležavanja na aromu vina Muškat. Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom detekcijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS). Rezultati su pokazali da vino proizvedeno jabučno-mliječnom fermentacijom i uz dodatak hrastovog „čipsa“ karakteriziraju veće koncentracije linalola i α -terpineola, β -damaskenona, *i*-butanola, 2,3-butandiola, dietil sukcinata, *i*-amil acetata te furfurala koji se ekstrahirao iz dodanog hrastovog „čipsa“.*

Ključne riječi: *aroma, alkoholna fermentacija, jabučno-mliječna fermentacija, hrastov „čips“*

Rad sadrži: 34 stranice, 4 slike, 3 tablice, 51 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić*

Pomoć pri izradi: *Dr. sc. Natka Ćurko, viši asistent, Marina Tomašević, mag. ing., asistent*

Rad predan: lipanj 2016.

BASIC DOCUMENTATION CRAD

Final work

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

AROMA ANALYSIS OF WHITE WINE PRODUCED USING DIFFERENT TECHNOLOGYS

Lejla Joukhadar, 6287/PT

Abstract: *The aroma of wine is a result of the combination of numerous volatile compounds derived from grapes or formed during fermentation and maturation of wine. Quantitatively the most important aroma compounds are formed during alcohol fermentation through yeasts metabolism. The aim of this study was to determine the influence of alcoholic and malolactic fermentation and the influence of oak „chips“ addition during wine aging on aroma of Muscat wine. Identification and quantification of compounds was carried out by gas chromatography- mass spectrometry with solid-phase microextraction (SPME-GC/MS). The results showed that wine produced with malolactic fermentation and added oak „chips“ is characterized with higher concentrations of linalool, α -terpineol, β -damascenone, *i*-butanol, 2,3-butanediol, diethyl succinate, *i*-amyl acetate and furfural which was extracted from added oak „chips“.*

Key words: *aroma, alcohol fermentation, malolactic fermentation, oak „chips“*

Thesis contains: 34 pages, 4 figures, 3 tables, 51 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Karin Kovačević Ganić, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD Natka Čurko, Senior assistant, Marina Tomašević, mag. ing., assistant*

Thesis delivered: June 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. AROMA VINA	2
2.2. PODJELA TVARI AROME PREMA PODRIJETLU	2
2.2.1. Primarna aroma vina.....	2
2.2.2. Sekundarna aroma vina	4
2.2.3. Aroma fermentacije	4
2.2.3.1. Alkoholna fermentacija i njen utjecaj na aromu.....	4
2.2.3.2. Jabučno-mliječna fermentacija i njen utjecaj na aromu	7
2.2.4. Aroma starenja	7
2.2.4.1. Hrastove bačve	8
2.2.4.2. „Hrastov čips“	9
2.3. MUŠKAT ŽUTI	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJAL	11
3.1.1. Proizvodnja bijelog vina.....	11
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Aparatura i pomoćni pribor	14
3.1.3.1. Aparatura.....	14
3.1.3.2. Pomoćni pribor.....	15
3.2. METODE.....	15
3.2.1. Određivanje topljive suhe tvari aerometrom (moštomjerom).....	15
3.2.2. Određivanje ukupnog i slobodnog sumporovog dioksida (SO ₂)	17
3.2.3. Određivanje ukupne kiselosti mošta i vina	17
3.2.4. Praćenje jabučno-mliječne fermentacije tankoslojnom kromatografijom	18
3.2.5. Određivanje fermentacijske arome vina Muškata žuti plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS).....	19
3.2.5.1. Priprema uzorka, mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME).....	19
3.2.5.2. Kvantifikacija primarne arome	20
4. REZULTATI	21

4.1. ALKOHOLNA FERMENTACIJA	21
4.2. JABUČNO-MLIJEČNA FERMENTACIJA	22
4.3. ANALIZA FIZIKALNO-KEMIJSKIH KARAKTERISTIKA VINA.....	22
4.4. ANALIZA AROMATSKIH SPOJEVA	23
5. RASPRAVA.....	24
5.1. ALKOHOLNA FERMENTACIJA	24
5.2. JABUČNO-MLIJEČNA FERMENTACIJA	24
5.3. ANALIZA FIZIKALNO-KEMIJSKIH KARAKTERISTIKA VINA.....	25
5.4. ANALIZA AROMATSKIH SPOJEVA	25
6. ZAKLJUČCI.....	29
7. LITERATURA	30

1. UVOD

Vino je karakteristično po svojim senzorskim svojstvima kao što su boja, miris (aroma) i okus. Kemijske komponente vina, bilo da su prisutne već u grožđu ili se sintetiziraju tijekom prerade, alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije te starenja, odgovorne su za aromu vina.

Na sastav spojeva arome ovise brojni faktori, kao što su sorta i zrelost grožđa, vinogradarska praksa, primijenjeni enološki postupci, uvjeti odležavanja i starenja itd.

U posljednje vrijeme sve više se istražuju čimbenici koji utječu na formiranje arome vina. Razvoj modernih analitičkih metoda omogućio je iscrpnu analizu pojedinačnih spojeva arome. Utvrđeno je da aromu vina čini veliki broj spojeva različitih kemijskih struktura kao što su terpeni, norizoprenoidi, viši alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri, hlapive kiseline, pri čemu kvantitativno prevladavaju viši alkoholi, kiseline i esteri.

U zadnjih nekoliko godina postignut je značajan napredak u tehnološkom ali i znanstvenom razvoju u području proizvodnje vina. Došlo je do niza novih saznanja i otkrića o pojedinim procesima koji se zbivaju tijekom prerade grožđa i proizvodnje vina te su na osnovu toga uvedene nove metode u tehnološkim procesima u svrhu poboljšanja organoleptičkih svojstava i same kvalitete vina.

Cilj ovog rada bit će proizvodnja vina Muškati žuti primjenom različitih enoloških postupaka te utvrđivanje njihovog utjecaja na aromu proizvedenog vina. Ispitat će se utjecaj alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije te dodatka hrastovog „čipsa“ tijekom odležavanja vina. Spojevi arome identificirati i kvantificirati će se primjenom plinske kromatografije uz masenu detekciju uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. AROMA VINA

Aromu u širem smislu možemo definirati kao sveukupni senzorski doživljaj mirisnih i okusnih svojstava vina, a rezultat je kvalitete grožđa i načina proizvodnje vina (Lambrechts i Pretorius, 2000).

Na aromu vina utječe mnogo faktora, njen sastav i složenost ovise o sorti i zrelosti grožđa, aktivnosti kvasca, postupcima prije i tijekom fermentacije te o uvjetima dozrijevanja vina (Wilson, 1998).

O načinu provođenja fermentacije ovisi i sadržaj hlapivih komponenata nastalih tijekom alkoholne fermentacije, a sastav arome također ovisi o tome da li se starenje odvija u boci ili u bačvi pri čemu dolazi do formiranja određenih spojeva i ekstrakcije spojeva iz drva bačve (Piñeiro i sur., 2006).

2.2. PODJELA TVARI AROME PREMA PODRIJETLU

Obzirom na vrijeme formiranja, tvari arome mogu se podijeliti u određene skupine, a to su primarna, sekundarna aroma, aroma fermentacije te aroma starenja (Rapp, 1990).

2.2.1. Primarna aroma vina

Formiranje primarne arome vina počinje u vinogradu pod utjecajem tla, klime, načina uzgoja i gnojenja, a na nju najviše utječe sorta grožđa. Karakteristične komponente za primarnu aromu su aldehidi, terpeni spojevi, C6 spojevi, norizoprenoidi i metokspirazini. Najvažnija grupa spojeva primarne arome grožđa su terpeni (Jackson, 1994).

Terpeni

Terpeni su nađeni u svim sortama grožđa dok je najveći udjel ovih spojeva pronađen u sortama kao što su Gerwurztraminer, Muškat te Rizling. Vina ovih sorata obično su percipirana kao vina sa izraženim cvjetnim atributima. U biljkama je identificirano više od 400 terpenih spojeva, međutim u grožđu i vinu ih je pronađeno oko 40 i tek nekoliko njih predstavljaju važne komponente za aromu vina (Esti i Tamborra, 2006).

Najjednostavniji terpeni su monoterpeni sa 10 ugljikovih atoma (dvije izoprenske jedinice) (Pine, 1994). U bobici grožđa nalaze se u pokožici i mesu, te postoje u dva oblika, slobodnom i glikozidno vezanom. Slobodni oblici koji imaju utjecaj na aromu su: geraniol,

nerol, linalol, linalol oksid, α -terpineol, citronelol, hotrienol i nemirisni polihidroksilatni spojevi (polioli) koji uslijed blage kiselinske hidrolize prelaze u mirisne oblike (Gunata i sur., 1993).

Monoterpeni se inače koriste za sortnu karakterizaciju vina upravo zbog toga što se ne mijenjaju tijekom alkoholne fermentacije jer ne ulaze u metabolizam kvasaca. Čimbenici koji utječu na vrstu i koncentraciju ovih spojeva u grožđu ili vinu su: zrelost i sorta grožđa, izloženost bobica sunčevom svjetlu, upotreba glikozidaza, prešanje i starenje vina (Webster i sur., 1993).

Mnoga vina sadrže ove spojeve u koncentracijama iznad senzorskog praga osjetljivosti, te zbog toga oni aktivno sudjeluju u formiranju arome (Piñeiro i sur., 2006). Upravo su monoterpeni karakteristični za sortu Muškat te su zastupljeni u gotovo deset puta većim koncentracijama u odnosu na druge sorte grožđa (Sánchez-Palomo i sur., 2007).

