

Sumporni spojevi pozitivan i negativan utjecaj na aromu vina

Šenjug, Dora

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:159:646196>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

DORA ŠENJUG

7444/PT

**SUMPORNI SPOJEVI – POZITIVAN I NEGATIVAN UTJECAJ
NA AROMU VINA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija vina

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

Sumporni spojevi – pozitivan i negativan utjecaj na aromu vina
Dora Šenjug, 0058211020

Sažetak: Cilj ovog rada bio je literaturni pregled sumpornih spojeva u vinu, njihov utjecaj na senzorska svojstva vina te metode određivanja. Predstavnicima hlapivih sumpornih spojeva odgovornih za negativnu aromu su sumporovodik, merkaptani i dimetil sulfid, dok su nositelji pozitivnih aroma sortni tioli 3SH, 3SHA te 4MSP. Na njihovu koncentraciju u vinu utječu brojni čimbenici kao što su fizikalno-kemijski sastav mošta, uvjeti alkoholne fermentacije, soj kvasca koji se koristi za fermentaciju, uvjeti i temperatura maceracije, prisutnost kisika, dodatak bakra te starenje vina u bačvama. U vinu se nalaze u niskim koncentracijama i imaju niske senzorske pragove osjetljivosti, stoga se za analizu hlapivih sumpornih spojeva najčešće koristi plinska kromatografija s masenim spektrometrom kao detektorom (GC/MS) radi svoje osjetljivosti, specifičnosti i pouzdanosti.

Ključne riječi: aroma, hlapivi sumporni spojevi, sortni tioli, vino

Rad sadrži: 30 stranica, 2 slike, 2 tablice, 66 literaturnih 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

Mentorica: Doc. dr. sc. Marina Tomašević

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**

Sulfur compounds-positive and negative influence on wine flavor

Dora Šenjug, 0058211020

Abstract: The aim of this paper, based on scientific literature, was to present an overview of most important sulfur compounds in wine, their impact on sensory characteristics as well as methods for their detection. Representatives of negative volatile sulfur compounds are hydrogen sulfide, mercaptans and dimethyl sulfide, while positive ones are varietal thiols 3SH, 3SHA and 4MSP. Their concentration in wine is influenced by numerous factors such as the composition of the must, the conditions during alcoholic fermentation, the yeast strain used for fermentation, the conditions and temperature of maceration, the presence of oxygen, addition of copper and aging of the wine in barrels. They are present in low concentration in wine and have low sensitivity thresholds and therefore the gas chromatography with a mass spectrometry (GC/MS) is the method most often used for the analysis of these compounds due to its sensibility, specificity and reliability.

Keywords: aroma, varietal thiols, volatile sulfur compounds, wine

Thesis contains: 30 pages, 2 figures, 2 tables, 66 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

Defense date: June 15th 2020

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. POZITIVNI SUMPORNI SPOJEVI	1
2.1. BIOTRANSFORMACIJA PREKURSORA AROME	3
3. NEGATIVNI SUMPORNI SPOJEVI	6
4. UTJECAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA NA KONCENTRACIJU SUMPORNIH SPOJEVA U VINU ..	9
4.1. UTJECAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA NA KONCENTRACIJU POZITIVNIH SUMPORNIH SPOJEVA.....	9
4.1.1. Utjecaj zrelosti grožđa na koncentraciju pozitivnih sumpornih spojeva	9
4.1.2. Utjecaj temperature fermentacije koncentraciju pozitivnih sumpornih spojeva	9
4.1.3. Utjecaj maceracije na koncentraciju pozitivnih sumpornih spojeva.....	10
4.1.4. Utjecaj kvasca na razvoj pozitivnih sumpornih spojeva tijekom alkoholne fermentacije.....	11
4.1.5. Utjecaj starenja vina na koncentraciju pozitivnih sumpornih spojeva.....	12
4.2. UTJECAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA NA KONCENTRACIJU NEGATIVNIH SUMPORNIH SPOJEVA.....	13
4.2.1. Utjecaj kvasca na razvoj negativnih sumpornih spojeva tijekom alkoholne fermentacije.....	13
4.2.2. Utjecaj starenja i kisika na koncentraciju negativnih sumpornih spojeva.....	15
4.2.3. Utjecaj dodatka bakra i drugih metala na koncentraciju negativnih sumpornih spojeva.....	16
4.2.4. Utjecaj svjetla tijekom skladištenja na koncentraciju negativnih sumpornih spojeva	17
5. METODE ZA ANALIZU SUMPORNIH SPOJEVA	18
5.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA (GC).....	18
5.2. MASENI DETEKTOR (MSD).....	18
5.3. PRIPREMA UZORKA.....	19
5.3.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	19
5.3.2. <i>Headspace</i> metoda.....	20
5.3.3. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)	21
6. ZAKLJUČAK.....	22
7. LITERATURA.....	23

1. UVOD

Spojevi sa sumporom imaju velik utjecaj na senzorska svojstva vina. U vino dospijevaju transformacijom iz prekursora koji se nalaze u bobici, tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem metabolizma kvasaca ili kemijskim reakcijama koje se odvijaju tijekom skladištenja i starenja vina pod utjecajem brojnih čimbenika. S obzirom na hlapivost, ovi spojevi se dijele u dvije skupine: (i) visoko hlapive spojeve sa vrelištem ispod 90 °C, te (ii) nisko hlapive spojeve sa vrelištem iznad 90 °C. Prva skupina obuhvaća sve one spojeve koji negativno doprinose aromi vina, dok su predstavnici druge skupine izrazito poželjni za aromu vina jer su nositelji pozitivnih senzorskih nota.

Sumporni spojevi u vinu mogu nastati enzimskim ili neenzimskim reakcijama. U enzimskim reakcijama kao produkti metaboličkih i fermentativnih puteva nastaju spojevi sa sumporom koji vinu daju negativnu aromu, a kao supstrati u takvim reakcijama koriste se aminokiseline i pesticidi koji sadrže sumpor. Neenzimske reakcije podrazumijevaju fotokemijske, termalne i druge kemijske reakcije koje se odvijaju tijekom proizvodnje i skladištenja vina (Fracassetti i sur., 2018).

Spojevi sa sumporom koji vinu daju negativnu aromu su sumporovodik, merkaptani i dimetilsulfid te ih najčešće povezujemo uz reduktivne arome poput luka, pokvarenih jaja, pokvarenog kupusa, kanalizacije i brojnih drugih. Spojevi sa sumporom koji vinu daju pozitivnu aromu su sortni tioli, a nositelji su poželjne tropske voćne arome poput marakuje i grejpa.

Cilj ovog rada bio je, kroz pregled dostupne literature, objasniti porijeklo pozitivnih i negativnih sumpornih spojeva u vinu, utjecaj pojedinih tehnoloških postupaka na njihovu koncentraciju te metode određivanja njihove koncentracije u vinu.

2. POZITIVNI SUMPORNI SPOJEVI

Sortni tioli su nositelji pozitivnih aromatskih karakteristika vina, a glavni predstavnici ove skupine spojeva su: 4-sulfanil-4-metilpentanon (4MSP), 3-sulfanilheksanol (3SH), 3-sulfanilheksil acetat (3SHA) i 4-sulfanil-4-metilpentan-2-ol (4MSPOH). Ove spojeve karakteriziraju iznimno niske koncentracije, kao i niski senzorski pragovi osjetljivosti, koji iznose 0,8 ng/L (4MSP), 60 ng/L (3SH), 4,2 ng/L (3SHA) i 55 ng/L (4MSPOH) (Tablica 1). 3SH je od ovih spojeva najzastupljeniji i uvijek je prisutan u vinu, bez obzira na sortu grožđa, u koncentracijama većim od svog senzorskog praga osjetljivosti. Za razliku od 3SH, koncentracija 4MSPOH u vinu je uvijek niža od njegovog senzorskog praga osjetljivosti i smatra se najmanje bitnim sortnim tiolom za aromu vina. S druge strane, koncentracije 3SHA i 4MSP znatno ovise o samoj sorti grožđa, a prilično variraju u različitim uzorcima istih sorti, ovisno o primijenjenim tehnološkim postupcima (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Općenito, 4MSP je sortni tiol odgovoran za aromu vina na šimšir te drvenaste note (Darriet i sur., 1995). Prvobitno je otkriven u vinu Sauvignon Blanc, a kasnije i u drugim vinima poput Scheurebe, Maccabeo, Gewürztraminer, Riesling, Muscat, Colombard, Petit Manseng i Tokajskim vinima (Roland i sur., 2011).

3SH je nositelj arome na grejp i marakuju, dok se aroma 3SHA može opisati kao šimšir i marakuja (Tominaga i sur., 1998). Identificirani su u velikom rasponu različitih sorta, među kojima su vina bijelih sorte: Sauvignon Blanc, Petite Arvine, Petit i Gros Manseng, Melon B. i Bacchus, Semillon, Verdejo, i Koshu; te vina crnih sorti: Grenache, Merlot i Cabernet Sauvignon; kao i Rosé vina iz Provanse (Roland i sur., 2011).

U istraživanju koje su proveli Rigou i sur. (2014) o utjecaju sortnih tiola (4MSP, 3SH i 3SHA) na razvoj arome crnog ribizla u crnim vinima utvrđeno je kako su upravo ovi spojevi zaslužni za aromu na crni ribizl u vinu. Koncentracija 4MSP veća od 16 ng/L, predstavlja glavnu ulogu u razvoju arome na crni ribizl u crnom vinu, dok 3SH i 3SHA u visokim koncentracijama djeluju kao pojačivači percepcije ove arome.

Tablica 1. Opis arome, prag osjetljivosti i koncentracija sortnih tiola u vinu (Roland i sur., 2011).

