Utjecaj bistrenja bentonitom tijekom alkoholne fermentacije na proteinsku stabilnost, arome, fenole i senzorsku kvalitetu vina Malvazije Istarske

Horvat, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

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:159:733061

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 3.0

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ivana Horvat

UTJECAJ BISTRENJA BENTONITOM TIJEKOM ALKOHOLNE FERMENTACIJE NA PROTEINSKU STABILNOST, AROME, FENOLE I SENZORSKU KVALITETU VINA MALVAZIJE ISTARSKE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ivana Horvat

UTJECAJ BISTRENJA BENTONITOM TIJEKOM ALKOHOLNE FERMENTACIJE NA PROTEINSKU STABILNOST, AROME, FENOLE I SENZORSKU KVALITETU VINA MALVAZIJE ISTARSKE

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Igor Lukić

Zagreb, 2020.

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Ivana Horvat

INFLUENCE OF BENTONITE FINING DURING ALCOHOLIC FERMENTATION ON PROTEIN STABILITY, AROMAS, PHENOLS, AND SENSORY QUALITY OF MALVAZIJA ISTARSKA WINE

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Igor Lukić, PhD

Zagreb, 2020

Tema rada prihvaćena je na 4. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu akad. god. 2017./2018., održanoj 30. siječnja 2018. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti na svojoj 12. sjednici u akad. god. 2017./2018., održanoj 12. lipnja 2018. godine.

Istraživanje je provedeno u okviru uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ UIP-2014-09-1194 „Razjašnjavanje sortne tipičnosti vina i maslinovih ulja od hrvatskih domaćih sorti” te je omogućeno i putem HRZZ projekta „Projekt razvoja karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti” (DOK-10-2015) financijskom potporom Hrvatske zaklade za znanost i Instituta za poljoprivredu i turizam.

Informacije o mentoru

Dr. sc. Igor Lukić viši je znanstveni suradnik na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču. Diplomirao je i magistrirao na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a doktorski rad obranio na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku 2008. godine i stekao akademski stupanj doktora znanosti u području biotehničkih znanosti, polju prehrambene tehnologije. Na Institutu je zaposlen od 2001. godine, gdje je od 2012. godine voditelj Vinarskog laboratorija a od 2017. godine predstojnik Zavoda za poljoprivredu i prehranu. Područje njegova znanstvenog interesa su kemija i analitika vina, maslinovog ulja i ostalih poljoprivredno-prehrambenih proizvoda, s posebnim naglaskom na istraživanju odziva senzorski aktivnih kemijskih spojeva na tehnološke i druge izvore varijabilnosti, kao i njihovu povezanost sa senzorskom kvalitetom proizvoda. Sudjelovao je u 11 nacionalnih i 2 međunarodna znanstvena projekta. Bio je voditelj uspostavnog istraživačkog projekta „Razjašnjavanje sortne tipičnosti vina i maslinovih ulja od hrvatskih domaćih sorti" financiranog od Hrvatske zaklade za znanost. Do danas je objavio više od 50 znanstvenih radova, među ostalim i 35 radova zastupljenih u *Current Contents* i *Science Citation Index Expanded* bazama, od čega 17 radova u časopisima iz prvog kvartila prema *Clarivate Analytics*. Rezultate je predstavio na 29 međunarodnih konferencija. Citiran je više od 350 puta uz *h*-indeks 12, a u razdoblju 2015.-2018. nagrađivan je kao najproduktivniji znanstvenik Instituta. Recenzirao je stotinjak rukopisa za više od 20 uglednih znanstvenih časopisa te je član odbora recenzenata časopisa *Agronomy* i tematski urednik u časopisu *Molecules* (oboje MDPI, Švicarska), odnosno član znanstvenog odbora časopisa *Journal of Raw Materials to Processed Foods* Sveučilišta u Cukurovi u Turskoj. Dr. sc. Igor Lukić od 2001. godine sudjeluje u izvođenju nastave u okviru Stručnog studija vinarstva, Specijalističkog diplomskog stručnog studija vinarstva i Stručnog studija mediteranske poljoprivrede Poljoprivrednog odjela Veleučilišta u Rijeci te je bio mentor nekoliko završnih i diplomskih radova. Član je Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (CroP-BioDiv), Hrvatskog kemijskog društva, Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, ovlašteni je službeni senzorni analitičar za maslinovo ulje te je bio član Povjerenstva za izradu specifikacija za zaštićene oznake izvornosti vina u Republici Hrvatskoj i član Panela za vrednovanje znanstvenih projekata Hrvatske zaklade za znanost.

U prvom redu, i najviše, zahvaljujem svojem mentoru dr. sc. Igoru Lukiću na viziji, uloženom trudu i vremenu, nesebičnoj pomoći i zalaganju u svim fazama ostvarivanja ovog cilja tijekom pet godina mog rada na Institutu. Veliko hvala prof. dr. sc. Mari Banović, prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić i dr. sc. Sanji Radeki na savjetima za poboljšanje kvalitete sadržaja ovog rada. Hvala suradnicima na projektu TYPICRO i drugim kolegama koji su na bilo koji način bili uključeni u ovo istraživanje, pri čemu opet posebno zahvaljujem dr. sc. Sanji Radeki na stručnoj pomoći tijekom proizvodnje vina i značajnom doprinosu u senzorskim analizama, zatim dr. Urški Vrhovšek na nezaboravnom gostoprimstvu tijekom stručnog usavršavanja u Italiji, dr. sc. Tomislavu Plavši i Robiju Damijaniću na stručnoj i tehničkoj pomoći u Minivinifikaciji, kolegicama Marici Stranić, Tini Jerman i Ireni Delač iz Vinarskog laboratorija za sve odrađene fizikalno-kemijske analize i pomoć pri senzorskim analizama. Beskrajno hvala bivšim i sadašnjim kolegicama zbog kojih je život i rad u novoj sredini, daleko od doma, bio mnogo lakši i podnošljiviji. Hvala Anji Novoselić, Dori Klisović i Sari Rossi iz Prostorije 3B, mojem Tihomiru i mojoj obitelji u Koprivnici na svakom obliku bezrezervne podrške.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Doktorski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam
UDK: 547.56:663.2:663.252.4:666.322(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ BISTRENJA BENTONITOM TIJEKOM ALKOHOLNE FERMENTACIJE NA PROTEINSKU STABILNOST, AROME, FENOLE I SENZORSKU KVALITETU VINA MALVAZIJE ISTARSKE

Ivana Horvat, mag. ing. bioproc.

Rad je izrađen na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču
Mentor: dr. sc. Igor Lukić, viši znanstveni suradnik

Kratki sažetak
Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj različitih uvjeta bistrenja bentonitom tijekom fermentacije - trenutka primjene, načina primjene i načina pripreme bentonita, primjene enoloških tanina u kombinaciji s bentonitom, temperature mošta tijekom bistrenja, primjene različitih doza bentonita te utjecaj tipa primijenjenog bentonita - na potrebnu dozu bentonita za postizanje proteinske stabilnosti vina, osnovne fizikalno-kemijske parametre kvalitete, hlapljive spojeve arome, fenole te senzorsku kvalitetu vina malvazije istarske. Najznačajnije smanjenje doze postignuto je primjenom bentonita u posljednjoj trećini trajanja fermentacije. Priprema bentonita u deioniziranoj vodi u manjoj je mjeri doprinijela sniženju doze. Primjena enoloških tanina snizila je ukupnu dozu potrebnog bentonita, ali u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji nije postigla sinergijski učinak. Bistrenje bentonitom u fermentaciji značajno je utjecalo na fizikalno-kemijski sastav proizvedenih vina: očuvane su više koncentracije hidroksicinamoiltartarata, a posebno je značajan bio pozitivan učinak na očuvanje koncentracija ključnih hlapljivih spojeva fermentacijske arome, hlapljivih masnih kiselina i estera. Primjena tanina doprinijela je očuvanju viših koncentracija ukupne kiselosti, ukupnih fenola i hidroksicinamoiltartarata. Dodatak tanina, viša temperatura bistrenja te primjena više doze bentonita u fermentaciji imali su dodatan povoljan utjecaj na hlapljive estere. Pojedini tipovi bentonita pokazali su značajnije pozitivne učinke od ostalih. Bistrenje bentonitom tijekom alkoholne fermentacije pokazalo je jasan pozitivan učinak na senzorsku kvalitetu vina. Različiti pozitivni učinci bili su izraženiji u djelomično bistrenim vinima nakon fermentacije, dok ih je dodatno bistrenje nakon fermentacije umanjilo ili poništilo. Učinci pojedinih tretmana nisu bili jednakog intenziteta ili čak predznaka u različitim godinama istraživanjima. Daljnja istraživanja trebala bi se usredotočiti na utvrđivanje mogućnosti ograničenja nepovoljnih učinaka završnog bistrenja bentonitom nakon fermentacije, odnosno razjašnjavanje utjecaja fizikalno-kemijskog sastava grožđa kao polazišne sirovine na učinkovitost bistrenja tijekom fermentacije.

Broj stranica: 227
Broj slika: 13
Broj tablica: 46
Broj literaturnih navoda: 243
Broj priloga: 21
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: aroma, bentonit, bistrenje, fenoli, fermentacija, malvazija istarska, proteinska stabilnost, senzorska kvaliteta, vino

Datum obrane: 27. listopada 2020.
Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Mara Banović
2. prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić
3. dr. sc. Sanja Radeka, znanstvena savjetnica
4. prof. dr. sc. Nada Vahčić (zamjena)

Rad je pohranjen u: knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4; Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Doctoral dissertation

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition
UDK: 547.56:663.2:663.252.4:666.322(043.3)
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Food Technology

INFLUENCE OF BENTONITE FINING DURING ALCOHOLIC FERMENTATION ON PROTEIN STABILITY, AROMAS, PHENOLS, AND SENSORY QUALITY OF MALVAZIJA ISTARSKA WINE

Ivana Horvat, mag. ing. bioproc.

Thesis performed at the Institute of Agriculture and Tourism, Poreč
Supervisor: Senior research associate Igor Lukić, PhD

Short abstract
The aim of this study was to investigate the influence of different conditions of bentonite fining during fermentation - the moment of bentonite application, application method, bentonite preparation method, application of oenological tannins in combination with bentonite, must temperature during fining, bentonite dose, and bentonite type applied - on the required dose of bentonite to achieve protein stability, standard physico-chemical quality parameters, the concentrations of phenols and volatile aroma compounds, and sensory quality of Istrian Malvasia wine. The most significant reduction of dose was achieved by applying bentonite in the last third of the fermentation period. The preparation of bentonite in deionized water slightly contributed to the reduction. The application of oenological tannins lowered the total dose of bentonite required, but the combination of tannins with bentonite in fermentation did not achieve a synergistic effect. Bentonite fining during fermentation significantly affected physico-chemical composition of the produced wines: it preserved higher concentrations of hydroxycinnamyltartrates, while a positive effect on the preservation of the amounts of key fermentation aroma volatile compounds, such as volatile fatty acids and esters, was particularly significant. The application of tannins contributed to the preservation of higher concentrations of total acidity, total phenols, and hydroxycinnamoyltartrates. The addition of tannins, higher temperature during fining, and the application of higher dose of bentonite in fermentation had an additional beneficial effect on volatile esters. Particular types of bentonite showed more significant positive effects than others. Bentonite fining during alcoholic fermentation showed a clear positive effect on the sensory quality of the investigated wines. Various positive effects were more pronounced in partially fined wines after fermentation, while additional fining after fermentation reduced or nullified them. The effects of particular treatments were not of equal intensity or even sign in different years of research. Further research should focus on identifying the possibilities to limit the adverse effects of final fining with bentonite after fermentation, as well as on elucidating the influence of physico-chemical composition of grapes as raw material on the efficiency of fining during fermentation.

Number of pages: 227
Number of figures: 13
Number of tables: 46
Number of references: 243
Number of supplements: 21
Original in: Croatian

Key words: aroma, bentonite, fermentation, fining, Istrian Malvasia, phenols, protein stability, sensory quality, wine

Date of the thesis defense: 27 October 2020
Reviewers:

1. Full professor Mara Banović, PhD
2. Full professor Karin Kovačević Ganić, PhD
3. Scientific advisor Sanja Radeka, PhD
4. Full professor Nada Vahčić, PhD (substitute)

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23; National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4; University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

UTJECAJ BISTRENJA BENTONITOM TIJEKOM ALKOHOLNE FERMENTACIJE NA PROTEINSKU STABILNOST, AROME, FENOLE I SENZORSKU KVALITETU VINA MALVAZIJE ISTARSKE

Proteinska stabilnost jedno je od ključnih svojstava bijelih vina namijenjenih tržištu. Bentonit je već dulji niz godina najučinkovitije i najisplativije sredstvo u vinarstvu za postizanje proteinske stabilnosti bijelih vina, a njegova se učinkovitost zasniva na adsorpciji i uklanjanju proteina koji bi u određenim uvjetima mogli dovesti do pojave zamućenja. Standardnim bistrenjem vina bentonitom nakon završetka fermentacije gubitci količine vina s talogom mogu biti znatni, a postoji i velika vjerojatnost negativnog utjecaja na njegovu kvalitetu. Stoga je proizvođačima od velikog interesa optimizirati postupak bistrenja bentonitom kako bi se gubitci količine vina umanjili, a njegova kvaliteta očuvala. Iako je ranije nagoviješten potencijal primjene bentonita tijekom fermentacije za sniženje ukupne doze i postizanje manjih gubitaka vina u odnosu na standardno bistrenje nakon fermentacije, vrlo je slabo ili nije istražen utjecaj takvih tretmana. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj različitih uvjeta bistrenja bentonitom tijekom fermentacije na potrebnu dozu bentonita za postizanje proteinske stabilnosti vina, osnovne fizikalno-kemijske parametre kvalitete, hlapljive spojeve arome, fenole te senzorsku kvalitetu vina malvazije istarske. Istraživan je utjecaj trenutka primjene bentonita u fermentaciji, načina primjene bentonita, načina pripreme bentonita, primjene tanina u kombinaciji s bentonitom, temperature mošta tijekom bistrenja, primjene različitih doza bentonita te utjecaj tipa bentonita primijenjenog u fermentaciji. Kao kontrolni tretman poslužilo je vino proizvedeno bez primjene bentonita u fermentaciji, u potpunosti bistreno nakon fermentacije. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se najznačajnija poboljšanja mogu postići primjenom bentonita u posljednjoj trećini trajanja fermentacije (do 21 % manja doza) pa je utjecaj ostalih čimbenika istražen u kombinaciji s tim tretmanom. Priprema bentonita u deioniziranoj vodi doprinijela je sniženju doze, iako u manjoj mjeri. Pokazano je da primjena enoloških tanina može sniziti ukupnu dozu potrebnog bentonita, ali kombinacija tanina s bentonitom u fermentaciji nije postigla sinergijski učinak. Različiti tipovi bentonita zahtijevali su različite doze za postizanje ekvivalentne razine proteinske stabilnosti, ali su se u odnosu na količinu proizvedenog vina važnijim ispostavile razlike u volumenu dobivenog taloga ovisno o tipu bentonita. Ostali istraživani čimbenici nisu utjecali na dozu potrebnog bentonita. Bistrenje bentonitom u fermentaciji značajno je utjecalo na fizikalno-kemijski sastav proizvedenih vina. U većini je slučajeva utvrđen relativno blag nepovoljan utjecaj na koncentraciju ukupnog suhog ekstrakta, ukupne kiselosti i ukupnih

fenola. Utjecaj na pojedinačne kemijske spojeve utvrđen je prvenstveno u odnosu na vino kontrolnog tretmana, dok su razlike između pojedinih tretmana bistrenja bile manje izražene. Među fenolima, najizraženiji učinak bentonita primijenjenog u fermentaciji bilo je očuvanje viših koncentracija hidroksicinamoiltartarata. Primjena tanina doprinijela je očuvanju viših koncentracija ukupne kiselosti, ukupnih fenola i hidroksicinamoiltartarata. Utjecaj na koncentracije slobodnih hlapljivih i glikozidno vezanih spojeva sortne arome bio je relativno slab do umjeren te neujednačen ovisno o tretmanu. Tretmani s primjenom bentonita tijekom fermentacije uglavnom su pokazali značajan pozitivan učinak na očuvanje koncentracija ključnih hlapljivih spojeva fermentacijske arome, posebno hlapljivih masnih kiselina te estera. Dodatak tanina, viša temperatura bistrenja te primjena više, dvostruke doze bentonita u fermentaciji imali su dodatan povoljan utjecaj na hlapljive estere. Pojedini tipovi bentonita pokazali su značajnije pozitivne učinke od ostalih. Bistrenje bentonitom u fermentaciji imalo je nedvojbeno pozitivan utjecaj na senzorsku kvalitetu proizvedenih vina, koji se očitovao u vidu viših ocjena za kvalitetu i viših intenziteta ključnih pojedinačnih svojstava mirisa i okusa dodijeljenih vinima tih tretmana. Primjenom ostalih uvjeta bistrenja (postupno doziranje bentonita, priprema bentonita u deioniziranoj vodi, primjena tanina, viša temperatura bistrenja, dvostruka doza bentonita) nisu ostvarena dodatna poboljšanja senzorske kvalitete vina. Različiti tipovi bentonita pokazali su različit raspon utjecaja na senzorsku kvalitetu vina. Rezultati ovog istraživanja potvrdili su postavljenu hipotezu da bistrenje bentonitom tijekom alkoholne fermentacije može poboljšati proteinsku stabilnost te fizikalno-kemijsku i senzorsku kvalitetu vina kultivara malvazija istarska. Ipak, valja imati na umu da učinci pojedinih tretmana nisu bili jednakog intenziteta ili čak predznaka u različitim godinama istraživanjima, što je potvrdilo ranija saznanja da različit polazišni sastav grožđa može značajno utjecati na učinkovitost bistrenja. Također, različiti pozitivni učinci bili su izraženiji u djelomično bistrenim vinima nakon fermentacije, dok ih je dodatno bistrenje nakon fermentacije umanjilo ili poništilo. Navedeno upućuje da bi se daljnja istraživanja u okviru ove teme trebala usredotočiti na razjašnjavanje utjecaja fizikalno-kemijskog sastava grožđa kao polazišne sirovine, odnosno utvrđivanje mogućnosti ograničenja ili umanjenja nepovoljnih učinaka završnog bistrenja bentonitom nakon fermentacije.

KLJUČNE RIJEČI: aroma, bentonit, bistrenje, fenoli, fermentacija, malvazija istarska, proteinska stabilnost, senzorska kvaliteta, vino

INFLUENCE OF BENTONITE FINING DURING ALCOHOLIC FERMENTATION ON PROTEIN STABILITY, AROMAS, PHENOLS, AND SENSORY QUALITY OF MALVAZIJA ISTARSKA WINE

Protein stability is one of the key properties of white wines intended for the market. For many years, bentonite has been the most efficient and cost-effective oenological fining agent for achieving protein stability in white wines and its effectiveness is based on the adsorption and removal of proteins that cause turbidity. Standard fining of wine with bentonite after fermentation can lead to the loss of a certain amount of wine with sediment and may have a negative impact on wine quality. Therefore, it is of great interest to producers to optimize the bentonite fining process in order to reduce losses in both wine quantity and quality. Although the potential of the use of bentonite during fermentation to reduce its total dose and achieve lower quantitative losses of wine compared to standard fining after fermentation has been previously suggested, the impact of such treatments has generally been poorly or not investigated. The aim of this study was to investigate the influence of different conditions of bentonite fining during fermentation on the required dose of bentonite to achieve protein stability of wine, standard physico-chemical quality parameters, the concentrations of phenols and volatile aroma compounds, and sensory quality of Istrian Malvasia wine. The investigated factors included the moment of bentonite application in fermentation, bentonite application method, bentonite preparation method, application of oenological tannins in combination with bentonite, must temperature during fining, application of different doses of bentonite, and the influence of the type of bentonite applied in fermentation. Wine produced without the use of bentonite in fermentation, fined completely after fermentation, was used as a control. The results of this study showed that the most significant improvements can be achieved by applying bentonite in the last third of the fermentation period (up to 21 % lower dose), so the influence of the other factors was investigated in combination with this treatment. The preparation of bentonite in deionized water contributed to the reduction of bentonite dose, although to a lesser extent. It was shown that the application of oenological tannins can lower the total dose of bentonite required, but the combination of tannins with bentonite in fermentation did not achieve a synergistic effect. Different types of bentonite required different doses to achieve an equivalent level of protein stability, but in relation to the amount of wine produced, differences in the volume of sediment obtained turned out to be more important. Other factors investigated did not affect the dose of bentonite required. Bentonite fining in fermentation significantly affected the physico-chemical composition of the

produced wines. In most cases, a relatively mild negative effect on the concentration of total dry extract, total acidity, and total phenols was found. The effect on individual chemical compounds was determined primarily in relation to the control treatment wine, while the differences between individual fining treatments were less pronounced. Among phenols, the most pronounced effect of bentonite fining during fermentation was the preservation of higher concentrations of hydroxycinnamoyltartrates. The application of tannins preserved higher concentrations of total acidity, total phenols, and hydroxycinnamoyltartrates. The effect on the concentrations of free volatile and glycosidically bound varietal aroma compounds was relatively weak to moderate and uneven depending on the treatment. Treatments with bentonite during fermentation generally showed a significant positive effect on preserving the concentrations of key fermentation volatile compounds, especially volatile fatty acids and esters. The addition of tannins, higher temperature during fining, and the application of a double dose of bentonite in fermentation had additional beneficial effects on the content of volatile esters. Particular types of bentonite showed more significant positive effects than others. Fining with bentonite during fermentation undoubtedly had a positive effect on the sensory quality of the wines produced, manifested through higher quality grades and higher intensities of particular key aroma and taste attributes assigned to the wines of these treatments. By applying other fining conditions (gradual dosing of bentonite, preparation of bentonite in deionized water, application of tannins, higher temperature during fining, double bentonite dose) no additional improvements in the sensory quality of wine were achieved. Different types of bentonite showed a different range of effects on the sensory quality of wine. The results of this study confirmed the hypothesis that fining with bentonite during alcoholic fermentation can improve protein stability and physico-chemical and sensory quality of Istrian Malvasia wine. However, it should be kept in mind that the effects of particular treatments were not of equal intensity or even sign in different research years, which confirmed earlier findings that different starting composition of grapes can significantly affect the effectiveness of fining. Also, various positive effects were more pronounced in partially fined wines after fermentation, while additional fining after fermentation had reduced them. This suggests that further research under this topic should focus on elucidating the influence of physico-chemical composition of grapes as raw material, as well as identifying the possibilities to limit or reduce the adverse effects of final fining with bentonite after fermentation.