Norizoprenoidi

Norizoprenoidi su aromatični spojevi nastali hidrolizom međuprodukata oslobođenih tijekom razgradnje karotenoida (Winterhalter i Schreier, 1994). Formiraju se iz karotenoida utjecajem svjetla, temperature i kisika. Oksidativnom degradacijom karotenoida (terpena s 40 C atoma) nastaju derivati s 9, 10, 11 ili 13 C atoma. Među njima, norizoprenoidni derivati s 13 C atoma imaju najznačajnija aromatična svojstva (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

S obzirom na kemijsku strukturu C₁₃-norizoprenoidni derivati se dijele na dvije skupine: megastigmani i ne-megastigmani. Megastigmani su oksidirani C₁₃-norizoprenoidi, a dijele se na damaskenonsku (oksidirani na C7) i iononsku (oksidirani na C9) grupu (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

β -damaskenon, koji spada u damaskenonsku grupu, s kompleksnom aromom na cvijeće, tropsko voće i kuhanu jabuku ima značajan utjecaj na aromu vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006), te se smatra se da je prisutan u svim sortama grožđa (Ferreira i sur., 2000).

Ako vino dozrijeva u barik bačvama, ili se u vino stavi hrastov „čips“ dolazi do oslobađanja norizoprenoida uslijed hidrolize glikozidnih oblika što pozitivno utječe na aromu vina (Grba, 2010).

2.2.2. Sekundarna aroma vina

Sekundarna aroma vina nastaje prilikom prerade grožđa, dakle, tijekom muljanja, ruljanja i prešanja te daljnjim kemijskim i enzimatskim reakcijama u moštu. Svi tehnološki procesi kroz koje grožđe prolazi prije alkoholne fermentacije utječu na koncentraciju i intenzitet spojeva arome, ali i na nastajanje novih spojeva.

2.2.3. Aroma fermentacije

Formiranje arome fermentacije odvija se za vrijeme alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije, a spojevi odgovorni za ovu aromu nastaju kao produkt metabolizma kvasaca i bakterija (Guth i Sies, 2002).

2.2.3.1. Alkoholna fermentacija i njen utjecaj na aromu

Alkoholna fermentacija je vrlo snažan biokemijski proces, koji obuhvaća međudjelovanje kvasaca, bakterija i ostalih mikroorganizama (Fugelsang i Edwards, 2004).

Najvažniji dio arome vina nastaje tijekom alkoholne fermentacije. Kvasci ne samo da pretvaraju šećer u etanol i ugljikov dioksid; oni također proizvode niz osjetilno važnih hlapivih spojeva (Lambrechts i Pretorius, 2000). Također, tijekom alkoholne fermentacije povećava se kemijska složenost i kompleksnost okusa i mirisa, olakšava se ekstrakcija spojeva iz čvrste faze prisutne u moštu te se modificiraju neki spojevi porijeklom iz grožđa (Pretorius, 2000).

Vrlo je važno kontrolirati uvjete u kojima se odvija proizvodnja vina (pH, temperatura, sastav medija, aerobnost procesa, soj kvasaca itd.) jer u slučaju nepovoljnih uvjeta (visoka temperatura i oksidiranost) nastaje manje hlapivih spojeva te se povećava koncentracija nepoželjnih spojeva (Piñeiro i sur., 2006).

Kvasac koji se najčešće koristi za proizvodnju vina je *Saccharomyces cerevisiae*, a karakterizira ga sposobnost rasta u medijima sa visokom koncentracijom šećera (od 220 do 250 g/L) i pri niskom pH (od 3 do 4). Također, dobro podnosi visoke koncentracije etanola (Moreira i sur., 2001).

Osnovne kemijske skupine koje nastaju tijekom alkoholne fermentacije su: viši alkoholi, esteri, masne kiseline, karbonilni spojevi, spojevi sa sumporom i hlapivi fenoli (Fleet, 1993).

Viši alkoholi

Višim alkoholima se nazivaju alkoholi koji imaju više od dva ugljikova atoma, veću molekulsku masu i vrelište od etanola. Pripadaju skupini spojeva koji značajno pridonose aromi vina, a imaju karakterističan snažan i oštar miris (Nykänen, 1986).

Sinteza viših alkohola odvija se istodobno sa stvaranjem etanola (Rapp i Versini, 1991). To su sekundarni metaboliti kvasca, a na njihovo nastajanje utječe koncentracija aminokiselina koje su prekursori za sintezu viših alkohola (Swiegers i Pretorius, 2005). Nastaju deaminacijom i dekarboksilacijom odgovarajućih aminokiselina (treonin, valin, leucin, izoleucin) ili sintezom iz šećera (Mauricio i sur., 1997).

Ukupni udio viših alkohola u vinu u rasponu je od 100-500 mg/L (Dubourdieu i sur., 2006). Njihova koncentracija ovisi o sorti, uvjetima fermentacije (koncentracija šećera, pH, temperatura fermentacije i aeracija), mutnoći mošta i soju kvasca koji provodi fermentaciju (Swiegers i sur., 2005).

Koncentracije viših alkohola iznad 400 mg/L, koje uglavnom nastaju uslijed mikrobiološkog kvarenja rezultiraju jakim i oštrim mirisima, dok u optimalnim koncentracijama, ispod 300 mg/L imaju voćne karakteristike i pozitivno doprinose aromi vina (Swiegers i Pretorius, 2005).

Najznačajniji predstavnici ove skupine spojeva su 1-propanol, 1-butanol, *i*-amil alkohol i 2-fenil etanol (Swiegers i sur., 2005).

Također, viši alkoholi su važni prekursori nastajanja estera koji su povezani sa ugodnim i poželjnim aromama vina (Dubourdieu i sur., 2006).

Esteri

Esteri predstavljaju jedne od najvažnijih spojeva koji čine aromu vina. Sorta i zrelost grožđa, ekološki uvjeti, uvjeti prerade grožđa te uvjeti provedbe fermentacije i dozrijevanje vina, su faktora koji utječu na sastav i koncentraciju estera u vinu (Lambrechts i Pretorius, 2000).

Dvije glavne skupine estera nastaju tijekom fermentacije, etil esteri ravnolančanih masnih kiselina i acetatni esteri viših alkohola. Etilni esteri poznati su kao voćni esteri, a u vinima su prisutni: etil propionat, etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanat

(Lambrechts i Pretorius, 2000), dok su najznačajniji acetatni esteri prisutni u vinu: etil acetat i *i*-amil acetat (Wang i sur., 2002).

Kiseline

Grožđe je bogato organskim kiselinama koje preko mošta prelaze u vino, a dijele se na hlapive i nehlapive. Kiseline mogu imati pozitivan i negativan utjecaj na aromu vina, ovisno o koncentraciji u kojoj se nalaze, te tipu i stilu vina.

Hlapive organske kiseline u vinu nastaju, uglavnom, kao sekundarni produkt alkoholne fermentacije, a mogu nastati tijekom procesa dozrijevanja, ali i usred kvarenja vina (Jackson, 1994).

Srednjelančane masne kiseline: heksanska, oktanska i dekanska nastaju metabolizmom kvasca kao intermedijeri u biosintezi dugolančanih masnih kiselina (Lambrechts i Pretorius, 2000), dok kratkolančane masne kiseline: propionska, mliječna i maslačna su sekundarni produkti fermentacije, iako se propionska i maslačna kiselina mogu povezati i s djelovanjem bakterija (Sweigers i sur., 2005).

Tijekom alkoholne fermentacije dolazi do povećanja udjela kratkolančanih kiselina, dok se udio srednjelančanih masnih kiselina smanjuje (Fleet, 1993).

Karbonilni spojevi

Kao najvažnije spojeve koji utječu na miris vina, u ovoj skupini spojeva bitno je istaknuti acetaldehid i diacetil

Glavni aldehid pronađen u vinu je etanal ili acetaldehid. Jedan je od najvažnijih karbonilnih spojeva u vinu i nalazi se u količini od 90% od ukupne količine svih aldehida u vinu. Sintetizira se tijekom rasta kvašćevih stanica nakon što se potroši 25% šećera (Liu i PNONE, 2000). Također, zadnji je prekursor prije formiranja etanola jer piruvat, posljednji produkt glikolize, prelazi u acetaldehid uz piruvat dekarboksilazu koji potom uz alkohol dehidrogenazu prelazi u etanol (Delfini i Costa, 1993).

Od ketona važan sastojak arome vina je diacetil ili 2,3-butandiol. Nastaje kao sekundarni metabolit alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije (Bratowsky i Henschke, 2004) te ga karakterizira maslačna aroma. Sinteza diacetila je proporcionalna dostupnosti aminokiselina, osobito valina i treonina. Diacetil nije stabilan produkt i lako se reducira u

2,3-butandiol uz pomoć kvasaca preko acetona koji potiče tu oksido-redukcijsku reakciju. (Fleet, 1993).

2.2.3.2. *Jabučno-mliječna fermentacija i njen utjecaj na aromu*

Jabučno-mliječna fermentacija obično se provodi nakon alkoholne fermentacije djelovanjem bakterija mliječne kiseline. Tijekom jabučno-mliječne fermentacije jabučna kiselina se dekarboksilira u mliječnu uz nastajanje CO₂. Provodi se u slučaju povećane kiselosti vinu te utječe na aromatski profil vina, odnosno poboljšava njegove aromatske karakteristike (Lambrechts i Pretorius, 2000).

Najčešće korištene bakterije u proizvodnji vina su bakterije roda *Oenococcus oeni*. Vino je kemijski nepovoljno okruženje za bakterije, a bakterije roda *Oenococcus oeni* su najviše prilagodljive te se koriste gotovo isključivo za poticanje jabučno-mliječne fermentacije u vinima (Henschke, 1993). Istraživanje, koje su proveli Bratowsky i Henschke (2004), pokazuje da ove bakterije mogu modificirati neke komponente i senzorska svojstva vina stvarajući nove arome i okuse vina.