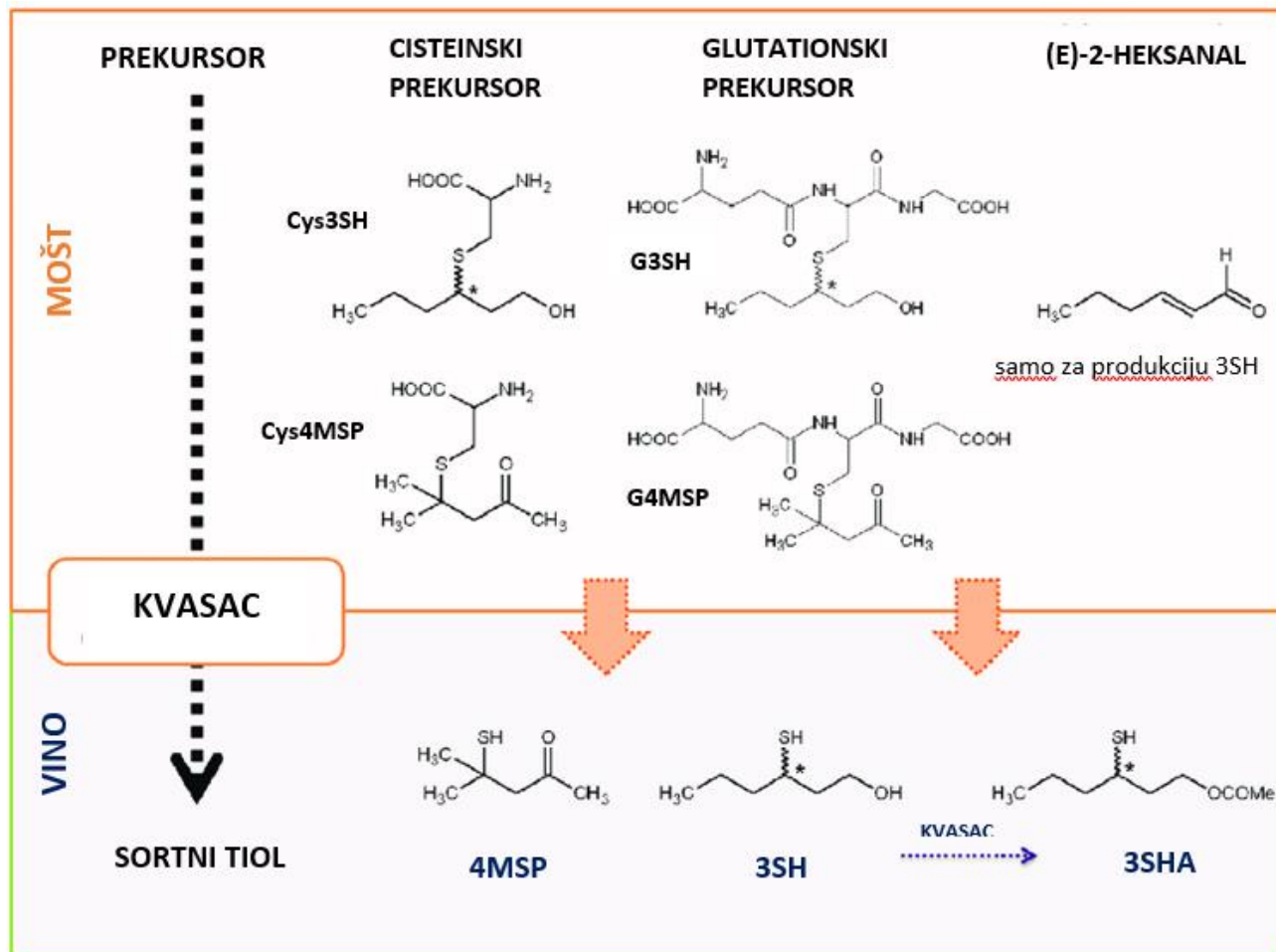
Sortni tiol	Opis arome	Prag osjetljivosti (ng/L)	Koncentracija u vinu (ng/L)
4MSP	šimšir, crni ribzl, mačji urin	0,8	0-400
4MSPOH	citrusne note	-	-
3SH	grejp, marakuja	60	0-19000
3SHA	šimšir, marakuja	4,2	0-2500

2.1. BIOTRANSFORMACIJA PREKURSORA AROME

Sortni tioli nisu prisutni u grožđu, već nastaju tijekom alkoholne fermentacije iz brojnih cisteinskih i glutationskih prekursora djelovanjem kvasca (Moreno-Arribas i Polo, 2009). *S*-cisteinski konjugati su značajni bezmirisni, nehlapivi prekursori sortnih tiola, koji su otkriveni u grožđu mnogo kasnije od drugih prekursora aroma. Oni su *S*-supstituirani derivati L-cisteina, a razlikuju se po prirodi strukture na cisteinskom atomu sumpora (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Prekursori iz kojih nastaje 4MSP se razvijaju u grožđu u ranijoj fazi od prekursora 3SH (Darriet i sur., 1995).

Najjednostavniji opis nastajanja sortnih tiola vezan je uz enzimsku aktivnost kvasaca. Tijekom alkoholne fermentacije dolazi do cijepanja veze ugljik-sumpor (C-S) pomoću enzima β -liaza te se hlapivi i mirisni tiolni spojevi otpuštaju iz *S*-cistein konjugata. Takva enzimska aktivnost potrebna je za cijepanje *S*-cistein konjugata, a pokazalo se da tijekom fermentacije s različitim sojevima kvasca *S. cerevisiae* nastaju različite koncentracije aromatičnih tiolskih spojeva (Moreno-Arribas i Polo, 2009), što implicira iznimnu važnost odabira kvasaca za konačnu aromu vina.

Osim prethodno opisanog metaboličkog puta, u literaturi se često spominju 3 biogenetska puta koja su prihvaćena kako bi se objasnilo oslobađanje 4MSP i 3SH iz prekursora u vinu. Iako nije pronađeno postojanje prekursora za 3SHA, utvrđeno je kako on nastaje esterifikacijom iz 3SH pomoću enzima alkohol aciltransferaze, tijekom alkoholne fermentacije (Slika 1) (Roland i sur., 2011).



Slika 1. Putevi transformacije prekursora u sorte toile (Roland i sur., 2011).

Prvi biogenetski put objašnjava oslobađanje tiola iz cisteinskih prekursora. *S*-3-(heksan-1-ol)-cistein (Cys3SH) se nalazi u većim koncentracijama u grožđu nego *S*-3-(4-sulfanil-4-metilpentan-2-on)-cistein (Cys4MSP) (Roland i sur., 2011). Unatoč činjenici da raspodjela Cys3SH dijastereoizomera varira među različitim sortama grožđa, on je uvijek prisutan u najvišim koncentracijama. Enantiomerska raspodjela je vrlo bitna, poglavito za 3SHA. Enantiomerske forme 3SH i 3SHA prisutne su u različitim omjerima, s različitim senzorskim pragovima osjetljivosti te su nositelji različite arome vina. (*R*-) i (*S*-)3SH forme su odgovorne za aromu na grejpu i marakuju s vrlo malim razlikama u senzorskim pragovima osjetljivosti, dok se (*R*-) i (*S*-)3SHA forme dosta razlikuju u aromi. Pritom je (*R*-)3SHA nositelj arome na marakuju, dok je (*S*-)3SHA vegetativne arome s karakterističnim mirisom na šimšir (Roland i sur., 2011). U kojim omjerima će se ove forme nalaziti u vinu značajno ovisi o zdravstvenom stanju grožđa, odnosno zaraženosti

plijesni *Botrytis cinerea*. Cys3SH je određen u znatno većoj koncentraciji u vinu koje je proizvedeno od grožđa zaraženog plijesni *Botrytis cinerea* nego u vinu proizvedenom od zdravog grožđa (Thibon i sur.,2009).

Drugi biogenetski put odnosi se na oslobađanje tiola iz glutationskih prekursora: *S*-3-(heksan-1-ol)-glutation (G3SH) i *S*-3-(4-sulfanil-4-metilpentan-2-on)-glutation (G4MSP). Jedino je put izdvajanja tiola iz G3SH razjašnjen, pri čemu je utvrđeno i kako je u grožđu prisutna veća koncentracija G3SH u usporedbi sa G4MSP (Roland i sur., 2011).

Treći biogenetski put uključuje *E*-(2)-heksanal, za koji se smatra da je još jedan prekursor 3SH. Dolazi do transformacije ovog nezasićenog karbonilnog spoja u odgovarajući tiol, pri čemu dolazi do adicije sumpora na dvostruku vezu i redukcije karbonilne grupe (Schneider i sur., 2006). Pritom je važno istaknuti kako donor sumpora još uvijek nije identificiran (Roland i sur., 2011).

3. NEGATIVNI SUMPORNI SPOJEVI

Sumporni spojevi nalaze se u brojnim svježim proizvodima (voću i povrću) kao i u brojnim fermentiranim proizvodima (sir, pivo, vino) (Laudaud i sur., 2008), a njihov senzorski utjecaj ovisi o njihovom pragu osjetljivosti i koncentraciji u kojoj se nalaze u hrani (McGorin, 2011). Općenito su prisutni u vrlo niskim koncentracijama pri kojima imaju pozitivan utjecaj na aromu hrane, međutim, pri višim koncentracijama doprinose reduktivnim aromama (McGorin, 2011). Sumporni spojevi u vinu povezani s negativnim aromama su sumporovodik, metantio, etantio, dimetilmerkaptani (dimetil sulfid, dimetil disulfid, dimetil trisulfid), metil tioesteri (S-etil tioacetat i S-metiltioacetat) (Robinson i sur., 2014) te karbonil sulfid (Franco-Luesma i Ferreira, 2014). Ovi spojevi povezani su s reducirajućim aromama kao što su kuhani kupus, luk, pokvarena jaja, karfiol, sir, vlasac, češnjak, trulež, šparoge (Swiegers i Pretorius, 2007) i imaju vrlo štetan utjecaj na kvalitetu vina (Laudaud i sur., 2008). Međutim, u malim koncentracijama oni su prisutni kao normalni spojevi i imaju ulogu u formiranju određenih senzorskih karakteristika (Franco-Luesma i Ferreira, 2014).