KEY WORDS: aroma, bentonite, fining, fermentation, Istrian Malvasia, phenols, protein stability, sensory quality, wine

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

2. OPĆI DIO **4**

2.1. Proteinsko zamućenje u vinu **4**

2.1.1. Proteini u vinu 4

2.1.2. Nestabilni (PR) proteini 5

2.1.3. Utjecaj drugih čimbenika u vinu na pojavu proteinske nestabilnosti i zamućenja 6

2.1.4. Mehanizam nastajanja proteinskog zamućenja 7

2.2. Bentonit **8**

2.3. Međudjelovanje bentonita i proteina **10**

2.4. Međudjelovanje bentonita i ostalih sastojaka mošta i vina **11**

2.4.1. Djelovanje bentonita na fenolne spojeve 12

2.4.2. Djelovanje bentonita na spojeve arome 14

2.5. Tehnike i pristupi kao alternative bistrenju bentonitom prije punjenja u boce **16**

3. MATERIJALI I METODE **23**

3.1. Proizvodnja vina i bistrenje bentonitom tijekom fermentacije **23**

3.2. Pokus 2015.: Istraživanje učinka trenutka primjene bentonita **24**

3.3. Pokus 2016.: Istraživanje učinka trenutka primjene bentonita u fermentaciji, načina primjene bentonita u fermentaciji, načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji i primjene tanina u kombinaciji s bentonitom **25**

3.4. Pokus 2017.: Istraživanje učinka temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji, primjene dvostruke doze bentonita u fermentaciji (prebistrenje) i primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji **27**

3.5. Postupci nakon fermentacije **28**

3.6. Određivanje proteinske stabilnosti vina **29**

3.7. Određivanje doze bentonita **29**

3.8. Standardne fizikalno-kemijske analize **30**

3.9. Analiza fenolnih spojeva **30**

3.10. Analiza slobodnih i vezanih hlapljivih spojeva arome **32**

3.11. Senzorska analiza vina malvazije istarske **34**

3.12. Statistička obrada rezultata **35**

4. REZULTATI **36**

4.1. Učinak trenutka primjene bentonita **37**

4.1.1. Doza bentonita 37

4.1.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri 39

4.1.3. Fenolni spojevi 41
4.1.4. Hlapljivi spojevi arome 45
4.1.5. Senzorska svojstva 56
4.2. Učinak načina primjene bentonita u fermentaciji 61
4.2.1. Doza bentonita 61
4.2.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri 62
4.2.3. Fenolni spojevi 63
4.2.4. Hlapljivi spojevi arome 65
4.2.5. Senzorska svojstva 69
4.3. Učinak načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji 72
4.3.1. Doza bentonita 72
4.3.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri 73
4.3.3. Fenolni spojevi 74
4.3.4. Hlapljivi spojevi arome 76
4.3.5. Senzorska svojstva 80
4.4. Učinak primjene tanina u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji 83
4.4.1. Doza bentonita 83
4.4.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri 84
4.4.3. Fenolni spojevi 85
4.4.4. Hlapljivi spojevi arome 89
4.4.5. Senzorska svojstva 95
4.5. Učinak temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji 97
4.5.1. Doza bentonita 97
4.5.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri 98
4.5.3. Fenolni spojevi 99
4.5.4. Hlapljivi spojevi arome 101
4.5.5. Senzorska svojstva 104
4.6. Učinak primjene dvostruke doze tijekom bistrenja u fermentaciji (prebistrenje) 106
4.6.1. Doza bentonita 106
4.6.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri 107
4.6.3. Fenolni spojevi 108
4.6.4. Hlapljivi spojevi arome 110
4.6.5. Senzorska svojstva 112
4.7. Učinak primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji 115
4.7.1. Doza bentonita 115
4.7.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri 117
4.7.3. Fenolni spojevi 118

4.7.4. Hlapljivi spojevi arome 121
4.7.5. Senzorska svojstva 124

5. RASPRAVA 127
5.1. Proteinska stabilnost vina 127
5.1.1. Utjecaj trenutka primjene bentonita u fermentaciji 127
5.1.2. Utjecaj načina primjene bentonita u fermentaciji 131
5.1.3. Utjecaj načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji 132
5.1.4. Utjecaj primjene tanina u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji 133
5.1.5. Utjecaj temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji 134
5.1.6. Utjecaj primjene dvostruke doze bentonita u fermentaciji (prebistrenje) 135
5.1.7. Utjecaj primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji 136
5.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri 139
5.3. Fenolni spojevi 142
5.3.1. Utjecaj trenutka primjene bentonita u fermentaciji 142
5.3.2. Utjecaj načina primjene bentonita u fermentaciji 146
5.3.3. Utjecaj načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji 148
5.3.4. Utjecaj primjene tanina u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji 148
5.3.5. Utjecaj temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji 153
5.3.6. Utjecaj primjene dvostruke doze bentonita u fermentaciji (prebistrenje) 154
5.3.7. Utjecaj primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji 156
5.4. Hlapljivi spojevi arome 158
5.4.1. Utjecaj trenutka primjene bentonita u fermentaciji 158
5.4.2. Utjecaj načina primjene bentonita u fermentaciji 169
5.4.3. Utjecaj načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji 171
5.4.4. Učinak primjene tanina u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji 174
5.4.5. Utjecaj temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji 177
5.4.6. Utjecaj primjene dvostruke doze bentonita u fermentaciji (prebistrenje) 180
5.4.7. Utjecaj primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji 182
5.5. Senzorska svojstva 186
5.5.1. Utjecaj trenutka primjene bentonita u fermentaciji 186
5.5.2. Utjecaj načina primjene bentonita u fermentaciji 193
5.5.3. Utjecaj načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji 194
5.5.4. Utjecaj primjene tanina u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji 196
5.5.5. Utjecaj temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji 198
5.5.6. Utjecaj primjene dvostruke doze bentonita u fermentaciji (prebistrenje) 200
5.5.7. Utjecaj primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji 201

6. ZAKLJUČAK 206

7. LITERATURA 210

8. PRILOZI

ŽIVOTOPIS

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

1. UVOD

U proizvodnji bijelog vina od velike je važnosti osigurati stabilnost konačnog proizvoda. Stabilno bijelo vino je bistro i nema vidljivog taloga pri punjenju u boce, niti dolazi do taloženja u bocama vina tijekom skladištenja ili transporta (Van Sluyter i sur., 2015). Uobičajeni razlozi za pojavu zamućenja i nastajanje taloga su narušena mikrobiološka, tartaratna ili proteinska stabilnost (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Proteinsko zamućenje je vrlo česta posljedica proteinske nestabilnosti u proizvodnji bijelih vina (Pocock i sur., 2011). Ključan čimbenik u nastajanju proteinskog zamućenja jesu prisutni proteini porijeklom iz grožđa (uglavnom proteini slični taumatinu i hitinaze) koji s vremenom, u određenim uvjetima skladištenja i/ili transporta, mogu denaturirati i agregirati te stupiti u interakciju s drugim spojevima neproteinske prirode, pa ih je potrebno ukloniti iz vina prije nego ga se plasira na tržište (Waters i sur., 1996; Marangon i sur., 2011c). Zamućenje bijelog vina, za razliku od onog u crnom vinu, vrlo se lako detektira pa je zamućeno bijelo vino potrošačima uglavnom odbojno. Iako se radi samo o vizualnom nedostatku, nužno je spriječiti pojavu zamućenja jer je nepoželjno i prepreka je stavljanju vina na tržište (Marangon i sur., 2013).

Bistrenje je proces dodavanja tvari koje uzrokuju taloženje čestica (u ovom slučaju proteina) u otopini i potiču njihovu sedimentaciju. Bentonit, neproteinsko anorgansko bistrilo, smatra se najučinkovitijim za dobivanje proteinski stabilnog bijelog vina (Chagas i sur., 2012). Standardno se dodaje u vino nakon završene fermentacije, s ciljem smanjenja koncentracije ili potpunog uklanjanja (nestabilnih) proteina čime se smanjuje i mogućnost pojave zamućenja u vinu (Waters i sur., 2005; Lira i sur., 2015). Unatoč svim potencijalnim negativnim stranama i danas je u masovnoj upotrebi u globalnim okvirima (Lira i sur., 2014; Lira i sur., 2015), čemu pridonose i jednostavnost njegove primjene te relativno niski troškovi nabave (Waters i sur., 2005). Primjenom bentonita često se s talogom gube značajne količine (3-10 % volumena) te narušava kvaliteta preostalog vina (Waters i sur., 2005). Procjenjuje se da su gubici od ukupnog godišnjeg dohotka svjetske vinarske industrije koji proizlaze iz primjene bentonita za bistrenje oko milijardu dolara, što odgovara tržišnoj vrijednosti količine bijelog vina koja se godišnje proizvede na Novom Zelandu (Majewski i sur., 2011). Budući da nije selektivno bistrilo, bentonit može negativno utjecati na senzorsku kvalitetu konačnog vina (Puig-Deu i sur., 1996), uglavnom jer može adsorbirati i tako umanjiti koncentracije poželjnih hlapljivih spojeva arome (Armada i Falqué, 2007; Lambri i sur., 2012b; Vincenzi i sur., 2015). Uklanjanje navedenih nedostataka standardne primjene bentonita od velikog je interesa za

proizvođače te predstavlja veliki izazov znanstvenicima i stručnjacima koji ih potiče u nastojanju da pronađu djelotvornija alternativna bistrila ili razviju protokole s manjim potrebama za bentonitom.

Alternativni tretmani bistrenja, poput kombinacije zagrijavanja i primjene proteolitičkih enzima (Pocock i sur., 2003), primjene cirkonijeva dioksida (Pashova i sur., 2004; Lucchetta i sur., 2013), karagenana (Marangon i sur., 2013), različitih mezoporoznih materijala (Dumitriu i sur., 2018), itd., pokazali su se manje ili više učinkovitima, ali su još uvijek u fazi istraživanja ili nisu u primjeni u vinarskoj industriji zbog određenih nedostataka, najčešće nepraktičnosti i/ili ekonomske neisplativosti.

Prema nekim autorima, bistrenje mošta bentonitom može smanjiti ukupnu potrebnu dozu bentonita u usporedbi s uobičajenim bistrenjem i tako umanjiti gubitke u količini vina (Ewart i sur., 1980; Miller i sur., 1985; Lambri i sur., 2012b), međutim, uočen je negativan učinak takvih postupaka na sastav i senzorsku kvalitetu vina (Armada i Falqué, 2007; Lambri i sur., 2012b; Burin i sur., 2016). Alternativan pristup koji je u skladu s trenutno važećom zakonskom regulativom te se pokazao obećavajućim i relativno jednostavno primjenjivim je bistrenje mošta tijekom fermentacije. Mogućnost smanjenja ukupne doze bentonita, ali i poboljšanja kvalitete vina bistrenjem mošta tijekom fermentacije (u odnosu na standardno bistrenje vina nakon fermentacije), nagoviješteni su još u osamdesetim godinama prošlog stoljeća (Ewart i sur., 1980). Međutim, od tada pa do danas objavljeno je svega nekoliko znanstvenih radova na tu temu s utvrđenim manje ili više pozitivnim učincima (Pocock i sur., 2011; Lira i sur., 2014; Lira i sur., 2015).

Viša koncentracija proteina u vinu obično podrazumijeva i veću potrebu za bentonitom, iako ta veza nije strogo linearna (Mesquita i sur., 2001). Dosadašnja istraživanja provođena su s kultivarima relativno niskih (ispod 100 g/hL, Lira i sur., 2014; Lira i sur., 2015; Vela i sur., 2017) ili umjerenih (oko 150 g/hL, Pocock i sur., 2011) potreba za bentonitom, dok su učinci tretiranja vina kultivara s kritično visokim koncentracijama proteina neistraženi. Ovo istraživanje provest će se s grožđem malvazije istarske (*Vitis vinifera* L.), ekonomski najvažnijeg autohtonog bijelog kultivara u Republici Hrvatskoj (APPRRR, 2016), problematičnog po pitanju proteinske stabilnosti vina, s izrazito visokim potrebama za standardnim bentonitom na osnovi natrija (i do 300 g/hL).

Glavna hipoteza ovog istraživanja je da se pri određenim uvjetima bistrenja bentonitom tijekom alkoholne fermentacije proteinska stabilnost može postići s manjom ukupnom dozom

u odnosu na standardno bistrenje nakon fermentacije, uz očuvanje ili poboljšanje ključnih parametara fizikalno-kemijske i senzorske kvalitete. Sukladno navedenoj hipotezi postavljen je cilj ovog istraživanja: istražiti utjecaj različitih uvjeta bistrenja bentonitom tijekom alkoholne fermentacije na proteinsku stabilnost (potrebnu dozu bentonita), vrijednosti osnovnih fizikalno-kemijskih parametara, koncentracije fenolnih spojeva, koncentracije slobodnih i vezanih spojeva arome te senzorsku kvalitetu vina malvazije istarske, u svrhu procjene najboljeg omjera dobivenih količina i kvalitete stabiliziranog vina. U tu svrhu istražen je utjecaj sljedećih čimbenika: trenutka i načina primjene bentonita, načina pripreme bentonita, kombinirane primjene bentonita i tanina, temperature mošta tijekom bistrenja, doze bentonita te tipa bentonita.

2. OPĆI DIO

2.1. Proteinsko zamućenje u vinu

Uobičajeni razlozi pojave zamućenja i nastajanja taloga u vinu jesu narušavanje njegove mikrobiološke, tartaratne ili proteinske stabilnosti (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Proteinsko zamućenje vrlo je česta posljedica proteinske nestabilnosti u proizvodnji bijelih vina (Pocock i sur., 2011), za koju su ključni prisutni proteini porijeklom iz grožđa (uglavnom proteini slični taumatinu i hitinaze). Zamućenje se percipira kao mana vina, vrlo se lako uočava u bijelom vinu i predstavlja prepreku stavljanju vina na tržište. Zato je neophodno spriječiti pojavu zamućenja (Marangon i sur., 2013).

2.1.1. Proteini u vinu

Polisaharidi, polifenoli i proteini tri su glavne skupine makromolekula u moštu i bijelom vinu (Waters i sur., 2005). Proteini se u vinu nalaze u relativno niskim koncentracijama koje se kreću u rasponu od 15 do 230 mg/L te stoga nisu od velikog značaja za nutritivna svojstva vina. Njihova važnost je u utjecaju koji imaju na kvalitetu konačnog proizvoda, točnije, na stabilnost vina (Ferreira i sur., 2001). Proteini mogu dospjeti u vino iz kvasca tijekom fermentacije uslijed autolize njegovih stanica. Takvi proteini visoko su glikozilirane molekule i zapravo su manjim dijelom proteinskog sastava, a nazivaju se manoproteinima (Dupin i sur., 2000). Osim toga, egzocelularne proteaze kvasca mogu doprinijeti hidrolizi proteina tijekom fermentacije i na taj način izmijeniti sastav proteina u vinu (Feuillat i sur., 1980). Ipak, najveći dio proteina u bijelom vinu čine proteini porijeklom iz pulpe grožđa (Ferreira i sur., 2000a). Procesi tijekom vinifikacije, posebno fermentacije, dovode do promjena u njihovom profilu koji se tako na kraju proizvodnje razlikuje od početnog profila iz grožđa. Do gubitaka dijela proteina tijekom proizvodnje uglavnom dolazi i zbog djelovanja proteaza i denaturacije uslijed promjene pH (Bayly i Berg, 1967; Feuillat i sur., 1980; Murphey i sur., 1989; Ferreira i sur., 2000a). Međutim, proteini koji preostanu u vinu, među kojima i oni odgovorni za proteinsku nestabilnost, pokazuju svojstva velike otpornosti na proteolizu i na karakteristično nisku pH vrijednost vina (Waters i sur., 1992).

Problematičnim proteinima vina smatraju se proteini odgovorni za proteinsku nestabilnost, odnosno nastanak zamućenja. Proteini koji najviše doprinose proteinskoj nestabilnosti pripadaju skupinama hitinaza i taumatinu sličnih proteina (engl. *thaumatin-like*, TL) (Waters i

sur., 1996; Pocock i sur., 2000; Marangon i sur., 2011c; Vincenzi i sur., 2011). Hitinaze i TL proteini su globularni, kompaktni proteini relativno male molekulske mase (do 35 kDa), imaju pozitivan naboj pri pH vrijednosti vina i otporni su na tako nizak pH (Ferreira i sur., 2001; Waters i sur., 2005; Marangon i sur., 2014). β-Glukanaze također mogu doprinijeti nastanku zamućenja (Esteruelas i sur., 2009; Sauvage i sur., 2010), ali su prisutne u nižim koncentracijama te je njihov utjecaj manji u odnosu na hitinaze i TL proteine. Problematični proteini koje se smatra odgovornim za nastanak zamućenja nazivaju se još i proteinima povezanim s patogenezom grožđa (engl. *pathogenesis related*, PR), jer dio autora smatra da je njihova pojačana proizvodnja dodatno inducirana situacijama patološke ili slične naravi u kojima ih loza proizvodi kao obranu (van Loon, 1985; Datta i Muthukrishnan, 1999; Pocock i sur., 2000). Međutim, dokazano je da PR proteini nastaju tijekom normalnog sazrijevanja grožđa i mogu biti prisutni u visokim koncentracijama neovisno o izloženosti stresu i tzv. patogenima (Pocock i sur., 2000).

Proteini koji ne sudjeluju u nastajanju zamućenja jesu invertaze iz grožđa (Dambrouck i sur., 2005), glikoproteini i proteoglikani bogati arabinozom i galaktozom iz stijenki stanica grožđa (Waters i sur., 1994b) te manoproteini iz kvasca (Waters i sur., 1994a; Dupin i sur., 2000). Međutim, i oni mogu imati utjecaj na kvalitetu vina – mogu djelovati stabilizirajuće umanjujući potencijal zamućivanja vina uslijed viših temperatura (Schmidt i sur., 2009), utjecati na svojstva pjene pjenušavih vina (Vincenzi i sur., 2014) te interagirati sa spojevima arome (Jones i sur., 2008).

2.1.2. Nestabilni (PR) proteini

Hitinaze i TL proteini imaju različita svojstva u vidu toplinske stabilnosti i temperature mekšanja. Hitinaze su manje stabilne i na temperaturama iznad 40 °C denaturiraju puno brže, već za nekoliko minuta, u odnosu na TL proteine koji u istim uvjetima denaturiraju tek za nekoliko tjedana (Falconer i sur., 2010). Hitinaze se odmataju pri nižoj temperaturi (55 °C) nego TL proteini (62 °C) što ih također čini manje stabilnima (Falconer i sur., 2010), a osim toga, njihovo je odmatanje ireverzibilno (ne poprimaju prvotnu strukturu s hlađenjem) i dovodi do agregiranja i taloženja. TL proteini također mogu biti prisutni u obliku izo-formi koje se ireverzibilno odmataju i agregiraju te sudjeluju u pojavi zamućenja (Falconer i sur., 2010; Marangon i sur., 2011c; Marangon i sur., 2014).

Proteinska stabilnost nije u korelaciji s ukupnom koncentracijom proteina jer se pojedinačni proteini različito ponašaju (Bayly i Berg, 1967; Hsu i sur., 1987). Nestabilni proteini mogu se

taložiti u vinu i stvarati zamućenje čak i kad su prisutni u niskim koncentracijama (Waters i sur., 1991). Potencijal zamućivanja zapravo ovisi o sastavu proteina na početku vinifikacije, odnosno omjeru nestabilnih proteina i proteina koji djeluju stabilizirajuće (Vincenzi i sur., 2011).

2.1.3. Utjecaj drugih čimbenika u vinu na pojavu proteinske nestabilnosti i zamućenja

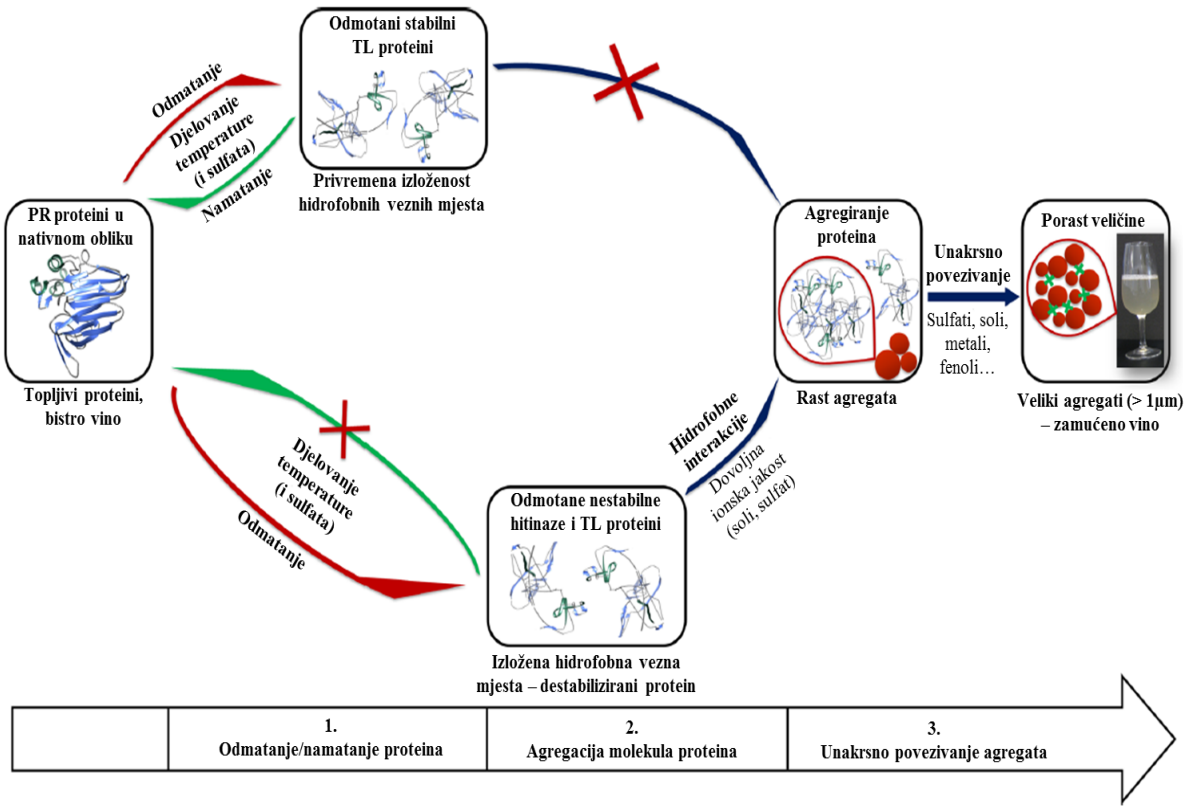
Nestabilni proteini imaju glavnu ulogu u nastanku zamućenja i proteinske nestabilnosti, ali i drugi čimbenici utječu na stvaranje zamućenja, kao što je već pokazano za koncentraciju etanola, fenolnih spojeva, polisaharida, organskih kiselina, sulfatnog aniona te za ionsku jakost i pH vrijednost vina (Pocock i sur., 2007; Jones i sur., 2008; Batista i sur., 2009; Marangon i sur., 2011b; Marangon i sur., 2011c; Dufrechou i sur., 2012; Gazzola i sur., 2012).

Pri pH vrijednosti vina nestabilni proteini imaju pozitivan naboj što samo po sebi može spriječiti njihovo agregiranje i time pojavu zamućenja u modelnim sustavima zbog međusobnog elektrostatskog odbijanja (Van Sluyter i sur., 2015). U modelnom se vinu prisutnost sulfatnih iona pokazala ključnom za agregiranje hitinaza uslijed zagrijavanja, ne samo zbog povećanja ionske jakosti otopine čime je umanjeno elektrostatsko odbijanje molekula proteina, nego i zbog povoljnog utjecaja na hidrofobne interakcije: posljedica interakcije sulfatnih iona i molekula vode bila je slabljenje vodikovih veza između molekula vode i proteina čime se potaknulo isoljavanje proteina i njihova agregacija (Marangon i sur., 2011b). Ovisno o ionskoj jakosti i temperaturi, pH vrijednost vina može sprječavati ili poticati nastanak zamućenja (Batista i sur., 2010; Dufrechou i sur., 2012). Na sobnoj temperaturi promjena pH vina u rasponu od 2,5 do 4,0 dovodi do odmatanja hitinaza, a TL proteini ostaju stabilni (Dufrechou i sur., 2013). Organske kiseline djeluju stabilizirajuće kroz elektrostatsku interakciju s proteinima čime sprečavaju interakciju fenolnih spojeva s proteinima koja može dovesti do zamućenja (Batista i sur., 2010). Vodikovim vezama ili hidrofobnim interakcijama molekule polifenola (primjerice kondenziranih tanina) mogu se povezivati s molekulama proteina, što može dovesti do njihove agregacije i taloženja, vjerojatno zbog unakrsnog povezivanja agregata u vidljive, veće agregate (Marangon i sur., 2010). Povezivanje proteina i neproteinskih molekula uključuje i kovalentne i nekovalentne interakcije. U oksidativnim uvjetima, fenolni spojevi mogu oksidirati u jako reaktivne kinone koji se kovalentno povezuju s proteinima. Polisaharidi mogu djelovati dvojako na potencijal zamućenja, a to može ovisiti o omjeru koncentracija polisaharida i proteina te o tipu proteina. Polisaharidi su se tako

pokazali ključnima u destabilizaciji TL proteina, ali ne i hitinaza (Gazzola i sur., 2012). Vino redovito sadrži niže koncentracije proteina nego mošt od kojeg je proizvedeno, a osim proteolize, taloženja uslijed interakcije s polifenolima i snižavanja pH vrijednosti, sniženju koncentracije proteina tijekom vinifikacije može doprinijeti i povišenje volumnog udjela etanola (Lagace i Bisson, 1990; Sauvage i sur., 2010). Siebert i sur. (1996a) su istraživanjem učinka pH vrijednosti i volumnog udjela etanola na pojavu zamućenja u modelnoj otopini zaključili da u uvjetima pH raspona svojstvenog vinima etanol nema značajan učinak na pojavu zamućenja, dok pokazuje umjeren učinak pri pH vrijednosti svojstvenoj za pivo. Siebert i Lynn (2003) pokazali su da pri volumnom udjelu etanola od 12 % vol. najintenzivnije zamućenje nastaje u uvjetima pH u rasponu od 4,0 do 4,5. Dodavanjem etanola u bijelo vino u manjim postocima Mesquita i sur. (2001) nisu značajno utjecali na zamućenje te su potvrdili zaključak Sieberta i sur. (1996a). Veći značaj etanol može imati utječući na bistrenje bentonitom kao što je opisano kasnije (poglavlje 2.3.).

2.1.4. Mehanizam nastajanja proteinskog zamućenja

U tek proizvedenom i izbistrenom vinu proteini su stabilni, u svom prirodnom obliku (Van Sluyter i sur., 2015). U uvjetima povišene temperature tijekom skladištenja može doći do odmatanja njihove strukture tako da hidrofobna vezna mjesta postaju dostupna za interakcije (Marangon i sur., 2010). Nestabilni TL proteini u svojoj strukturi imaju izloženu petlju stabiliziranu disulfidnom vezom. Ta veza se djelovanjem topline i sulfita reducira, čime hidrofobna petlja može stupiti u interakcije koje dovode do agregacije (Marangon i sur., 2014). Stabilni TL proteini imaju hidrofilna područja koja nisu povoljna za agregaciju i uslijed hlađenja se oni ponovo namataju u početni, prirodan oblik (Falconer i sur., 2010; Marangon i sur., 2014). Nakon odmatanja i otkrivanja hidrofobnih područja molekula, proteini se međusobno povezuju u agregate hidrofobnim interakcijama. Pritom čestice koje modificiraju ionsku jakost otopine (soli, sulfati) potiču povezivanje razmotanih molekula proteina i njihovu agregaciju (Marangon i sur., 2010). Agregati se unakrsno povezuju pri čemu su važan čimbenik sulfati i polifenoli. Postaju sve veći i konačno dolazi do njihove agregacije i taloženja (Dufrechou i sur., 2012). Sulfati i soli mogu smanjiti elektrostatsko odbijanje između molekula proteina, a polifenoli putem hidrofobnih interakcija unakrsno povezuju agregate proteina. Shema mehanizma nastajanja proteinskog zamućenja u vinu prikazana je na Slici 1.

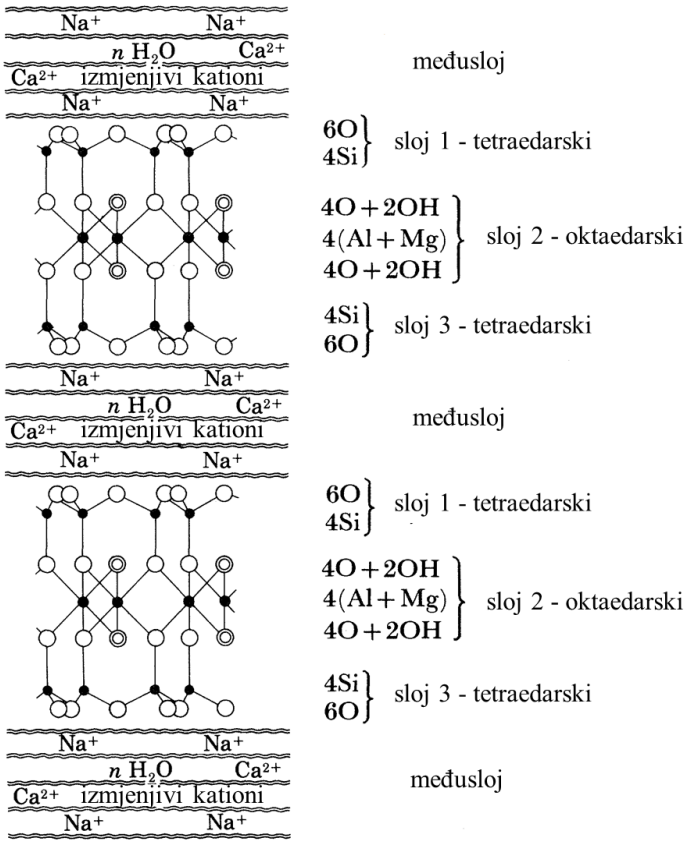


Slika 1. Mehanizam kojim je objašnjena pojava proteinskog zamućenja u vinu (Van Sluyter i sur., 2015)

2.2. Bentonit

Najčešći i najučinkovitiji način sprječavanja pojave zamućenja kao posljedice proteinske nestabilnosti bijelih vina u industrijskoj proizvodnji je bistrenje bentonitom (Ferreira i sur., 2001; Catarino i sur., 2008; Chagas i sur., 2012; Vela i sur., 2017). Komercijalno dostupan u obliku praha ili granula, priprema se za dodavanje u vino namakanjem, odnosno suspendiranjem u vodi u kojoj nabubri i tvori želatinastu masu.