Jedan od intermedijera metabolizma bakterija mliječne kiseline je diacetil, koji se smatra jednom od najvažnijih komponenti arome proizvedene tokom jabučno-mliječne fermentacije (Rankie i sur., 1969). Djelovanjem bakterija mliječne kiseline nastaje najveći udjel diacetila u vinu (od 1-4 mg/L). Zbog toga je proizvodnja diacetila djelovanjem bakterija puno važnija od malih količina koje nastaju djelovanjem kvasca tijekom alkoholne fermentacije (Bratowsky i Henschke, 2004). Jabučno-mliječna fermentacija koja je provedena pri nižim temperaturama, npr. 18 °C, je sporija, pri čemu se sintetizira veća koncentracija diacetila (Hart, 1997).

Također, udjel etilnih estera povećava se nakon jabučno-mliječne fermentacije (Gambaro i sur., 2001).

2.2.4. Aroma starenja

Faza proizvodnje vina nakon završene alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije zove se stabilizacija tijekom koje vino odležava kroz određeni vremenski period pri čemu dolazi do njegovog dozrijevanja, ali i starenja te razvoja tzv. arome starenja („bouquet starenja“). Tako je npr. odležavanje vina nakon fermentacije u hrastovim bačvama do trenutka punjenja

u boce česta praksa, a jedan od glavnih razloga ovog postupka je formiranje „arome drveta“ (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Najznačajnije reakcije koje se odvijaju tijekom starenja vina su oksidacija postojećih aromatskih spojeva te ekstrakcija sastojaka iz drveta bačve, ukoliko vino odležava u bačvama. Oksidacijom dolazi do povećanja koncentracije aldehidnih sastojaka (uključujući acetaldehid koji nastaje oksidacijom etilnog alkohola) koji doprinose mirisu na dunju, jabuku i suho orašasto voće. Također, smanjuje se količina voćnih estera, *i*-amil acetata i 2-fenil acetata, te povećava količina dietil sukcinata. Ekstrakcijom sastojaka podrijetlom iz drvenih bačvi u vino dopijevaju različiti aromatski spojevi kao što su: aldehidi, ketoni, laktoni i hlapivi fenoli (Moreno-Arribas i Polo, 2009.).

Koncentracija i sastav hlapivih spojeva koji potječu iz drveta bačve ovise o njezinom podrijetlu (vrsta drveta, geografska regija, starost drveta itd.) kao i o samom načinu proizvodnje (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Ovisno o periodu odležavanja vina u bačvama različit je njihov utjecaj na mirisna i okusna svojstva. Tanini drveta su u vinu dobro topivi te mogu značajno utjecati na okus, boju i miris vina.

2.2.4.1. *Hrastove bačve*

Francis i sur. (1992) su pomoću senzorske deskriptivne analize opisali utjecaj podrijetla hrasta, sušenja i paljenja na aromu vina po drvu i pritom su utvrdili da jače paljenje pojačavaju arome vanilije, karamela, oraha, maslaca i cedra, a gube se arome grožđa. Arome, koje se ekstrahiraju iz drveta, a ima ih preko 40, mogu se podijeliti u 4 grupe: furani, laktoni, fenolni aldehidi i fenoli.

Postoje dva tipa sušenja drva, a to su prirodno i umjetno sušenje. Prirodno sušenje drveta traje nekoliko godina, ovisno o debljini dužica bačve, a odvija se na prozračnim, prostranim mjestima. Prirodno sušenje drveta vodi povećanju koncentracije različitih aromatskih komponenti: eugenola i vanilin aldehida koji nastaju raspadom lignina. Umjetno sušenje drva se obavlja u ventiliranim sušarama na 40 - 60 °C u vremenskom trajanju od otprilike jednog mjeseca. Umjetno sušeno drvo u odnosu na prirodno sušeno sadrži veću koncentraciju tanina i kumarina (veća gorčina), te manju koncentraciju eugenola, vanilina i metil-oktalaktona (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Također, kvaliteta bačava ovisi o uspješnosti paljenja, koje ima značajan utjecaj na fizikalno-kemijske i organoleptične karakteristike vina tijekom starenja (odležavanja) vina (Francis i sur. 1992). Tri su razine paljenja: lagano (traje otprilike 5 min., visina temp. 120 – 180 °C), srednje (traje otprilike 10 min., temperatura 200 °C) i jako (traje više od 15 min., temperatura 230 °C). Kompleksnost arome drva povećava se od laganog prema jakom paljenju. Ova aroma se uglavnom karakterizira nijansama vanilije i tostiranog, paljenog (podrijetlom od furano- i fenol aldehida), kao i dimnim, začinskim, te notama prženog (podrijetlom od hlapivih fenola). Jakim paljenjem aroma samog drva se smanjuje, a ističu se mirisi po dimljenom i paljenom (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

2.2.4.2. „Hrastov čips“

Odležavanje vina u bačvama zahtjeva dugi vremenski period, a ujedno je i financijski vrlo zahtjevno. Zbog toga se posljednjih nekoliko godina sve više koristi nova, jeftinija i jednostavnija tehnologija koja uključuje stavljanje komada drveta (hrastov „čips“) u vino. Uporabom hrastovog „čipsa“ mogu se postići senzorska svojstva slična onima u vinima koja su odležavala u bačvama (Rodriguez-Bencomo i sur., 2008). Ovom tehnikom drvo se stavlja u vino, a ne vino u drvo, cijela površina drveta je dostupna, a ne samo 40% (Stutz, Lin i Herdman, 1999) kolika je kontaktna površina primjenom hrastovih bačava.

Hrastov „čips“ može biti korišten na više načina: može se dodati u mošt, tijekom prešanja ili u tank s gotovim vinom. Također, dodatak hrastovog „čipsa“ vinima koja su odležala u bačvama može dati novi karakter arome po drvu (Schahinger i Rankine, 1995).

U današnje vrijeme dostupan je veliki broj takvih proizvoda na tržištu. Karakteristike vina proizvedenog dodatkom „čipsa“ ovisit će o veličini komadića samog „čipsa“, geografskom podrijetlu drveta, stupnju paljenja, dužini kontakta sa vinom, trenutku primjene te tipu drveta (Rodriguez-Bencomo i sur., 2008).

2.3. MUŠKAT ŽUTI

Vinova loza (lat. *Vitis vinifera*) jedna je od najstarijih kultura rasprostranjenih po čitavome svijetu (Olmo, 2000) koja svojom ukupnom proizvodnjom nadmašuje sve ostale voćne vrste (Maletić i sur., 2008).

Muškat žuti pripada skupini muškatnih kultivara čije je podrijetlo područje Bliskog istoka. Najviše se uzgaja u Italiji i na Siciliji (Mirošević i Turković 2003), a u Hrvatskoj je zastupljen u podregijama Istra i Zagorje - Međimurje (HCPHS, 2008).

Ova sorta naziva se još i Nebbiolo B, Muškat rumeni, Muscat lunei, Moscato siro, Moscato Giallo B, Moscato cipro, Moscatel te Moscat (OIV, 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Proizvodnja bijelog vina

Vina sorte Muškat žuti proizvedena su preradom grožđa u fazi tehnološke zrelosti (rujan 2015.) u laboratorijskim uvjetima prema shematskom prikazu na slici 1. Primijenjena su dva tehnološka postupka, kojima su proizvedena dva vina (Vino 1 i Vino 2).

Količina bijelog grožđa u iznosu od 5 kg izruljana je i izmuljana, a tako dobiveni masulj je isprešan, kako bi se tekući dio (mošt) odvojio od krutog dijela (pokožice i sjemenke). Na osnovu dobivenog volumena mošta (2 L) izračunata je količina sumporaste kiseline (koncentracije 160 g/L) koju je potrebno dodati da bi se u moštu postigla koncentracija od 60 mg/L ukupnog sumporovog dioksida. Dio sumporaste kiseline dodan je u mošt tijekom samog procesa prešanja i to na način da je sumporasta kiselina dodana u manji odvojeni dio mošta (cca 100 ml), koji je potom uz miješanje vraćen u ukupni volumen mošta. Nakon prešanja u moštu je određen ukupni sumporov dioksid koji je iznosio 31 mg/L te je potom korigiran na 60 mg/L, a dobiveni mošt je prebačen u staklenu posudu od 5 L na taloženje kroz 24 sata na sniženoj temperaturi, dok je sama posuda zatvorena vrenjačom.