Prethodno nabrojane reducirajuće arome smatraju se manama vina, a najčešće nastaju tijekom starenja vina u bocama (Franco-Luesma i Ferreira, 2014), odnosno zbog kemijskih reakcija koje se odvijaju prije i nakon punjenja u boce (Kinzurik i sur., 2016). Također, utvrđeno je nastajanje sumporovodika i drugih reduktivnih sumpornih spojeva tijekom alkoholne fermentacije iz prekursora prisutnih u moštu i tijekom asimilacijske redukcije sulfata (Swiegers i sur., 2007), ali neki reduktivni sumporni spojevi mogu nastati i tijekom autolize kvasca (Jackson, 2008). U putu asimilacijske redukcije sulfata, anorganski sulfat se koristi za biosintezu organskih komponenti kao što su cistein i glutation te se ovim putem može sintetizirati sumporovodik (Swiegers i sur., 2007). Anorganski sulfat prirodno se nalazi u samoj bobici i predstavlja glavni izvor sumpora u grožđu, a koncentracija mu ovisi o vanjskim parametrima kao što su mineralni sastav tla na kojem se uzgaja vinova loza te kvaliteta vode koja se koristi za navodnjavanje vinograda. Osim u obliku anorganskog sulfata, sumpor može biti prisutan i u obliku vitamina biotina i tiamina, kao i aminokiselina sa sumporom, peptida i glutationa (Smith i sur., 2015). Sulfiti koji se koriste kao antioksidacijsko i antimikrobno sredstvo u putu asimilacijske redukcije sulfata isto tako mogu biti izvor nastanka sumporovodika (Muller i Rauhut, 2018). Također, otkriveno je kako su ostaci elementarnog sumpora u moštu povezani s formiranjem sumporovodika i drugih negativnih sumpornih spojeva tijekom fermentacije (Kwasniewski i sur., 2014).

Sumporovodik predstavlja jedan od najvećih problema tijekom proizvodnje vina. Vrlo je reaktivan i može pokrenuti reakcije u kojima nastaju merkaptani i dimetil sulfid, koji također daju vinu negativnu aromu (Swiegers i sur., 2005). Nastaje kao nepoželjan produkt tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, tokom asimilacijske redukcije sulfata (Muller i Rauhut, 2018). Njegova koncentracija varira ovisno o dostupnosti spojeva sa sumporom, soju kvasca koji se koristi za fermentaciju i dostupnosti nutrijenata potrebnih za rast kvasca (Swiegers i sur., 2005). Sumporovodik se u vinima nalazi u vrlo malim koncentracijama (0–370 µg/L), a njegov senzorski prag osjetljivosti je također vrlo nizak (0,001–150 µg/L) (Fracassetti i Vigentini, 2018). Nositelj je mirisa vina na pokvarena jaja (Tablica 2).

Dimetil sulfid u vinu nastaje tijekom alkoholne fermentacije iz metionina i cisteina, ili iz prekursora SMM (S-metil metionin) i DMSO (dimetil sulfoksid) (Smith i sur., 2015). Pozitivan utjecaj dimetil sulfida otkriven je u Syrah vinima, tako što je utvrđeno da pojačava njegova senzorska svojstva. Utvrđeno je i kako povećava voćnu aromu crnih vina, kao rezultat interakcije s esterima i norizoprenoidima prisutnim u vinu (Robinson i sur., 2014). Međutim, u bijelim vinima, dimetil sulfid nije povezan s pozitivnim aromama (Robinson i sur., 2014). Vrlo je hlapiv spoj koji se gubi tijekom alkoholne fermentacije, ali njegova koncentracija se povećava tijekom starenja vina u boci zbog hidrolize SMM (Franco-Luesma i sur., 2016). U vinima je određen u koncentracijama do 910 µg/L, a senzorski prag osjetljivosti ovog spoja iznosi 10–160 µg/L (Fracassetti i Vigentini, 2018). Nositelj je arome na karfiol, šparoge, tartufe (Tablica 2).

Merkaptani nastaju djelovanjem kvasca iz metionina i cisteina, a njihovo nastajanje može biti povezano i sa sintezom aminokiselina (Franco-Luesma i sur., 2016). Pri niskom pH mogu biti hidrolizirani u tiole, stvarajući tako nove hlapive sumporne spojeve (Smith i sur., 2015). Najpoznatiji merkaptani u vinu su: metantioi, koji je prisutan u vinu u vrlo niskim koncentracijama (0-16 µg/L), a karakterizira ga i niski senzorski prag osjetljivosti (0,3 µg/L); te etantioi koji je utvrđen u koncentracijama između 0-50 µg/L, sa senzorskim pragom osjetljivosti od 1,1 µg/L (Fracassetti i Vigentini, 2018). Navedeni merkaptani su nositelji nepoželjne arome vina na bijeli luk i pokvareni kupus (Tablica 2).

Tablica 2. Opis arome, prag osjetljivosti i koncentracija negativnih sumpornih spojeva u vinu (Fracassetti i Vigentini, 2018).

Spoj	Opis arome	Prag osjetljivosti (µg/L)	Koncentracija u vinu (µg/L)
sumporovodik	pokvarena jaja, reducirana aroma	0,001-150	0-370
metantioi	pokvareni kupus, reducirana aroma	0,3	0-16
etantioi	bijeli luk,	1,1	0-50
dimetil sulfid	karfiol, šparoge, tartufi	10-160	0-910

Sumporovodik i drugi reduktivni sumporni spojevi nastaju u različitim fazama proizvodnje i dozrijevanja vina. Na njihovu koncentraciju utječu brojni faktori: (i) pretjerano dodavanje sumporovog dioksida u mošt uzrokuje povećanje reduktivnih sumpornih spojeva; (ii) kisik utječe na smanjuje njihove koncentracije, a reduktivna aroma sumporovodika, ako postoji, obično se može brzo ukloniti blagim prozračivanjem (Jackson, 2002); (iii) dodatak bakra isto može smanjiti njihovu koncentraciju; (iv) pri smanjenom udjelu dušika u moštu, potrebnom za rad kvasca tijekom alkoholne fermentacije, povećava se koncentracija reduktivnih sumpornih spojeva; (v) tijekom starenja odvijaju se brojne kemijske reakcije koje također rezultiraju njihovim povećanjem (Moreira i sur., 2010).

4. UTJECAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA NA KONCENTRACIJU SUMPORNIH SPOJEVA U VINU

Mnogi čimbenici kao što su sastav mošta, uvjeti tijekom alkoholne fermentacije, soj kvasca koji se koristi za fermentaciju, uvjeti i temperatura maceracije, prisutnost kisika, dodatak bakra, starenje vina u bačvama, utječu na koncentraciju sumpornih spojeva u vinu, a neki od ovih utjecaja će biti detaljnije objašnjeni u nastavku.

4.1. UTJECAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA NA KONCENTRACIJU POZITIVNIH SUMPORNIH SPOJEVA

4.1.1. Utjecaj zrelosti grožđa na koncentraciju pozitivnih sumpornih spojeva

Na koncentraciju sortnih tiola i dominantnost arome utječe i termin berbe, odnosno sama zrelost grožđa. Peyrot des Gachons i sur. (2000) su proveli istraživanje o tome kako zrelost bobice utječe na količinu cisteinskih prekursora (Cys3SH, Cys4MSP, Cys4MSPOH). Utvrđeno je kako zrelost bobice utječe direktno na koncentraciju prekursora, povećavajući njihovu ukupnu koncentraciju u bobicama (Roland i sur., 2011). Roland i sur. (2010) su proveli slično istraživanje među vinima Sauvignon blanc i Melon B., a istraživali su utjecaj zrelosti na cisteinske i glutationske prekursore. Utvrdili su kako se koncentracija Cys3SH, G3SH i G4MSP u vinu Sauvignon blanc značajno povećava s povećanjem stupnja zrelosti grožđa od kojeg je to vino proizvedeno. S druge strane, koncentracija Cys4MSP je bio viši u bobicama koje su bile manje zrele. U bobicama sorte Melon B. nije utvrđena korelacija između promjene u koncentraciji prekursora i stupnja dozrijevanja.

4.1.2. Utjecaj temperature fermentacije na koncentraciju pozitivnih sumpornih spojeva

Postoji nekoliko istraživanja o utjecaju temperature fermentacije na koncentraciju sortnih tiola koji se oslobađaju djelovanjem kvasca. Masneuf-Pomarède i sur. (2006) proveli su istraživanje o tome kako različite temperature alkoholne fermentacije utječu na koncentraciju sortnih tiola u Sauvignon blanc vinima. Rezultati su pokazali kako je viša temperatura alkoholne fermentacije (20 °C) rezultirala višim koncentracijama 4MSP i 3SH u vinu, u usporedbi s nižom temperaturom (13 °C). S obzirom na mehanizam nastajanja, odnosno reakciju esterifikacije, koncentracija

nastalog 3SHA je usko vezana uz koncentraciju oslobođenog 3SH. Iako, u slučaju 3SHA, temperatura nema nikakav učinak na stupanj esterifikacije 3SH, postoji neizravan učinak na koncentraciju 3SHA preko koncentracije 3SH. Slične rezultate dobili su i Howell i sur. (2004) u svom istraživanju, pri čemu su utvrdili više koncentracije 4MSP u vinima proizvedenim alkoholnom fermentacijom pri temperaturi od 28 °C nego u onima dobivenim fermentacijom pri 18 °C.