Bentonit je prirodna glina, alumosilikat, smektit montmorilonitnog tipa, laminarne strukture tetraedarskih i oktaedarskih slojeva tako da je između dva tetraedarska sloja jedan oktaedarski sloj (Slika 2). Kad u tetradrima dolazi do supstitucije Si^{4+} trovalentnim kationima, odnosno u oktaedrima do supstitucije Al^{3+} dvovalentnim kationima, površina postaje hidrofilna. Negativan naboj koji preostaje nakon takvih supstitucija uravnotežen je prisutnim izmjenjivim kationima (npr. Na^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} i K^{+}) u prostoru između slojeva i na vanjskim površinama čestica gline (bentonita) koji se mogu otpuštati u medij (npr. vino) (Lambri i sur., 2016).



Slika 2. Struktura i kemijski sastav montmorilonita (Odom, 1984)

Molekule vode koje se okupljaju oko izmjenjivih kationa povezuju se s bentonitom vodikovim vezama, dipolnim privlačenjem i Van der Waalsovim silama te proširuju prostor između slojeva lamelarne strukture. Ekspanzija ili bubrenje ovisi o prisutnim kationima, ionskoj jakosti medija i drugim čimbenicima. Molekule vode se negativnim dijelom dipola okreću prema kationu i pritom oslabljuju elektrostatske interakcije s nabijenim slojem čime se povećava razdvajanje između dva sloja. Kationi s površine mogu se zamijeniti kationima u okolnom mediju. Smektiti općenito mogu nabubriti tako da održe svoju strukturu ili se struktura raspada i slojevi razdvoje (Bergaya i sur., 2012).

Prema kodeksu Međunarodne organizacije za vinovu lozu i vino (fr. *Organisation Internationale de la vigne et du vin*, OIV), u vinarstvu je dozvoljeno korištenje tri tipa bentonita: prirodnog natrijevog, prirodnog kalcijevog i aktiviranog (kalcijevog) bentonita (OIV, 2011). Prirodni kalcijev bentonit ima visok omjer Ca^{2+}/Na^{+} kationa, a prirodni natrijev bentonit visok Na^{+}/Ca^{2+} omjer i jače bubri (Catarino i sur., 2008) jer se u prostor između slojeva lamelarne strukture bentonita tijekom namakanja u mediju (vodi) u prisutnosti natrijevih kationa može umetnuti više molekula vode nego u prisutnosti kalcijevih kationa

(Lambri i sur., 2016). Za poboljšanje moći bubrenja i uklanjanja proteina kalcijev bentonit se može podvrći mineralnoj aktivaciji - vlažna bentonitna suspenzija zagrijava se na 80 °C u prisutnosti Na_2CO_3 pri čemu se Ca^{2+} ioni talože u obliku $CaCO_3$ te se dio međuslojnih i površinskih Ca^{2+} zamjenjuje s Na^+ ionima (Catarino i sur., 2008).

2.3. Međudjelovanje bentonita i proteina

Bentonit u suspenziji koja se primjenjuje za bistrenje ima veliku negativno nabijenu adsorpcijsku površinu koja može stupiti u elektrostatske interakcije s pozitivno nabijenim proteinima (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Negativni naboj stabiliziran je prisutnim izmjenjivim kationima u prostoru između slojeva lamelarne strukture i na vanjskim površinama čestica bentonita koji se mogu otpuštati u vino (Dordoni i sur., 2015a). Proteini adsorbirani na bentonit se zajedno s njim taloženjem uklanjaju iz vina (Van Sluyter i sur., 2015). Proteini kojima je pI viša od pH vina pozitivno su nabijeni i mogu se adsorbirati zamjenom s kationima na površini bentonita (Boulton i sur., 1996). Drugi kationi u otopini (vinu) natječu se s proteinima za adsorpciju na bentonit. Značajan utjecaj na kapacitet vezanja proteina na površinu i između slojeva lamelarne strukture bentonita mogu imati pH vrijednost otopine i volumni udio etanola (Blade i Boulton, 1988), temperatura i općenito fizikalna svojstva bentonita – specifična površina, gustoća naboja po jedinici površine, prirodni pH bentonita i indeks bubrenja (Lambri i sur., 2016).

Vrijednost pH medija vjerojatno je najznačajniji čimbenik jer može utjecati i na naboj proteina i na površinski naboj bentonita. Prema Dordoni i sur. (2015a) promjena pH vrijednosti u rasponu od 3,0 do 3,6 ima značajan utjecaj na adsorpciju proteina srednje i velike molekulske mase, koji se obično i teže uklanjaju, a proteini male molekulske mase uspješno se uklanjanju svim bentonitima bez obzira na pH vrijednost vina. Tražeći optimalne uvjete bistrenja bentonitom, u istraživanju s modelnim vinom i proteinom TL skupine izoliranim iz grožđanog soka, Muhlack i sur. (2016) došli su do zaključka da niži pH (3,0 u odnosu na 3,4) i viša temperatura (25 °C u odnosu na 5 °C) povećavaju adsorpcijski kapacitet natrijevog bentonita. Pri pH vrijednosti koja odgovara izoelektričnoj točki proteina, ukupan naboj proteina jednak je nuli i protein je najmanje topljiv. Vino ima pH vrijednost koja je blizu izoelektrične točke većine frakcija proteina u njemu. Ipak, većinu proteina u vinu karakteriziraju vrijednosti izoelektrične točke više od uobičajenog pH vina tako da je njihov ukupan naboj pozitivan (Zoecklein, 1988). Pri pH vrijednostima svojstvenim vinima, površina

bentonita je negativno nabijena što omogućuje adsorpciju proteina pozitivnih neto naboja i time njihovo uklanjanje iz vina (Lira i sur., 2015). Međutim, postoje i podaci koji ukazuju na moguća odstupanja, pa je tako Anelli (1977) utvrdila da je upravo u uzorku mošta kultivara malvazije istarske bilo prisutno 33 % negativno nabijenih proteina zbog izoelektrične točke niže od pH vrijednosti. Udio etanola u vinu također utječe na adsorpcijski kapacitet bentonita time što molekule etanola mogu zamijeniti molekule vode između slojeva lamelarne strukture i uzrokovati jače bubrenje. Jače bubrenje trebalo bi povećati broj izmjenjivih kationa rezultirajući povećanjem adsorpcijskog kapaciteta (Blade i Boulton, 1988). Pokazano je da volumni udio etanola iznad 10 % u modelnoj otopini vina značajno povećava adsorpcijski kapacitet bentonita (Blade i Boulton, 1988). Međutim, bolje razdvajanje slojeva bentonita zbog prisutnosti etanola je ograničeno i odnos nije u potpunosti linearan: na primjer, Sun i sur. (2007) utvrdili su maksimalan kapacitet bentonita za adsorpciju albumina iz kokošjeg jajeta (ovalbumin) u modelnoj otopini pri 12 vol. % etanola, dok je pri nižim i višim volumnim postocima etanola kapacitet bio slabiji. Također, moguća je adsorpcija samo onih proteina koji su dovoljno mali da uđu u strukturu bentonita (Achaerandio i sur., 2001). Trajanje kontakta s bentonitom također je važno za učinkovito bistrenje. Uobičajena praksa je dulje vrijeme kontakta vina i bentonita (nekoliko dana) (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b), međutim, u literaturi se kao optimalan kontaktni period spominje i kraće vrijeme jer je u laboratorijskim uvjetima s modelnim otopinama pokazano da se već u manje od 30 sekundi kontakta, odnosno nakon 20 - 40 minuta postiže maksimum adsorpcije proteina na bentonit (Blade i Boulton, 1988; Sun i sur., 2007). Viša temperatura pokazala se pogodnijom za adsorpciju proteina na bentonit (Sun i sur., 2007).

Općenito, moštevi i vina s visokim sadržajem proteina trebaju relativno velike količine bentonita da bi postigli proteinsku stabilnost u usporedbi sa moštevima i vinima s manje proteina, iako veza između potreba za bentonitom i koncentracije proteina nije strogo linearna (Mesquita i sur., 2001). Ukupan sadržaj proteina je koristan podatak, ali ne daje informaciju o riziku pojave zamućenja. Za to su važniji podaci o vrsti proteina i njihovim relativnim koncentracijama (Lambri i sur., 2012a).

2.4. Međudjelovanje bentonita i ostalih sastojaka mošta i vina

Osnovna namjena primjene bentonita u vinarstvu je dobivanje proteinski stabilnih vina, tj. uklanjanje proteina koji bi kasnije u određenim uvjetima mogli dovesti do pojave proteinske

nestabilnosti odnosno zamućenja. Međutim, osim proteina, bentonit može stupiti u interakciju s kemijskim spojevima odgovornim za senzorska svojstva, kao što su, na primjer, fenoli (Salazar i sur., 2006) ili hlapljivi spojevi arome (Lira i sur., 2015), te ih na koncu djelomično ukloniti i tako značajno umanjiti kvalitetu vina. Njihovo uklanjanje može biti neizravno, uslijed interakcije s proteinima, ili izravno, adsorpcijom na površinu bentonita (Lambri i sur., 2010).

2.4.1. Djelovanje bentonita na fenolne spojeve

Fenolni spojevi u vinu doprinose senzorskim svojstvima vina, osobito boji, okusu i astringentnosti (Vrhovsek, 1998), utječu na stabilnost i dozrijevanje vina, a zbog njihovog antioksidacijskog djelovanja umjereno konzumiranje vina može imati pozitivan učinak na ljudsko zdravlje (Frankel i sur., 1995; Bravo, 1998; Gris i sur., 2013). Većinom su porijeklom iz grožđa, a manjim dijelom nastaju kao proizvodi kvaščevog metabolizma ili se ekstrahiraju iz drveta tijekom čuvanja vina (Kennedy, 2008). Fenolni spojevi u vinu dijele se u dvije glavne skupine: flavonoidi (antocijani, flavanoli, flavonoli i drugi) i neflavonoidi (fenolne kiseline, fenolni alkoholi i stilbeni) (Kennedy i sur., 2006). Flavonoidi se pretežno nalaze u sjemenkama, kožicama i peteljkama groža pa su crna vina bogatija flavonoidima i fenolima općenito. Za bijela vina, s mnogo nižim koncentracijama fenolnih spojeva, karakteristični su neflavonoidi, odnosno fenolne kiseline kao glavni sastojci pulpe bobica grožđa (Jackson, 2008). Hidroksicimetne kiseline te flavonoli kao žuti pigmenti mogu doprinijeti boji bijelih vina (Somers i Ziemelis, 1985; Cheynier i sur., 1990; Castillo-Muñoz i sur., 2010). Hidroksicimetne kiseline i flavanoli osobito su osjetljivi na oksidaciju zbog koje može doći do stvaranja žuto obojenih produkata ili do posmeđivanja vina (Singleton i sur., 1984; Guyot i sur., 1996). Flavanolni monomeri, dimeri i oligomeri smatraju se važnima za osjet gorčine, a astringentnost se uglavnom povezuje s prisutnim taninima (proantocijanidinima ili flavanolnim polimerima) (Kennedy i sur., 2006), ali i flavonolima (Sáenz-Navajas i sur., 2012). Fenolni sastav vina ovisi o kultivaru grožđa, njegovoj zrelosti, okolišnim uvjetima u vinogradu (klima, tlo), zdravstvenom stanju grožđa, o tehnologiji proizvodnje vina uključujući predfermentativne postupke (sumporenje, primjena aksorbinske kiseline, maceracija) i način provođenja fermentacije, o taloženju, oksidaciji, adsorpciji, o primjeni sredstava za bistrenje i o uvjetima dozrijevanja (Balík i sur., 2008; Fang i sur., 2008; Kennedy, 2008; Saucier, 2010).

Dosadašnjih rezultata o utjecaju bistrenja i stabilizacije vina primjenom bentonita na koncentraciju i sastav fenolnih spojeva nema puno te se rijetka suvremena saznanja uglavnom odnose na crna vina. Isto tako, glavnina dosadašnjih spoznaja odnosi se na fenolne spojeve većih molekulskih masa, dok je utjecaj bentonita na jednostavnije fenolne spojeve gotovo u potpunosti neistražen. Chagas i sur. (2012) su uspoređujući učinke različitih sredstava za bistrenje – kazeina, ovalbumina, ribljeg mjehura, hitozana, hitina i PVPP-a, za koje je poznato da uklanjaju polifenole (Spagna i sur., 1996), s učinkom bistrenja bentonitom na sadržaj ukupnih proteina i fenola u bijelom vinu, utvrdili da je bentonit najučinkovitiji u proteinskoj stabilizaciji vina jer uklanja najveći dio proteina, ali i da ujedno u najvećoj mjeri snizuje koncentraciju polifenola u vinu. Prema Zoeckleinu i sur. (1990) bentonit može adsorbirati fenolne spojeve većih molekulskih masa, kao što su antocijanini, te komplekse proteina i fenolnih spojeva. Yıldırım (2011) je u istraživanju s crnim vinima potvrdio da bistrenje bentonitom dovodi do snižavanja koncentracije ukupnih fenola te je također pretpostavio da je bentonit mogao indirektno adsorbirati fenolne spojeve adsorbiranjem proteina na koje su se oni vezali. Istražujući utjecaj bistrenja različitim bistrilima na pojedine frakcije proantocijanidina crnog vina Gonçalves i Jordão (2009) objavili su rezultate prema kojima bentonit spada u grupu bistrila koja uklanjaju fenolne spojeve u manjoj mjeri: primjena bentonita rezultirala je sniženjem koncentracije monomera i dimera te polimernih proantocijanidina proporcionalno dozi koja je primijenjena, ali uglavnom ne značajnim u odnosu na kontrolni tretman, osim za dimerne procijanidine (21 %) s najvišom primijenjenom dozom (50 g/hL). Primjenom doza od 120, 240 i 480 g/hL Threlfall i sur. (1999) zapazili su da se proporcionalno snizuje koncentracija resveratrola u crnom vinu pri čemu je tek najviša primijenjena doza dovela do značajnog sniženja koncentracije. Još je ranije primijećeno da bistrenje vina bentonitom značajno smanjuje sadržaj ukupnih fenola, da pritom gotovo nema utjecaj na neflavonoidne fenole, ali da utječe na sniženje koncentracije flavonoida (Main i Morris, 1994), za koje se smatra da doprinose posmeđivanju vina enzimatskim putem (Simpson, 1982). Poznato je da bentonit, osim proteina i fenola, može adsorbirati enzime i druge pozitivno nabijene molekule (Zoecklein i sur., 1990; Main i Morris, 1991). S obzirom na inhibicijsku aktivnost bentonita prema enzimima (Main i Morris, 1991; Jaeckels i sur., 2015) pretpostavljeno je da bi njegova primjena tijekom fermentacije značajno utjecala na dinamiku djelovanja polifenol-oksidaze (Main i Morris, 1991), a time i na konačne koncentracije esterificiranih i slobodnih hidroksicimetnih kiselina i ostalih važnih fenola. Na primjeru enzima kateholaze (Main i Morris, 1994) i polifenol-oksidaze (Ough i sur., 1969) pokazalo se da tretman bentonitom može smanjiti aktivnost enzima odgovornih za reakcije

oksidacije fenolnih spojeva utjecanjem na fizikalne promjene u strukturi enzima ili taloženjem enzima. Međutim, prema Zoeckleinu i sur. (1990), bentonit neće zaštiti hidroksicimetne kiseline od oksidacije i polimerizacije u produkte koji se često uklanjaju tijekom fermentacije adsorpcijom na stanice kvasca. Dokazano je da postoje interakcije fenolnih spojeva i proteina što je potvrdilo da je njihovo neizravno uklanjanje bentonitom moguće (Salazar i sur., 2006). Yıldırım (2011) je također pretpostavio da bentonit može neizravno adsorbirati fenolne spojeve adsorbiranjem proteina na koje su se oni vezali. Dordoni i sur. (2015a) pokazali su da se uklanjanje polifenolnih spojeva bentonitom odvija posredstvom proteina jer je u korelaciji s uklanjanjem proteina. Isto tako, pokazana je mogućnost smanjenja koncentracije polifenola bez značajnijeg uklanjanja proteina, što je potvrdilo mogućnost izravne adsorpcije polifenola na površinu bentonita, vjerojatno uslijed jakih kemijskih interakcija (Lambri i sur., 2013).

2.4.2. Djelovanje bentonita na spojeve arome

Aroma je jedan je od najvažnijih parametara odgovornih za kvalitetu vina. Aroma, odnosno miris i mirisna komponentna okusa vina potječu od hlapljivih spojeva koji se u njemu nalaze. Pojedini hlapljivi spoj može imati veći ili manji utjecaj na aromatski profil vina, ovisno o omjeru koncentracije u kojoj je prisutan i praga osjetljivosti mirisa, koji je pak definiran kao najmanja koncentracija u kojoj spoj mora biti prisutan da ga se može osjetiti njuhom (Grosch, 2001). Navedeno znači da spoj koji se u vinu nalazi u niskoj koncentraciji može imati veći utjecaj na aromu vina od spoja prisutnog u višoj koncentraciji ako ima veći omjer koncentracije i praga osjetljivosti. Spojevi arome općenito se mogu svrstati u tri glavne skupine pa se razlikuju sortna (tzv. primarna) aroma, fermentacijska (tzv. sekundarna) aroma i aroma dozrijevanja (tzv. tercijarna aroma) (Ruiz i sur., 2019). Sortnu aromu čine spojevi koji potječu iz grožđa i imaju najveću ulogu u određivanju sortnog i/ili zemljopisnog karaktera vina. Najvažnije skupine spojeva sortne arome su terpeni, C_{13}-norizoprenoidi, metoksipirazini i tioli. Terpeni i norizoprenoidi javljaju se u slobodnom, hlapljivom obliku i kao vezani, uglavnom glikozilirani, nemirisni prekursori slobodnih oblika. Terpeni, uglavnom monoterpeni, poznati su kao nositelji karakteristične *muškatne* arome, odnosno prepoznatljivih *cvjetnih*, *voćnih* i *citrusnih* nota, iako se glavni predstavnici, kao što su linalol i geraniol, mogu naći u vinima svih poznatih sorti. Najvažniji predstavnici C_{13}-norizoprenoida, β-damaskenon te α- i β-jonon, odgovorni su za karakteristične *cvjetne* i *voćne* mirise, a metoksipirazini aromi vina doprinose tzv. *zelenim* i *biljnim* aromama, karakterističnim za, primjerice, vina kultivara crnog grožđa *cabernet sauvignon*. Hlapljivi tioli

koji se tijekom fermentacije oslobađaju iz vezanih prekursora, S-cistein konjugata, karakteristični su za aromu vina kultivara *sauvignon blanc* kojoj doprinose mirisima koji podsjećaju na *tropsko voće*, šimšir i žutilovku (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Coetzee i du Toit, 2012) iako se u posljednje vrijeme pronalaze u vinima sve više kultivara. Fermentacijsku aromu čine spojevi koji se oslobađaju tijekom predfermentativne prerade grožđa djelovanjem različitih enzima, na primjer metanol i alkoholi sa šest atoma ugljika u molekuli (C_6-alkoholi), te spojevi koji nastaju tijekom alkoholne i malolaktične fermentacije djelovanjem kvasaca, odnosno bakterija. Kvantitativno, spojevi fermentacijske arome čine najveći dio ukupne arome vina (Polášková i sur., 2008). Glavne skupine hlapljivih spojeva koji se sintetiziraju uslijed kvaščeve aktivnosti tijekom fermentacije su viši alkoholi, nositelji mirisa koji podsjećaju na alkohol i ostala otapala, kratkolančane i srednjelančane masne kiseline koje doprinose mirisima nalik mastima, siru, pa čak i užeglosti, etilni i acetatni esteri koji imaju ključan doprinos u stvaranju *voćnih* i *cvjetnih* aroma vina, te aldehidi koji doprinose aromama po maslacu, *voću* i *orašastom voću* (Lambrechts i Pretorius, 2000; Molina i sur., 2007). Tercijarnu aromu čine spojevi koji nastaju tijekom dozrijevanja i starenja vina kao posljedica kemijskih i biokemijskih reakcija hidrolize, esterifikacije i oksidacije (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Razvoj aroma u grožđu i aroma vina ovisi o kultivaru, tlu i klimatskim uvjetima u području uzgoja, vinogradarskim postupcima, zdravstvenom stanju i zrelosti grožđa, tehnologiji prerade grožđa, predfermentativnoj obradi i strategiji provođenja fermentacije te postfermentativnim postupcima kao što su bistrenje, filtracija i način dozrijevanja (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Styger i sur., 2011).

Zbog neselektivnosti bentonita, bistrenje s ciljem uklanjanja proteina može rezultirati negativnim učinkom na kvalitetu konačnog vina uklanjanjem hlapljivih aroma (Armada i Falqué, 2007; Lambri i sur., 2010, Lambri i sur., 2012b; Vincenzi i sur., 2015). Gubitak spojeva arome može biti posljedica izravne adsorpcije na bentonit (Voilley, 1990) ili neizravnog uklanjanja posredstvom uklanjanja proteina na koje se hlapljivi spojevi također mogu adsorbirati (Lubbers i sur., 1993; Lubbers i sur., 1996). Osim toga, tretman bistrenja bentonitom može dovesti do smanjenja sadržaja dušika i drugih nutrijenata u moštu i vinu što također može imati negativan utjecaj na proizvodnju spojeva arome (Lira i sur., 2015). Isto tako, uvjetno negativan utjecaj bentonita na spojeve arome može se ostvariti putem inhibiranja odnosno adsorbiranja enzima β-glukozidaze koja svojom aktivnošću hidrolizira i oslobađa glikozidno vezane terpene. Vincenzi i sur. (2015) istražili su učinak dodatka bentonita u modelnoj otopini koja je sadržavala spojeve arome izdvojene iz vina te zaključili

da bentonit samostalno putem adsorpcije može ukloniti dio etilnih estera i masnih kiselina, dok se u prisutnosti proteina povećava gubitak estera dugolančanih masnih kiselina. Isti autori nisu utvrdili značajan utjecaj na gubitak koncentracija monoterpena. Zaključili su da se interakcija spojeva arome s bentonitom i proteinima bazira na njihovoj hidrofobnosti. Lambri i sur. (2013) također su pomoću modelnog vina istražili adsorpciju spojeva arome na bentonit i došli do spoznaje da je njihova interakcija uglavnom fizikalna, ali može biti i kemijska, posebno za etil-estere. Puig i Deu (1996) pokazali su da vino u kojem je bistrenje provedeno bentonitom pred sam početak fermentacije ima gotovo 50 % niže koncentracije etilnih i acetatnih estera, alkohola i terpena nego vino koje nije bistreno. Armada i Falque (2007) uočili su ukupni gubitak monoterpena i C_{13}-norizoprenoida u iznosu od 13 % u vinu kultivara *albariño* proizvedenom od mošta bistrenog bentonitom te 33 %-tni gubitak C_6 spojeva predfermentativne arome u odnosu na kontrolno vino, što se u nekim slučajevima može smatrati i pozitivnim jer se veće koncentracije C_6 spojeva u vinu mogu negativno odraziti na aromu.

2.5. Tehnike i pristupi kao alternative bistrenju bentonitom prije punjenja u boce

Zbog potencijalnih negativnih posljedica primjene bentonita, među kojima se ističu gubitak značajnog volumena vina s talogom (Majewski i sur., 2011), narušavanje senzorske kvalitete vina (Armada i Falqué, 2007; Lambri i sur., 2012b; Vincenzi i sur., 2015) te drugi problemi poput troškova povezanih sa zbrinjavanjem taloga nastalog primjenom bentonita (Salazar i sur., 2017), proizvođači nastoje minimizirati količinu potrebnog bentonita, a znanstvenici i stručnjaci nastoje pronaći učinkovitije alternative bentonitu ili razviti protokole kojima bi se smanjile potrebe za bentonitom.

Neka od do danas predloženih alternativnih rješenja, za koje su obavljena preliminarna istraživanja, jesu ultrafiltracija (Hsu i sur., 1987; Flores i sur. 1990), primjena proteolitičkih enzima i protočna pasterizacija (Pocock i sur., 2003; Marangon i sur., 2012), primjena adsorbensa poput silikagela, hidroksiapatita i aluminijevog oksida (Sarmento i sur., 2000), cirkonijevog oksida (Pashova i sur., 2004; Salazar i sur., 2006; Marangon i sur., 2011a), prirodnih zeolita (Mierczynska-Vasilev i sur., 2019), hitina (Vincenzi i sur., 2005) i hitozana (Colangelo i sur., 2018), karagenana (Marangon i sur., 2013) te primjena određenih manoproteina (Ribeiro i sur., 2014).

Postupak membranske ultrafiltracije pokazao je određene nedostatke jer je osim proteina uklonio i druge spojeve velike molekulske mase, poput polisaharida koji doprinose kvaliteti vina. Hsu i sur. (1987) su tehnologijom membranske ultrafiltracije postigli 99 %-tno uklanjanje proteina, međutim Flores i sur. (1990) su nakon istovrsnog postupka primijetili istovremenu redukciju boje bijelog vina, koncentracije ukupnih fenola i spojeva arome. Osim toga, oprema i izvedba ovakvog procesa obrade iziskivali bi velika novčana ulaganja.