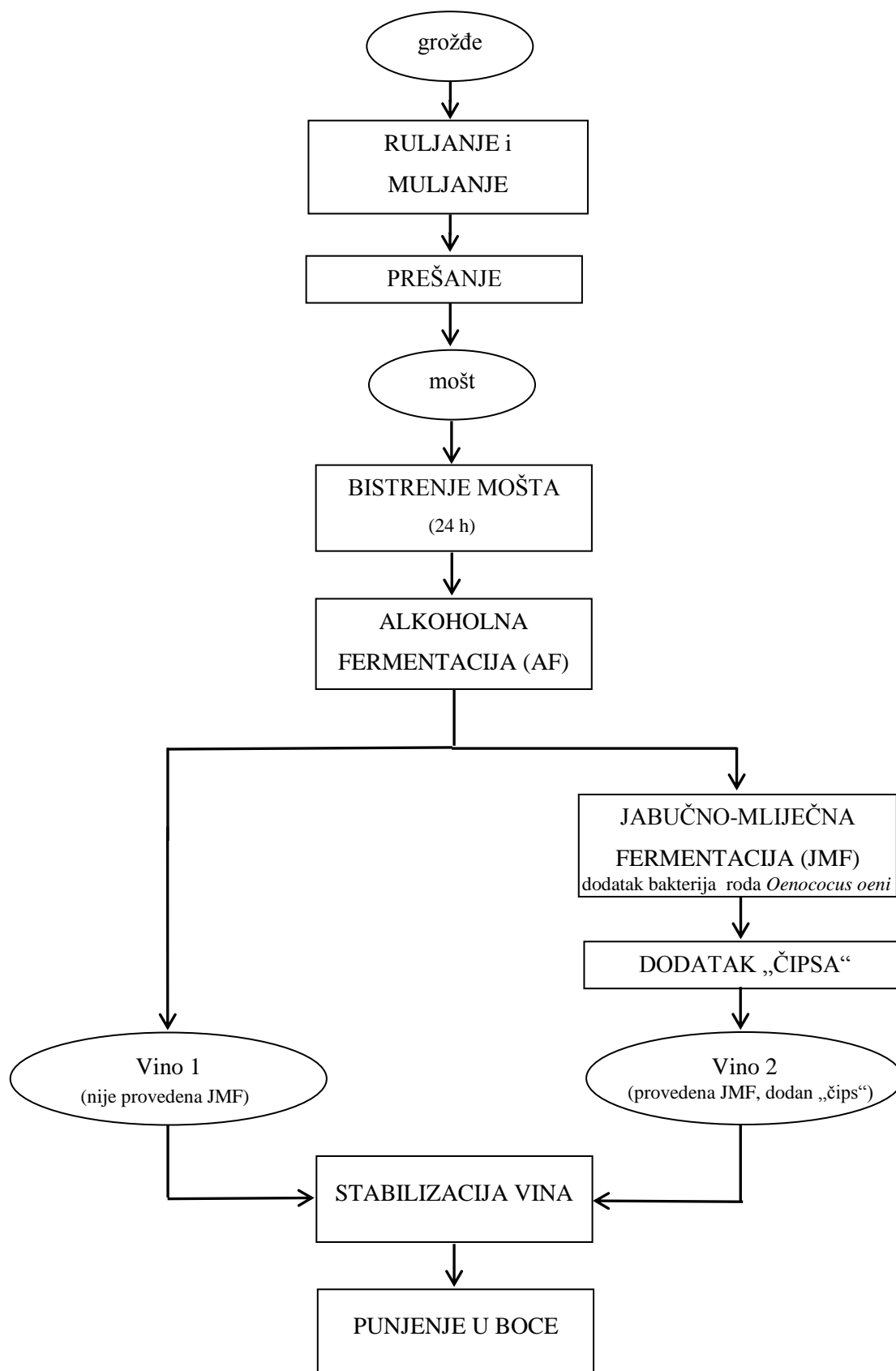
Sljedećeg dana bistri dio mošta odvojen je od taloga zatvorenim pretokom (pomoću crijeva) u staklenu tikvicu s vrenjačom u kojoj je provedena alkoholna fermentacija. U izbistrenom moštu određena je ukupna kiselost koja je iznosila je 2,7 g/L te je potom korigirana na 5 g/L uz dodatak vinske kiseline. Također, nakon taloženja i bistrenja određen je slobodni i ukupni sumporov dioksid koji su iznosili redom 21 mg/L te 49 mg/L. Nadalje, Klosterneuburger moštomjerom po Babo-u izmjerena je koncentracija šećera koja je iznosila 20 °Kl uz temperaturu mošta od 19°C. Upotrebom Salleronovih tablica izmjerena vrijednost °Kl preračunata je u °Bx te g/L, a izračunat je i ukupni teorijski udio alkohola.

Alkoholna fermentacija provedena je inokulacijom selekcioniranog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Actiflore, Laffort, Bordeaux, Francuska) u dozi od 20 g/hL drugog dana prerade. Kvasci su rehidratirani uz dodatak destilirane vode i 30 g/hL sredstva za rehidrataciju (Dynastart Superstart, Laffort, Bordeaux, Francuska) pri temperaturi od 38 °C tijekom 20 minuta, a potom su dodani u staklenu tikvicu za fermentaciju s vrenjačom. Alkoholna fermentacija mošta trajala je 6 dana. Tijekom svih 6 dana mjereno je pad koncentracija šećera (Klosterneuburger moštomjerom te enzimski ispod 4 °Kl) kao i temperatura fermentacije. Primjenom Salleronovih tablica koncentracija šećera preračunata

je u °Bx i g/L, a izračunat je teorijski porast udjela alkohola tijekom fermentacije. Temeljem navedenih parametara dobiven je uvid o dinamici alkoholne fermentacije.

Nakon završetka alkoholne fermentacije vino je zatvorenim pretokom pretočeno u dvije manje staklene tikvice te su dalje primijenjena dva različita tehnološka postupka. Prvi tehnološki postupak proizvodnje nije uključio provedbu jabučno-mliječne fermentacije (JMF), zbog čega je odmah po završetku alkoholne fermentacije vino sumporeno do 60 mg/L ukupnog sumporovog dioksida (kako bi se spriječila spontana provedba JMF). Ovim postupkom proizvedeno je Vino 1. Drugi tehnološki postupak proizvodnje uključio je provedbu JMF inokulacijom bakterije roda *Oenococcus oeni* (SB3 Instant, Laffort, Francuska) u dozi od 1 g/hL. Neposredno prije dodatka u vino bakterije su rehidratirane u 20 puta većem volumenu vode pri temperaturi od 20°C tijekom 15 minuta. Kontrola jabučno-mliječne fermentacije provedena je tankoslojnom kromatografijom u oba vina. Nakon provedbe JMF vino je sumporeno do 40 mg/L ukupnog sumporovog dioksida te je dodano 3 g/L „čipsa“ (Dominoes French Oak Add Ins™, Nadalie, Francuska), tijekom mjesec dana. Ovim postupkom proizvedeno je Vino 2.

Stabilizacija oba vina uključila je bistrenje bentonitom (Microcol Alpha, Laffort, Bordeaux, Francuska). Prethodno provedenim testom termostabilnosti utvrđena je doza od 50 g/hL bentonita. Bentonit je prije dodatka u vino prvo rehidratiran u 10 puta većem volumenu vode uz neprekidno miješanje tijekom 2 sata, a nakon 24 sata dodan je u vina. Nakon tjedan dana proveden je pretok vina, sumporenje vina do 60 mg/L ukupnog sumporovog dioksida, analiza fizikalno-kemijskih parametara (FTIR metodom) te punjenje u boce.



Slika 1. Shematski prikaz proizvodnje bijelih vina

3.1.2. Kemikalije

- Jod, Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija
- Škrob, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev klorid, čistoće > 99,5% „Carlo Erba“, Vale de Reuil, Francuska
- Natrijev hidroksid (NaOH), Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska
- Sumporna kiselina (H₂SO₄), Panreac, Barcelona, Španjolska
- Vinska kiselina (C₄H₆O₆), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Jabučna kiselina (C₄H₆O₅), Acros Organics, New Jersey, SAD
- Mliječna kiselina (C₃H₆O₃), T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- *n*-amil- „Fluka“, čistoće > 99% (interni standard), Steinheim, Švicarska
- Etanol- HPLC grade, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska

3.1.3. Aparatura i pomoćni pribor

3.1.3.1. Aparatura

- Analitička vaga, Metler Toledo, Columbus, OH, SAD
- Klosterneuburgova moštna vaga, TLOS laboratorijsko staklo d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- pH metar inoLab 7110, WTW, Weilheim, Njemačka
- Mikropipeta, 10-100 µL, Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD
- Mikrolitarska igla volumena 10 µL,
- Stakleni nosač presvučen silikagelom: KIESELGEL 60 F₂₅₄ (dimenzija ploče 4x4 cm, debljina sloja silikagela 0,5 mm)
- Magnetska miješalica RT 5 power IKAMAG, IKA, Staufen, Njemačka
- Termoblok s magnetskom miješalicom, Pierce, Reacti-Therm, Heating/Stirring module, No. 18971, Rockford, IL, SAD
- SPME vlakno: 100 µm PDMS, 23 Ga, Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- Plinski kromatograf (GC), Agilent Technologies 6890 Network GC System, Santa Clara, CA, SAD
- Maseni spektrometar, Agilent Technologies 5973 Inert Mass Selective Detector, Santa Clara, CA, SAD

3.1.3.2. Pomoćni pribor

- Staklena Erlenmayerova tikvica, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Staklena posuda, 5000 mL
- Staklena čaša, 50 mL, 100 mL, 250 mL
- Stakleni štapić za miješanje
- Menzura, 50 mL
- HSS bočice, 20 mL
- Silikonski čepovi za HSS bočice
- Graduirana pipeta od 1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL
- Bireta, 50 mL
- Vrenjača, plastična

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje topljive suhe tvari aerometrom (moštomjerom)

Princip određivanja koncentracije šećera:

Ova fizikalna metoda određivanja koncentracije šećera u moštu temelji se na činjenici da 90-94% suhe tvari mošta čine ugljikohidrati te principu Arhimedova zakona koji glasi:

$$F_u = \rho_{\text{tekućine}} \times V_{\text{tijela}} \times g$$

iz čega vidimo da je sila uzgona (F_u) funkcija gustoće tekućine.

Zbog ovisnosti o sili uzgona dolazi do različitog uranjanja areometra u tekućinu (mošt), a na njemu se nalazi skala koja izražava količinu šećera u moštu.

Skale koje susrećemo u vinarstvu su različite i ne daju količinu šećera u g/L već u stupnjevima koje najčešće nazivamo po konstruktoru skale, npr. stupnjevi Babo ili Klosterneuburger stupnjevi (Klosterneuburger skala po Babo-u) - °Ba (°Kl); Oechsle-ovi (Ekslovi) stupnjevi - °Oe.

Babo-ov moštomjer (Klosterneuburgova moštna vaga) izražava sadržaj šećera u masenim postocima (w/w) tj. stavlja u odnos masu otopljene tvari (šećera) sa masom otopine (mošta) x 100.

°Ba (°Kl)= koliko grama šećera ima u 100 g mošta

Kod mjerenja šećera na ovaj način najvažnije je napomenuti da gustoća mošta ovisi o njegovoj temperaturi. Na svakom moštomjeru piše pri kojoj je temperaturi baždaren i u slučaju odstupanja od te temperature mora se izvršiti korekcija očitane vrijednosti. Iz tog razloga u sastav moštomjera ulazi i termometar. Ako ga nema, s termometrom se izmjeri temperatura mošta i izvrši korekcija.