4.1.3. Utjecaj maceracije na koncentraciju pozitivnih sumpornih spojeva

Rani postupci koji se primjenjuju tijekom vinifikacije, kao što su kontakt čvrste i tekuće faze masulja i tlakovi koji se primjenjuju tijekom prešanja, utječu na ekstrakciju spojeva arome i njihovih prekursora u mošt. Također, direktno utječu i na njihovu koncentraciju u krajnjem produktu proizvodnje, odnosno vinu. Sortni tioli (4MSP, 4MSPOH, 3SH i 3SHA) u pravilu nisu prisutni u masulju, sintetiziraju se iz različitih cisteinskih i glutationskih prekursora tijekom alkoholne fermentacije (Maggu i sur., 2007). Istraživanjem raspodjele prekursora tiola u samoj bobici grožđa, Peyrot des Gachons i sur. (2002) utvrdili su kako je u trenutku berbe koncentracija Cys4MSP jednako zastupljen u pokožici i pulpi grožđa Sauvignon blanc, dok je koncentracija Cys3SH bio najviše zastupljen u pokožici bobice. Dodatnim istraživanjima otkriveno je kako se cisteinski i glutationski prekursori 3SH osim u pokožici, nalaze još i u lišću vinove loze te pulpi bobice grožđa (Roland i sur., 2011). Postoje brojna istraživanja o tome kako produljenje kontakta mošta s pokožicom (maceracije) rezultira povećanjem koncentracije tiola u vinu (Maggu i sur., 2007; Murat i sur., 2001). Utjecaj različite duljine maceracije (0 h, 4 h, 16 h i 32 h) i tlakova primijenjenih tijekom prešanja (samotok, 0,4 atm i 2 atm) na koncentraciju prekursora 3SH i 3SHA u vinu Sauvignon blanc, istraživali su Maggu i sur. (2007). Njihovim istraživanjem utvrđeno je kako nema prevelike razlike u koncentraciji Cys3SH na početku kontakta čvrste i tekuće faze i nakon 4h maceracije, nego se povećanje zamjećuje nakon 16h maceracije, dok se znatno povećanje koncentracije dogodilo nakon 32h. Najveća koncentracija cisteinskog prekursora 3SH ekstrahirana je nakon maceracije koja se provodila 32h i uz primijenjeni tlak tijekom prešanja od 0,4 atm, dok je uz primijenjeni tlak od 2 atm koncentracija bila nešto manja. Na osnovu navedenog može se zaključiti kako duljina kontakta mošta s pokožicom ima puno veći utjecaj na koncentraciju prekursora nego intenzitet primijenjenog tlaka tijekom prešanja.

Temperatura maceracije isto tako ima utjecaj na aromatski profil vina (Álvarez i sur., 2006). Olejar i sur. (2015) dokazali su kako niske temperature kod kriogene maceracije povećavaju

koncentraciju tiola zbog oštećenja bobica uzrokovano formiranjem kristala u bobici. Prekursori tiola koji se nalaze u matriksu, uslijed temperaturnog šoka prelaze iz bobice u mošt (Kobayashi i sur., 2002).

Nadalje, Allen i sur. (2011) utvrdili su kako strojna berba, tijekom koje dolazi do značajnih oštećenja bobica, također ima velik utjecaj na povećanje koncentracije ovih spojeva (3SH i 3SHA) u vinu.

4.1.4. Utjecaj kvasca na razvoj pozitivnih sumpornih spojeva tijekom alkoholne fermentacije

Iako postoje brojne hlapive arome koje se direktno formiraju iz kemijskih spojeva grožđa, mnogi spojevi arome se formiraju radom kvasca tijekom alkoholne fermentacije (Swiegers i sur., 2005). Alkoholna fermentacija je vrlo bitna za razvoj arome vina jer se tijekom ove faze sintetizira najviše spojeva koji su zaslužni za aromu vina. Niski pH i visok udio šećera u moštu ili masulju utječu na selekciju kvasca jer samo određeni kvasci mogu podnijeti takve uvjete za rast i razmnožavanje. Dodatak sumporovog dioksida, koji ima jak antioksidacijski i antimikrobni učinak, isto tako utječe na selekciju kvasca (Swiegers i sur., 2005). Stoga se za alkoholnu fermentaciju koristi kvasac visoke fermentacijske sposobnosti koji može preživjeti takve uvjete, a to je najčešće kvasac *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* je ujedno i najučinkovitiji kvasac za transformaciju sortnih tiola iz njihovih prekursora, a pri optimalnim uvjetima fermentacije uspije transformirati manje od 5 % sortnih tiola iz prekursora (Swiegers i sur., 2007). U nekim istraživanjima (Murat i sur., 2001; Dubourdieu i sur., 2000) mogu se naći podaci kako koncentracija 3SH proporcionalno raste s porastom koncentracije cisteinskog prekursora (Cys3SH) tijekom fermentacije. Dok Murat i sur. (2001) u svom istraživanju pokazuju kako se u moštu Cabernet Sauvignon i Merlot samo 3,6 % prekursora pocijepalo pri čemu se oslobodio 3SH tijekom fermentacije, istraživanje koje su proveli Dubourdieu i sur. (2000) pokazuje kako se u model uzorku samo 1,6 % prekursora pocijepalo uz oslobađanje 3SH. Takav rezultat može biti ili zbog djelomične oksidacije izdvojenog 3SH ili je dio 3SH ili Cys3SH metaboliziran radom kvasca (Murat i sur., 2001). Stoga, može se zaključiti kako je kvasac prilično ograničen u sposobnosti da u potpunosti iskoristi prekursore (Swiegers i sur., 2007).

Koncentracija 4MSP i 3SH koji se oslobađaju tijekom alkoholne fermentacije ovisi o soju kvasca koji se koristi. Komercijalno dostupni *S. cerevisiae* sojevi VL3 i EG8 (The AWRI Wine

Microorganism Culture Collection) oslobađaju puno više tiola nego sojevi VL1 i 522d (AWMCC). Komercijalni kvasac, VIN13 (Anchor Yeast, South Africa), koji oslobađa puno više tiola nego VL3 otkriveni su u istraživanju koje su proveli Swiegers i sur. (2006). Osim toga, postoje i neka istraživanja koja tvrde *Saccharomyces bayanus* sojevi oslobađaju puno više koncentracije 4MSP i 3SH nego *S. cerevisiae* (Swiegers i sur., 2007).

Enzimski mehanizam oslobađanja tiola, predložen je istraživanjem Tominaga i sur. (1995) u kojem su autori dokazali kako enzimski ekstrakt bakterije *Eubacterium limosum* i pročišćena triptofanaza iz *Escherichia coli* pokazuju β -eliminacijsku aktivnost *S*-cistein konjugata i mogu osloboditi 4MSP iz prekursora Cys4MSP (Swiegers i sur., 2007). Kako bi objasnili mehanizam izdvajanja 4MSP iz Cys4MSP, Howell i sur. (2005) testirali su izdvajanje 4MSP brisanjem gena koji kodiraju ugljik-sumpor liazu kvasca *S. cerevisiae*. Otkrivena su 4 gena, BNA3, CYS3, GLO1 i IRC7, za koja se smatra da imaju utjecaj na cijepanje 4MSP sa cisteinskog prekursora u laboratorijskom uzorku, ukazujući da je u proces oslobađanja 4MSP uključeno više gena (Howell i sur., 2005). S druge strane, Thibon i sur. (2008) su dokazali da samo β -liaza Irc7p može provesti konverziju cisteinskog prekursora u 4MSP. IRC7 gen se regulira preko Ure2p/Gln3p proteina (Thibon i sur., 2008). Iako cisteinski konjugat za 3SHA još nije otkriven, Swiegers i sur. (2006) su u svom radu dokazali kako se 3SHA formira iz 3SH djelovanjem kvasca *S. cerevisiae* tijekom alkoholne fermentacije. Alkohol acetiltransferaza, Atf1p, enzim koji je uključen u formaciju estera etil acetata, pokazao se kao glavni enzim uključen u formaciju 3SHA. Laboratorijski kvasac i komercijalni vinski kvasac pokazali su kako ATF1 gen proizvodi znatno više 3SHA nego autohtoni tip, dok ekspresija IAH1 gena uzrokuje smanjenje koncentracije 3SHA (Swiegers i sur., 2006).