Pocock i sur. (2003) proveli su tretmane s pepsinom životinjskog porijekla te komercijalnom smjesom fungalnog pepsina i pektolitičkog enzima koja se i inače koristi u proizvodnji vina, ali je preporučena doza mnogo niža od primijenjene u tom istraživanju. Primjena proteolitičkih enzima i protočne pasterizacije grijanjem pri 90 °C tijekom 1 minute pokazala se učinkovitom u razgradnji nestabilnih proteina (TL proteina i hitinaza) te je potrebna doza bentonita za postizanje proteinske stabilnosti vina smanjenja. Međutim, tretmani nisu bili jednako uspješni u pilot-mjerilu, a za ostvarenje komercijalne primjene proteolitički enzimi trebali bi biti još učinkovitiji. Osim toga, nakon tretmana zagrijavanja pepsin je zaostajao u vinu te nije bio u potpunosti uklonjen ni bistrenjem bentonitom. Primijećen je vrlo slab utjecaj na aromu kao posljedica zagrijavanja i djelovanja enzima. Uspješne tretmane proveli su Marangon i sur. (2012) s kombinacijom pepsina fungalnog porijekla i grijanja pri 75 °C tijekom 1 minute čime su potpuno eliminirali potrebu za bistrenjem bentonitom. Primjena je odobrena komercijalno na području Australije 2015. godine, međutim ne i globalno (AWRI, 2015). Kao osnovni nedostatak ovakvog postupka pokazala se potreba za značajnim tehničkim zahvatima u vinariji te visoka cijena početne investicije, stoga isti nije ekonomski isplativ za većinu proizvođača vina.

Cirkonijev dioksid kao adsorbens za proteine primijenili su Pashova i sur. (2004) u kontinuiranom procesu proteinske stabilizacije vina te Marangon i sur. (2011a) potapanjem metalnih kaveza s peletima adsorbensa u vino. Kontinuirani proces nije bio učinkovit zbog vrlo spore adsorpcije proteina i zahtjevne regeneracije materijala, a iako je u diskontinuiranom procesu regeneracija bila jednostavnija, vino se moralo konstantno miješati tijekom nekoliko dana što je predstavljalo nezanemariv trošak u proizvodnji. Osim toga, primijećen je negativan učinak na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva vina uz gubitak intenziteta voćne arome (Pashova i sur., 2004; Salazar i sur., 2006; Marangon i sur., 2011a). Iako su Lucchetta i sur. (2013) poboljšali postupak Marangona i sur. (2011a) dodajući pelete cirkovnijeva dioksida tijekom fermentacije da bi iskoristili prirodno miješanje i ostvarili

uštede, tretmani s cirkonijevih dioksidom nisu se pokazali prihvatljivi u vinarstvu zbog nepraktičnosti i relativno visoke cijene.

Vincenzi i sur. (2005) uspješno su uklonili hitinaze hitinom, čime su postigli značajno smanjenje zamućenja, ali nisu istražili utjecaj na senzorsku kvalitetu vina. Colangelo i sur. (2018) su primjenom hitozana u laboratorijskim uvjetima koji nisu u potpunosti vjerno simulirali bistrenje bentonitom postigli značajno uklanjanje hitinaza, s manjim negativnim učinkom na aromu, značajnim za slobodne terpene.

Postupci alternativni primjeni bentonita s ciljem postizanja proteinske stabilnosti vina, odnosno sniženja doze bentonita potrebne za postizanje proteinske stabilnosti, pokazali su se relativno uspješni u uklanjanju nestabilnih proteina iz vina, ali uglavnom nisu bili praktični za komercijalnu primjenu, pokazali su se ekonomski neisplativi i/ili su imali različite negativne učinke. Takvi postupci još su na eksperimentalnoj razini i nisu dopušteni u proizvodnji na razini EU te nije izgledno da će biti industrijski primjenjiva alternativa bentonitu u bližoj budućnosti. Stoga su današnja istraživanja simultano usmjerena i na razvijanje protokola bistrenja bentonitom koji bi bili učinkovitiji od standardne primjene bentonita nakon fermentacije, s ciljem ostvarivanja poboljšanja u pogledu smanjenja doze potrebne za postizanje proteinske stabilnosti, a ujedno i umanjivanja negativnog učinka na spojeve aroma i fenole, odnosno očuvanja senzorske kvalitete vina.

Prema Ewart i sur. (1980), kasnije Miller i sur. (1985) i u novije vrijeme Lambri i sur. (2012b), bistrenje mošta bentonitom može sniziti ukupnu potrebnu dozu bentonita u usporedbi s uobičajenim bistrenjem nakon fermentacije i tako umanjiti gubitke u količini vina. Međutim, većinom je uočeno da se takvim tretmanom negativno utječe na količinu kvascu dostupnog dušika, na koncentraciju sastojaka sortne i fermentacijske arome te na senzorsku kvalitetu vina (Armada i Falque, 2007; Lambri i sur., 2010; Lambri i sur. 2012b; Burin i sur., 2016).

Alternativan pristup bistrenju bentonitom koji je u skladu s trenutno važećom zakonskom regulativom te se pokazao obećavajućim i relativno jednostavno primjenjivim je bistrenje mošta tijekom fermentacije. Ewart i sur. (1980) među prvima su primijetili prednosti ovog načina nestandardne primjene bentonita u pogledu smanjenja ukupne doze i poboljšanja kvalitete vina, a do danas je objavljen vrlo mali broj znanstvenih radova na tu temu s utvrđenim manje ili više pozitivnim učincima (Pocock i sur., 2011; Lira i sur., 2014; Lira i sur., 2015), iako uglavnom uz vrlo slabo istražene popratne učinke na važne senzorski aktivne

kemijske sastojke i senzorsku kvalitetu vina (Lira i sur., 2014; Lira i sur., 2015). Kao izrazito pozitivan primjer istaknula se studija autora Lire i sur. (2015) u kojoj je postignuto čak i do 50 %-tno smanjenje potrebne ukupne doze bentonita nakon bistrenja tijekom fermentacije u odnosu na standardno bistrenje nakon fermentacije, uz određena poboljšanja u pogledu pojedinih parametara kemijskog sastava i senzorske kvalitete vina kultivara *albariño*. Isti autori utvrdili su značajan utjecaj trenutka primjene bentonita tijekom različitih faza fermentacije, s najboljim rezultatima postignutim nakon tretmana bistrenja u sredini ili pred sam kraj fermentacije.

Unatoč obećavajućim rezultatima, učinak bistrenja bentonitom tijekom fermentacije na proteinsku stabilnost (potrebnu dozu bentonita) i sadržaj različitih ključnih kemijskih i senzorskih parametara vina općenito je izrazito slabo izučen. Svega dvije objavljene publikacije bavile su se uglavnom osnovnim, tzv. slobodnim hlapljivim spojevima (Lira i sur., 2014; Lira i sur., 2015). Do danas uopće nije istražen utjecaj primjene bentonita u fermentaciji na koncentracije važnih glikozidno vezanih spojeva arome, iako se mogu pretpostaviti različite interakcije ovisno o uvjetima primjene jer bentonit može djelovati kao adsorbens hlapljivih spojeva arome (Lambri i sur., 2013; Vincenzi i sur., 2015), ali i kao inhibitor aktivnosti enzima β-glukozidaze (Jaeckels i sur., 2015) koji je odgovoran za cijepanje glikozidnih veza tijekom fermentacije i oslobađanje spojeva arome. S obzirom na inhibitornu aktivnost bentonita prema enzimima, pretpostavljeno je da bi njegova primjena tijekom fermentacije značajno utjecala na dinamiku djelovanja polifenol-oksidaze (Main i Morris, 1991), a samim tim i na konačne koncentracije esterificiranih i slobodnih hidroksicimetnih kiselina i ostalih važnih fenola. Međutim, utjecaj primjene bentonita u fermentaciji na pojedinačne fenole u vinu do danas nije istraživan. Dosadašnja istraživanja bistrenja bentonitom u fermentaciji bila su, uvjetno rečeno manjkava, iz razloga jer su se odnosila uglavnom na nedorađena vina (Lira i sur., 2015), dok njihova učinkovitost i popratni učinci u odnosu na standardnu primjenu nisu provjeravani u finaliziranim, proteinski stabilnim vinima.

Osim utjecaja trenutka primjene bentonita (Lira i sur., 2015), do danas nije istražen utjecaj različitih uvjeta za koje se u vinarskoj praksi potvrdilo da mogu utjecati na djelotvornost bentonita, a čijim bi se variranjem mogla optimirati njegova primjena tijekom fermentacije, kao što su npr., doza i način pripreme te način dodavanja bentonita, kombinirani utjecaj dodatka bentonita i komercijalno dostupnih tanina s deklariranom reaktivnosti prema proteinima te utjecaj temperature mošta tijekom bistrenja.

Šaržno dodavanje bentonita (u jednoj dozi) najčešći je način njegove primjene za bistrenje vina i primjenjuje se od samih početaka komercijalne upotrebe bentonita u te svrhe zabilježenih 30-ih godina prošlog stoljeća (Muhlack i sur., 2006). S druge strane, tzv. *in-line* doziranje podrazumijeva dodavanje pripremljenog bentonita u vino u zatvorenom sustavu pumpanjem do mjesta injektiranja, do kojeg se pumpanjem dovodi i vino. Doziranje suspenzije bentonita u vino provodi se kontinuiranim procesom, u zoni kontakta vina i bentonita odvija se miješanje, dolazi do adsorpcije proteina, a bentonit se potom kontinuiranim centrifugiranjem odjeljuje od vina (Muhlack i sur., 2006; Nordestgaard i sur., 2007). Muhlack i sur. (2006) istražili su ovaj način bistrenja koji se danas koristi u vinarstvu, iako rijetko, posebno zbog potrebe za većim materijalnim ulaganjima i posebnih tehnoloških zahtjeva. Autori su izbistrili mošt i vino u trajanju od 2 minute kontakta s bentonitom i nisu primijetili značajan učinak na senzorska svojstva vina. Međutim, primjena ovakvog postrojenja pokazala se problematičnom i zahtjevnom zbog nepotpunog izdvajanja bentonita centrifugiranjem, koji se taložio i stvarao gubitke. Primjenom istovremenog doziranja i izdvajanja bentonita nakon završetka alkoholne fermentacije Muhlack i Colby (2018) postigli su 84 %-tno smanjenje količine zaostalog bentonita u bistrenom vinu. U oba slučaja nije istražen utjecaj in-line postupka bistrenja na fizikalno-kemijske parametre, uključujući arome i fenole te specifičnija senzorska svojstva vina, pa se nisu mogli donijeti zaključci u tom pogledu. U ovom izraživanju pokušalo se primijeniti sličan princip bistrenja tijekom fermentacije, u mnogo jednostavnijem obliku koji je praktično izvediv, bez potrebe za instalacijom dodatne opreme i bez izmjene osnovnih postupaka bistrenja. Ideja je bila simulirati kontinuirani proces bistrenja dodavanjem bentonita na način da se veću dozu, koja bi se inače dodala odjednom, dodaje u nekoliko manjih obroka te potom istražiti učinke takve primjene bentonita na proteinsku stabilnost i kvalitetu vina.

U pripremi bentonita uobičajeno je korištenje vodovodne vode. Na primjer u Poreču, gdje je istraživanje provedeno, vodovodna voda je standardno srednje tvrda do tvrda (IVB, 2017-2019), uslijed čega je izgledno da može doći do zamjene Na^+ iona bentonita Ca^{2+} ionima iz vodovodne vode (Plavša i Palman, 2011) čime se pojačavaju veze među lamelama bentonita i smanjuje njegovo bubrenje (Kawatra i Ripke, 2003). Bistrenje u takvim slučajevima rezultira manjim udjelom taloga, ali se smanjuje mogućnost adsorpcije proteina pa je potrebna viša doza bentonita, za razliku od bistrenja bentonitom pripremljenim s deioniziranom vodom (Plavša i Palman, 2011). Utvrđeno je da je bistrenje bentonitom pripremanim s deioniziranom vodom u manjoj mjeri snizilo senzorsku kvalitetu vina u odnosu

na kontrolni, nebistreni uzorak, osobito kad se radilo o natrijevom bentonitu. Vrijedi istaknuti da u literaturi uopće nema podataka o utjecaju načina pripreme po pitanju tvrdoće vode na koncentracije važnih spojeva arome i fenola, a utjecaj tvrdoće vode korištene za pripremu bentonita na njegovu učinkovitost uopće nije istražen ni u kontekstu bistrenja u fermentaciji.

Enološki tanini široko su prihvaćeni kao aditivi u modernom vinarstvu te komercijalni dobavljači promiču njihovu upotrebu za poboljšanje boje, zaštitu od oksidacije te poboljšanje okusa (Sonni i sur., 2009; Sonni i sur., 2011; Larcher i sur., 2015). Tanini su dobro poznati po interakcijama s proteinima (Hagerman, 1989; Haslam i sur., 1992; Terrier i sur., 2009) pa pojedini dobavljači ističu to svojstvo na deklaraciji, međutim primjena enoloških tanina kao pomoćnih sredstava u bistrenju do danas je izučavana vrlo rijetko, a uopće nije istražena primjena u fermentaciji zajedno s bistrenjem bentonitom tijekom fermentacije. Radeka i sur. (2009) su predfermentativnom primjenom različitih enoloških tanina tijekom prerade grožđa postigli određena poboljšanja u pogledu smanjenja potrebne doze bentonita nakon fermentacije pa ostaje za istražiti može li primjena tanina u fermentaciji, zajedno s bentonitom, rezultirati istim ili još boljim učinkom na smanjenje doze te kako djeluje na sastav i senzorska svojstva vina.

Iako je iz rezultata istraživanja na modelnim vinima poznato da bentonit pokazuje bolja svojstva adsorpcije proteina pri višim temperaturama (Sun i sur., 2007; Muhlack i sur., 2016), utjecaj temperature mošta na bistrenje bentonitom tijekom fermentacije nije istraživan.

Viša koncentracija proteina u vinu obično podrazumijeva i veću potrebu za bentonitom, iako ta veza nije strogo linearna (Mesquita i sur., 2001). Sauvage i sur. (2010) su u svojem istraživanju dali doprinos objašnjenju te pojave. Postigli su 50 %-tno smanjenje ukupnog sadržaja proteina u vinu s dozom 50 g/hL i 85 %-tno smanjenje s dozom 100 g/hL, međutim povećanjem doze na 150 g/hL nije se postiglo daljnje smanjenje sadržaja proteina. Utvrdili su da zaostali proteini pripadaju TL skupini proteina, da se proteini selektivno uklanjanju s obzirom na različita svojstva koja imaju i da se uklanjanje problematičnog dijela TL proteina postiže tek s dozom od 200 g/hL. Utvrđeno je da su različiti proteini u kompeticiji za adsorpcijska mjesta na površini bentonita te je za proteinsku stabilnost vina važnije koje vrste proteina su prisutne i koje su njihove relativne koncentracije nego njihova ukupna apsolutna koncentracija (Lambri i sur., 2012a). Kako do danas nije istraženo da li se povećanjem doze bentonita primijenjenog u fermentaciji može proporcionalno poboljšati proteinska stabilnost vina te kakav utjecaj povećanje doze primijenjene u fermentaciji ima na važne fizikalno-kemijske parametre i senzorsku kvalitetu vina, navedeno je planirano istražiti u ovom radu.

Općenito je prihvaćena činjenica da bentonit bogatiji Na^+ kationima ima bolju učinkovitost uklanjanja poteina o čemu su izvijestili Blade i Boulton (1988). Oni su istražili adsorpciju albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) na četiri različita bentonita (Na, Na-Ca, Ca-Na i Ca) i utvrdili da je natrijev bentonit imao veći kapacitet adsorpcije od ostalih tipova bentonita. Lambri i sur. (2010) su nakon istraživanja bistrenja vina s bentonitima koji su imali visok, ali različit omjer Na^+/Ca^{2+}, a pored toga i različita druga fizikalna svojstva, zaključili da je za učinkovitost adsorpcije bitna i veća specifična površina (engl. *specific surface area*, SSA). Lambri i sur. (2012a) su istraživanjem djelovanja različitih kalcijevih bentonita aktiviranih natrijem postigli jednako uspješno uklanjanje proteina male molekulske mase uključujući TL proteine, ali su utvrdili razlike u njihovom afinitetu za uklanjanje proteina većih molekulskih masa. Istaknuli su da na uklanjanje proteina veći utjecaj ima visok sadržaj montmorilonita u bentonitu i viši omjer gustoće naboja i SSA, nego omjer Na^+/Ca^{2+}. Lambri i sur. (2013) uvidjeli su veću sposobnost adsorpcije senzorski aktivnih spojeva arome kod bentonita s većim omjerom Na^+/Ca^{2+}, međutim Lambri i sur. (2010) primijetili su da učinak na spojeve arome u vinu više ovisi o kemijskoj prirodi spojeva i koncentraciji prije bistrenja te o količini i vrsti proteina, nego o tipu bentonita. Salazar i sur. (2017) su usporedbom bistrenja natrijevim i natrijevim aktiviranim bentonitom pokazali značajan učinak trenutka primjene bentonita i tipa bentonita na uklanjanje proteina i proteinsku stabilizaciju vina, količinu taloga te na profil spojeva fermentacijske arome vina nakon fermentacije. Iako su oba istraživana bentonita učinkovito proteinski stabilizirala vino, primjena aktiviranog natrijevog bentonita rezultirala je višom koncentracijom ostatka proteina, višom koncentracijom hlapljivih spojeva arome i manjom količnom taloga, osobito ako se radilo o primjeni u kasnijoj fazi fermentacije. Pored ovih rezultata, učinak bistrenja različitim tipovima bentonita na važne fizikalno-kemijske parametre i senzorska svojstva vina još je uvijek prilično nedovoljno istražen, osobito u kontekstu primjene bentonita u fermentaciji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Proizvodnja vina i bistrenje bentonitom tijekom fermentacije

Istraživanje je provedeno tijekom tri uzastopne godine, s grožđem kultivara malvazija istarska iz berbi 2015., 2016. i 2017. godine. Za sve tri godine istraživanja grožđe je ubrano ručno u trenutku njegove tehnološke zrelosti, u pokusnom nasadu Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču (Slika 3), na području vinogradarske podregije Hrvatska Istra, Vinogorja Zapadne Istre.

Slika 3. Dio pokusnih nasada vinove loze Instituta za poljoprivredu i turizam (Poreč, Hrvatska) (vlastita fotografija)

Postupci primarne prerade grožđa, pripreme mošta i proizvodnje vina provedeni su u prostorima vinarskog podruma „Minivinifikacija" na Institutu (Slika 4). Prerada grožđa (runjenje, muljanje i tiještenje) provedena je na dan berbe. Grožđe je tijekom primarne prerade zaštićeno od oksidacije dodatkom sredstva Aromax (AEB S.p.A., Brescia, Italija) u masenom udjelu 20 g/100 kg grožđa. Tiještenje je provedeno pomoću pneumatske preše zatvorenog tipa tlakom do 1 bar (Letina Inox d.o.o., Čakovec, Hrvatska). Mošt je hladno taložen pri temperaturi 12 °C tijekom 36 h uz dodatak pektolitičkih enzima Endozym Rapid u koncentraciji 2 g/hL (AEB S.p.A.). Veći dio mošta odvojen je od taloga, dio mošta s talogom je filtriran, filtrat je pripojen ostatku mošta te je sveukupna količina homogenizirana.

Za proteinsku stabilizaciju vina korištena je suspenzija bentonita u vodovodnoj vodi (70 g/L ili 7 %) pripremljena 24 sata prije primjene. S obzirom da je planirano izbjeći moguće

prebistrenje te ostvariti samo djelomičnu stabilizaciju vina do završetka fermentacije, predviđeno je bistrenje u dvije faze kako bi se različiti tretmani kasnije mogli uspoređivati. U prvoj fazi, u određenom trenutku prije završetka fermentacije, primijenjena je proizvoljno odabrana doza od 100 g/hL (2015.), odnosno 95 g/hL (2016. i 2017.). Određivanjem koncentracije šećera u moštu u fermentaciji praćen je tijek fermentacije da bi se mogao procijeniti trenutak za primjenu, odnosno dodavanje bentonita. Druga faza bistrenja provođena je nakon fermentacije i kratkog dozrijevanja vina. U drugoj fazi primijenjena je doza potrebna za potpunu proteinsku stabilizaciju vina, utvrđena probama bistrenja i testovima stabilnosti. Na odabir doze primijenjene u prvoj fazi (100, odnosno 95 g/hL) utjecalo je dotadašnje dugogodišnje praktično iskustvo proizvođača vina malvazije istarske i stručnjaka u znanstveno-istraživačkim krugovima prema kojem je malvazija istarska sorta koja često treba visoke doze bentonita za postizanje proteinske stabilnosti. One često iznose i do 300 g/hL, a u vrlo rijetkim slučajevima su niže od 150 g/hL.

Slika 4. Prostorija vinarskog podruma „Minivinifikacija" na Institutu s opremom za proizvodnju vina za potrebe znanstveno-istraživačkog rada (vlastite fotografije)

3.2. Pokus 2015.: Istraživanje učinka trenutka primjene bentonita

Berba grožđa provedena je 15. rujna 2015. godine. Vrijednost ukupne kiselosti mošta podešena je dodatkom vinske kiseline (VWR Chemicals, Radnor, PA, SAD) u koncentraciji 1,0 g/L. Homogenizirani bistri mošt jednakomjerno je razdijeljen u 15 spremnika od nehrđajućeg čelika kapaciteta 80 L i nacijepljen selekcioniranim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin QA23 (Lallemand SA, Montreal, Kanada) u koncentraciji 20 g/hL, čija je

rehidratacija provedena uz dodatak Go-Ferm Protect Evolution (Lallemand) na način da je njegova koncentracija u inokuliranom moštu bila 30 g/hL. U dva obroka dodana je prihrana kvascu, Fermaid E (Lallemand), po 20 g/hL 2. dan i 5. dan fermentacije. Fermentacija je provedena u kontroliranim uvjetima temperature, pri 17 ± 0,5 °C, do sniženja koncentracije (reducirajućih) šećera od početnih 230 g/L na ispod 2 g/L, što je potrajalo 13 dana.

Za proteinsku stabilizaciju primijenjen je granulirani natrijev aktivirani bentonit, CX Bentonite Special Grain (Corimpex, Villesse, GO, Italija). U triplikatu je postavljeno i provedeno pet tretmana koji su se razlikovali prema trenutku primjene bentonita:

(i) kontrolni tretman - nije dodavan bentonit u prvoj fazi bistrenja, odnosno ni prije ni tijekom fermentacije (K15)

(ii) dodano je 100 g/hL bentonita prije fermentacije u bistri mošt (BGS15)

(iii) dodano je 100 g/hL bentonita na početku, tj. u prvoj trećini predviđenog trajanja fermentacije, pri koncentracijama šećera 170 – 180 g/L (BP15)

(iv) dodano je 100 g/hL bentonita u sredini predviđenog trajanja fermentacije, pri koncentracijama šećera 90 – 100 g/L (BS15)

(v) dodano je 100 g/hL bentonita u posljednjoj trećini fermentacije, pri koncentracijama šećera 40 – 50 g/L (BK15).

3.3. Pokus 2016.: Istraživanje učinka trenutka primjene bentonita u fermentaciji, načina primjene bentonita u fermentaciji, načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji i primjene tanina u kombinaciji s bentonitom

Berba grožđa provedena je 12. i 13. rujna 2016. godine. Vrijednost ukupne kiselosti mošta podešena je dodatkom vinske kiseline (VWR Chemicals) u koncentraciji 1,5 g/L. Homogenizirani bistri mošt jednakomjerno je razdijeljen u 21 spremnik od nehrđajućeg čelika kapaciteta 80 L i nacijepljen selekcioniranim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin QA23 (Lallemand) u koncentraciji 30 g/hL, čija je rehidratacija provedena uz dodatak Go-Ferm Protect Evolution (Lallemand) na način da je njegova koncentracija u inokuliranom moštu bila 30 g/hL. U dva obroka dodana je prihrana kvascu, Fermaid E (Lallemand), po 20 g/hL 6. dan i 13. dan fermentacije. Fermentacija je provedena u kontroliranim uvjetima temperature, pri 15 ± 0,5 °C, do sniženja koncentracije (reducirajućih) šećera od početnih 250 g/L na ispod 4 g/L, što je potrajalo 21-23 dana.

Temperatura mošta u fermentaciji povišena je na 16 °C 24 h prije bistrenja i održavana do 24 h nakon bistrenja, nakon čega je ponovo podešena na 15 °C do kraja fermentacije. Za proteinsku stabilizaciju primijenjen je granulirani natrijev aktivirani bentonit, CX Bentonite Special Grain (Corimpex, Villesse, GO, Italija). U pojedinim tretmanima dodavan je komercijalni pripravak tanina s deklairanom aktivnosti prema proteinima, po sastavu čisti galni tanin, Tannino Etere (Enologica Vason S. p. A., Verona, Italy). U triplikatu je postavljeno i provedeno sedam tretmana:

(i) kontrolni tretman - nisu dodavani bentonit ni pripravak tanina ni prije ni tijekom fermentacije (K16)

(ii) dodano je 95 g/hL bentonita u sredini predviđenog trajanja fermentacije, pri koncentracijama šećera 127 – 137 g/L (BS16)

(iii) dodano je 95 g/hL bentonita u posljednjoj trećini fermentacije, pri koncentracijama šećera 45 – 55 g/L (BK16), na dan pripreme bentonita za ovaj tretman tvrdoća vode bila je 18 °nj ili 320 mg $CaCO_3$ / L (podatak Istarskog vodovoda d.o.o.)

(iv) dodano je 95 g/hL bentonita razdvojeno na tri jednaka obroka u drugoj polovini fermentacije, pri koncentracijama šećera 125 – 127 g/L (prvi obrok), 100 – 105 g/L (drugi obrok), 45 – 55 g/L (treći obrok) (BKS16)

(v) dodano je 95 g/hL bentonita pripremljenog suspendiranjem u deioniziranoj vodi, u posljednjoj trećini fermentacije, pri koncentracijama šećera 45 – 55 g/L (BKDEI16)

(vi) dodano je 25 g/hL pripravka tanina u tri obroka, 10 g/hL 1. dan, 5 g/hL 7. dan (pri koncentracijama šećera 151 – 157 g/L) i 10 g/hL 15. – 17. dan fermentacije (pri koncentracijama šećera 48 – 56 g/L), a bentonit nije dodavan tijekom fermentacije (T16)

(vii) dodano je 25 g/hL pripravka tanina u tri obroka, 10 g/hL 1. dan, 5 g/hL 7. dan (pri koncentracijama šećera 128 – 159 g/L) i 10 g/hL 15. – 17. dan fermentacije (pri koncentracijama šećera 33 – 46 g/L) te je dodano i 95 g/hL bentonita u posljednjoj trećini fermentacije, pri koncentracijama šećera 45 – 55 g/L; treća doza tanina i doza bentonita dodavale su se u istoj fazi fermentacije, ali se nastojalo izbjeći moguće interferiranje dodavanjem tanina dan nakon dodavanja bentonita (BKT16).