Kod preračunavanja očitanih stupnjeva u masenu koncentraciju šećera u g/L koriste se Salleronove tablice ili Oechslove tablice iz kojih se direktno očita odgovarajuća vrijednost.

Formule za izračunavanje:

$$\% \text{ šećera (g/100 mL) } = \text{°Oe} \times 0,266 - 3 \text{ (preciznija vrijednost)}$$

$$\% \text{ šećera (g/100 mL) } = \text{°Oe}/4 - 3$$

$$\text{°Oe} = \text{°Ba (°Kl)} \times 5$$

Na bazi količine šećera, uz preračunavanje Salleronovim tablicama može se procijeniti potencijalna količina alkohola u budućem vinu. Količina alkohola u vinu se izražava u vol%.

$$\text{vol\% alkohola} = \text{°Oe}/6 - 2,5$$

$$\% \text{ šećera (g/100ml) } \times 0,59 = \text{vol\% alkohola}$$

Postupak određivanja koncentracije šećera:

Izmjeriti koncentraciju šećera Klosterneuburger moštomjerom po Babo-u u °Kl. Mošt pretočiti u menzuru do vrha te uroniti moštomjer i ostaviti par sekundi da se stabilizira. Očitati vrijednost °Kl i temperature. Temperatura baždarenja moštomjera je 15 °C. Ukoliko se temperatura mošta razlikuje od temperature baždarenja moštomjera mora se izvršiti korekcija očitane vrijednosti koncentracije šećera i to:

- Za svakih 2,5 °C iznad temperature baždarenja moštomjera (15 °C) očitanoj vrijednosti dodati 0,1°
- Za svakih 2,5 °C ispod temperature baždarenja moštomjera (15 °C) očitanoj vrijednosti oduzeti 0,1°

3.2.2. Određivanje ukupnog i slobodnog sumporovog dioksida (SO₂)

Princip određivanja:

SO₂ nalazi se u vinu u vezanom i slobodnom obliku. SO₂ veže se s aldehydima, šećerima i polifenolnim tvarima. Ovom se metodom usporedno određuje slobodni i ukupni SO₂ pa se količina vezanog izračunava na temelju njihove razlike. Određivanje se provodi pomoću otopine joda, pri čemu se SO₂ oksidira, a jod reducira, pa se na temelju utroška otopine joda izračuna koncentracija SO₂.

Postupak određivanja slobodnog SO₂:

U Erlenmeyer-ovu tikvicu s brušenim grlom otpipetirati 50 mL vina, zatim dodati 10 mL otopine H₂SO₄ (25%) i 3 mL 1%-tne otopine škroba. Titrirati s 0,01 M I₂ do pojave plave boje koja će se održati pola minute. Utrošak pomnožiti faktorom 12,8 i na taj način izračunati koncentraciju slobodnog SO₂ izraženu u mg/L.

Postupak određivanja ukupnog SO₂:

U Erlenmeyer-ovu tikvicu sa šlifom otpipetirati 50 mL vina, dodati 25 mL 1M NaOH. Zatvoriti tikvicu te dobro protresti i ostaviti 10 minuta kako bi sav SO₂ prešao u slobodni oblik. Zatim dodati 15 mL otopine H₂SO₄ (25%) i 3 mL 1%-tne otopine škroba. Titrirati s 0,01 M I₂ do pojave plave boje koja će se održati pola minute. Utrošak pomnožiti faktorom 12,8 i na taj način izračunati koncentraciju ukupnog SO₂ izraženu u mg/L.

3.2.3. Određivanje ukupne kiselosti mošta i vina

Princip određivanja ukupne kiselosti:

Metoda se temelji na potenciometrijskoj titraciji uzorka s otopinom natrijevog hidroksida. Sve slobodne organske i anorganske kiseline i njihove soli te druge kisele tvari neutraliziraju se otopinom natrijevog hidroksida, iz čijeg se utroška izračuna ukupna kiselost. Ukupna kiselost izražava se kao vinska kiselina u g/L.

Postupak određivanja ukupne kiselosti:

Otpipetirati 10 mL pripremljenog uzorka u čašu. Izmjeriti pH vrijednost. Uz lagano miješanje mošt (vino) titrirati s 0,1 M NaOH dok se ne dostigne vrijednost od pH = 7,00. Utrošak pomnožiti s faktorom 0,1 M NaOH (f = 1,000) te faktorom 0,75 (faktor za

preračunavanje kiselosti na vinsku kiselinu) i na taj način izračunati koncentraciju ukupne kiselosti izraženu u g/L. Ako je potrebno, korigirati ukupnu kiselost. Izračunati količinu vinske kiseline potrebnu za korekciju na koncentraciju 5,5 g/L, izvagati, dobro otopiti u otprilike 30 mL mošta, a potom dodati u posudu od 1 L te dobro promiješati.

3.2.4. Praćenje jabučno-mliječne fermentacije tankoslojnom kromatografijom

Postupak praćenja jabučno-mliječne fermentacije:

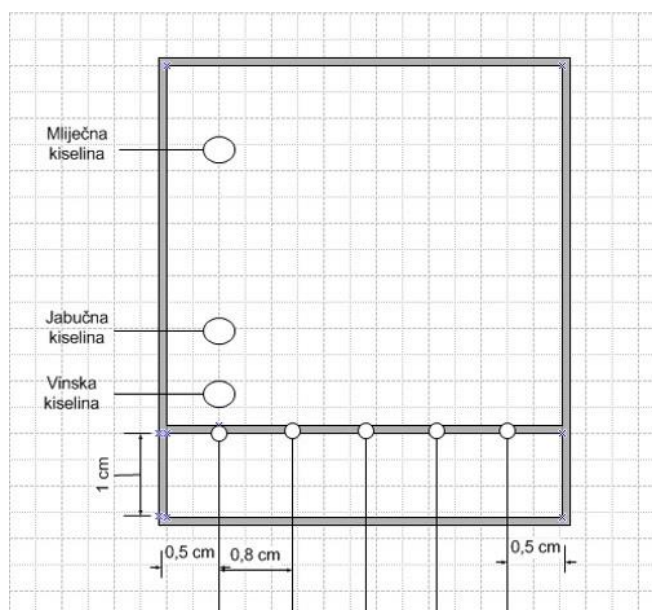
Na izrezane ploče nanijeti 10 μ l uzorka vina na visini 1 cm od donjeg ruba ploče. Za nanošenje uzoraka koristiti iglu volumena 10 μ l. Uzorak nanositi postepeno u 10 obroka, uz sušenje. Osim uzoraka potrebno je na ploču nanijeti model otopine jabučne i mliječne kiseline. 10-ak minuta prije stavljanja ploče, u čašu pipetirati 2 mL otapala i staviti filter papir. Nakon razvijanja kromatograma (10-ak minuta, tj. dok otapalo ne dođe do vrha ploče), izvaditi ploču, staviti u provjetreni prostor i sušiti s fenom 10-ak minuta, do pojave tamno modre boje. Zatim detektirati žute mrlje na modro-zelenoj podlozi (koje predstavljaju kiseline) i skenirati ili slikati s digitalnim aparatom. Po završetku jabučno-mliječne fermentacije vidjet će se žuta mrlja samo kod mliječne kiseline što znači da je ovaj proces završio.

Za proučavanje i usporedbu dobivenih rezultata na kromatografsku ploču nanijeti model otopinu koja se sastoji 2 g/L mliječne kiseline i 2 g/L jabučne kiseline otopljenih u 13%-tnom etanolu.

$$R_f (\text{vinske kiseline}) = 0,1$$

$$R_f (\text{jabučna kiselina}) = 0,24$$

$$R_f (\text{mliječna kiselina}) = 0,61$$



3.2.5. Određivanje fermentacijske arome vina Muškat žuti plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS)

Princip određivanja:

Određena količina ispitivane smjese uvodi se strujom inertnog plina (plina nosioca) u kromatografsku kolonu, u kojoj se sastojci razdjeljuju između adsorbensa (nepokretna faza) i plina nosioca (pokretna faza). Prisutnost odijeljenih sastojaka smjese u plinu nosiocu po izlasku iz kolone utvrđuje se u detektoru, uređaju koji količinu eluiranog sastojka kao funkciju vremena registrira u obliku kromatograma. Na slici 2 prikazan je plinski kromatograf s masenim spektrometrom.

GC/MS analiza

Kolona korištena za analizu: BP20 (50m x 220 μ m x 0,25 μ m), SGE Analytical Science, Victoria, Australia.

Uvjeti rada plinskog kromatografa (GC/MS):

- temperatura injektora: 250°C
- temperatura detektora: 280°C
- temperaturni program: 40°C, 5 min → 200°C, 3°C /min → 240°C, 30°C /min
- plin nosioc: He
- protok plina nosioca: 1,2 mL/min
- 'Splitless mode' injektiranja

3.2.5.1. Priprema uzorka, mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)

U tikvicu od 50 mL otpipetirati dio uzorka te dodati *n*-amil (interni standard) u koncentraciji od 20 mg/L, te nadopuniti tikvicu uzorkom, do oznake. Odvagati 2 g NaCl u HSS bočicu te dodati 10 mL uzorka s internim standardom i staviti na adsorpciju na SPME pri 40°C kroz 30 minuta i konstantno miješanje. Nakon pola sata vlakno se prenijeti u injektor plinskog kromatografa gdje se desorbira kroz pet minuta.

3.2.5.2. Kvantifikacija primarne arome

Retencijska vremena pojedinih sastojaka (vrijeme u minutama između injektiranja i detektiranja pri izlasku iz kolone), pomoću kojih se kasnije identificira pojedini sastojak, utvrditi prilikom razvoja metode, injektiranjem model otopina različitih koncentracija te pojedinačnim injektiranjem pojedinog spoja.