4.1.5. Utjecaj starenja vina na koncentraciju pozitivnih sumpornih spojeva

3SH je jako nestabilna komponenta i njegova koncentracija se tijekom starenja vina znatno smanjuje zbog oksidacijskih procesa. Koncentracija 3SHA također se smanjuje tijekom starenja zbog reakcija hidrolize 3SHA na 3SH i octenu kiselinu. Hidroliza 3SHA znatno se povećava s povećanjem temperature skladištenja (Makhotkina i sur. 2012). Brajkovich i sur. (2005) utvrdili su kako su koncentracije 3SH i 3SHA tijekom starenja u bocama koje su zatvorene plutenim čepovima niže od vrijednosti dobivenih u bocama zatvorenim navojnim čepovima. Razlog tome može biti oksidacija vina jer su pluteni čepovi porozniji (propuštaju kisik), ali postoji i mogućnost

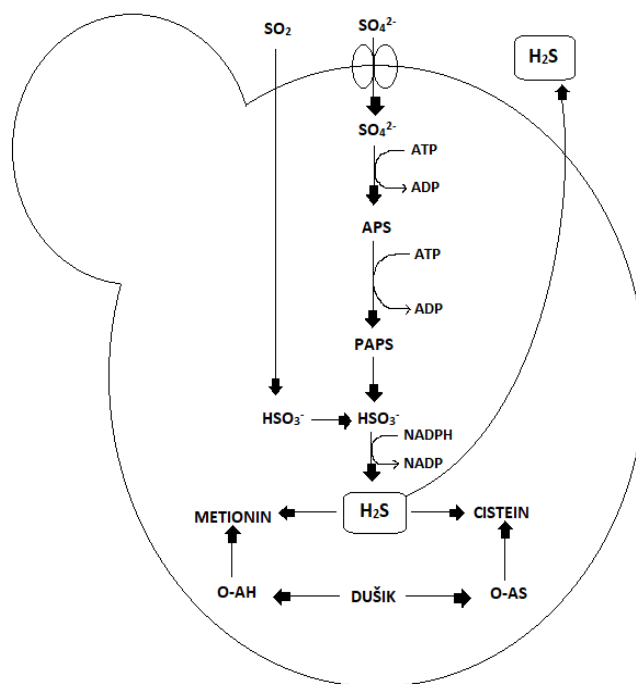
da je tijekom zatvaranja vina plutenim čepom došlo do apsorpcije 3SH i 3SHA (Brajkovich i sur., 2005). Blanchard i sur. (2004) objašnjavaju kako na smanjenje 3SH znatno utječe prisutnost katehina, koji u prisutnosti kisika oksidiraju u kinone. *O*-kinoni su snažni oksidansi i vrlo lako reagiraju s tiolima te na taj način uzrokuju njihovo smanjenje. *O*-kinoni isto tako mogu vrlo lako stvoriti perokside koji također uzrokuju smanjenje koncentracije 3SH zbog svojih oksidacijskih svojstava (Blanchard i sur., 2004). Dodatak SO₂ može umanjiti smanjenje koncentracije 3SH zbog antioksidacijskog učinka na katehine (Blanchard i sur., 2004). To je potvrđeno i istraživanjem koje su proveli Nikolantonaki i sur. (2010). U svom istraživanju također su proučavali utjecaj (+)-katehina i (-)-epikatehina na koncentraciju 3SH i 4MSP. Prisutnost (-)-epikatehina uzrokuje znatno veće smanjenje koncentracije 3SH nego prisutnost (+)-katehina, dok na koncentraciju 4MSP njihova prisutnost ima znatno manji utjecaj (Nikolantonaki i sur., 2010).

4.2. UTJECAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA NA KONCENTRACIJU NEGATIVNIH SUMPORNIH SPOJEVA

4.2.1. Utjecaj kvasca na razvoj negativnih sumpornih spojeva tijekom alkoholne fermentacije

Razvoj sumpornih spojeva pomoću kvasca uključuje: (i) razgradnju aminokiselina koje sadrže sumpor, (ii) razgradnju pesticida koji sadrže sumpor i (iii) oslobađanje i/ili metabolizam prekursora koji sadrže sumpor (Swiegers i sur., 2005). *S. cerevisiae* odgovoran je za produkciju nekoliko hlapivih sumpornih spojeva, koji utječu na senzorsku kvalitetu vina. Vrlo važni hlapivi sumporni spojevi koji nastaju tim procesom su sumporovodik, merkaptani i dimetilsulfid koji vinu daju negativne arome. Najpoznatiji sumporni spoj u vinu je sumporovodik i on predstavlja jedan od najvećih problema u procesu proizvodnje vina. Poznato je da je *S. cerevisiae* odgovoran za nastajanje sumporovodika u vinu, a njegova produkcija ovisi o različitim sojevima. Samo 1 % prirodnih vinskih kvasaca ne posjeduje sposobnost proizvodnje sumporovodika (Romano i sur., 2019). Općenito, ovaj spoj može nastati metabolički pomoću kvasca iz anorganskih sumpornih spojeva: sulfata i sulfita, ili iz organskih sumpornih spojeva: cisteina i glutationa (Swiegers i sur., 2005). Postoje brojna istraživanja (Spiropoulos i Bisson, 2000; Donalies i Stahl, 2002; Linderholm i sur., 2010) o utjecaju ekspresije različitih gena na koncentraciju sumporovodika u vinu te o načinima kako umanjiti njegovo nastajanje. Između ostaloga, održavanjem nižeg pH vina može se smanjiti produkcija sumporovodika (Bekker i sur., 2016).

Mošt je, općenito, siromašan organskim sumpornim spojevima i takvo stanje šalje signal kvascu da pokrene njihovu sintezu iz anorganskih sumpornih spojeva, odnosno da se pokrene redukcija sulfata (slika 2). Kao produkt tog puta nastaje sumporovodik, koji je metabolički međuprodukt u redukciji sulfata ili sulfita potrebnih za sintezu organskih sumpornih spojeva. Ukoliko se tijekom alkoholne fermentacije redukcija sulfata odvija s prikladnom količinom dušika biti će dostupna dovoljna količina prekursora (*O*-acetylserin i *O*-acetylhomoserin, koji nastaju tijekom metabolizma dušika) za sintezu metionina i cisteina. Pri dovoljnoj količini prekursora, HS⁻ ion izdvojen iz *O*-acetylserina i *O*-acetylhomoserina koristi se za sintezu metionina i cisteina. Pri nedostatku dušika, dolazi i do nedostatka prekursora i nakupljanja sumporovodika i njegovog izdvajanja u mošt (Swiegers i sur., 2007).



Slika 2. Put redukcije sulfata. Adenozin 5'-fosfosulfat (APS); 3'-fosfoadenozin 5'-fosfosulfat (PAPS); *O*-acetylserin (*O*-AS); *O*-acetylhomoserin (*O*-AH) .

Sumporovodik je vrlo reaktivan i u kombinaciji s drugim komponentama u vinu može stvoriti hlapive sumporne spojeve poput merkaptana etantiola, koji nastaje reakcijom sumporovodika s etanolom ili acetaldehidom. Dimetilsulfid može nastati na sličan način kao merkaptani ili može biti sintetiziran iz cisteina ili glutationa radom kvasca tijekom alkoholne fermentacije. Također može nastati i redukcijom iz dimetil sulfoksida djelovanjem kvasca (Romano i sur., 2019).

4.2.2. Utjecaj starenja i kisika na koncentraciju negativnih sumpornih spojeva

Tijekom starenja dolazi do značajne promjene arome vina. Najveći problem stvara proces oksidacije jer oksidacijom dolazi do promjene boje vina (posmeđivanje), stvaraju se različiti spojevi koji daju nepoželjnu aromu vinu te dolazi do gubitka svježih i voćnih aroma. Osim oksidacije, na aromu tijekom starenja također utječe i temperatura skladištenja (Makhotkina i sur. 2012). Iako nije u potpunosti jasno zašto se reduktivni sumporni spojevi formiraju tijekom starenja u boci, osobito u vinima u kojima su se već razvili tijekom fermentacije, postoji nekoliko hipoteza kojima se to pokušava objasniti: (i) hidroliza tioacetata i tioestera; (ii) redukcija disulfida; (iii) reakcije između cisteina i dikarbonila u vinu; (iv) redukcija sulfata i sulfita katalizirana prijelaznim metalima; (v) desulfurizacija aminokiselina katalizirana metalima. Sve ove mogućnosti uključuju *de novo* formiranje sumporovodika i metantiola iz njihovih prekursora kroz kemijske reakcije (Franco-Luesma i Ferreira, 2016).

Starenje vina u bocama iznimno ovisi o svojstvima zatvarača i njihovim sposobnostima da spriječe ulazak kisika u bocu (Lopes i sur., 2006). Utvrđeno je kako je ulazak kisika u bocu bio najmanje prisutan kod boca koje su bile zatvorene navojnim i aglomeriranim plutenim čepovima, srednje propusnima su se pokazali prirodni pluteni čepovi, a najveću propusnost kisika imali su sintetski čepovi, zbog poroznog materijala od kojeg su izrađeni (Lopes i sur., 2006). Vrsta zatvarača koji se koristi isto tako ima utjecaj i na koncentraciju slobodnog sumporovog dioksida, koji se koristi kao antioksidacijsko sredstvo u vinima. Gubitkom sumporovog dioksida dolazi do reakcija posmeđivanja čime dolazi do promjene boje vina (He i sur., 2013). Brajkovich i sur. (2005) također potvrđuju kako navojni čepovi propuštaju najmanje kisika u bocu i rezultiraju najmanjim gubitkom sumporovog dioksida iz vina. Isto tako je utvrđeno da vina zatvorena navojnim čepovima imaju najviše očuvanu voćnu aromu. Međutim, nakon 18 mjeseci skladištenja otkriveno je kako vina s navojnim čepovima imaju i najviše negativnih, reduktivnih aroma zbog porasta merkaptana koji su nositelji arome na truli kupus (Brajkovich i sur., 2005). Zbog male propusnosti kisika u vinima s navojnim zatvaračima, dolazi do povećanja koncentracije merkaptana koji se zbog male prisutnosti kisika ne mogu oksidirati do disulfida (He i sur., 2013). Ipak, koncentracija reduktivnih sumpornih spojeva (sumporovodika i merkaptana) je visoka zbog sporog smanjenja tijekom procesa starenja, a ne zbog nakupljanja (He i sur., 2013). Utvrđeno je i kako koncentracija dimetil sulfida ne ovisi o prisutnosti kisika ali se tijekom starenja vina njegova koncentracija

povećava (Fedrizzi i sur., 2011). Dimetil sulfid (DMS) može nastati tijekom starenja iz nehlapivih prekursora kao što su dimetil sulfoksid (DMSO), metionin sulfoksid (MSO), S-metilmetionin (SMM) i cistein (He i sur., 2013). Najveća koncentracija DMS nastaje iz SMM (Fedrizzi i sur., 2011). Bekker i sur., (2015) također potvrđuju kako prisutnost kisika u vinu smanjuje koncentraciju sumporovodika i merkaptana tijekom starenja. Smanjenje njihovih koncentracija povezuju s porastom stvaranja kinona pri višim koncentracijama kisika. Kinoni su poznati po tome da lako reagiraju s tiolima, stoga, povećanje koncentracije kinona, u vinima tretiranim kisikom, može smanjiti koncentraciju tiola nastalih tijekom alkoholne fermentacije i tijekom anaerobnog skladištenja (Bekker i sur., 2015).