3.4. Pokus 2017.: Istraživanje učinka temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji, primjene dvostruke doze bentonita u fermentaciji (prebistrenje) i primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji

Berba grožđa provedena je 6. rujna 2017. godine. Vrijednost ukupne kiselosti mošta podešena je dodatkom vinske kiseline (VWR Chemicals) u koncentraciji 1,8 g/L. Homogenizirani bistri mošt jednakomjerno je razdijeljen u 21 spremnik od nehrđajućeg čelika kapaciteta 80 L i nacijepljen selekcioniranim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin QA23 (Lallemand) u koncentraciji 30 g/hL te je dodano i sredstvo OptiMUM white (Lallemand) u koncentraciji 30 g/hL. U dva obroka dodana je prihrana kvascu, Fermaid E (Lallemand), po 20 g/hL 4. dan i 11. dan fermentacije. Fermentacija je provedena u kontroliranim uvjetima temperature, pri 15 ± 0,5 °C, do sniženja koncentracije (reducirajućih) šećera od početnih 220 g/L na ispod 4 g/L, što je potrajalo 21-23 dana.

Za proteinsku stabilizaciju primijenjena su 4 tipa bentonita: standardni bentonit koji je primjenjivan i u prve dvije godine istraživanja, CX Bentonite Special Grain (granulirani natrijev aktivirani bentonit, Corimpex), SIHA Puranit (aktivni Na-Ca bentonit, Eaton, Langenlonsheim, Njemačka), Pentagel (aktivirani natrijev bentonit, Perdomini-IOC S.p.A., S. Martino Buon Albergo, Italija) i Mastervin Compact (silikagel adsorbiran na aktivirani natrijev bentonit i aktivirani SiO_2, Enologica Vason). Preliminarno je određena relativna učinkovitost različitih bentonita. Provedene su probe bistrenja svježeg mošta koji je prethodno sumporen i ostavljen na hladnom (6 °C) radi inaktivacije mikroorganizama i sprječavanja procesa fermentacije. Mošt je centrifugiran i filtriran te je nakon proba bistrenja i standardnog testa grijanjem i hlađenjem određena proteinska stabilnost uzoraka bistrenih različitim dozama različitih bentonita. Uspoređene su doze potrebne za postizanje stabilnosti. Uspostavljen je relativni omjer doza pa su, s obzirom na dozu već korištenog bentonita za postizanje djelomične stabilizacije u fermentaciji u pokusima prethodnih godina (95 – 100 g/hL), izračunate i primijenjene ekvivalentne doze istog i drugih bentonita u fermentaciji. Prva faza bistrenja provedena je u posljednjoj trećini fermentacije u svim tretmanima. Temperatura mošta u fermentaciji povišena je na 16 °C 24 h prije bistrenja i održavana do 24 h nakon bistrenja nakon čega je ponovno podešena na 15 °C do kraja fermentacije, osim u jednom od tretmana (iii). U triplikatu je postavljeno i provedeno sedam tretmana:

(i) kontrolni tretman - nije dodavan bentonit tijekom fermentacije (K17)

(ii) dodano je 95 g/hL standardnog bentonita CX Bentonite Special Grain u posljednjoj trećini fermentacije, pri koncentracijama šećera 47 – 54 g/L (BK17)

(iii) dodano je 95 g/hL standardnog bentonita CX Bentonite Special Grain u posljednjoj trećini fermentacije, pri koncentracijama šećera 53 – 56 g/L, temperatura mošta u fermentaciji povišena je na 18 °C 24 h prije bistrenja i održavana do 24 h nakon bistrenja nakon čega je ponovno podešena na 15 °C do kraja fermentacije (BKTMP17)

(iv) dodano je 190 g/hL standardnog bentonita CX Bentonite Special Grain u posljednjoj trećini fermentacije, pri koncentracijama šećera 42 – 56 g/L (BKDUP17)

(v) dodano je 143 g/hL bentonita Mastervin Compact u posljednjoj trećini fermentacije, pri koncentracijama šećera 42 – 50 g/L (MVN17)

(vi) dodano je 238 g/hL bentonita SIHA Puranit u posljednjoj trećini fermentacije, pri koncentracijama šećera 46 – 52 g/L (PUR17)

(vii) dodano je 95 g/hL bentonita Pentagel u posljednjoj trećini fermentacije, pri koncentracijama šećera 46 – 49 g/L (PEN17).

3.5. Postupci nakon fermentacije

Nakon fermentacije vina su pretočena u spremnike od nehrđajućeg čelika zapremnine 50 L i ostavljena da se spontano talože tijekom 2 mjeseca nakon čega su pretočena u staklene boce volumena 34 L. Usporedno s navedenim pretokom uzeti su uzorci za analize hlapljivih spojeva arome i fenolnih spojeva te je vino punjeno u boce za senzorsku i fizikalno-kemijsku analizu (uzorkovanje nakon fermentacije, F).

Vino u bocama volumena 34 L podvrgnuto je drugoj fazi bistrenja, u svim slučajevima sa standardnim bentonitom CX Bentonite Special Grain. Kontrolni tretman svih godina istraživanja proveden je bistrenjem samo nakon fermentacije i to standardnim bentonitom CX Bentonite Special Grain. Vino je bistreno dozama koje su bile potrebne da bi se postigla potpuna proteinska stabilnost. Nakon još 2 tjedna taloženja vino je napunjeno u boce namijenjene kemijskoj i senzorskoj analizi (uzorkovanje nakon dodatnog bistrenja, B).

Nakon fermentacije, prije i nakon pretoka, odnosno prije punjenja vina u boce izmjerena je vrijednost slobodnog SO_2 u uzorcima i korigirana na 40 mg/L dodavanjem kalijeva

metabisulfita (Perdomini-IOC) kako bi vino bilo zaštićeno od oksidacije u svim kritičnim fazama.

3.6. Određivanje proteinske stabilnosti vina

Proteinska stabilnost vina provjeravana je pomoću dva testa, standardnim testom zagrijavanjem te zagrijavanjem s dodatkom tanina. Volumen od 20 mL svakog uzorka vina filtriran je kroz PTFE filter širine pora 0,45 μm.

U standardnom testu zagrijavanjem filtrirani uzorci držani su pri temperaturi od 80 °C tijekom dva sata, nakon čega su kratko hlađeni pod mlazom vode iz slavine i držani u hladnjaku pri 4 °C tijekom sljedeća dva sata. Zatim su izvađeni i ostavljeni da postignu sobnu temperaturu. Stupanj zamućenja u tako tretiranim uzorcima mjeren je turbidimetrom Hanna Instruments HI 83749 (Padova, Italija) i izražen u jedinicima zamućenja (engl. *nephelometric turbidity units*, NTU). Filtrirani alikvot istog uzorka kojem se mjeri zamućenje bez prethodnog grijanja i hlađenja predstavljao je kontrolu – slijepu probu. Uzorak je smatran proteinski stabilnim kad je razlika u izmjerenom zamućenju između uzorka koji je grijan i hlađen te odgovarajuće kontrole bila manja od 2 NTU (Pocock i sur., 2011; Lira i sur., 2015).

Drugi test stabilnosti, zagrijavanje s dodatkom tanina, provodio se grijanjem 20 mL filtriranog uzorka vina pri 80 °C tijekom pola sata, uz prethodni dodatak 5 mL otopine taninske kiseline (Alfa Aesar, Kandel, Njemačka) masene koncentracije 100 g/L. Nakon što se uzorak ohladio na sobnu temperaturu provedeno je mjerenje. Filtrirani alikvot istog uzorka kojem nije dodana otopina taninske kiseline niti je grijan predstavljao je kontrolu – slijepu probu. Da bi se uzorak smatrao proteinski stabilnim razlika između očitanja grijanog uzorka i kontrole trebala je biti manja od 5 NTU (Radeka i sur., 2009).

3.7. Određivanje doze bentonita

Nakon fermentacije uzorci vina iz različitih tretmana bili su proteinski nestabilni ili djelomično stabilizirani u slučajevima kada je provedeno djelomično bistrenje prije ili tijekom fermentacije. Potrebna doza bentonita za bistrenje nakon fermentacije određena je testovima proteinske stabilnosti. Uzorci su u laboratoijskim uvjetima bistreni različitim dozama standardnog bentonita (u rasponu od 10 do 300 g/hL) te je turbidimetrijski određeno njihovo zamućenje primjenom oba testa kao što je prethodno opisano. Doza koja je rezultirala

proteinski stabilnim vinom na osnovi standardnog testa zagrijavanjem primijenjena je za bistrenje vina nakon fermentacije. Potrebna ukupna doza bentonita određena je zbrajanjem početne doze primijenjene prije ili tijekom fermentacije i preostale potrebne doze bentonita primijenjene nakon fermentacije te se na osnovi ukupne doze procijenila učinkovitost pojedinih tretmana u odnosu na kontrolni tretman standardnog bistrenja vina nakon fermentacije.

3.8. Standardne fizikalno-kemijske analize

Fizikalno-kemijske analize uzoraka provedene su standardnim metodama objavljenima od strane OIV-a (OIV, 2019). U uzorcima su određeni sljedeći parametri: relativna gustoća, alkoholna jakost (volumni udio etanola), ukupni suhi ekstrakt, reducirajući šećeri, ukupna kiselost (izražena kao vinska kiselina u g/L), hlapljiva kiselost (izražena kao octena kiselina u g/L) te pH vrijednost. Slobodni i ukupni SO_2 određivani su tijekom proizvodnje vina da bi se po potrebi podesila razina slobodnog SO_2 te je u početku fermentacije koncentracija šećera praćena refraktometrijski (Artisan HR200.002, APT Instruments, Litchfield, IL, SAD).

3.9. Analiza fenolnih spojeva

Fenolni spojevi u uzorcima vina analizirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) na uređaju Agilent Infinity 1260 opremljenim s G1311B kvarternom pumpom, G1329B autosamplerom, G1316A odjeljkom za termostatiranje kolone i G4212B detektorom s nizom dioda (engl. *diode array detector*, DAD) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD). Za identifikaciju i kvantifikaciju korišten je računalni program Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition, verzija 01.07.027 (Agilent Technologies). Uzorci su filtrirani kroz PTFE filtere (Chromafil Xtra, širina pora 0,45 µm, promjer 25 mm). Upotrijebljena je modificirana metoda preuzeta od Pati i sur. (2014). Volumen uzorka od 10 µL injektiran je u kolonu Poroshell 120 EC-C18 (150 mm × 4,6 mm, veličina čestica 2,7 µm) s istovrsnom pretkolonom (5 mm × 4,6 mm, veličina čestica 2,7 µm) (Agilent Technologies). Temperatura kolone održavana je tijekom analize na 26 °C. Primijenjeno je gradijentno eluiranje pri čemu je eluens A bila 1%-tna mravlja kiselina (voda : mravlja kiselina, 99 : 1, v/v), a eluens B čisti acetonitril (Tablica 1). Voda (Honeywell, Charlotte, NC, SAD) i acetonitril (J. T. Baker, Fischer Scientific, Göteburg, Švedska) bili su kromatografske čistoće, a mravlja kiselina analitičke čistoće

(VWR Chemicals). Kromatogrami su bilježeni na valnim duljinama 280 nm i 330 nm, uz snimanje spektara u rasponu valnih duljina od 200 do 600 nm. Spojevi su identificirani usporedbom vremena zadržavanja i UV/Vis spektara s vremenima zadržavanja i UV/Vis spektrima standarda u standardnim otopinama. Kvantifikacija je provedena prema baždarnim krivuljama dobivenim analizom standardnih otopina fenolnih spojeva ili je provedeno semikvantitativno određivanje u slučaju kada su na raspolaganju bili samo kvalitativni standardi. Kemikalije za pripremu standardnih otopina nabavljene su od Sigma-Aldrich, Acros Organics (Geel, Belgija) i Extrasynthese (Genay, Francuska) (Prilog 1). Kvalitativne standarde *trans*-kutarne i *trans*-fertarne kiseline donirala je dr. Urška Vrhovšek iz Fondazione Edmund Mach (San Michele All'Adige, Italija). *Cis*-izomeri hidroksicinamoiltartarata dobiveni su izlaganjem otopina *trans*-izomera u metanolu UV svjetlosti u trajanju od 4 sata.

Tablica 1. Program eluiranja u metodi na osnovi tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti primijenjenoj za analizu fenolnih spojeva u vinu kultivara malvazija istarska

Vrijeme (min)	% A	% B	Brzina protoka (mL/min)
0	98	2	0,3
10	87	13	0,3
25	85	15	0,3
30	78	22	0,3
46	78	22	0,3
47	1	99	0,7
49	1	99	0,7
56	98	2	0,7
64	98	2	0,7
65	98	2	0,3
74	98	2	0,3

Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida provedeno je prema metodi Di Stefano i sur. (1989), nakon razrjeđenja uzorka vina 10 do 20 puta otopinom etanol : voda : klorovodična kiselina (37 %-tna) u omjeru 70 : 30 : 1 (v/v/v) i očitanja apsorbancije u području valnih duljina 230 – 700 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida određena je prema uputama iz metode grafički i računski.

Određivanje koncentracije ukupnih fenola provedeno je prema metodi Singleton i Rossi (1965). U tikvici od 25 mL alikvotu uzorka (0,25 mL) dodano je 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 15 mL vode, a nakon 30 sekundi 5 mL Na_2CO_3 te deionizirana voda do oznake. Nakon još 30 min očitana je apsorbancija na valjnoj duljini 765 nm. Koncentracija je određena prema kalibracijskoj krivulji apsorbancija standardnih otopina galne kiseline i izražena u mg/L ekvivalenata galne kiseline.

3.10. Analiza slobodnih i vezanih hlapljivih spojeva arome

Priprema uzoraka iz berbi 2015. i 2016. provedena je prema metodi opisanoj u radu Lukića i sur. (2017b) uz manje izmjene. Volumen od 40 mL uzorka vina razrijeđen je do 100 mL deioniziranom vodom te je dodano 100 µL unutarnjeg standarda (1-heptanol u etanolu, koncentracije 230 mg/L). Kolonice za ekstrakciju na čvrstoj fazi od hiper-umreženog hidroksiliranog polistiren-divinilbenzen kopolimera (Isolute ENV+, 1 g, 6 mL, Biotage, Uppsala, Švedska) kondicionirane su propuštanjem 15 mL metanola (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i 20 mL deionizirane vode, a zatim su kroz njih propuštena razrijeđena vina. Nakon toga kolonice su isprane s 20 mL deionizirane vode da bi se s njih uklonile sve nečistoće topive u vodi. Slobodni hlapljivi spojevi eluirani su s kolonica propuštanjem 25 mL diklorometana (Sigma-Aldrich). Eluati su skupljani u tikvice od 100 mL i dodano im je 50 mL pentana (Sigma-Aldrich), a nakon toga bezvodni Na_2SO_4 (Gram-Mol d. o. o., Zagreb, Hrvatska) za uklanjanje vode. Eluat je koncentriran do 500 µL pomoću Vigreuxove kolone. U plinski kromatograf injektiran je 1 µL ekstrakta bez cijepanja protoka plina nositelja (*splitless* način). Glikozidno vezani prekursori hlapljivih spojeva arome eluirani su s kolonica propuštanjem 25 mL metanola. Eluati su upareni do suha pomoću rotirajućeg vakuum uparivača. Tikvice u kojima su uparavani eluati ispirane su s 10 mL smjese pentana i diklorometana (2 : 1, v/v) da se uklone preostali tragovi slobodnih hlapljivih spojeva. Vezana frakcija tada je ponovo otopljena u 4 mL citratnog pufera (pH 5), dodano je 200 µL pektolitičkog enzima s β-glikozidaznim djelovanjem AR2000 (DSM Food Specialties B. V., Delft, Nizozemska) koncentracije 70 mg/mL i smjesa je inkubirana na 40 °C tijekom 24 sata. Nakon toga je dodano 25 µL otopine internog standarda te je provedena ekstrakcija oslobođenih vezanih hlapljivih spojeva na čvrstoj fazi uporabom kolonica punjenih oktadecilsilicijevim dioksidom C-18 (Bond Elut, 500 mg, 6 mL, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD) prethodno aktiviranih metanolom i deioniziranom vodom. Daljnje eluiranje, dehidracija i koncentriranje do 250 µL izvedeno je kao i za slobodne hlapljive tvari, s 5 puta manjim volumenima otapala. U plinski kromatograf injektiran je 1 µL ekstrakta bez cijepanja protoka plina nositelja.

Hlapljivi spojevi arome izolirani su iz uzoraka vina iz berbe 2017. mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase microextraction*, SPME) pomoću SPME vlakna od divinilbenzen-karboksen-polidimetilsiloksana (DVB-CAR-PDMS) prema metodi opisanoj u radovima od Lukića i Horvat (2017), odnosno Lukića i sur. (2017a). U staklenoj bočici (tzv.

viali od engl. *vial*) od 10 mL pripremljeno je 4 mL uzorka razrijeđenog 4 puta, uz dodatak 1 g $(NH_4)_2SO_4$ (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska) i 50 µL otopine unutarnjih standarda (2-oktanola u koncentraciji 0,84 mg/L vina za monoterpene, C_{13}-norizoprenoide i alkohole, metil-nonanoata u koncentraciji 0,82 mg/L vina za estere te heptanske kiseline u koncentraciji 2,57 mg/L za masne kiseline). Nakon 15 min kondicioniranja pri temperaturi od 40 °C, provedena je ekstrakcija vršnih para pomoću DVB-CAR-PDMS vlakna (Supelco, Bellefonte, PA, SAD) pri istoj temperaturi tijekom 40 min uz neprekidno miješanje upotrebom magnetske miješalice (800 rpm). Po završetku ekstrakcije vlakno je postavljeno u injektor plinskog kromatografa gdje je provedena desorpcija hlapljivih spojeva pri temperaturi od 248 °C tijekom 5 min (3 min bez cijepanja protoka plina nositelja).

Identifikacija i kvantifikacija hlapljivih spojeva arome provedena je korištenjem vezanog sustava plinski kromatograf Varian 3900 – spektrometar masa Varian Saturn 2100 T s detektorom na principu ionske stupice (engl. *gas chromatograph – mass spectrometer*, GC-MS; Varian Inc., Harbor City, CA, SAD) i pomoću pripadajućeg računalnog programa Star Chromatography Workstation, verzija 6.6 (Varian, Inc.). Dimenzije korištene kapilarne Rtx-WAX kolone bile su 60 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 µm d.f. (Restek, Bellefonte, PA, SAD). Temperaturni program zagrijavanja pećnice kolone bio je sljedeći: početna temperatura postavljena je na 40 °C te je nakon toga zagrijavana za 2 °C u minuti do 240 °C na kojoj je držana 10 min. Temperatura injektora bila je 245 °C, transfer linije 80 °C i ionske stupice 120 °C. Spektri su dobiveni elektronskom ionizacijom (EI, 70 eV) uz 1 s/scan, a raspon detekcije postavljen je za ione omjera mase i naboja 30 – 450. Plin nositelj bio je helij uz protok 1,2 mL/min. Kemikalije za pripremu standardnih otopina (Prilog 1) nabavljene su od tvrtki Merck (Darmstadt, Njemačka), Sigma-Aldrich i Fluka (Buchs, Švicarska). Standardne otopine pripremane su u modelnoj otopini vina koja je sadržavala 12 vol. % etanola i 5 g/L vinske kiseline, a čija je pH vrijednost podešena na 3,2. Za dostupne standarde izrađene su kalibracijske krivulje na osnovi analize standardnih otopina. Linearni retencijski indeksi (relativni u odnosu prema retencijskim indeksima n-alkana od C_{10} do C_{28}) izračunati su i uspoređeni s onima iz literature. Identifikacija spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja i spektara masa s onima čistih standarda u slučaju kad su bili dostupni te sa spektrima masa iz NIST05 biblioteke spektara. Za ostale spojeve provedeno je semikvantitativno određivanje te su koncentracije izražene kao ekvivalenti koncentracija spojeva slične kemijske strukture za koje su standardi bili dostupni, uz pretpostavku da je relativni faktor odziva bio jednak 1.

Kvanitativno određivanje udjela acetaldehida, metanola, etil-acetata, 1-propanola, izobutanola i izoamilnog alkohola obavljeno je uporabom plinskog kromatografa Varian 3350 (Varian Inc.), opremljenog s kapilarnom kolonom Rtx-WAX dimenzija 60 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 µm d.f. (Restek). Volumen od 50 mL vina neutraliziran je titracijom s 0,1 N otopinom NaOH te je destiliran pomoću elektronske destilacijske jedinice. Destilat je sakupljan u tikvicu od 100 mL te je dvostruko razrijeđen destilat vina injektiran izravno u plinski kromatograf mikroštrcaljkom pri temperaturi kolone od 40 ºC. Nakon 4 minute kolona je zagrijana do 90 ºC brzinom od 5 ºC u minuti te zatim od 90 ºC do konačne temperature od 235 ºC brzinom od 15 ºC u minuti. Konačna temperatura kolone održavana je još 10 minuta. Injektirana su 2 µL razrijeđenog uzorka, s cijepanjem protoka plina nositelja u omjeru 1:20. Plin nositelj bio je helij, uz stalni pritisak pri ulazu u kolonu od 138 kPa. Temperature injektora i detektora bile su 160 ºC, odnosno 240 ºC. Prije kromatografske analize, u razrijeđeni uzorak dodano je 0,25 mL otopine unutarnjeg standarda 1-pentanola koncentracije 31,74 mg/L. Identifikacija hlapljivih spojeva izvršena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja u koloni s vremenima zadržavanja čistih standarda. Konstruirane su baždarne krivulje na osnovi analize standardnih otopina, a korištena je metoda unutarnjeg standarda.

3.11. Senzorska analiza vina malvazije istarske

Senzorsku analizu vina proveo je panel ocjenjivača-kušača sastavljen od 6 do 8 članova. Članovi panela uglavnom su već imali višegodišnje iskustvo u senzorskoj analizi vina malvazije istarske. Uzorci vina ocijenjeni su kvantitativnom deskriptivnom analizom (Prilog 2). Kriteriji za kvalitativnu i kvantitativnu analizu (glavni deskriptori i njihov opis te intenziteti percepcije) prethodno su dogovoreni, potvrđeni i usuglašeni ocjenjivanjem reprezentativnih uzoraka vina malvazije istarske na nekoliko preliminarnih sjednica. Isti uzorak ocijenjen je kao kontrolni uzorak više puta prije niza uzoraka iz pokusa radi ujednačavanja ocjenjivača na svakoj sjednici. Senzorska analiza provedena je u prostoriji namijenjenoj za tu svrhu koja je zadovoljavala kriterije norme HRN EN ISO 8589 (2010). Članovi panela bili su smješteni u zasebne kabine, zaštićeni od mogućih izvora interferencija iz okoliša (buka, vizualni podražaji, mirisi). Uzorci su čuvani na 11 °C i posluženi označeni šiframa nasumičnim redoslijedom u standardnim čašama (ISO 3591, 1977) na sobnoj temperaturi (20 °C). Tijekom kvantitativne deskriptivne analize intenziteti pojedinih senzorskih svojstava (deskriptora) mirisa i okusa ocjenjivani su korištenjem strukturirane skale vrijednostima od 0 (svojstvo se ne može osjetiti) do 10 (svojstvo se osjeti vrlo

intenzivno). Opća kvaliteta uzoraka vina ocjenjivana je OIV metodom od 100 bodova (OIV, 2009; Prilog 3). Uzorci su također nanizani prema preferencijama: u testu nizanja (engl. *ranking test*, Zoecklein i sur., 1995) od ocjenjivača se očekivalo da s obzirom na preferenciju nanižu vina na ljestvici, pri čemu je redni broj u nizu 1 dodijeljen najviše preferiranom, a najviši broj u nizu najmanje preferiranom vinu.

3.12. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu rezultata korišten je računalni program Statistica, verzija 13.2 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Provedena je jednosmjerna analiza varijancije (ANOVA) i Fischerov test najmanjih značajnih razlika (LSD) na razini značajnosti $p < 0,05$ za usporedbu prosječnih vrijednosti (n = 3).

4. REZULTATI

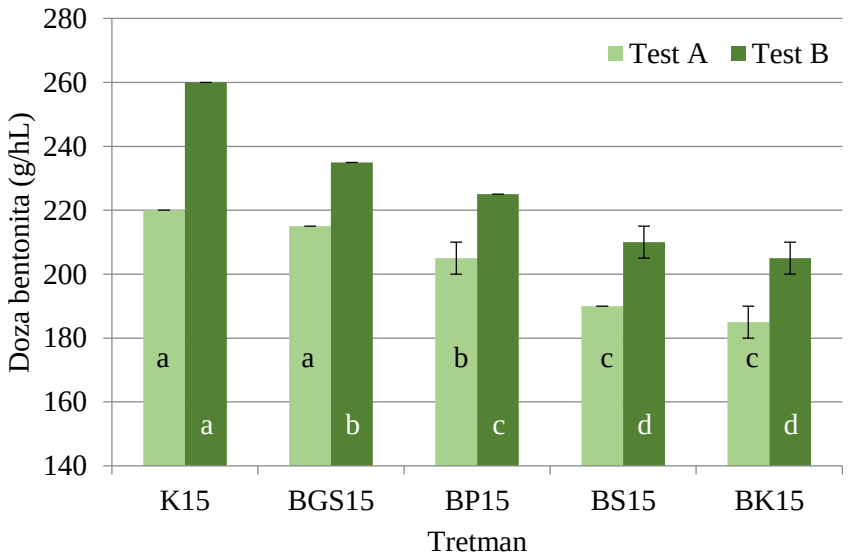
Rezultati su prikazani redom s obzirom na istraživane utjecaje pojedinih čimbenika u eksperimentalnoj proizvodnji vina (trenutak primjene bentonita, način primjene bentonita, način pripreme bentonita, primjena enoloških tanina, povišena temperatura tijekom bistrenja, prebistrenje, tip bentonita). Za svaki istraživani čimbenik prikazani su rezultati svih obavljenih analiza: ukupnih doza primijenjenih za postizanje proteinske stabilnosti vina, vrijednosti osnovnih fizikalno-kemijskih parametara, koncentracija fenolnih spojeva i hlapljivih spojeva arome te rezultati senzorske analize vina.