Kvantifikaciju provesti kompjuterskom obradom dobivenih podataka, odnosno kromatograma, u programu Enhanced ChemStation (Agilent Technologies), metodom internog standarda. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvije paralele te je izračunata standardna devijacija ($n=2$). Obrada podataka provedena je pomoću programa Microsoft Excel 2010. Identifikacija nepoznatih spojeva je provedena na način da su uspoređeni maseni spektri dobivenih pikova s onima iz „library“ uz uvjet da su već detektirani u vinu tj. potvrđeni.



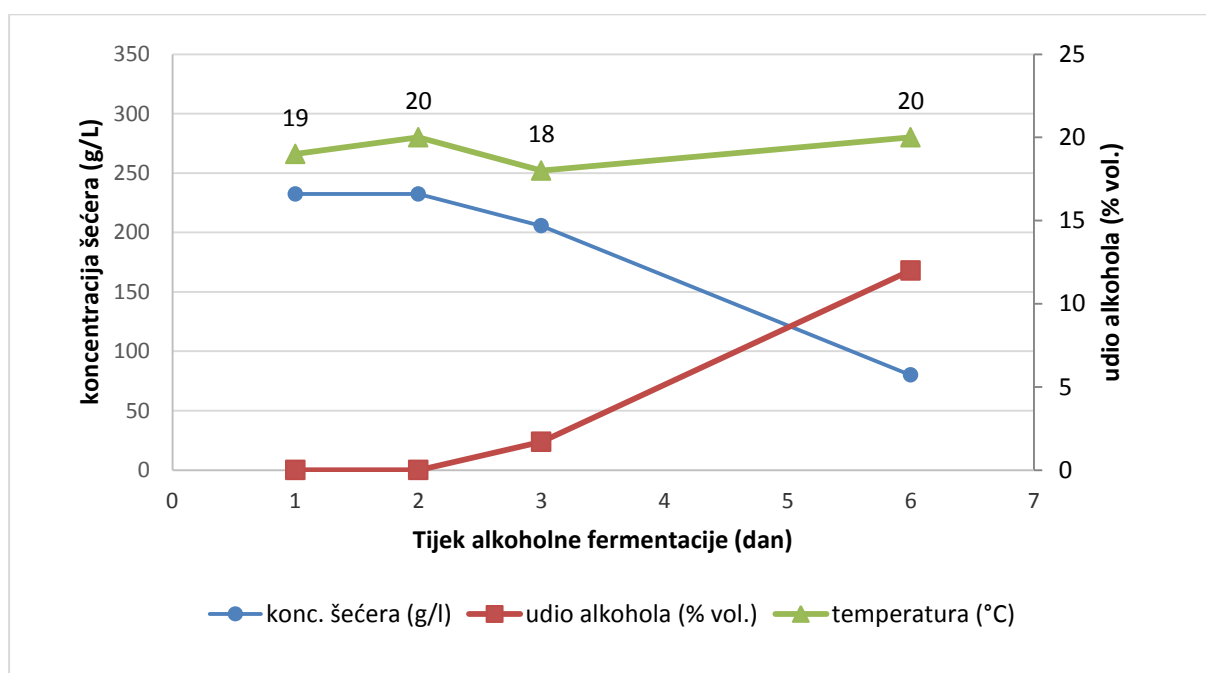
Slika 2. GC-MS uređaj

4. REZULTATI

4.1. ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Tablica 1. Ukupni podaci tijekom alkoholne fermentacije

Dan fermentacije	Temperatura (°C)	Koncentracija šećera (°Kl)	Koncentracija šećera (°Brix)
1	19	20,2	23,9
2	20	20,2	23,9
3	18	18,1	21,5
4	-	-	-
5	-	-	-
6	20	< 4	< 5



Slika 3. Grafički prikaz dinamike alkoholne fermentacije

4.2. JABUČNO-MLIJEČNA FERMENTACIJA



Slika 4. Praćenje tijeka jabučno-mliječne fermentacije tankoslojnom kromatografijom

4.3. ANALIZA FIZIKALNO-KEMIJSKIH KARAKTERISTIKA VINA

Tablica 2. Rezultati fizikalno-kemijske analize proizvedenih vina

Analiza	UZORCI	
	Vino 1 (bez JMF)	Vino 2 (JMF, „čips“)
Alkohol (%)	12,8	12,8
pH	3,35	3,27
Reducirajući šećeri (g/L)	3,0	3,0
Ukupna kiselost (g/L vinske kiseline)	5,7	5,6
Hlapiva kiselost (g/L octene kiseline)	0,41	0,44
Jabučna kiselina (g/L)*	0,7	0,2
Mliječna kiselina (g/L)*	0,2	0,4

*Sadržaj jabučne i mliječne kiseline može odstupati za $\pm 0,3$ g/L JMF, jabučno-mliječna fermentacija

4.4. ANALIZA AROMATSKIH SPOJEVA

Tablica 3. Rezultati GC/MS analize proizvedenih vina (srednje vrijednosti i standardne devijacije)

	UZORCI	
	Vino 1 (bez JMF)	Vino 2 (JMF, „čips“)
Karbonilni spojevi (mg/L)		
Furfural	nd	4,82 ± 0,13
Esteri (mg/L)		
<i>i</i> -amil acetat	2,13 ± 0,07	2,45 ± 0,05
Heksil acetat	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00
2-feniletil acetat	0,16 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Etil heksanoat	0,35 ± 0,01	0,31 ± 0,01
Etil oktanoat	0,27 ± 0,01	0,23 ± 0,00
Etil dekanat	0,14 ± 0,00	0,12 ± 0,01
Dietil sukcinat	0,07 ± 0,00	2,08 ± 0,04
Alkoholi (mg/L)		
<i>i</i> -butanol	9,14 ± 0,32	11,04 ± 0,24
<i>i</i> -amil alkohol	134,84 ± 4,65	126,55 ± 2,73
<i>i</i> -heksanol	0,92 ± 0,03	0,86 ± 0,02
<i>Cis</i> -3-heksen-1-ol	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Feniletil alkohol	10,02 ± 0,35	11,02 ± 0,24
2,3-butandiol	56,38 ± 1,94	129,04 ± 2,78
Kiseline (mg/L)		
Kaprinska kiselina	2,87 ± 0,10	3,28 ± 0,07
Kaprilna kiselina	3,15 ± 0,08	2,03 ± 2,34
Terpeni (µg/L)		
Linalol	91,69 ± 3,16	111,28 ± 2,39
α-terpineol	67,33 ± 2,32	119,66 ± 2,58
Citronelol	1,70 ± 0,06	1,64 ± 0,04
Nerol	2,81 ± 0,10	3,26 ± 0,07
Geraniol	8,58 ± 0,30	7,14 ± 0,15
Norizoprenoidi (ng/L)		
β- damaskenon	904,61 ± 31,20	1764,51 ± 38,00

5. RASPRAVA

5.1. ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Tijekom praćenja alkoholne fermentacije u tablicu 1 upisani su mjereni podaci od 1. do 6. dana (4. i 5. dana nije bilo mjerenja). Mjereni podaci su temperatura fermentacije te koncentracija šećera izmjerena moštomerom pri temperaturi fermentacije ($^{\circ}\text{Kl}$, T_{ferm}). Obzirom da je moštomer baždaren pri temperaturi od $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom svih određivanja nužno je bilo preračunati vrijednost koncentracije šećera pri određenoj temperaturi fermentacije. Također, koncentracija šećera pri temperaturi baždarenja mošta preračunata je u koncentraciju šećera po Brix-u.

Na slici 3 prikazana je dinamika alkoholne fermentacije, odnosno promjena koncentracije šećera (g/L), temperature mošta ($^{\circ}\text{C}$) te udjela alkohola (% vol) ovisno o trajanju (dani) alkoholne fermentacije. Tijekom prva dva dana fermentacije koncentracija šećera bila je jednaka ($232,3\text{ g/L}$) kao i udio alkohola ($0\text{ vol}\%$) što znači da su se kvasci za to vrijeme prilagođavali i razmnožavali i da nije došlo do pretvorbe šećera u alkohol. Tijekom faze prilagodbe kvasaca došlo je do blagog porasta temperature sa $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Od trećeg do šestog dana dolazi do burne alkoholne fermentacije što se očituje naglim padom koncentracije šećera te paralelno s time i naglim porastom teorijskog udjela alkohola. Također, kako je sam proces fermentacije egzoterman, zbog oslobođene energije dolazi do blagog porasta temperature. Šestog dana alkoholne fermentacije koncentracija šećera moštomerom se nije mogla odrediti (<4) što znači da su kvasci sav kisik iz šećera (glukoza i fruktoza) iskoristili za svoje metaboličke potrebe te ga transformirali u etanol i ugljikov dioksid. Po završetku alkoholne fermentacije teorijski udio alkohola (% vol) iznosio je 12, a temperatura 20°C .

5.2. JABUČNO-MLIJEČNA FERMENTACIJA

Slika 4 prikazuje praćenje tijekom jabučno-mliječne fermentacije tankoslojnom kromatografijom. S lijeva na desno nanešeni su standard jabučne kiseline, standard mliječne kiseline, uzorak vina bez provedene jabučno-mliječne fermentacije (Vino 1) te uzorak vina sa provedenom jabučno-mliječnom fermentacijom (Vino 2).

Kod uzorka Vino 1 vidljiva je jabučna kiselina, dok mliječna nije što je znak da se jabučno-mliječna fermentacija u Vinu 1 nije provela, a to je ujedno i bio cilj dodatka sumporovog dioksida. Kod uzorka Vino 2 vidljive su i jabučna i mliječna kiselina što je pokazatelj da je u Vinu 2 jabučno-mliječna fermentacija još u tijeku.

5.3. ANALIZA FIZIKALNO-KEMIJSKIH KARAKTERISTIKA VINA

Rezultate fizikalno-kemijske analize proizvedenih vina (Vino 1 i Vino 2) prikazuje tablica 2, a analizirani parametri su postotak alkohola, pH vrijednost, koncentracija reducirajućih šećera (g/L), ukupna kiselost vina (koncentracija vinske kiseline), hlapiva kiselost vina (koncentracija octene kiseline) te koncentracija jabučne i mliječne kiseline.