4.2.3. Utjecaj dodatka bakra i drugih metala na koncentraciju negativnih sumpornih spojeva

Katalitički učinci dodatka metalnih iona na formiranje hlapivih sumpornih spojeva u vinu, istraživani su od strane brojnih autora, pri čemu su korišteni: Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Sn^{4+} , Sn^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} te je njihov dodatak povezan s povećanjem formacije hlapivih sumpornih spojeva iz njihovih prekursora (Bekker i sur., 2016). Dodatak bakra, općenito, ima pozitivan učinak na uklanjanje spojeva odgovornih za negativne, reducirane arome koje daju sumporovodik i merkaptani, ali dodatak bakra u kombinaciji s malim udjelom kisika ili bez prisutnosti kisika, uzrokuje povećanje koncentracije sumporovodika i u nešto manjoj mjeri merkaptana (Ugliano i sur., 2011; Viviers i sur., 2013). Različiti metali, uključujući bakar, mogu pospješiti odsumporavanje različitih supstrata, kao što je cistein, s posljedičnim oslobađanjem sumporovodika uz prisutstvo katalizatora (Ugliano i sur., 2011). Utjecaj 5 različitih metala i njihovih kombinacija na koncentraciju dimetil sulfida proučavali su Viviers i sur. (2013) te su utvrdili kako pojedinačno ili u kombinaciji uzrokuju smanjenje koncentracije dimetil sulfida.

Bekker i sur. (2016) proučavali su kako dodatak bakra i promjena pH vrijednosti utječu na koncentraciju sumporovodika, dimetil sulfida i merkaptana. Otkriveno je kako pH vina ima veliki utjecaj na interakciju Cu^{2+} iona s prekursorskim komponentama tijekom formiranja hlapivih sumpornih spojeva. Utvrdili su da dodatkom bakra koncentracija sumporovodika raste, međutim sniženjem pH vrijednosti, u vinu s dodanim bakrom, dolazi do smanjenja koncentracije sumporovodika. Nadalje, dodatak bakra u bijela vina uzrokuje smanjenje koncentracije merkaptana, dok dodatak bakra u crna vina uzrokuje povećanje koncentracije merkaptana. Interakcijom bakra s komponentama u vinu, koje se razlikuju u bijelim i crnim vinima dolazi do

različitog rezultata u količini formiranja merkaptana. Na koncentraciju dimetil sulfida nije dokazan utjecaj bakra, dok sniženje pH vina znatno smanjuje njegovu koncentraciju (Bekker i sur., 2016).

4.2.4. Utjecaj svjetla tijekom skladištenja na koncentraciju negativnih sumpornih spojeva

Negativni sumporni spojevi uzročnici su nastanka reduktivne arome u vinima skladištenim u prozirnim bocama, a nastanku pogoduje izloženost svjetlosti. Utjecaj svjetla na vina očituje se u smanjenju udjela antocijana u crnim vinima te može uzrokovati posmeđivanje bijelih vina (Fracassetti i Vigentini, 2018). Reduktivna aroma nastaje zbog prisutnosti riboflavina i metionina. Metionin se pod utjecajem svjetla razgrađuje na metional, koji je vrlo nestabilan spoj i raspada se na metantiol i akrolein. Riboflavin je molekula jako osjetljiva na svjetlo i pri izloženosti prolazi kroz brojne degradacije od kojih je intermolekularna fotoredukcija najznačajnija za formiranje reducirajućih aroma (Fracassetti i Vigentini, 2018). Metantiol i dimetil sulfid, koji nastaju ovim reakcijama, doprinose aromi vina na kuhani kupus. Nastanak negativnih aroma može se spriječiti korištenjem kvasaca koje proizvode male količine riboflavina ili uklanjanjem riboflavina pomoću bentonita (Fracassetti i Vigentini, 2018).

5. METODE ZA ANALIZU SUMPORNIH SPOJEVA

Kromatografska tehnika koja se najčešće koristi za analizu hlapivih sumpornih spojeva vina, zbog svoje brzine analize, osjetljivosti, specifičnosti i pouzdanosti, je plinska kromatografija s masenim sprektrometrom kao detektorom (GC/MS) (Mastres i sur., 2000). Hlapivi spojevi se odjeljuju plinskom kromatografijom, a zatim se identificiraju masenim spektrometrom.

5.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA (GC)

Plinska kromatografija je najprimjenjivija tehnika koja se koristi za odjeljivanje i kvantitativno određivanje hlapivih komponenti vina, a temelji se na razdvajanju plinovite, tekuće ili krute komponente između stacionarne i mobilne faze. Kao mobilna faza koristi se kemijski inertni plin (helij, dušik, vodik) koji transportira uzorak kroz kolonu, a stacionarna faza može biti krutina (plinsko-kruta kromatografija-GSC) ili tekućina (plinsko tekućinska kromatografija-GLC), koja se češće koristi kao stacionarna faza. Komponente se razdvajaju na osnovu njihove različite raspodjele između stacionarne i mobilne faze. Neka komponenta ima veći afinitet prema stacionarnoj fazi nego prema mobilnoj fazi i zbog toga će ona brže putovati kroz kolonu i pojaviti se kao pik na kromatogramu. Plinski kromatograf (GC) sastoji se od: injektora, termostatisane kolone koja se nalazi unutar pećnice, detektora, računala i kontrole protoka plina nosioca. Princip rada u najjednostavnijem smislu je unošenje uzorka pomoću šprice u zagrijani injektor gdje komponente prelaze u plinovito stanje i nošene plinom nosiocom uvode se u kolonu. U koloni se komponente razdvajaju na osnovi relativne topljivosti u stacionarnoj fazi i relativnom tlaku para a zatim nošene plinom dolaze na detektor gdje se detektiraju i signal se šalje na računalo koji ga prikazuje kao kromatogram (McNair i Miller, 2009).

5.2. MASENI DETEKTOR (MSD)

Maseni detektor koristi se za identifikaciju spojeva u vinu, koji su prethodno razdvojeni iz smjese plinskom kromatografijom (GC). Pojednostavljeni princip rada masenog detektora je bombardiranje elektronima organske molekule, u plinovitom stanju, pri čemu se stvaraju pozitivno nabijeni ioni. Nastali ioni se mogu fragmentirati na manje ionizirane fragmente, a njihovo nastajanje se ne odvija proizvoljno već prvo pucaju slabije veze u molekuli. Ioni se razdvajaju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nakon prolaska kroz električno ili magnetsko polje, a nakon

razdvajanje prolaze kroz detektor gdje se na osnovu izmjerenog impulsa određuje njihova količina. Prateći pravila odvajanja određenih funkcionalnih skupina, moguće je odrediti strukturu originalnih molekula (Christie, 2011).

Za detekciju hlapivih sumpornih spojeva koji se u vinima nalaze u niskim koncentracijama, osim MS detektora može se koristiti i tandem maseni spektrometar (MS/MS), također poznat kao "trostruki kvadrupolni" maseni spektrometar, koji je značajan i pouzdan analitički uređaj. Prednost ova dva detektora je njihova visoka osjetljivost i selektivnost. Osim za određivanje molekularne mase imaju sposobnost analize različitih spojeva, među kojima su i hlapivi sumporni spojevi (Seger i sur., 2008).

5.3. PRIPREMA UZORKA

Tri glavna problema tijekom analize sumpornih spojeva su njihova visoka reaktivnost s drugim spojevima, niska koncentracija te složenost matriksa. Iz tih razloga uspješnost primjene GC/MS sustava uvelike ovisi o prethodnoj pripremi uzorka. Postupci koje je potrebno provesti prije kromatografske analize su ekstrakcija i koncentriranje, a najčešće tehnike koje se koriste s ciljem osiguravanja adekvatne ekstrakcije su: ekstrakcija tekuće-tekuće, *headspace* metode (statička i dinamička) i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME, engl. *solid-phase microextraction*) (Mestres i sur., 2000). Također, tijekom pripreme uzorka veliki problem stvara oksidacija analita. Problem se može riješiti dodatkom dušika (Lopez i sur., 2007) ili pripremom uzorka u specijalno konstruiranim uređajima za manipulaciju u inertnim uvjetima, tzv. *glove box* (Slaghenaufi i sur., 2017).