Doze bentonita primijenjene u različitim tretmanima proizvodnje vina prikazane su pomoću grafikona. Visine stupaca predstavljaju prosječne vrijednosti ukupnih doza primijenjenih u tri ponavljanja svakog tretmana, a stupci pogrešaka predstavljaju pripadajuće standardne devijacije. Ukupne doze predstavljaju zbroj početnih doza primijenjenih u fermentaciji, a u slučaju tretmana BGS15 prije fermentacije (uvijek 100 ili 95 g/hL), i dodatnih doza primijenjenih nakon fermentacije potrebnih za potpunu proteinsku stabilizaciju proizvedenih eksperimentalnih vina. Različita mala slova unutar stupaca grafikona predstavljaju statistički značajne razlike između tretmana pri razini značajnosti $p < 0,05$ (univarijantna ANOVA i LSD test), zasebno utvrđene za rezultate standardnog testa proteinske stabilnosti zagrijavanjem (test A) i testa zagrijavanja s taninom (test B). Po potrebi, u opisima slika dodatno su pojašnjeni detalji.

Rezultati određivanja vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara uzoraka vina, analize fenolnih spojeva, analize hlapljivih spojeva aroma te senzorske analize prikazani su u tablicama. Radi preglednosti prikazane su prosječne vrijednosti ponavljanja unutar istog tretmana i rezultati statističke obrade podataka, dok su standardne devijacije navedene u prilozima gdje su prikazani svi rezultati u obliku prosječna vrijednost ± standardna devijacija bez oznaka statistički značajnih razlika. Oznaka F označava uzorke uzorkovane nakon završene fermentacije, a oznaka B uzorke uzorkovane nakon konačnog bistrenja, tj. uzorke potpuno proteinski stabilnih vina. Kemijski spojevi koji su kvantificirani semikvantitatvno označeni su eksponentom ^{S}. Različita mala slova uz vrijednosti u retku predstavljaju statistički značajne razlike između tretmana pri razini značajnosti $p < 0,05$ (univarijantna ANOVA i LSD test), zasebno za F i B uzorke. Oznakom * označene su statistički značajne razlike između F i B uzoraka istog tretmana pri razini značajnosti $p < 0,05$ (univarijantna ANOVA i LSD test), a oznaka je navedena uz višu vrijednost.

4.1. Učinak trenutka primjene bentonita

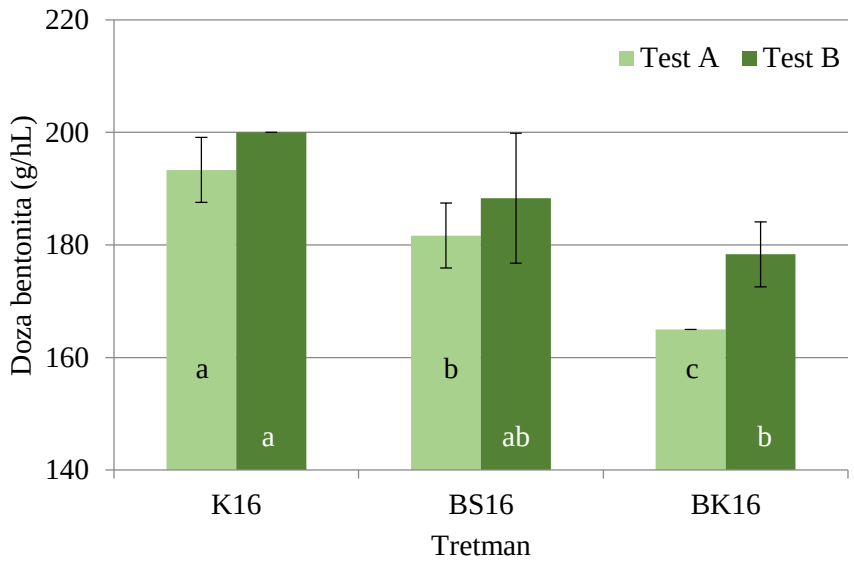
4.1.1. Doza bentonita



Slika 5. Ukupne doze bentonita primijenjene u tretmanima proizvodnje vina kultivara malvazija istarska u berbi 2015. godine

Skraćenice: K15 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BGS15 - djelomično bistren mošt prije fermentacije, BP15 - djelomično bistren mošt u početnoj fazi fermentacije, BS15 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK15 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

U pokusu iz 2015. godine testovima stabilnosti utvrđeno je da je vino kontrolnog tretmana K15 (bistreno na standardni način nakon završene alkoholne fermentacije) potrebno bistriti ukupnom dozom bentonita od 220 g/hL (prema rezultatima standardnog testa zagrijavanjem), odnosno 260 g/hL (prema rezultatima testa zagrijavanja s taninom), što su bile najviše od potrebnih ukupnih doza utvrđenih za sve tretmane (Slika 5). Tretman s bistrenjem mošta prije fermentacije BGS15, nakon kojeg je bentonit ostavljen u moštu tijekom fermentacije, trebao je ukupno nižu dozu nego kontrolni tretman (215, odnosno 235 g/hL, ovisno o testu), sa značajnom razlikom samo u slučaju testa zagrijavanja s taninom. Svi tretmani bistrenja mošta tijekom fermentacije trebali su statistički značajno niže ukupne doze bentonita nego kontrolni tretman K15 i tretman bistrenja mošta prije fermentacije BGS15, dok su među njima tretmani bistrenja mošta u sredini trajanja fermentacije BS15 i u posljednjoj trećini fermentacije BK15 zahtijevali najmanje doze (190 i 210 g/hL, odnosno 185 i 205 g/hL, ovisno o testu) i nisu se međusobno značajno razlikovali.



Slika 6. Ukupne doze bentonita primijenjene u tretmanima proizvodnje vina kultivara malvazija istarska u berbi 2016. godine

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BS16 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

U drugoj godini istraživanja (berba 2016.) ponovljena su dva tretmana kojima se istraživao utjecaj trenutka bistrenja bentonitom u fermentaciji. Tretmani su se pokazali značajno različitima s obzirom na doze procijenjene rezultatima standardnog testa zagrijavanjem dok je testom zagrijavanja s taninom značajna razlika utvrđena između tretmana bistrenja u posljednjoj fazi fermentacije BK16 i kontrolnog tretmana K16 (Slika 6). Najviša doza bentonita (193, odnosno 200 g/hL, ovisno o testu) bila je potrebna za potpuno bistrenje vina kontrolnog tretmana K16, za tretman BS16 ukupna potrebna doza bila je 182, odnosno 188 g/hL, a za bistrenje vina tretmana BK16 bila je upotrijebljena najniža ukupna doza (165, odnosno 178 g/hL, ovisno o testu).

4.1.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri

Tablica 2. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9913	0,9911	0,9910	0,9911	0,9912
	B	0,9914	0,9913	0,9912	0,9913	0,9913
Alkohol (vol. %)	F	13,36 ab*	13,44 a*	13,29 bc*	13,40 a*	13,20 c*
	B	13,10	13,16	13,12	13,14	13,14
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	22,4 a	22,4 a	21,5 c	22,2 ab	21,7 bc
	B	22,1	22,0	21,7	22,1	21,8
Reducirajući šećeri (g/L)	F	2,5 ab	3,2 a	2,3 b	2,9 ab	2,5 b
	B	2,6	2,9	2,5	2,7	2,6
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	19,9 a	19,2 b	19,2 b	19,3 b	19,2 b
	B	19,5	19,1	19,2	19,3	19,2
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,8 a	5,5 b	5,4 b	5,6 b	5,6 b*
	B	5,6	5,4	5,4	5,4	5,4
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,47 a	0,40 ab	0,44 a	0,40 ab	0,32 b
	B	0,42 a	0,34 ab	0,34 ab	0,35 ab	0,31 b
pH	F	3,26 bc	3,28 a	3,27 b	3,27 ab*	3,25 c
	B	3,26 ab	3,27 a	3,26 a	3,26 a	3,25 b

Skraćenice: K15 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BGS15 - djelomično bistren mošt prije fermentacije, BP15 - djelomično bistren mošt u početnoj fazi fermentacije, BS15 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK15 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

Vina djelomično bistrena prije ili tijekom fermentacije, nakon završene fermentacije (F) značajno su se razlikovala na osnovi volumnog udjela alkohola pri čemu su nižu koncentraciju imala vina tretmana BP15 i BK15, a vino BK15 ujedno i značajno nižu od vina kontrolnog tretmana K15 (Tablica 2). Određene razlike ustanovljene su i za ukupni ekstrakt i za reducirajuće šećere, međutim, koncentracija ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera bila je podjednaka u vinima svih tretmana djelomičnog bistrenja dok je u kontrolnom vinu K15 nakon fermentacije bila značajno viša. Isto je vrijedilo i za koncentraciju ukupne kiselosti. Hlapljiva kiselost bila je najniža u vinu tretmana BK15 i značajno niža od one u vinu tretmana BP15 i kontrolnog tretmana K15. Vino BK15 značajno se razlikovalo od ostalih tretmana djelomičnog bistrenja najnižom pH vrijednosti te je isto vrijedilo i nakon dodatnog bistrenja (Tablica 2).

U potpuno stabilnim vinima (B) koncentracija alkohola bila je značajno niža u odnosu na vina nakon fermentacije, međutim, vina se više nisu značajno razlikovala ni na osnovi volumnog

udjela alkohola ni na osnovi koncentracije ukupnog ekstrakta, reducirajućih šećera i ukupne kiselosti. Hlapljiva kiselost bila je najniža u vinu BK15 i značajno niža nego u vinu kontrolnog tretmana K15.

Tablica 3. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BS16	BK16
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9895 a	0,9888 b	0,9893 a
	B	0,9894 a	0,9889 b	0,9895 a
Alkohol (vol. %)	F	15,04 *	15,06 *	15,09 *
	B	14,69	14,70	14,66
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	22,6 a*	21,0 b*	22,4 a
	B	21,5 a	20,2 b	21,7 a
Reducirajući šećeri (g/L)	F	3,4 a	2,5 b	3,7 a
	B	3,4 a	2,5 b	3,5 a
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	19,2 a*	18,4 b*	18,7 ab*
	B	18,2 a	17,7 b	18,2 a
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,5 a*	5,2 b*	5,2 b*
	B	5,0	5,1	5,0
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,67	0,70	0,69
	B	0,65	0,70	0,66
pH	F	3,33 c	3,37 a	3,34 b
	B	3,36 a*	3,39 a*	3,31 b

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BS16 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

Vino tretmana BS16 se nakon fermentacije (F) nižim vrijednostima relativne gustoće, koncentracije ukupnog esktrakta i reducirajućih šećera značajno razlikovalo od vina tretmana BK16 i kontrolnog tretmana K16, koja se međusobno nisu značajno razlikovala s obzirom na vrijednosti tih parametara (Tablica 3). Vino kontrolnog tretmana K16 imalo je najvišu koncentraciju ukupne kiselosti i najnižu pH vrijednost, značajno različitu od vina BS16 i BK16 tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B) odnosi vrijednosti relativne gustoće i većine ostalih parametara nisu se promijenili, unatoč značajnim snižavanjem volumnog udjela alkohola, koncentracije ukupnog ekstrakta, razlike ukupnog ekstrakta i reducirajućih šećera te ukupne kiselosti (Tablica 3). Značajno se povisila pH vrijednost vina BS16 i kontrolnog tretmana K16 te je u odnosu na njih vino tretmana BK16 imalo značajno nižu pH vrijednost.

4.1.3. Fenolni spojevi

Tablica 4. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Hidroksibenzojeve kiseline						
galna kiselina	F	1,440 a*	1,247 c	1,144 d	1,315 b*	1,360 b*
	B	1,005 c	1,261 a	1,176 b	1,219 ab	1,201 b
protokatehinska kiselina	F	0,894	0,808	0,851	0,838	0,765
	B	1,069 a*	0,955 b*	0,931 b	0,917 b*	0,910 b
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,510 a	0,504 a	0,485 ab	0,478 b*	0,473 b
	B	0,529 a	0,491 b	0,466 b	0,429 c	0,460 bc
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,311 a	0,180 b	0,219 b	0,194 b	0,184 b
	B	0,315 a	0,183 b	0,213 b	0,192 b	0,183 b
siringinska kiselina	F	0,110 b*	0,152 a*	0,116 b*	0,117 b*	0,108 b*
	B	0,074 c	0,111 a	0,092 b	0,091 b	0,088 b
Hidroksicimetne kiseline						
trans-kaftarna kiselina	F	2,952 b	5,304 a*	5,102 a	5,361 a*	5,297 a*
	B	1,921 b	4,276 a	4,122 a	4,195 a	4,093 a
cis-kutarna kiselina[S]	F	0,628 d	0,726 a	0,682 b	0,660 bc	0,656 c
	B	0,643 d*	0,734 a	0,716 b*	0,705 bc*	0,700 c*
trans-kutarna kiselina[S]	F	0,108 b	0,648 a*	0,694 a	0,801 a*	0,826 a*
	B	0,031 b	0,316 a	0,348 a	0,365 a	0,409 a
kafeinska kiselina	F	2,721 a*	1,847 b	1,876 b	1,854 b	1,878 b
	B	2,627 a	1,780 d	1,853 b	1,819 c	1,809 cd
cis-fertarna kiselina[S]	F	0,595	0,561	0,570	0,562	0,585
	B	0,679 *	0,623 *	0,647	0,645 *	0,655 *
trans-fertarna kiselina[S]	F	1,863 b	2,199 a	2,138 a	2,170 a	2,169 a*
	B	1,785 b	2,146 a	2,090 a	2,115 a	2,095 a
p-kumarna kiselina	F	1,223 a	0,751 b	0,710 bc	0,675 bc*	0,628 c*
	B	1,064 a	0,667 b	0,631 b	0,572 b	0,575 b
ferulinska kiselina	F	1,173 a	0,884 b	0,865 b	0,839 b	0,843 b*
	B	1,137 a	0,872 b	0,840 b	0,814 b	0,811 b
Flavan-3-oli						
katehin	F	2,206	2,220 *	2,195	2,252	2,225
	B	2,237 a	2,096 b	2,203 a	2,258 a	2,224 a
procijanidin B1	F	2,931	2,884	2,789	2,917	2,901
	B	2,900	3,136 *	2,928	3,029 *	2,955
procijanidin B2	F	1,255 ab	1,105 b	1,222 ab	1,187 ab	1,276 a*
	B	1,208	1,204 *	1,177	1,207	1,221
Ostali						
tirosol	F	11,756	12,339	11,681	11,845	12,381
	B	11,993	12,479	12,006	12,130	12,661

taksifolin	F	0,174 a	0,090 c	0,099 bc	0,100 b	0,100 b
	B	0,181 a	0,097 b	0,103 b	0,101 b	0,098 b
Ukupni fenoli‡	F	130,545	119,879	119,227	116,273	111,242
	B	126,227	118,788	117,121	122,667	118,030

Skraćenice: K15 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BGS15 - djelomično bistren mošt prije fermentacije, BP15 - djelomično bistren mošt u početnoj fazi fermentacije, BS15 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK15 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

Nakon fermentacije (F) najvišu koncentraciju galne kiseline u odnosu na vina ostalih tretmana imalo je vino kontrolnog tretmana K15 (Tablica 4). Vina tretmana bistrenja u kasnijim fazama fermentacije, BS15 i BK15, nižom koncentracijom *p*-hidroksibenzojeve kiseline značajno su se razlikovala od vina tretmana BGS15 i kontrolnog tretmana K15. Vina kontrolnog tretmana K15 imala su najvišu koncentraciju 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline, kao što je i tretman BGS15 rezultirao višom koncentracijom siringinske kiseline u odnosu na ostale tretmane. *Trans*-hidroksicinamoiltartarata je bilo značajno više u svim vinima tretmana bistrenja prije i tijekom fermentacije, koja su pak sadržavala značajno niže koncentracije slobodnih hidroksicimetnih kiselina u odnosu na vino kontrolnog tretmana K15. Na osnovi koncentracije procijanidina B2 značajno su se razlikovala samo vina tretmana BGS15 s najnižom i tretmana BK15 s najvišom koncentracijom. Taksifolina je pronađeno značajno najviše u vinu kontrolnog tretmana K15, dok je tretman BGS15 rezultirao najnižom koncentracijom. Nisu utvrđene razlike između koncentracija ukupnih fenola u vinima različitih tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracija galne kiseline u vinima pojedinih tretmana ostala je podjednaka ili je značajno snižena, posebno u vinu kontrolnog tretmana K15 (Tablica 4). Koncentracija siringinske kiseline značajno se snizila u vinima svih tretmana, najniža je pronađena u kontrolnom tretmanu K15, dok su odnosi koncentracija u vinima pojedinih tretmana ostali podjednaki u odnosu na one utvrđene nakon fermentacije (F). Odnosi koncentracija hidroksicinamoiltartarata ostali su podjednaki, s time da je u više slučajeva utvrđeno opadanje koncentracija *trans*-, a povišenje koncentracija *cis*-izomera. Koncentracije slobodnih hidroksicimetnih kiselina (kao i taksifolina) snizile su se dodatnim bistrenjem (B) samo u pojedinim slučajevima, ali su najviše koncentracije hidroksicimetnih kiselina i taksifolina i dalje bile zabilježene u vinu kontrolnog tretmana K15. Nakon dodatnog bistrenja (B) došlo je do značajnog pada koncentracije katehina u vinu tretmana BGS15. Iako je došlo do značajnog porasta koncentracije procijanidina B1 u vinima dva tretmana, i dalje nije bilo

značajnih razlika između tretmana. Slično je utvrđeno i za drugi dimer, B2. Koncentracija ukupnih fenola nije se značajno mijenjala i s obzirom na nju vina različitih tretmana nisu se značajno razlikovala ni nakon dodatnog bistrenja (B).

Tablica 5. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BS16	BK16S
Hidroksibenzojeve kiseline				
galna kiselina	F	2,380	2,864	2,900
	B	2,973	3,161	2,976
protokatehinska kiselina	F	1,724 a	1,046 b	1,054 b
	B	1,195	1,232 *	1,189 *
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,538 a	0,337 b	0,340 b
	B	0,520 a	0,382 b*	0,382 b*
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,116 a	0,057 b	0,051 b
	B	0,125 a	0,082 b*	0,078 b*
siringinska kiselina	F	0,105 b	0,114 a	0,113 a
	B	0,137 *	0,147 *	0,157 *
Hidroksicimetne kiseline				
cis-kaftarna kiselina^{S}	F	1,720 *	1,770 *	1,807 *
	B	1,189	1,118	1,098
trans-kaftarna kiselina	F	12,762 b	19,236 a	19,132 a
	B	12,791 b	19,362 a	19,227 a
cis-kutarna kiselina^{S}	F	0,815 b*	0,871 a*	0,868 a*
	B	0,746 b	0,786 a	0,768 ab
trans-kutarna kiselina^{S}	F	0,082 b	0,228 a	0,230 a
	B	0,086 b	0,219 a	0,227 a
kafeinska kiselina	F	4,877 a	3,749 b	3,643 b
	B	5,535 a*	4,255 b*	4,037 b*
cis-fertarna kiselina^{S}	F	0,374 *	0,376 *	0,374 *
	B	0,249	0,249	0,250
trans-fertarna kiselina^{S}	F	1,641 b	1,771 a	1,765 a
	B	1,896 b*	1,978 a*	1,949 a*
p-kumarna kiselina	F	0,854 a	0,556 b	0,561 b
	B	1,123 a*	0,647 b*	0,591 b*
ferulinska kiselina	F	1,053 a	0,897 b	0,881 b
	B	1,015 a	0,900 b	0,858 b
Flavan-3-oli				
katehin + tirosol (kao katehin)	F	21,476	21,183	20,803
	B	21,281	21,172	20,348
epikatehin	F	0,781	0,801	0,787
	B	0,944 b	1,135 ab*	1,165 a*

procijanidin B1	F	1,605 b	1,727 a	1,696 a
	B	1,600 b	1,801 a*	1,754 ab
procijanidin B2	F	0,501 b	0,605 a	0,602 a
	B	0,740 b*	1,082 b	1,516 a*
Ostali				
taksifolin	F	0,155 a	0,100 c	0,108 b
	B	0,172 a*	0,114 b*	0,114 b*
trans-piceid	F	0,129 b*	0,169 a	0,172 a
	B	0,111 b	0,171 a	0,174 a
Ukupni fenoli[‡]	F	195,636 a	185,364 b	181,697 b
	B	214,970 a*	185,152 c	200,273 b*

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BS16 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.
[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

U vinima iz berbe 2016. u drugoj godini istraživanja, nakon fermentacije (F) koncentracije većine hidroksibenzojevih kiselina bile su značajno više u vinu kontrolnog tretmana K16, osim u slučaju galne kiseline koja je bila podjednakih koncentracija u vinima svih tretmana i siringinske koja je pronađena u najnižoj koncentraciji u vinu K16 (Tablica 5). Koncentracije gotovo svih hidroksicinamoiltartarata bile su niže u vinu kontrolnog tretmana K16 i značajno različite od onih u vinima svih tretmana bistrenja u fermentaciji, baš kao i koncentracije dimernih flavan-3-ola i *trans*-piceida, dok je obrnuto vrijedilo za slobodne hidroksicimentne kiseline. Tretmani su se značajno razlikovali prema koncentraciji taksifolina koja je bila najviša u vinu kontrolnog tretmana K16, a najniža u vinu tretmana BS16. Koncentracija ukupnih fenola u vinima tretmana BS16 i BK16 bila je značajno niža u odnosu na onu pronađenu u vinu kontrolnog tretmana K16.

Nakon dodatnog bistrenja (B), u većini slučajeva utvrđen je porast koncentracija hidroksibenzojevih kiselina u odnosu na one utvrđene nakon fermentacije (F) (Tablica 5). Odnosi koncentracija hidroksibenzojevih kiselina većinom su ostali podjednaki, a u slučaju siringinske kiseline razlike između tretmana više nisu bile značajne. Koncentracije *cis*-izomera hidroksicinamoiltartarata značajno su snižene dodatnim bistrenjem (B), međutim odnosi njihovih koncentracija ostali su uglavnom podjednaki. Koncentracije *trans*-izomera nisu se značajno mijenjale osim u slučaju koncentracije *trans*-fertarne kiseline koja je porasla. Odnosi koncentracija slobodnih hidroksicimetnih kiselina ostali su podjednaki kao i nakon fermentacije (F) s time da je ipak zabilježen značajan porast koncentracija kafeinske i *p*-kumarne kiseline. Nakon dodatnog bistrenja (B) značajno su porasle koncentracije epikatehina u vinima tretmana bistrenja u fermentaciji te su se pojavile značajne razlike

između tretmana s najvišom koncentracijom pronađenom u vinu tretmana BK16. Značajno je porasla i koncentracija procijanidina u pojedinim tretmanima te su se kao posljedica toga odnosi njihovih koncentracija donekle izmijenili. Koncentracije taksifolina značajno su se snizile u vinima svih tretmana i više nije bilo razlika između tretmana bistrenja, dok je koncentracija *trans*-piceida značajno snižena u vinu kontrolnog tretmana K16. Nakon dodatnog bistrenja (B) značajno su porasle koncentracije ukupnih fenola u vinima kontrolnog K16 i BK16 tretmana pa je ukupnih fenola bilo više u vinu BK16 u odnosu na vino BS16 tretmana. Vino kontrolnog tretmana K16 i dalje je sadržavalo najvišu koncentraciju ukupnih fenola.