Fizikalno-kemijski parametri pokazali su da nema većih razlika između proizvedenih vina osim u koncentracijama jabučne i mliječne kiseline te u pH vrijednosti. Razlike u koncentracijama jabučne i mliječne kiseline između dvaju vina su očekivane obzirom da je u Vinu 2 provedena jabučno-mliječna fermentacija što rezultira smanjenjem koncentracije jabučne i povećanjem koncentracije mliječne kiseline, dok u Vinu 1 u kojem je provedena samo alkoholna fermentacija koncentracija jabučne kiseline znatno je veća od koncentracije mliječne kiseline.

Također, jabučno-mliječna fermentacija je poželjna u vinu zbog smanjenja kiselosti. Obzirom da tijekom jabučno-mliječne fermentacije jabučna kiselina prelazi u blagu mliječnu kiselinu (dikiselina prelazi u monokiselinu) dolazi do smanjenja kiselosti što se očituje i u rezultatima pH proizvedenih vina gdje je vrijednost pH Vina 1 veća (pH=3,35) od Vina 2 (pH=3,27).

5.4. ANALIZA AROMATSKIH SPOJEVA

U vinima Muškat žuti, koja su dobivena različitim tehnologijama proizvodnje (Vino 1 i Vino 2), GC/MS analizom identificiran je cijeli spektar različitih aromatskih spojeva koji su kemijski različiti i koji doprinose aromi te također sinergistički djeluju na cjelokupnu aromu samog vina.

Rezultati GC/MS analize prikazani su u tablici 3. Ukupno su identificirana i kvantificirana 22 različita aromatska spoja, a mogu se klasificirati u sljedeće kategorije: *terpeni* (linalol, α -terpineol, citronelol, nerol i geraniol) i *norizoprenoidi* (β -damaskenon) koji pripadaju skupini primarne arome, *viši alkoholi* (*i*-butanol, *i*-amil alkohol, 1-heksanol, *cis*-3-heksen-1-ol, feniletil alkohol i 2,3-butandiol), *etilni esteri* (etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanoat i dietil sukcinat), *acetatni esteri* (*i*-amil acetat, heksil acetat i 2-feniletil acetat) i *hlapive kiseline* (kapronska kiselina i kaprinska kiselina) koji pripadaju skupini fermentacijske arome, te *karbonilni spoj* (furfural) koji pripada aromi starenja.

Koncentracija terpena ovisi o sorti grožđa, ali i o tehnološkom postupku prerade i njege vina (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Provedba jabučno-mliječne fermentacije povećala je koncentraciju terpena u Vinu 2, posebice linalola, α -terpineola i nerola, obzirom da bakterije mliječne kiseline i njihovi enzimi utječu na hidrolizu glikozidnih prekursora ovih spojeva, dok je nešto veći udio geraniola utvrđen u Vinu 1. Za terpene je poznato da su nositelji sortne arome tako da će ovako visoka koncentracija upravo i utjecati na dominantnu aromu Muškata koja je izraženija u Vinu 2. Kod ostalih spojeva (citronelol i nerol) nije uočena velika razlika između dva vina.

Prema Ribéreau-Gayonu i sur. (1975) alkoholne forme monoterpena imaju sljedeće mirisne karakteristike: linalol, nerol i geraniol - miris ruže, α -terpineol - miris kamfora, a citronelol - miris citriona (zeleni limun).

Od monoterpenskih alkohola najviše su se istaknuli linalol i α -terpineol. Prema Ribéreau-Gayonu i sur. (2006) senzorski prag linalola u vinima je oko 25 $\mu\text{g/L}$, te možemo zaključiti da se linalool u analiziranim vinima nalazi iznad praga osjetljivosti te bitno utječe na aromu vina. α -terpineol ima senzorski prag osjetljivosti od 250 $\mu\text{g/L}$ (Gómez-Miguez i sur., 2007) te možemo zaključiti da se u Vinu 1 nalazi ispod praga osjetljivosti, a u Vinu 2 iznad što znači da također bitno utječe na aromu Vina 2. Ostali terpenški spojevi, iako su prisutni u nižim koncentracijama, imaju neizravnu ulogu u formiranju arome jer u sinergističkim vezama djeluju kao pojačivači arome te pridonose ukupnoj kompleksnosti arome vina (Ferreira, 2010).

Jedini predstavnik norizoprenoida određen u analiziranim vinima je β -damaskenon, pri čemu je njegova koncentracija u Vinu 2 dvostruko veća u usporedbi s Vinom 1. Iako nema konkretnog dokaza, uloga kvasaca i bakterija u otpuštanju C_{13} -norizoprenoida je vrlo vjerojatna (Winterhalter i Schreier, 1994). Prema Radeka i sur. (2012) β -damaskenon je nositelj arome po jabuci, ruži i medu, te mu je senzorski prag osjetljivosti 0,05 $\mu\text{g/L}$. Obzirom da se u Vinu 1 i Vinu 2 nalazi iznad senzorskog praga osjetljivosti (0,905 $\mu\text{g/L}$; 1,765 $\mu\text{g/L}$) možemo zaključiti da pridonosi aromi oba proizvedena vina, posebice aromi Vina 2.

Obzirom na više alkohole, rezultati su pokazali da je od svih navedenih najzastupljeniji *i*-amilni alkohol u oba analizirana vina (u Vinu 1 blago veća koncentracija nego u Vinu 2). Iako literaturni podaci govore da je prag osjetljivost *i*-amilnog alkohola 300 mg/L, novija istraživanja pokazuju da je njegov doprinos aromi značajan već pri

koncentraciji 170 mg/L (Lambrechts i Pretorius, 2000), pa prema tome možemo zaključiti da bi ovaj spoj mogao imati utjecaj na aromu analiziranih vina Muškat žuti.

Koncentracija ostalih viših alkohola (*i*-butanol, *i*-heksanol, *cis*-3-heksen-1-ol, feniletil alkohol) se nakon jabučno-mliječne fermentacije te dodatka „čipsa“ u Vinu 2 nije bitno promijenila. *Cis*-3-heksen-1-ol određen je u oba vina u koncentracijama iznad praga osjetljivosti, koji iznosi 400 µg/L (Gómez-Miguez i sur., 2007), te pridonosi aromi analiziranih vina, dok su ostali spojevi određeni u koncentracijama ispod senzorskih pragova osjetljivosti te prema tome ne pridonose aromi analiziranih vina.

Koncentracija nekih etilnih estera povećava se, a drugih smanjuje nakon jabučno-mliječne fermentacije (Gambaro i sur., 2001), što se vidi iz rezultata GC/MS analize (tablica 3). U Vinu 2 određene su nešto veće koncentracije *i*-amil acetata (2,45 mg/L) kojem je senzorski prag osjetljivosti 0,26 mg/L (Lambrechts i Pretorius, 2000). Pri višim koncentracijama daje izraziti miris po banani i kruški (Ferreira i sur., 2000). Obzirom na dobivene rezultate možemo zaključiti da *i*-amil acetat pridonosi aromi proizvedenih vina Muškat. Također, u Vinu 2 određene su veće koncentracije dietil sukcinata (2,08 mg/L) koji je nositelj arome po dinji sa senzorskim pragom osjetljivosti od 1,2 mg/L (Lambrechts i Pretorius, 2000) te iz priloženih rezultata zaključujemo da pridonosi aromi Vina 2 dok ne utječe na aromu Vina 1 u kojem je određen u koncentracijama ispod praga osjetljivosti (0,07 mg/L). U sastavu ostalih estera (etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat, heksil acetat i 2-feniletil acetat) nije bilo značajnijih razlika između analiziranih vina. Etil heksanoat nositelj je karakterističnog mirisa po ljubici, jabuci i banani; etil oktanoat po ananasu i kruški, dok je etil dekanat odgovoran za cvjetne arome (Lambrechts i Pretorius, 2000). Heksil acetat prema Campu i sur. (2005) karakterizira miris po banani, dok je 2-feniletil acetat karakteriziran cvijetnim mirisima, mirisom meda i voća (Thurstonu i sur., 1981). Jedino etil heksanoat utječe na aromu proizvedenih vina obzirom da se nalazi iznad senzorskog praga osjetljivosti koji iznosi 0,014 mg/L (Lambrechts i Pretorius, 2000).

Od hlapivih kiselina u analiziranim vinima identificirane i kvantificirane su kapronska i kaprilna kiselina. To su srednjelančane masne kiseline te čine bitnu komponentu arome vina. Njih sintetiziraju kvasci kao međuprodukte pri biosintezi masnih kiselina dugog lanca. Pojedinačne koncentracije ovih kiselina u vinu uglavnom ne prelaze senzorske pragove, ali u interakciji s drugim hlapivim komponentama pozitivno utječu na njegove aromatske karakteristike (Rankie i sur., 1969). Blago veća koncentracija kaprilne kiseline određena je u

Vinu 1, dok je s druge strane blago veća koncentracija kapronske kiseline određena u Vinu 2.

Temeljna razlika između analizirana dva vina je u sastavu furfurala i 2,3-butandiola. U Vinu 2 je detektiran furfural koji se ekstrahirao iz hrastovog „čipsa“ tijekom odležavanja vina dok u Vinu 1 nije detektiran jer tehnološki proces proizvodnje toga vina nije sadržavao dodatak hrastovog „čipsa“. Prema Chatonnetu i sur. (1999) furfural nastaje razgradnjom monosaharida koji su dobiveni djelomičnom hidrolizom celuloze iz drveta, te doprinosi aromi sušenog voća, a posebno prženih badema.