5.3.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Predstavlja referentnu tehniku za ekstrakciju spojeva iz vina, a njenom primjenom svi hlapivi spojevi imaju visoki koeficijent raspodjele u organskoj fazi. Za ekstrakciju se koriste organska otapala, a korištenjem azeotropne smjese s više od jednog otapala moguće je poboljšati efikasnost ekstrakcije. Nedostaci ove metode su korištenje velike količine otapala koja mogu biti štetna (diklormetan), predugo vrijeme trajanja ekstrakcije te uparavanje otapala što može uzrokovati gubitak pojedinih komponenti. Kao pogodno sredstvo za ekstrakciju sumpornih

spojeva, uključujući negativne sumporne spojeve pokazao se diklormetan (Moreira, 2004). Kod ekstrakcije sortnih tiola najbolja otapala za ekstrakciju su etil acetat i kombinacija pentan-diklormetan. Također, *p*-hidroksimerkuribenzoat (*p*-HMB) je reagens koji se vrlo često koristi tijekom ekstrakcije sortnih tiola zbog specifične interakcije s tiolnim grupama i pospješnja ekstrakcija tiola iz vina, a njegovo korištenje prvi su predložili Tominaga i sur. (1998). Kako bi se tioli izdvojili iz kompleksa s *p*-HMB, za eluciju se koriste cistein i glutation (Mestres i sur., 2000). Međutim, mana ove metode je što dugo traje, pokazuje lošu specifičnost za 4MSP te postoji mogućnost degradacije 3SHA u 3SH (Roland i sur., 2012). Kako bi se smanjilo vrijeme potrebno za pripremu uzorka preporuča se korištenje agaroznog gela koji sadrži fenilmerkuri klorid, *Affi-Gel 501* (Tominaga i sur., 1998; Schneider i sur., 2003; Fedrizzi i sur., 2007). Kao odlično derivatizacijsko sredstvo pokazao se i 2,3,4,5,6-pentafluorobenzil bromida (PFB-Br), koji transformira tirole u njihove odgovarajuće pentafluorobenzil derivate (Fracassetti i Vigentini, 2018).

5.3.2. *Headspace* metoda

Headspace je separacijska tehnika kojom se lakohlapive komponente mogu izdvojiti iz složenog matriksa, nakon čega se injektiraju u plinski kromatograf i detektiraju (Mestres i sur., 2000), a postoje dvije izvedbe ove tehnike: statička i dinamička.

Kod statičkog *headspacea* uzorak se stavlja u staklenu vialu te termostatira. Analit se raspoređuje između tekućeg ili čvrstog uzorka i plinovite faze iznad uzorka. Kada se koncentracija analita u plinovitoj fazi iznad uzorka izjednači s koncentracijom analita u uzorku postignuto je stanje ravnoteže te se tada, pomoću plinopropusne štrcaljke, dio plinovite faze prenosi na plinski kromatograf (Snow, 2002). Koristi se za analizu spojeva koji nemaju visoke temperature vrelišta zbog nepostojanja koraka koncentriranja, odnosno zbog ograničene osjetljivosti metode (Mestres i sur., 2000). Ova metoda najčešće se koristi za ekstrakciju negativnih sumpornih spojeva u kombinaciji sa SPME tehnikom (HS-SPME), a dosad se koristila u brojnim istraživanjima u kojima se pokazala kao uspješna metoda (Nguyen i sur., 2012; Fedrizzi i sur., 2007; Slaghenaufi i sur., 2017; Mestres i sur., 1999).

Kod dinamičkog *headspacea* bitna je tehnika "*purge-and-trap*". Tekući ili čvrsti uzorak dolazi u kontakt s plinovitom fazom u komori. Komora se pročišćava pomoću plina koji nosi hlapive komponente iz uzorka do apsorbensa, na koji se zatim komponente apsorbiraju i koncentriraju.

Nakon što se analit koncentrirao na apsorbensu, mora se desorbirati povišenjem temperature kako bi se prenio na plinski kromatograf (Mestres i sur., 2000; Snow, 2002). Dinamički *headspace* je pogodna metoda za određivanje hlapivih sumpornih spojeva, koji se nalaze u niskim koncentracijama u vinu, upravo zbog tehnike koncentriranja analita na adsorbensu, ali tehnika je puno skuplja i kompleksnija od statičkog *headspacea* (Fracassetti i Vigentini, 2018). Ova metoda pogodna je za pripremu uzorka kod određivanja sortih tiola u vinu zbog smanjene uporabe organskih otapala korištenih prilikom ekstrakcije tekuće-tekuće kao i zbog svoje brzine ekstrakcije (Fedrizzi i sur., 2008).

5.3.3. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)

SPME tehnika predstavlja alternativu ekstrakcije tekuće-tekuće, vrlo je jednostavna metoda, jeftina, ima visoku osjetljivost. Također, ova tehnika ne zahtjeva uporabu otapala. Koristi vlakno prekriveno polimerom na koji se apsorbira analit i koncentrira (Nguyen i sur., 2012; Fedrizzi i sur., 2007). Tehnika je vrlo jednostavna: potrebno je samo uroniti vlakno u tekući uzorak ili u plinovitu fazu iznad uzorka (*headspace*) pri čemu se analit apsorbira i koncentrira na vlaknu (Mestres i sur., 2000). Međutim, veliki problem tijekom korištenja SPME metode može stvarati složenost matriksa. Može doći do prezasićenja vlakna ili do kompeticije za apsorpciju na vlakno između analita, standarda i drugih komponenata vina, stvarajući problem linearnosti u odgovoru (Lopez i sur., 2007). Iako ima nedostatke, SPME tehnika u kombinaciji s nekim drugim metodama, svejedno je najčešća metoda koja se koristi za ekstrakciju i koncentriranje prilikom pripreme uzorka za analizu negativnih sumpornih spojeva (Slaghenaufi i sur., 2017). Za njihovu ekstrakciju SPME tehnika najčešće se kombinira s *headspace* metodama, a kod izbora vlakna preporuča se korištenje dva vlakna: vlakno sa stacionarnom fazom polidimetilsiloksan/karboksen (PDMS/CAR) i vlakno sa stacionarnom fazom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS), zbog visokog iskorištenja tijekom ekstrakcije. Iskorištenje ekstrakcije može se povećati dodatkom soli kao što je magnezijev sulfat, a vrlo je bitno i dobro podesiti parametre kao što su temperatura uzorka te vrijeme ekstrakcije (Nguyen i sur., 2012; Fedrizzi i sur., 2007).

6. ZAKLJUČAK

Sumporni spojevi, zbog svog velikog utjecaja na senzorsku kvalitetu vina, postali su predmetom mnogih istraživanja. Brojna istraživanja provode se s ciljem utvrđivanja njihovog porijekla u vinu, utvrđivanja koji sve tehnološki postupci utječu na njihovu koncentraciju u vinu te radi njihove identifikacije.

Sumporni spojevi koji vinu daju ugodne, pozitivne arome su sortni tioli 3SH, 3SHA i 4MSP, a nositelji su arome na grejp, marakuju i šimšir. Na njihovu koncentraciju u vinu utječe zrelost grožđa, viša temperatura fermentacije, duže trajanje postupka maceracije kao i provođenje kriogene maceracije te smanjenje prisutnosti kisika u bocama.

S druge strane, negativni sumporni spojevi kao što su sumporovodik, merkaptani i dimetil sulfid nositelji su negativnih, reduktivnih aroma na pokvarena jaja, kiseli kupus, bijeli luk, karfiol, šaroge i tartufe. Na smanjenje njihove koncentracije značajno utječe prisutnost kisika tijekom proizvodnje i skladištenja vina, dodatak bakra pri nižim pH vrijednostima, kao i čuvanje vina u tamnim bocama s ciljem eliminacije negativnog utjecaja svjetla.

S obzirom na vrlo niske koncentracije hlapivih sumpornih spojeva u vinu kao najučinkovitija metoda za njihovu identifikaciju pokazala se plinska kromatografija s masenim spektrometrom kao detektorom (GC/MS) zbog visoke osjetljivosti. Najveći problem tijekom pripreme uzorka za analizu predstavlja kisik koji uzrokuje oksidaciju spojeva i njihov gubitak, a kako bi se smanjio njegov utjecaj na sumporne spojeve, tijekom pripreme uzorka potrebno je osigurati inertne uvjete.

7. LITERATURA

Allen T., Herbst-Johnstone M., Girault M., Butler P., Logan G., Jouanneau S., Nicolau L., Kilmartin P. A. (2011) Influence of grape-harvesting steps on varietal thiol aromas in Sauvignon blanc wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **59**: 10641–10650.

Bekker M. Z., Mierczynska-Vasilev A., Smith P. A., Wilkes E. N. (2016) The effects of pH and copper on the formation of volatile sulfur compounds in Chardonnay and Shiraz wines post-bottling. *Food Chemistry* **207**: 148–156.

Bekker M. Z., Day M. P., Holt H., Wilkes E. N., Smith P. A. (2015) Effect of oxygen exposure during fermentation on volatile sulfur compounds in Shiraz wine and a comparison of strategies for remediation of reductive character. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **22**: 24–35.

Blanchard L., Darriet P., Dubourdieu D. (2004) Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: Impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture* **55**: 115- 120.

Brajkovich M., Tibbits N., Peron G., Lund C. M., Dykes S. I., Kilmartin P. A., Nicolau L. (2005) Effect of screwcap and cork closures on SO₂ levels and aromas in a Sauvignon Blanc wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 10006–10011.

Christie, W.W. (2011) Gas Chromatography and lipids, <<http://lipidlibrary.aocs.org>>. Pristupljeno 10. lipnja, 2020.

Darriet P., Tominaga T., Lavigne V., Boidron J. N., Dubourdieu D. (1995) Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal* **10**: 385–392.

Donalies U. E. B., Stahl U. (2002) Increasing sulfite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of MET14 and SSU1. *Yeast* **19**: 475–484.

Fedrizzi B., Versini G., Lavagnini I., Nicolini G., Magno F. (2007) Gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine A comparison of headspace solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Analytica Chimica Acta* **596**: 291–297.

Fedrizzi B, Versini G, Lavagnini I, Badocca D, Nicolini G, Magno F. (2008) Hyphenated gas chromatography-mass spectrometry analysis of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine: Comparison with results of other sampling procedures via a robust regression. *Analytica Chimica Acta* **621**: 38-43.

Fedrizzi B., Zapparoli G., Finato F., Tosi E., Turri A., Azzolini M., Versini G. (2011) Model aging and oxidation effects on varietal, fermentative, and sulfur compounds in a dry botrytized red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 1804–1813.