4.1.4. Hlapljivi spojevi arome

Tablica 6. Koncentracije slobodnih hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Slobodni spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Monoterpeni						
cis-furan oksid linalola^{S}	F	0,287	0,253	0,295	0,315	0,259
	B	0,768 *	0,716	0,922 *	0,922 *	0,915 *
linalol	F	30,123	30,923	29,410	30,949	29,735
	B	48,428 c*	50,749 bc*	55,100 a*	52,073 b*	57,544 a*
hotrienol^{S}	F	11,152 ab	9,750 c	10,471 ab	9,766 b	11,711 a
	B	12,562 d	13,131 cd*	14,712 ab*	13,808 bc*	15,649 a*
α-terpineol	F	9,267 ab	9,692 a	9,157 bc	9,589 a	8,784 c
	B	32,010 c*	34,224 b*	35,863 a*	33,608 bc*	36,523 a*
trans-piran oksid linalola^{S}	F	0,177	0,156	0,212	0,184	0,197
	B	0,217	0,317	0,280	0,360 *	0,266
citronelol	F	10,809 a	6,813 b	7,104 b	7,008 b	7,194 b
	B	10,052 a	8,970 ab*	8,847 ab*	8,261 bc	7,553 c
geraniol	F	11,752 *	12,176	11,549	11,953 *	11,138
	B	9,025	9,648	10,849	9,239	9,104
C_{13}-norizoprenoidi						
vitispiran I^{S}	F	0,088 ab	0,095 ab	0,090 ab	0,076 b	0,116 a
	B	0,321 ab*	0,361 a*	0,304 ab*	0,276 b*	0,324 ab*
vitispiran II^{S}	F	0,101	0,088	0,117	0,089	0,098
	B	0,320	0,343 *	0,326 *	0,297 *	0,289 *
aktinidol etil-eter^{S}	F	0,045	0,018	0,043	0,040	0,063
	B	0,707 *	0,535 *	0,653 *	0,478 *	0,702 *
β-damaskenon	F	3,651 c*	3,654 c*	4,130 b*	4,383 a*	4,222 ab*
	B	2,648	2,306	2,268	2,225	2,397

aktinidol I[S]	F	0,868	0,903	0,840	0,887	0,899
	B	6,573 b*	7,179 ab*	7,269 a*	6,927 ab*	7,26 a*
aktinidol II[S]	F	1,673	1,722	1,589	1,701	1,648
	B	11,285 b*	12,276 a*	12,302 a*	11,746 ab*	12,333 a*
Alkoholi						
1-heksanol (mg/L)	F	1,877 a	1,483 b	1,916 a	1,939 a	1,848 a
	B	1,957 ab	1,724 c*	1,982 a	1,845 b	1,986 a*
trans-3-heksenol	F	126,938 bc	112,523 c	140,425 ab	139,522 ab	141,176a
	B	129,837 bc	123,263 c	148,496 a	133,977 b	148,368a
cis-3-heksenol	F	61,356 b	60,258 b	74,791 a	75,293 a	74,584 a
	B	66,503 c*	66,528 c*	77,155 a	72,194 b	76,554 a
1-okten-4-ol[S]	F	8,788	9,224	9,596	11,305	10,672
	B	21,428 b*	25,310 a*	23,971 ab*	23,420 ab*	25,287 a*
benzil-alkohol[S]	F	5,363 a	4,446 b	4,325 b	4,540 b	4,554 b
	B	9,902 a*	7,349 b*	7,762 b*	7,136 b*	7,354 b*
2-feniletanol (mg/L)	F	18,309 b	19,034 ab	22,334 ab	23,864 a	23,313 ab
	B	18,784	21,475	21,983	20,954	23,032
Masne kiseline						
butanska kiselina	F	32,728 b	30,910 b	40,252 a	40,771 a	40,699 a
	B	34,086 c	37,053 bc*	38,127 b	37,372 bc	42,144 a
heksanska kiselina (mg/L)	F	3,790 c	5,077 b	5,650 ab	5,326 ab	5,724 a
	B	3,588 d	4,960 c	5,686 ab	5,447 bc	6,229 a*
oktanska kiselina (mg/L)	F	1,619 c	2,450 b	3,031 a	2,722 ab	3,037 a
	B	1,881 d	2,493 c	3,105 ab	2,892 bc	3,387 a*
dekanska kiselina (mg/L)	F	0,652 c	0,966 b*	1,073 b*	1,007 b*	1,220 a*
	B	0,694 b	0,662 b	0,811 ab	0,794 ab	0,941 a
Etil-esteri						
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,449 c*	0,570 b*	0,580 b*	0,589 b*	0,652 a*
	B	0,300 c	0,307 c	0,384 b	0,359 b	0,432 a
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,777 b*	0,951 ab*	0,888 ab*	0,962 ab*	1,076 a*
	B	0,337 b	0,410 a	0,445 a	0,436 a	0,452 a
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,248 c*	0,298 bc*	0,303 ab*	0,287 bc*	0,348 a*
	B	0,080 c	0,112 b	0,124 ab	0,116 b	0,133 a
Acetatni esteri						
izoamil-acetat (mg/L)	F	0,728 c*	0,999 b*	1,347 a*	1,353 a*	1,321 a*
	B	0,458 c	0,665 b	0,794 ab	0,721 ab	0,856 a
heksil-acetat (mg/L)	F	0,095 b*	0,137 a*	0,134 a*	0,130 a*	0,130 a*
	B	0,019 b	0,035 a	0,044 a	0,039 a	0,047 a
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	0,123 b	0,184 a*	0,163 a*	0,178 a*	0,177 a*
	B	0,085 c	0,119 ab	0,108 b	0,120 ab	0,123 a
Ostali esteri						
etil-laktat (mg/L)	F	6,292	5,963	5,403	6,302	5,759
	B	16,485 *	16,044 *	17,426 *	16,913 *	17,063 *
izoamil-heksanoat[S]	F	1,102 b	1,377 ab	1,690 ab*	1,817 a	1,905 a
	B	2,680 b*	3,406 ab*	3,165 ab	3,691 a*	3,156 ab*
izoamil-oktanoat[S]	F	2,070 b	2,750 ab	2,781 ab	2,598 ab	3,182 a

	B	2,094 b	2,724 b	6,817 a	3,090 b	9,640 a*
dietil-sukcinat (mg/L)	F	0,217	0,280	0,175	0,259	0,220
	B	1,661 b*	2,237 a*	1,941 ab*	1,967 ab*	2,028 a*
Ostali						
furfural[S]	F	1,510 b	1,548 b	1,604 ab	1,748 ab	2,122 a
	B	11,019 a*	8,659 b*	11,286 a*	10,072 a*	11,053 a*
benzaldehid	F	4,865 b	5,299 b	7,104 ab	6,785 ab	7,773 a
	B	5,690 c	5,546 c	7,253 ab	6,293 bc	8,029 a
dihidro-3(2H)-tiofenon[S]	F	6,652	8,639 *	6,925	9,226 *	8,978
	B	4,612	6,445	4,876	5,423	6,002
etil-benzenacetat[S]	F	1,114	0,960	0,820	0,933	1,025
	B	2,416 *	2,241 *	2,125 *	2,120 *	2,309 *
4-etilfenol[S]	F	0,651	0,686	0,673	1,251	0,945
	B	0,774 b	0,885 ab*	0,866 ab	0,936 ab	1,006 a
4-vinilgvajakol[S]	F	100,730	113,544 *	117,139	113,718	107,288
	B	110,792 ab	104,512 ab	120,735 a	100,420 b	106,380 ab

Skraćenice: K15 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BGS15 - djelomično bistren mošt prije fermentacije, BP15 - djelomično bistren mošt u početnoj fazi fermentacije, BS15 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK15 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti spojeva slične kemijske strukture uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

Nakon fermentacije (F) koncentracije većine monoterpena nisu se značajno razlikovale među vinima različitih tretmana bistrenja, pa tako ni u slučaju najzastupljenijeg monoterpena linalola (Tablica 6). Koncentracija hotrienola bila je najniža u vinu BGS15, a najviša u vinu BK15 tretmana. Vino tretmana BK15 sadržavalo je najnižu koncentraciju α-terpineola. Koncentracija citronelola bila je podjednaka u vinima različitih tretmana bistrenja, dok je vino kontrolnog tretmana K15 sadržavalo značajno višu koncentraciju. Vina tretmana bistrenja u fermentaciji značajno su se razlikovala od vina kontrolnog tretmana višom koncentracijom β-damaskenona. Vina različitih tretmana bistrenja u fermentaciji u manjoj mjeri su se značajno razlikovala na osnovi koncentracija ostalih C_{13}-norizoprenoida. Koncentracije C_6-alkohola bile su uglavnom niže u vinu BGS15 tretmana i značajno različite u odnosu na vina ostalih tretmana bistrenja. Vina tretmana bistrenja u fermentaciji nisu se značajno razlikovala na osnovi koncentracija većine ostalih alkohola i uglavnom su sadržavala više koncentracije nego vina BGS15 i kontrolnog tretmana, dok je jedino koncentracija benzil-alkohola bila značajno viša u vinu kontrolnog tretmana K15. Razlike u koncentracijama hlapljivih masnih kiselina između vina tretmana koji su uključivali bistrenje u fermentaciji u većini slučajeva nisu bile značajne. U tim vinima uglavnom su pronađene više koncentracije masnih kiselina nego u ostalim vinima, K15 i BGS15. Vino tretmana BGS15 imalo je ili podjednake ili značajno više koncentracije nego vino kontrolnog tretmana

K15, ovisno o kiselini. Koncentracije etil-estera bile su više u vinima tretmana bistrenja prije i tijekom fermentacije u odnosu na vino kontrolnog tretmana K15. Vino tretmana BK15 imalo je značajno više koncentracije etil-estera od vina kontrolnog tretmana K15 te većinom i od vina BGS15 tretmana. Vina tretmana bistrenja tijekom fermentacije nisu se međusobno značajno razlikovala na osnovi koncentracija acetatnih estera, a većinom se nisu razlikovala ni od vina tretmana BGS15. Vino kontrolnog tretmana K15 imalo je značajno najniže koncentracije acetatnih estera. Koncentracije estera izoamilnog alkohola i masnih kiselina srednjeg lanca bile su značajno niže u vinu kontrolnog tretmana K15 nego u vinu tretmana BK15. Od ostalih spojeva, najviše koncentracije furfurala i benzaldehida pronađene su u vinu tretmana BK15, uz značajne razlike utvrđene u odnosu na vina kontrolnog K15 i BGS15 tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracije većine monoterpena su se značajno povisile, dok se koncentracija geraniola u pojedinim tretmanima značajno snizila (Tablica 6). Stabilna vina (B) tretmana s djelomičnim bistrenjem prije i tijekom fermentacije imala su više koncentracije linalola u odnosu na ista vina nakon fermentacije (F), pri čemu su vina tretmana bistrenja u fermentaciji sadržavala značajno više koncentracije od vina kontrolnog tretmana K15. Slično je utvrđeno i za hotrienol i α-terpineol. Vina BP15 i BK15 tretmana uglavnom su sadržavala najviše koncentracije spomenutih monoterpena. Nakon dodatnog bistrenja (B) vina BS15 i BK15 imala su značajno niže koncentracije citronelola od vina kontrolnog tretmana K15. Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracije većine C_{13}-norizoprenoida značajno su porasle, dok su se koncentracije β-damaskenona značajno snizile. Odnosi koncentracija vitispirana I između tretmana su se promijenili, ali BS15 vino je i dalje sadržavalo najnižu koncentraciju. Pojavile su se značajne razlike s obzirom na koncentracije aktinidola I i II, pri čemu je vino kontrolnog tretmana K15 uglavnom imalo najniže koncentracije. Koncentracije većine C_6-alkohola bile su najniže u vinima kontrolnog i BGS15 tretmana te značajno više u vinima tretmana bistrenja u fermentaciji. Koncentracija 1-okten-4-ola značajno je porasla u vinima svih tretmana, a bila je značajno niža u vinu kontrolnog tretmana K15 nego u vinima BGS15 i BK15 tretmana. Značajno je porasla i koncentracija benzil-akohola, ali se odnosi koncentracija između vina različitih tretmana nisu promijenili. Hlapljive masne kiseline bile su najnižih koncentracija u vinu kontrolnog K15 i BGS15 tretmana, a uglavnom najviše u vinu BK15 tretmana. Koncentracije etil-estera i acetatnih estera značajno su se snizile nakon dodatnog bistrenja (B), ali su odnosi koncentracija između tretmana uglavnom odgovarali onima nakon fermentacije (F). Nakon dodatnog bistrenja (B) značajno su porasle

koncentracije etil-laktata i dietil-sukcinata u vinima svih tretmana, pri čemu je koncentracija dietil-sukcinata bila niža u vinu kontrolnog K15 nego u vinima BGS15 i BK15 tretmana. Povisile su se koncentracije furfurala, a te promjene dovele su do toga da je stabilno vino (B) BGS15 tretmana sadržavalo najnižu koncentraciju. Odnosi koncentracija benzaldehida nisu se bitno izmijenili u odnosu na one nakon fermentacije (F). Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracija 4-etilfenola bila je značajno viša u vinu BK15 nego u vinu kontrolnog tretmana K15, a koncentracija 4-vinilgvajakola značjno viša u BP15 nego u vinu BS15 tretmana.

Tablica 7. Koncentracije slobodnih hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Slobodni spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BS16	BK16
Monoterpeni				
linalol	F	24,405 a	23,666 ab	22,920 b
	B	29,675	28,802 *	29,242 *
α-terpineol	F	9,506	10,377	10,179
	B	12,444	12,048	11,921 *
α-terpinolen^{S}	F	0,838	0,866	0,972
	B	0,892	0,994	1,351
citronelol	F	7,811	8,317	8,043
	B	7,676	7,778	7,585
terpendiol I^{S}	F	86,778 *	88,355	85,801 *
	B	77,585	75,654	76,090
C_{13}-norizoprenoid				
β-damaskenon	F	3,100	3,575 *	3,510 *
	B	2,287	2,482	2,322
Alkoholi				
1-heksanol (mg/L)	F	2,023	1,927	1,973 *
	B	1,976	1,948	1,912
trans-3-heksenol^{S}	F	134,293	130,399	133,372 *
	B	132,984	132,021	127,304
cis-3-heksenol^{S}	F	84,702	81,678	83,260 *
	B	83,090	81,984	78,587
1-oktanol^{S}	F	14,832	18,660	14,461
	B	18,618	13,275	15,009
benzil-alkohol^{S}	F	51,588 a	29,022 b	28,122 b
	B	60,788 a*	29,369 b	28,230 b
2-feniletanol (mg/L)	F	29,900 *	30,982	28,770
	B	27,993	29,238	28,140
Masne kiseline				
butanska kiselina (mg/L)	F	1,784	1,930	1,835
	B	1,751	1,937	1,737

heksanska kiselina (mg/L)	F	3,920 b	4,362 a	4,107 ab
	B	3,900	4,125	3,939
oktanska kiselina (mg/L)	F	5,357 b	6,326 a	5,963 a
	B	5,615	6,085	5,676
dekanska kiselina (mg/L)	F	1,597 b	1,857 a	1,759 ab
	B	1,842	1,851	1,766
dodekanska kiselina^{S}	F	52,434 a*	31,917 b	27,413 b
	B	36,627 a	26,775 b	22,642 b
Etil esteri				
etil-butanoat (mg/L)	F	0,289 b	0,349 a	0,330 ab
	B	0,312	0,349	0,317
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,492 b	0,610 a	0,572 a
	B	0,598	0,656	0,586
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,213 b	0,259 a	0,242 ab
	B	0,268 *	0,273	0,246
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,037 a	0,035 ab	0,031 b
	B	0,039	0,036	0,037
Acetatni esteri				
izoamil-acetat (mg/L)	F	0,911 c	1,212 a*	1,141 b*
	B	0,986	1,127	0,993
heksil-acetat	F	67,142 b	93,090 a	90,817 a
	B	82,899	89,606	80,056
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	0,118 b	0,157 a	0,149 a
	B	0,138	0,145	0,141
Ostali esteri				
etil-laktat (mg/L)	F	5,759	5,114	5,513
	B	7,595 *	7,045 *	7,599 *
etil-3-hidroksibutanoat^{S} (mg/L)	F	0,251 a	0,237 b	0,256 a*
	B	0,250	0,227	0,244
dietil-sukcinat^{S} (mg/L)	F	0,435	0,394	0,406
	B	0,693 *	0,669 *	0,670 *
metil-4-hidroksibutanoat^{S}	F	22,823 b*	24,189 ab	25,063 a*
	B	18,078	16,120	19,606
etil-4-hidroksibutanoat^{S} (mg/L)	F	6,706	7,739 *	7,460 *
	B	5,439	5,523	5,590
dietil-malat^{S} (mg/L)	F	0,311	0,299	0,294
	B	0,586 *	0,562 *	0,564 *
monometil-sukcinat^{S}	F	80,313 a	67,541 b	65,988 b
	B	79,255	64,129	72,433
monoetil-sukcinat^{S} (mg/L)	F	21,270	20,430	19,548
	B	26,480 *	25,299	26,297 *
etil-*p*-kumarat^{S} (mg/L)	F	0,445 a	0,392 b	0,400 ab
	B	0,489 a*	0,405 b	0,415 b
Ostali				
benzaldehid^{S}	F	9,263	6,864	9,216
	B	8,521	9,051	8,795

gvajakol[S]	F	0,951	0,923	0,974
	B	0,942	0,809	1,239
4-vinilgvajakol[S]	F	366,144	398,459	439,502
	B	382,427	332,417	417,905
acetoin[S]	F	29,514 a	15,968 c	24,282 b
	B	28,764 a	14,212 b	24,624 a
3-hidroksi-2-pentanon[S]	F	38,297	32,254	34,832
	B	36,903 a	30,626 b	35,033 ab
γ-butirolakton[S]	F	191,042 b	226,944 a	215,531 ab
	B	232,534	226,659	234,584
pantolakton[S]	F	45,073	41,324	46,794
	B	46,878	38,541	45,903
3-metiltiopropanol[S] (mg/L)	F	1,059	1,025	1,053
	B	1,058	0,969	1,021
triptofol[S] (mg/L)	F	0,746 b	1,073 a	1,068 a*
	B	0,922	1,023	0,837

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BS16 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

U drugoj godini istraživanja (berba 2016.) nakon fermentacije (F) vina BS16 i BK16 tretmana nisu se značajno razlikovala na osnovi koncentracija monoterpena (Tablica 7). Vino BK16 imalo je nižu koncentraciju linalola u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16. Nije bilo razlika u koncentracijama C_{13}-norizoprenoida β-damaskenona između vina različitih tretmana. S obizom na koncentracije alkohola, vina tretmana BS16 i BK16 nisu se međusobno značajno razlikovala, dok su se od vina kontrolnog tretmana K16 razlikovala jedino na osnovi niže koncentracije benzil-alkohola. Također, značajnih razlika između BS16 i BK16 vina nije bilo ni s obzirom na koncentracije masnih kiselina, koje su u nižim koncentracijama pronađene uglavnom u vinu kontrolnog tretmana K16. Koncentracije etil-estera uglavnom su bile više u vinima tretmana koji su uključivali bistrenje tijekom fermentacije, posebno BS16. Slično je utvrđeno i za acetatne estere, dok su se vina BS16 i BK16 tretmana razlikovala samo u koncentraciji izoamil-acetata, kojeg je značajno više bilo u BS16 vinu. Većinom nije bilo značajnih razlika između vina BS16 i BK16 tretmana s obzirom na koncentracije ostalih estera, dok su pojedini esteri iz ove skupine pronađeni u višoj koncentraciji u vinu kontrolnog tretmana K16. Najviša koncentracija acetoina pronađena je u vinu K16, a najniža u vinu BS16 tretmana. Vino kontrolnog tretmana K16 imalo je značajno nižu koncentraciju γ-butirolaktona u odnosu na vino BS16, odnosno triptofola u odnosu na vina BS16 i BK16 tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracije monoterpena i β-damaskenona bile su podjednake u svim vinima (Tablica 7). Značajne razlike utvrđene između vina kontrolnog K16 i ostalih tetmana s obzirom na koncentracije benzil-alkohola, dodekanske kiseline i etil-*p*-kumarata zadržale su se i nakon dodatnog bistrenja (B). Razlike s obzirom na koncentracije važnih etil-estera i acetatnih estera koje su utvrđene između vina različitih tretmana nakon fermentacije (F) nisu potvrđene te se vina nakon dodatnog bistrenja (B) nisu razlikovala na osnovi tih spojeva. Stabilna vina (B) BS16 i BK16 tretmana razlikovala su se po koncentraciji acetoina kao i nakon fermentacije (F), dok je vino kontrolnog tretmana K16 imalo značajno višu koncentraciju acetoina i 3-hidroksi-2-pentanona od vina BS16 tretmana.

Tablica 8. Koncentracije vezanih hlapljivih spojeva arome (µg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Vezani spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Monoterpeni						
β-pinen^{S}	F	0,284	0,274	0,179	0,188	0,207
	B	0,254 a	0,267 a	0,256 a*	0,248 a	0,187 b
trans-ocimen^{S}	F	0,137	0,198	0,275	0,288	0,262
	B	0,220 *	0,231	0,253	0,291	0,264
trans-furan oksid linalola^{S}	F	0,605	0,661	0,693	0,617	0,655
	B	0,829 ab*	0,808 ab	0,730 b	0,848 a*	0,832 a*
cis-furan oksid linalola^{S}	F	0,177 cd	0,286 ab	0,321 a	0,226 bc	0,136 d
	B	0,293 b*	0,217 b	0,509 a	0,225 b	0,255 b
linalol	F	28,295 *	28,472 *	30,706 *	30,216 *	27,384 *
	B	4,456	4,022	4,062	4,398	3,763
hotrienol^{S}	F	0,309 ab	0,281 b	0,339 ab	0,408 a*	0,313 ab
	B	0,361	0,281	0,284	0,234	0,344
α-terpineol	F	2,413 ab	2,151 b	2,464 ab	2,067 b	3,366 a*
	B	2,243	3,840	3,939	3,661	2,248
trans-piran oksid linalola^{S}	F	1,584	1,712	1,813	1,395	1,557
	B	2,373 a*	1,759 b	1,606 b	1,722 b	1,662 b
citronelol	F	6,539 b	11,592 ab*	15,467 a	9,625 ab	14,889 a
	B	7,018	3,624	7,314	5,847	5,944
nerol	F	9,594 b	11,653 ab*	10,966 ab*	11,941 a*	12,556 a*
	B	8,968	8,715	8,081	8,920	7,453
geraniol	F	72,382	79,283 *	82,493	83,458 *	81,471 *
	B	69,779 a	59,674 b	62,459 ab	65,809 ab	63,166 ab
C_{13}-norizoprenoid						
3-hidroksi-β-damaskon^{S}	F	49,828 ab*	51,439 a*	41,182 b	43,360 ab*	50,454 a*
	B	35,161	29,705	29,271	31,591	30,819
Alkoholi						

1-heksanol	F	132,806	133,754	134,164	140,294	150,727
	B	139,019 c	171,573 b	225,875 a*	115,231 c	123,773 c
trans-3-heksenol	F	0,642 b	1,341 ab	1,388 ab	1,298 ab	1,438 a
	B	1,860 *	1,750	1,626	1,708	1,886 *
cis-3-heksenol	F	28,752	29,049	29,288	28,940	29,890
	B	33,815 *	31,226	30,053	30,988	32,929
1-okten-3-ol[S]	F	1,485	1,617	1,692	1,590	1,698
	B	1,960 cd*	3,098 c	1,970 d	6,486 a*	4,218 b*
benzil-alkohol[S]	F	68,698	67,137	70,107	71,003	80,233
	B	92,505 a*	79,725 ab	78,609 b	87,171 ab*	81,085 ab
2-feniletanol	F	334,001 bc	371,412 ab*	317,873 c	355,377 abc	383,547 a*
	B	367,735 a	286,615 b	348,301 a	334,583 ab	276,681 b
Ostali						
benzaldehid	F	14,320 a	13,428 ab*	12,187 b	13,846 a	14,701 a
	B	15,770 a	10,562 c	12,258 bc	13,815 ab	15,433 a

Skraćenice: K15 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BGS15 - djelomično bistren mošt prije fermentacije, BP15 - djelomično bistren mošt u početnoj fazi fermentacije, BS15 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK15 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

Nakon fermentacije (F), utvrđene su određene razlike između vina različitih tretmana vezano uz glikozidno vezane spojeve arome, ali bez jasnih ponavljajućih obrazaca (Tablica 8). Vrijedi istaknuti vino BK15 tretmana koje se ponajviše razlikovalo od vina kontrolnog tretmana K15 i to na osnovi značajno viših koncentracija vezanih citronelola, nerola, *trans*-3-heksenola i 2-feniletanola. Vino BP15 tretmana sadržavalo je najvišu koncentraciju vezanog *cis*-furan oksida linalola.

Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđeno je značajno opadanje koncentracija pojedinih glavnih vezanih monoterpenskih alkohola, posebno linalola i geraniola, što je u slučaju potonjeg uzrokovalo pojavu razlika između vina pojedinih tretmana (Tablica 8). Vino BK15 tretmana razlikovalo se od ostalih na osnovi niže koncentracije vezanog β-pinena, BP15 na osnovi više koncentracije vezanog *cis*-furan oksida linalola, a vino kontrolnog tretmana K15 na osnovi više koncentracije vezanog *trans*-piran oksida linalola. S obzirom na koncentracije spojeva drugih skupina najviše su se značajno razlikovala vina BP15 i BK15 tretmana, a vina BGS15 i BS15 tretmana najviše su se razlikovala od vina kontrolnog tretmana K15.

Tablica 9. Koncentracije vezanih hlapljivih spojeva arome (µg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Vezani spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BS16	BK16
Monoterpeni				
trans-furan oksid linalola[S]	F	2,269	2,732	2,311
	B	2,338	2,344	2,300
cis-furan oksid linalola[S]	F	0,767	0,784	0,797
	B	0,842 a	0,815 ab	0,760 b
linalol	F	8,612 *	7,571	7,964
	B	6,478	6,269	6,025
hotrienol[S]	F	1,850	2,368	2,245
	B	1,814	2,298	2,352
α-terpineol	F	1,351	1,375	1,395
	B	1,330	1,368	1,327
trans-piran oksid linalola[S]	F	5,721	5,577	5,848
	B	5,724	5,523	5,767
citronelol	F	1,027	0,955	0,662
	B	0,694	0,991	1,044
nerol	F	7,447	7,405	7,688
	B	7,612	7,644	7,524
geraniol	F	43,486	40,910	45,476
	B	41,761	43,858	43,132
terpendiol I[S]	F	1,684	0,997	1,334
	B	1,436	1,003	1,321
trans-8-hidroksi-linalol[S]	F	29,597	20,839	29,551
	B	21,403	21,927	26,669
7-hidroksi-geraniol[S]	F	21,916	22,109	23,226
	B	19,401	19,737	23,475
cis-8-hidroksi-linalol[S]	F	92,777	91,964	99,874
	B	83,504	81,706	100,344
trans-geranijska kiselina[S]	F	8,372	7,877	9,366
	B	8,118 b	8,579 ab	9,541 a
C_{13}-norizoprenoidi				
β-damaskenon	F	0,144	0,140	0,102
	B	0,119	0,131	0,132
3-hidroksi-β-damaskon[S]	F	177,555 *	157,921 *	179,754
	B	130,081	128,769	135,159
3-okso-α-jonol[S]	F	59,229	56,015	62,705
	B	59,096	57,332	60,956
3-hidroksi-7,8-dihidro-β-jonol[S]	F	50,450	49,101	53,445
	B	47,417	45,005	52,070
vomifoliol[S]	F	20,284	18,474	25,323
	B	17,073	14,028	20,814

Alkoholi				
1-heksanol	F	88,109	86,501	86,977
	B	86,353	86,500	87,485
trans-3-heksenol[S]	F	1,157	1,111	1,098
	B	1,180	1,156	1,164
cis-3-heksenol[S]	F	13,289	13,279	13,463
	B	12,806	12,630	13,168
trans-2-heksenol[S]	F	15,182	16,309	16,374
	B	15,267	15,971	16,880
1-okten-3-ol[S]	F	2,491	2,483	2,597
	B	2,530	2,420	2,510
1-oktanol[S]	F	200,436	19,881	192,749
	B	210,644	188,657	180,566
2-feniletanol[S]	F	322,719 a	262,358 b	266,701 b
	B	305,423	260,852	273,109
Ostali				
benzaldehid[S]	F	5,087	2,380	2,582
	B	3,124	3,097	2,313
4-vinilgvajakol[S]	F	12,291	14,024	16,199
	B	10,362	9,555	13,413
triptofol[S]	F	10,091 b	11,189 ab	13,790 a
	B	10,624	10,918	12,641

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BS16 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

U drugoj godini istraživanja (2016.) nakon fermentacije (F) vina BS16 i BK16 tretmana nisu se značajno razlikovala prema koncentracijama vezanih spojeva arome, a imala su značajno nižu koncentraciju vezanog 2-feniletanola u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 (Tablica 9). Vino BK16 tretmana imalo je i značajno višu koncentraciju vezanog triptofola u odnosu na vino kontrolnog tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B) vina BS16 i BK16 nisu se značajno razlikovala, dok se vino BK16 razlikovalo od vina kontrolnog tretmana K16 samo na osnovi niže koncentracije vezanog *cis*-furan oksida linalola i više koncentracije vezane *trans*-geranijske kiseline (Tablica 9).