Nadalje, prema Bartowsky i Henschkeu (2004), najveća koncentracija 2,3-butandiola određena je pri niskim koncentracijama jabučne kiseline, odnosno na kraju jabučno-mliječne fermentacije, što možemo usporediti sa rezultatima analize koji pokazuju da je koncentracija 2,3-butandiola u Vinu 2 dvostruko veća nego u Vinu 1. Obzirom da 2,3-butandiol nastaje redukcijom diacetila koji je produkt jabučno-mliječne fermentacije (Rankie i sur., 1969), vrlo je vjerojatno da je većina diacetila, koji je nestabilan, prevedena u 2,3-butandiol.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati fizikalno-kemijske analize proizvedenih vina pokazali su da provedbom jabučno-mliječne fermentacije dolazi do povećanja pH vrijednosti, a što je posljedica smanjenja koncentracije jabučne kiseline.

SPME-GC/MS analizom vina Muškat identificirano je 22 spoja arome koji se u vinima nalaze u različitim koncentracijama te pripadaju skupinama primarne arome (terpeni, norizoprenoidi), fermentacijske arome (viši alkoholi, esteri, hlapive kiseline) te arome starenja (karbonilni spojevi).

Jabučno-mliječna fermentacija rezultirala je višim koncentracijama linalola i α -terpineola te β -damaskenona (primarna aroma), a od predstavnika fermentacijske arome *i*-butanola, 2,3-butandiola, dietil sukcinata te *i*-amil acetata.

Glavna razlika između proizvedenih vina je u sastavu karbonilnih spojeva- furfural je jedino određen u vinu u kojemu je provedena jabučno-mliječna fermentacija te dodan hrastov „čips“ što je i očekivano obzirom da se tijekom odležavanja ovaj spoj ekstrahirao iz hrastovog drveta.

7. LITERATURA

- Bratowsky, E. J., Henschke, P. A. (2004) The "buttery" attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 23-252.
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Cacho, J. (2005) Prediction of the Wine sensory Properties Related to Grape Variety from Dynamic-Headspace Gas Chromatography-Olfactometry Data. *Food Chem.* **53**, 5682-5690.
- Chatonnet, P., Cutzach, I., Pons, M., Dubourdieu, D. (1999) Monitoring Toasting Intensity of Barrels by Chromatographic Analysis of Volatile Compounds from Toasted Oak Wood. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4310-4318.
- Delfini, C., Costa, A. (1993) Effects of the Grape Must Lees and Insoluble Materials on the Alcoholic Fermentation Rate and Production of Acetic Acid, Pyruvic Acid, and Acetaldehyde. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**, 102-107.
- Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., des Gachons., C. P., Murat, M. L. (2006) The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation: The Example of Sauvignon blanc. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 81-88.
- Esti, M., Tamborra, P. (2006) Influence of winemaking techniques on aroma precursors. *Anal. Chim. Acta.* **563**, 173-179.
- Ferreira, V. (2010) Volatile aroma compounds and wine sensory attributes. U: Managing wine quality: Viticulture and wine quality, 1.izd. (Reynolds, G. A., ured.), Woodhead Publishing Limited, Boston/New York, str. 3-23.
- Ferreira, V., Lopez, R., Cacho, J. F. (2000) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agr.* **80**, 1659–1667.
- Fleet, G. H. (1993) Malolactic fermentation. U: Wine microbiology and biotechnology, (Fleet, G. H., ured.), Harwood Academic Publishers, Sidney, str. 314-317.
- Francis, I. L., Sefton, M. A., Williams, P. J. (1992) A Study by Sensory Descriptive Analysis of the Effects of Oak Origin, Seasoning, and Heating on the Aromas of Oak Model Wine extrats. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 23-30.
- Fugelsang, K. C., Edwards, C. G. (2004) Wine Microbiology, 2. izd., Springer Science, New York.

- Gambaro, A., Boido, E., Zlotejablko, A., Medina, K., Lloret, A., Dellacassa, E., Carrau, F. (2001) Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **7**, 27-32.
- Gómez-Miguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., Heredia, F. J. (2007) Volatile components of Zalema white wines. *Food Chem.* **100**, 1464-1473.
- Grba, S. (2010) *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Plejada, Zagreb.*
- Gunata, Z., Dugellay, L., Sapis, J.C., Baumes, R., Bayonove. C. (1993) Role of enzymes in the use of the flavor from grape glycosides in winemaking. U: *Progress in Flavour precursors studies*, (Schreier, P., Winterhalter. P., ured.), Allured Publishing corporation, Illinois, USA, str. 219-234.
- Guth, H., Sies, A. (2002) Flavour of wines: Towards an understanding by reconstitution experiments and an analysis of ethanol's effect on odour activity of key compounds. *Proceedings of the Eleventh Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, Australia*, str. 128-139.
- Hart, A. (1997) The influence of malolactic fermentation on the concentration of diacetyl by individual strains of *Oenococcus oeni*. Honours thesis (The University of Adelaide, Adelaide, Australia).
- HCPHS (2008) *Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, evidencija Hrvatskog zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo, Zagreb.*
- Henschke, P.A. (1993) An overview of malolactic fermentation research. *Austral. New Zealand Wine Industr. J.* **8**, 69-79.
- Hornsey, I. (2007) *The chemistry and biology of winemaking, The royal society of chemistry, Cambrige.*
- Jackson, R.S. (1994) *Wine Science, Academic Press, California*, str. 178-212.
- Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97-129.

Liu, S. Q., Pilone, G. J. (2000) An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implication. *Int. J. Food Sci. Tech.* **35**, 49-61.

Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I. (2008) *Vinova loza*, Školska knjiga, Zagreb.

Mauricio, J. C., Moreno, J., Zea, L., Ortega, J. M., Medina, M. (1997) The Effects of Grape Must Fermentation Conditions on Volatile Alcohols and Esters Formed by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Sci. Food Agric.* **75**, 155-160.

Mirošević, N., Turković, Z. (2003) *Ampelografski atlas*, Golden marketing Tehnička knjiga, Zagreb.

Moreira, N., Mendes, F., Pereira, O., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, L. (2001) Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Anal. Chim. Acta.* **458**, 157-167.

Moreno-Arribas, M. V., Polo, C. (2009) *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer Science and Business Media, LLC

Nykänen, L. (1986) Formation and Occurrence of Flavour Compounds in Wine and Distilled Alcoholic Beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**, 84-96.

OIV (2003) Organisation internationale list of vine varieties and their synonyms, str.115.

Olmo, P.H. (2000) *The origin and Domestication of the Vinifera Grape*. U: *The Orgins and Ancient History of Wine*, (McGovern, E. P., Fleming, J. S., ured.), Gordon and Breach Publishers. University of Pennsylvania, USA.

Pine, S. H. (1994) *Organska kemija* (preveli Bregovec, I., Rapić V.) Školska knjiga, Zagreb

Piñeiro, Z., Natera, R., Castro, R., Palma, M., Puertas, B., Barroso, C. G. (2006) Characterisation of volatile fraction of monovarietal wines: Influence of winemaking practices. *Anal. Chim. Acta.* **563**, 165-172.

Pretorius, I. S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* **16**, 675-729.

- Radeka, S., Lukić, I., Peršurić, Đ. (2012) Influence of Different Maceration Treatments on the Aroma Profile of Rosé and Red Wines from Croatian Aromatic cv. Muškat ruža porečki (*Vitis vinifera* L.). *Food Technol. Biotech.* **50**, 442-453.
- Rankie, B. C., Fornachon, J. C. M., Bridson, D. A. (1969) Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis* **8**, 129-134.
- Rapp, A. (1990) Natural flavours of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Fresenius J. Anal. Chem.* **43**, 777-785.
- Rapp, A., Versini, G. (1991) Influence on nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. U: Proceedings of International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. *Am. Soc. Enol Vitic.* 156-164.
- Ribéreau-Gayon, P., Boidron, J. N., Terrier, A. (1975) Aroma of Muscat grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* **23(6)**, 1042-1047.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006) Handbook of Enology Vol 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatment of Wine, 2. izd., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Ortega-Heras, M., Perez-Magarino, S., Gonzales-Huerta, C., Gonzales-San Jose, M. (2008) Importance of Chip Selection and Elaboration Process on the Aromatic Composition of Finished Wines. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5102-5111.
- Sánchez-Palomo, E., Diaz-Maroto, M.C., Gonzalez-Vinas, M.A., Soriano-Perez A., Perez-Coello, M.S. (2007) Aroma profile of wine from Albillo and Muscat grape varieties at different stages of ripening. *Food Control* **18**, 398-403.
- Schahinger, G., Rankie, B. C. (1995) Cooperage for Winemakers, 2. izd., Ryan Publications, Adelaide, Australia, str. 112
- Stutz, T., Lin, S., Herdman, I. (1999) Barrel Renewal Systems-A User's Perspective. Presented at International Symposium on Oak in Winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**, 541-543.
- Sweigers, J. H., Bratowsky, E. J., Henschke, P. A., Pretorius, I. S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **11**, 139-173.

Sweigers, J. H., Pretorius, I. S. (2005) Yeast Modulation of Wine Flavour. *Adv. Appl. Microbol.* **57**, 131-175.

Thurston, P.A., Taylor, R. and Ahvenainen, J. (1981) Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters. *J. I. Brewing.* **87**, 92-95.

Wang, X. D., Bohlscheid, J. C., Edwards, C. G. (2002) Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 349-359.

Webster, D. R., Edwards, C. G., Spayd, S. E., Peterson, J. C., Seymour, B. J. (1993) Influence of Vineyard Nitrogen Fertilization on Concentration of Monoterpenes, Higher Alcohols and Esters in Aged Riesling Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**, 275-284.

Wilson, J.E. (1998) *Terroir: The Role of Geology, Climate, and Culture in the Making of French Wines.* University of California Press, Berkeley

Winterhalter, P. and Schreier, P. (1994) C₁₃-Norisoprenoid glycosides in plant tissues: An overview on their occurrence, composition and role as flavour precursors. *Flavour Fragr. J.* **9**, 281-287.