Ferreira V., Ortín N., Cacho J. F. (2007) Optimization of a procedure for the selective isolation of some powerful aroma thiols. *Journal of Chromatography A* **1143**: 190–198.

Fracassetti D., Vigentini I. (2018) Occurrence and analysis of sulfur compounds in wine. U: Grapes and Wines - Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization, Jordão A. M., Cosme F., ur., IntechOpen, str. 226-238.

Franco-Luesma, E., & Ferreira, V. (2014) Quantitative analysis of free and bonded forms of volatile sulfur compounds in wine. Basic methodologies and evidences showing the existence of reversible cation-complexed forms. *Journal of Chromatography A* **1359**: 8-15.

Franco-Luesma E., Ferreira V. (2016) Reductive off-odors in wines: Formation and release of H₂S and methanethiol during the accelerated anoxic storage of wines. *Food Chemistry* **199**: 42–50.

Franco-Luesma E., Sáenz-Navajas M.-P., Valentin D., Ballester J., Rodrigues H., Ferreira V. (2016) Study of the effect of H₂S, MeSH and DMS on the sensory profile of wine model solutions by Rate-All-That-Apply (RATA). *Food Research International* **87**: 152–160.

Gómez-Miguez M. J., Cacho J. F., Ferreira V., Vicario I. M., Heredia F. J. (2007) Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry* **100**: 1464-1473.

He J., Zhou Q., Peck J., Soles R., Qian M. C. (2013) The effect of wine closures on volatile sulfur and other compounds during post-bottle ageing. *Flavour and Fragrance Journal* **28**: 118–128.

Hofmann T., Schieberle P., Grosch W. (1996) Model Studies on the Oxidative Stability of Odor-Active Thiols Occurring in Food Flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 251–255.

Jackson R. S. (2002) Wine Tasting: A Professional Handbook, Elsevier, str. 71.

Kinzurik M. I., Herbst-Johnstone M., Gardner R., Fedrizzi B. (2015) Evolution of volatile sulfur compounds during wine fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**: 8017-8024.

Kinzurik M. I., Herbst-Johnstone M., Gardner R. C., Fedrizzi B. (2016) Hydrogen sulfide production during yeast fermentation causes the accumulation of ethanethiol, S-ethyl thioacetate and diethyl disulfide. *Food Chemistry* **209**: 341-347.

Kobayashi H., Takase H., Suzuki Y., Tanzawa F., Takata R., Fujita K., Kohno M., Mochizuki M., Suzuki S., Konno T. (2011) Environmental stress enhances biosynthesis of flavor precursors, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine, in grapevine through glutathione S-transferase activation. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1325–1336.

Landaud S., Helinck S., Bonnarme P. (2008) Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**: 1191–1205.

Linderholm A., Dietzel K., Hirst M., Bisson L. F. (2010) Identification of MET10-932 and Characterization as an Allele Reducing Hydrogen Sulfide Formation in Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 7699–7707.

Lopes P., Saucier C., Teissedre P.-L., Glories Y. (2006) Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 6741- 6746.

Lopes P., Silva M. A., Pons A., Tominaga T., Lavigne V. R., Saucier C. D., Darriet P., Teissedre P.-L., Dubourdieu D. (2009) Impact of oxygen dissolved at bottling and transmitted through closures on the composition and sensory properties of a Sauvignon Blanc wine during bottle storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 10261-10270.

Lopez R., Aznar M., Cacho J., Ferreira V. (2002) Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **966**: 167–177.

Makhotkina O., Kilmartin P. A. (2012) Hydrolysis and formation of volatile esters in New Zealand Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry* **135**: 486–493.

- Makhotkina O., Pineau B., Kilmartin P. (2012) Effect of storage temperature on the chemical composition and sensory profile of Sauvignon Blanc wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **18**: 91-99.
- Maggu M., Winz R., Kilmartin P. A., Trought M. C., Nicolau L. (2007) Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 10281-10288.
- Masneuf-Pomarède I., Mansour C., Murat M.-L., Tominaga T., Dubourdieu D. (2006) Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *International Journal of Food Microbiology* **108**: 385-390.
- McGorin R. J. (2011) The significance of volatile sulfur compounds in food flavors. U: Volatile sulfur compounds in food, Qian M., Fan X., Mahattanatawee K., ur., American Chemical Society str. 3-31.
- McNair H. M., Miller J. M. (2009) Basic Gas Chromatography. Techniques in Analytical Chemistry, 2. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, SAD.
- Mestres M., Busto O., Guasch J. (2000) Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A*, **881**: 569–581
- Moreno-Arribas M. V., Polo M.C. (2009) Wine Chemistry and Biochemistry, Springer. str. 260-282.
- Moreira E. N. (2004) Method for analysis of heavy sulphur compounds using gas chromatography with flame photometric detection. *Analytica Chimica Acta* **513**:183-189.
- Moreira N., Guedes de Pinho P., Santos C., Vasconcelos I. (2010) Volatile sulphur compounds composition of monovarietal white wines. *Food Chemistry* **123**: 1198–1203.
- Murat M.-L., Tominaga T., Dubourdieu D. (2001) Assessing the aromatic potential of Cabernet Sauvignon and Merlot musts used to produce Rose wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 5412–5417.
- Müller N., Rauhut D. (2018) Recent developments on the origin and nature of reductive sulfurous off-odours in wine. *Fermentation* **4**: 62.

Nikolantonaki M., Chichuc I., Teissedre P.-L., Darriet, P. (2010) Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. *Analytica Chimica Acta* **660**: 102–109.

Nguyen D.D., Nicolau L. and Paul A. Kilmartin (2012) Application of an Automated Headspace Solid Phase Micro-Extraction for the GC-MS Detection and Quantification of Reductive Sulfur Compounds in Wines. U: Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications, Salih B., Çelikbiçak Ö., ur., IntechOpen str. 172-192.

Olejar K. J., Fedrizzi B., Kilmartin P. A. (2015) Influence of harvesting technique and maceration process on aroma and phenolic attributes of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry* **183**: 181-189.

Piano F., Fracassetti D., Buica A., Stander M., du Toit W. J., Borsa D., Tirelli A. (2015) Development of a novel liquid/liquid extraction and UPLC-MS/MS method for the assessment of thiols in South African Sauvignon blanc wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **21**: 40-48.

Radeka S., Lukić I., Peršurić Đ. (2012) Influence of different maceration treatments on the aroma profile of rose and red wines from Croatian aromatic cv. Muškat Ruža Porečki (*Vitis vinifera* L.). *Food technology and biotechnology* **5**: 442-453.

Rigou P., Triay A., Razungles A. (2014) Influence of volatile thiols in the development of blackcurrant arôme in red wine. *Food Chemistry* **142**: 242-248.

Robinson L. A., Boss K. P., Solomon S. P., Trengove D. R., Heymann H., Ebeler E. S. (2014) Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *American Journal of Enology and Viticulture* **65**: 1-24.

Roland A., Schneider R., Razungles A., Cavelier F. (2011) Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications. *Chemical reviews* **111**: 7355-7376.

Roland A., Vialaret J., Razungles A., Rigou P., Schneider R. (2010) Evolution of S-Cysteinylation and S-Glutathionylation of Thiol Precursors during Oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc Musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 4406-4413.

Roland A., Cavelier F., Schneider R. (2012) How organic and analytical chemistry contribute to knowledge of the biogenesis of varietal thiols in wine. A review. *Flavour and Fragrance Journal* **27**: 266–272.

Roland A., Schneider R., Guernevé C. L., Razungles A., Cavelier F. (2010) Identification and quantification by LC–MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3SH production in wine. *Food Chemistry* **121**: 847–855.

Romano P., Ciani M., Fleet G. H. (2019) *Yeasts in the Production of Wine*, Springer. str. 61-70.

Schneider R., Charrier F., Razungles A., Baumes R. (2006) Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta* **563**: 58–64.

Schneider R., Kotseridis Y., Ray J.-L., Augier C., Baumes R. (2003) Quantitative Determination of Sulfur-Containing Wine Odorants at Sub Parts per Billion Levels. 2. Development and Application of a Stable Isotope Dilution Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 3243–3248.

Seger C., Vogeser M. (2008) A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory e goals for further developments. *Clinical Biochemistry* **41**: 649-662.

Snow N. H., Slack G.C. (2002) Head-space analysis in modern gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **21**: 608–617.

Spiropoulos A., Bisson L. F. (2000) MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology* **66**: 4421–4426.

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.

Swiegers J. H., Capone D. L., Pardon K. H., Eelsey G. M., Sefton M. A., Francis I. L., Pretorius I. S. (2007) Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast* **24**: 561–574.

Swiegers J. H., Pretorius I. S. (2007) Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**: 954-960.

Thibon C., Dubourdieu D., Darriet P., Tominaga T. (2009) Impact of noble rot on the aroma precursor of 3-sulfanylhhexanol content in *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc and Semillon grape juice. *Food Chemistry* **114**: 1359–1364

Tominaga T., Masneuf I., Dubourdieu D. (1995) A S-cysteine conjugate, precursor of aroma of white sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **29**: 227–232.


Tominaga T., Murat, M., Dubourdieu, D. (1998) Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 1044- 1048.

Ugliano M., Kwiatkowski M., Vidal S., Capone D., Siebert T., Dieval J.-B., Aagaard O., Waters E. J. (2011) Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon blanc Wines. Effect of Glutathione, Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 2564–2572.

Viviers M. Z., Smith M. E., Wilkes E., Smith P. (2013) Effects of Five Metals on the Evolution of Hydrogen Sulfide, Methanethiol, and Dimethyl Sulfide during Anaerobic Storage of Chardonnay and Shiraz Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 12385–12396.

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.



ime i prezime studenta