4.1.5. Senzorska svojstva

Tablica 10. Rezultati kvantitativne deskriptivne analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Svojstva mirisa						
cvjetni	F	6,4 b*	7,3 a*	7,3 a	7,6 a	7,6 a*
	B	5,7 d	6,8 c	7,4 a	7,2 b	7,0 b
voćni	F	6,3 b*	7,1 a*	7,1 a	7,3 a*	7,2 a*
	B	5,1 d	6,2 c	7,0 a	6,6 b	6,6 b
biljni	F	2,6 a	2,0 b	2,1 b	2,0 b	2,0 b
	B	2,3	2,1	2,3	2,3	2,1
začinski / aromatično bilje	F	2,8	3,0	3,2	2,7	3,1
	B	1,8 b	2,3 ab	2,8 a	2,7 a	2,7 a
sovinjonski	F	2,7 b	3,4 a	3,5 a	3,8 a*	3,6 a
	B	2,4	2,7	3,1	2,9	3,2
muškatni	F	2,8 b	3,4 ab	3,6 a	3,5 ab	3,4 ab
	B	2,4 b	2,6 b	3,4 a	3,3 a	3,3 a
med	F	3,0 b	3,7 ab	4,1 a	3,9 a	3,9 a
	B	2,6 b	3,1 ab	3,8 a	3,5 ab	3,3 ab
vosak	F	2,5	2,9	2,9	3,0	2,7
	B	2,1	2,2	2,8	2,4	2,3
Svojstva okusa						
svježina	F	6,5	6,6	6,6	6,6	6,6
	B	6,2	6,5	6,4	6,5	6,5
kiselost	F	6,2 a	5,4 bc	5,5 b*	5,2 c	5,5 b
	B	6,3 a	5,5 b	5,4 b	5,5 b	5,4 b
tijelo / punoća	F	7,2 b	7,9 a*	8,0 a	8,2 a*	8,1 a
	B	6,5 c	7,5 b	7,8 a	7,6 ab	7,5 ab
slatkoća	F	4,1 b	5,6 a*	5,3 a	5,6 a	5,5 a
	B	3,9 c	5,0 b	5,4 a	5,3 ab	5,3 ab
viskozitet	F	7,0 b*	7,8 a*	7,8 a	8,0 a	7,8 a
	B	6,4 c	7,4 ab	7,7 a	7,5 ab	7,3 b
gorčina	F	3,9 a	3,1 b	3,2 b	3,0 b	3,1 b
	B	3,8 a	2,9 b	3,0 b	3,1 b	3,3 ab
astringentnost	F	3,8 a	2,9 bc	2,9 bc	2,8 c	3,0 b
	B	3,6 a	3,0 c	3,0 c	3,1 bc*	3,4 ab*

Skraćenice: K15 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BGS15 - djelomično bistren mošt prije fermentacije, BP15 - djelomično bistren mošt u početnoj fazi fermentacije, BS15 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK15 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

Nakon fermentacije (F), intenziteti *cvjetnih* i *voćnih* mirisa te mirisa koji podsjećaju na miris vina kultivara *sauvignon blanc* podrijetlom od hlapljivih tiola (tzv. *sovinjonski* miris nalik

mirisu *tropskog voća* u kombinaciji s mirisima brnistre, šimšira i žutilovke), bili su podjednako intenzivni u vinima svih tretmana koji su uključivali djelomično bistrenje u fermentaciji, a značajno viši nego u vinu kontrolnog tretmana K15 (Tablica 10). Intenzitet *biljnog* mirisa bio je najviši u vinu kontrolnog tretmana K15, *muškatna* nota bila je značajno slabija u vinu kontrolnog K15 nego u vinu BP15 tretmana, dok je miris koji podsjeća na med bio značajno manje intenzivan u vinu kontrolnog tretmana K15 nego u vinima tretmana bistrenja tijekom fermentacije, koji se međusobno na osnovi njega nisu razlikovali. Od svojstava okusa, intenzitet *kiselosti* bio je značajno izraženiji u kontrolnom vinu K15 nego u ostalima, s najslabijim intenzitetom zabilježenim u vinu BS15. *Tijelo / punoća*, *slatkoća* i *viskozitet* ocijenjeni su značajno intenzivnijim u vinima tretmana djelomičnog bistrenja u fermentaciji nego u vinu kontrolnog tretmana K15, dok se ono odlikovalo značajno intenzivnijom *gorčinom* i *astringencijom*.

Nakon dodatnog bistrenja (B), intenziteti *cvjetnih* i *voćnih* mirisa u vinima određenih tretmana snizili su se, posebno u vinima tretmana K15 i BGS15. Bili su značajno viši u vinima tretmana bistrenja u fermentaciji u odnosu na ostala vina, a najviši u BP15 (Tablica 10). Pojavile su se razlike među tretmanima u intenzitetu mirisa koji podsjećaju na *začinsko* i *aromatično bilje* koje nisu zabilježene nakon fermentacije te je vino kontrolnog tretmana K15 ocijenjeno najnižim intenzitetom. Obrnuto je utvrđeno za *sovinjonske* note tako da nisu utvrđene razlike u intenzitetu tog mirisa između vina različitih tretmana nakon dodatnog bistrenja (B). Odnosi razlika između tretmana ostali su slični onima utvrđenim nakon fermentacije (F) za većinu svojstava mirisa i okusa.

Tablica 11. Rezultati kvantitativne deskriptivne analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BS16	BK16
Svojstva mirisa				
cvjetni	F	6,9 b	6,7 b	7,2 a
	B	6,6	6,7	7,2
voćni	F	6,4 b	6,8 ab	6,9 a
	B	6,5	6,7	7,0
biljni	F	2,0	1,9	2,5
	B	2,2	2,0	2,4
začinski / aromatično bilje	F	1,5	2,1	1,7
	B	1,8 b	2,7 a	2,2 ab
sovinjonski	F	3,2 b	4,1 a	3,5 ab
	B	3,1 b	4,0 a	3,4 ab
muškatni	F	3,5	3,9	3,6
	B	3,5	3,5	3,6
med	F	1,5	2,3	2,1
	B	2,0	2,0	2,8
vosak	F	2,3	2,5	2,8
	B	1,8	1,8	2,5
Svojstva okusa				
svježina	F	7,3	7,4	7,4*
	B	7,1	7,4	7,0
kiselost	F	5,9	5,8	5,8
	B	5,5	5,9	5,7
tijelo / punoća	F	7,8	7,8	8,2
	B	7,7	7,9	8,1
slatkoća	F	6,5	6,3	6,5
	B	6,5 ab	6,4 b	6,8 a
viskozitet	F	7,3	7,5	7,6
	B	7,5	7,6	7,7
gorčina	F	3,2	3,2	3,3
	B	3,4*	3,6	3,4
astringentnost	F	2,8	2,7	2,6
	B	2,4	2,6	2,7

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BS16 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

U drugoj godini istraživanja (2016.) nakon fermentacije (F) vino BK16 tretmana razlikovalo se od vina kontrolnog tretmana K16 na osnovi viših intenziteta *cvjetnih* i *voćnih* mirisa, dok je vino BS16 tretmana u odnosu na K16 bilo intenzivnijeg *sovinjonskog* mirisa (Tablica 11).

Nakon dodatnog bistrenja (B), značajna razlika u intenzitetu mirisa zadržala se samo u slučaju *sovinjonskog*, a pojavila u slučaju mirisa *začinskog* i *aromatičnog bilja*, u oba slučaja s višim intenzitetima utvrđenim u vinu BS16 u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 (Tablica 11). Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđena je i razlika u intenzitetu *slatkoće*, koji je bio viši u vinu BK16 u odnosu na vino BS16 tretmana.

Tablica 12. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova i test nizanja) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Bodovi	F	81,2 c	84,3 b*	84,9 ab	85,7 a*	85,6 ab*
	B	79,5 d	82,3 c	84,8 a	83,6 b	83,3 b
Poredak	F	5	4	3	1	2
	B	5	4	1	2	3

Skraćenice: K15 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BGS15 - djelomično bistren mošt prije fermentacije, BP15 - djelomično bistren mošt u početnoj fazi fermentacije, BS15 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK15 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

Nakon fermentacije (F), vino kontrolnog tretmana K15 ocijenjeno je značajno nižim brojem bodova od ostalih vina (Tablica 12). Među vinima tretmana koji su uključivali bistrenje prije i tijekom fermentacije, vino BS15 je ocijenjeno većim brojem bodova od vina BGS15. Vina koja su bistrena tijekom fermentacije nisu se međusobno značajno razlikovala s obzirom na broj bodova. U testu nizanja po preferenciji vina tretmana koji su uključivali bistrenje bila su više preferirana od vina BGS15 i vina kontrolnog tretmana K15 koje je bilo najmanje preferirano.

Nakon dodatnog bistrenja (B) vino tretmana BP15 razlikovalo se od ostalih tretmana na osnovi značajno većeg broja bodova dobivenih u senzorskom ocjenjivanju (Tablica 12). Isto stabilno vino bilo je i najviše preferirano. Vina BS15 i BK15 nisu se značajno razlikovala međusobno, ali su ocijenjena višim brojem bodova te su bila više preferirana od vina BGS15 i kontrolnog tretmana K15, koje je imalo najmanji broj bodova.

Tablica 13. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova i test nizanja) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

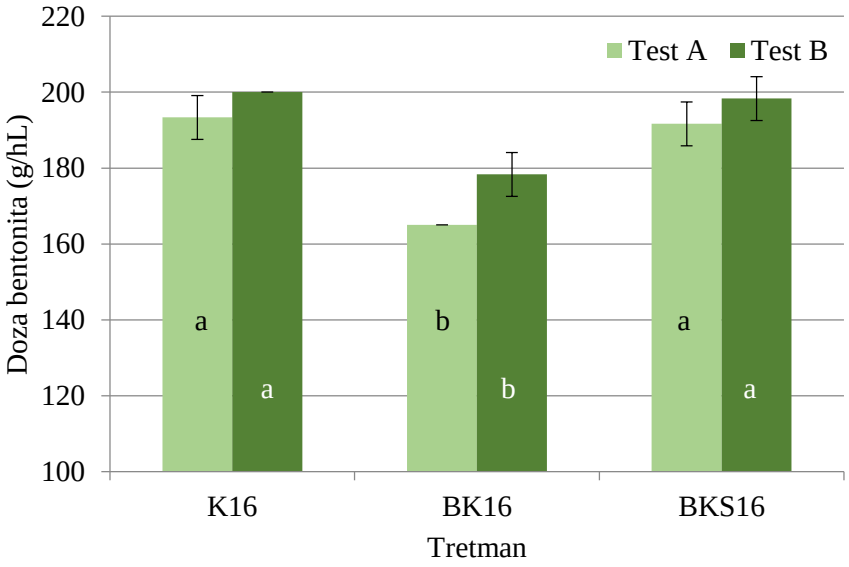
	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BS16	BK16
Bodovi	F	83,0 c	84,9 b	86,1 a
	B	83,6 b	84,2 b	85,6 a
Poredak	F	3	2	1
	B	3	2	1

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BS16 - djelomično bistren mošt u sredini trajanja fermentacije, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije.

U drugoj godini istraživanja (2016.) vino BK16 tretmana je nakon fermentacije (F) ocijenjeno značajno većim brojem bodova u odnosu na vina BS16 i K16 tretmana, što je potvrđeno i ponovnim ocjenjivanjem nakon dodatnog bistrenja (B) (Tablica 13). Vino BS16 tretmana se na osnovi bolje senzorske ocjene značajno razlikovalo od vina K16 nakon fermentacije, međutim ne i nakon dodatnog bistrenja.Vino BK16 bilo je najviše, a vino kontrolnog tretmana K16 najmanje preferirano od ocjenjivača i nakon fermentacije (F) i nakon dodatnog bistrenja (B).

4.2. Učinak načina primjene bentonita u fermentaciji

4.2.1. Doza bentonita



Slika 7. Ukupne doze bentonita primijenjene u tretmanima proizvodnje vina kultivara malvazija istarska u berbi 2016. godine

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije jednom cjelovitom dozom bentonita, BKS16 - mošt djelomično bistren u drugoj polovini trajanja fermentacije u ukupnoj dozi jednakoj kao i BK16, ali raspodijeljenoj u tri manje, jednake doze.

Tretman BKS16 koji je uključivao djelomično bistrenje mošta u drugoj polovini trajanja fermentacije primjenom bentonita u tri manje doze nije se značajno razlikovao od kontrolnog tretmana K16 prema ukupno potrebnoj dozi, dok je tretman u kojem je ista doza primijenjena odjednom u posljednjoj trećini fermentaciji BK16 zahtijevao najmanju ukupnu dozu bentonita, neovisno o upotrijebljenom testu proteinske stabilnosti (Slika 7).

4.2.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri

Tablica 14. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKS16
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9895	0,9893	0,9892
	B	0,9894	0,9895	0,9893
Alkohol (vol. %)	F	15,04 ab*	15,09 a*	14,94 b*
	B	14,69	14,66	14,66
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	22,6 *	22,4	21,8
	B	21,5	21,7	21,2
Reducirajući šećeri (g/L)	F	3,4	3,7	3,3
	B	3,4	3,5	3,3
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	19,2 a*	18,7 b*	18,5 b*
	B	18,2	18,2	18,0
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,5 a*	5,2 b*	5,3 b
	B	5,0	5,0	5,0
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,67	0,69	0,69
	B	0,65	0,66	0,70
pH	F	3,33 c	3,34 b	3,37 a
	B	3,36 a*	3,31 b	3,39 a

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije jednom cjelovitom dozom bentonita, BKS16 - mošt djelomično bistren u drugoj polovini trajanja fermentacije u ukupnoj dozi jednakoj kao i BK16, ali raspodijeljenoj u tri manje, jednake doze.

Vino BKS16 tretmana se nakon fermentacije (F) značajno razlikovalo od vina BK16 tretmana na osnovi nižeg volumnog udjela alkohola i više pH vrijednosti (Tablica 14). Vino kontrolnog tretmana K16 imalo je najnižu pH vrijednost. Vina BK16 i BKS16 tretmana imala su niže koncentracije ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera i ukupne kiselosti u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16.

Nakon dodatnog bistrenja (B) značajno su sniženi volumni udio alkohola te koncentracije ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera i ukupne kiselosti u vinima svih tretmana, a značajna razlika između tretmana BK16 i BKS16 zadržala se samo u slučaju pH vrijednosti (Tablica 14).

4.2.3. Fenolni spojevi

Tablica 15. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKS16
Hidroksibenzojeve kiseline				
galna kiselina	F	2,380	2,900	3,064
	B	2,973 b	2,976 b	3,457 a*
protokatehinska kiselina	F	1,724 a	1,054 b	1,079 b
	B	1,195	1,189 *	1,213 *
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,538 a	0,340 b	0,347 b
	B	0,520 a	0,382 b*	0,370 b*
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,116 a	0,051 b	0,061 b
	B	0,125 a	0,078 b*	0,063 b
siringinska kiselina	F	0,105 b	0,113 a	0,115 a
	B	0,137 ab*	0,157 a*	0,130 b
Hidroksicimetne kiseline				
cis-kaftarna kiselina^{S}	F	1,720 *	1,807 *	1,782 *
	B	1,189	1,098	1,172
trans-kaftarna kiselina	F	12,762 b	19,132 a	18,578 a
	B	12,791 b	19,227 a	18,375 a
cis-kutarna kiselina^{S}	F	0,815 b*	0,868 a*	0,870 a*
	B	0,746 c	0,768 b	0,814 a
trans-kutarna kiselina^{S}	F	0,082 c	0,230 a	0,208 b
	B	0,086 c	0,227 a	0,186 b
kafeinska kiselina	F	4,877 a	3,643 b	3,740 b
	B	5,535 a*	4,037 b*	4,194 b*
cis-fertarna kiselina^{S}	F	0,374 *	0,374 *	0,383 *
	B	0,249	0,250	0,255
trans-fertarna kiselina^{S}	F	1,641 b	1,765 a	1,765 a
	B	1,896 b*	1,949 a*	1,939 a*
p-kumarna kiselina	F	0,854 a	0,561 b	0,574 b
	B	1,123 a*	0,591 b*	0,728 b*
ferulinska kiselina	F	1,053 a	0,881 b	0,906 b
	B	1,015 a	0,858 b	0,887 b
Flavan-3-oli				
katehin + tirosol (kao katehin)	F	21,476 a	20,803 b	20,911 b*
	B	21,281 a	20,348 b	20,621 b
epikatehin	F	0,781	0,787	0,930
	B	0,944 b	1,165 a*	0,931 b
procijanidin B1	F	1,605 b	1,696 a	1,665 ab
	B	1,600 b	1,754 a	1,668 ab
procijanidin B2	F	0,501 b	0,602 a	0,651 a
	B	0,740 b*	1,516 a*	0,848 b*

Ostali				
taksifolin	F	0,155 a	0,108 b	0,098 c
	B	0,172 a*	0,114 b*	0,103 c
trans-piceid	F	0,129 b*	0,172 a	0,166 a*
	B	0,111 c	0,174 a	0,162 b
Ukupni fenoli‡	F	195,636 a	181,697 b	182,727 b
	B	214,970 a*	200,273 b*	177,333 c

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije jednom cjelovitom dozom bentonita, BKS16 - mošt djelomično bistren u drugoj polovini trajanja fermentacije u ukupnoj dozi jednakoj kao i BK16, ali raspodijeljenoj u tri manje, jednake doze.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.
[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

Razlike u koncentracijama fenolnih spojeva između vina tretmana s različitim načinom doziranja bentonita tijekom fermentacije, BK16 i BKS16, utvrđene su u rijetkim slučajevima (Tablica 15). Nakon fermentacije (F) vina ta dva tretmana imala su slične koncentracije hidroksibenzojevih kiselina i većine hidroksicimetnih kiselina, kao i ostalih fenola. Izuzetak su bili *trans*-kutarna kiselina i taksifolin koji su pronađeni u nižoj koncentraciji u vinu tretmana BKS16. Tretmani bistrenja bentonitom u fermentaciji, BK16 i BKS16, uzrokovali su sniženje koncentracije ukupnih fenola u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16.

Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđene su određene promjene koje su za tretman BKS16 bile gotovo jednake kao i za tretman BK16 (Tablica 15), a koje su opisane u poglavlju 4.1.3. Koncentracija *cis*-kutarne kiseline je nakon sniženja dodatnim bistrenjem (B) postala značajno viša u vinu tretmana BKS16. U istom vinu pronađena je značajno niža koncentracija procijanidina B2, iako povišena u vinima svim tretmanima. Odnos koncentracija taksifolina ostao je nepromijenjen jer je u vinima svih tretmana došlo do njenog povišenja. Zbog malog, ali značajnog sniženja nakon dodatnog bistrenja, koncentracija *trans*-piceida u vinu tretmana BKS16 bila je značajno niža od one pronađene u vinu BK16 tretmana. Koncentracija ukupnih fenola u vinu tretmana BKS16 dodatnim se bistrenjem (B) nije značajno promijenila, ali je zbog povišenja koncentracije u vinu BK16 razlika između vina ta dva tretmana postala značajna. Vino BKS16 tretmana sadržavalo je najnižu, a vino kontrolnog tretmana K16 najvišu koncentraciju.

4.2.4. Hlapljivi spojevi arome

Tablica 16. Koncentracije slobodnih hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Slobodni spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKS16
Monoterpeni				
linalol	F	24,405	22,920	23,789
	B	29,675	29,242 *	27,463 *
α-terpineol	F	9,506 b	10,179 a	9,660 ab
	B	12,444	11,921 *	12,892 *
α-terpinolen^{S}	F	0,838	0,972	1,073
	B	0,892	1,351	0,793
citronelol	F	7,811	8,043	8,006
	B	7,676	7,585	7,901
terpendiol I^{S}	F	86,778 *	85,801 *	84,588
	B	77,585	76,090	78,130
C_{13}-norizoprenoid				
β-damaskenon	F	3,100	3,510 *	3,408 *
	B	2,287	2,322	2,519
Alkoholi				
1-heksanol (mg/L)	F	2,023	1,973 *	1,982
	B	1,976	1,912	1,963
trans-3-heksenol^{S}	F	134,293	133,372 *	133,652
	B	132,984	127,304	131,435
cis-3-heksenol^{S}	F	84,702	83,260 *	82,784
	B	83,090	78,587	81,071
1-oktanol^{S}	F	14,832	14,461	16,497
	B	18,618	15,009	14,957
benzil-alkohol^{S}	F	51,588 a	28,122 b	28,735 b
	B	60,788 a*	28,230 b	29,909 b*
2-feniletanol (mg/L)	F	29,900 *	28,770	28,748
	B	27,993	28,140	28,904
Masne kiseline				
butanska kiselina (mg/L)	F	1,784	1,835	1,813
	B	1,751	1,737	1,795
heksanska kiselina (mg/L)	F	3,920	4,107	4,064
	B	3,900	3,939	4,019
oktanska kiselina (mg/L)	F	5,357 b	5,963 a	5,728 ab
	B	5,615	5,676	5,835 *
dekanska kiselina (mg/L)	F	1,597 b	1,759 a	1,632 ab
	B	1,842	1,766	1,821
dodekanska kiselina^{S}	F	52,434 a*	27,413 b	25,801 b
	B	36,627 a	22,642 b	25,687 b

Etil esteri				
etil-butanoat (mg/L)	F	0,289	0,330	0,323
	B	0,312	0,317	0,319
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,492 b	0,572 a	0,556 a
	B	0,598	0,586	0,618 *
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,213	0,242	0,229
	B	0,268 *	0,246	0,286 *
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,037 a	0,031 b	0,033 b
	B	0,039	0,037	0,040 *
Acetatni esteri				
izoamil-acetat (mg/L)	F	0,911 b	1,141 a*	1,076 a
	B	0,986	0,993	0,984
heksil-acetat	F	67,142 b	90,817 a	85,551 a
	B	82,899	80,056	84,650
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	0,118 b	0,149 a	0,143 a
	B	0,138	0,141	0,135
Ostali esteri				
etil-laktat (mg/L)	F	5,759	5,513	5,404
	B	7,595 *	7,599 *	7,554 *
etil-3-hidroksibutanoat^{S} (mg/L)	F	0,251 a	0,256 a*	0,237 b
	B	0,250	0,244	0,237
dietil-sukcinat^{S} (mg/L)	F	0,435	0,406	0,394
	B	0,693 *	0,670 *	0,689 *
metil-4-hidroksibutanoat^{S}	F	22,823 ab*	25,063 a*	22,448 b*
	B	18,078	19,606	18,106
etil-4-hidroksibutanoat^{S} (mg/L)	F	6,706	7,460 *	6,934*
	B	5,439	5,590	5,359
dietil-malat^{S} (mg/L)	F	0,311 a	0,294 ab	0,282 b
	B	0,586 *	0,564 *	0,581 *
monometil-sukcinat^{S}	F	80,313 a	65,988 ab	64,828 b
	B	79,255	72,433	77,722
monoetil-sukcinat^{S} (mg/L)	F	21,270 a	19,548 ab	19,144 b
	B	26,480 *	26,297 *	26,812 *
etil-*p*-kumarat^{S} (mg/L)	F	0,445 a	0,400 b	0,381 b
	B	0,489 a*	0,415 b	0,444 ab*
Ostali				
benzaldehid^{S}	F	9,263	9,216	8,750
	B	8,521	8,795	9,050
gvajakol^{S}	F	0,951	0,974	0,475
	B	0,942	1,239	0,954
4-vinilgvajakol^{S}	F	366,144	439,502	393,622
	B	382,427	417,905	451,898
acetoin^{S}	F	29,514 a	24,282 b	21,679 b
	B	28,764 a	24,624 b	22,784 b
3-hidroksi-2-pentanon^{S}	F	38,297	34,832	36,701
	B	36,903	35,033	36,880

γ-butirolakton[S]	F	191,042	215,531	206,255
	B	232,534	234,584	247,659 *
pantolakton[S]	F	45,073	46,794	44,795
	B	46,878	45,903	46,339
3-metiltiopropanol[S] (mg/L)	F	1,059	1,053	1,018
	B	1,058	1,021	1,024
triptofol[S] (mg/L)	F	0,746 c	1,068 a*	0,868 b
	B	0,922	0,837	0,799

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije jednom cjelovitom dozom bentonita, BKS16 - mošt djelomično bistren u drugoj polovini trajanja fermentacije u ukupnoj dozi jednakoj kao i BK16, ali raspodijeljenoj u tri manje, jednake doze.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

Vina BK16 i BKS16 tretmana se nakon fermentacije (F) nisu značajno razlikovala na osnovi koncentracija većine slobodnih hlapljivih spojeva arome (Tablica 16), pa je i odnos koncentracija između vina BKS16 i kontrolnog tretmana K16 bio vrlo sličan onome već opisanom za BK16 u poglavlju 4.1.4. Vino BKS16 tretmana imalo je značajno niže koncentracije etil-3- i metil-4-hidroksibutanoata u odnosu na vino BK16 tretmana. Za razliku od vina BK16, vino BKS16 tretmana sadržavalo je značajno niže koncentracije pojedinih estera iz skupine ostalih estera u usporedbi s vinom kontrolnog tretmana K16.

Nakon dodatnog bistrenja (B), promjene koje su utvrđene u vinu BKS16 također su bile vrlo slične onima već opisanim za vino BK16 tretmana u poglavlju 4.1.4. Razlike u koncentracijama važnih etilnih i acetatnih estera između vina različitih tretmana koje su utvrđene nakon fermentacije (F) nisu potvrđene nakon dodatnog bistrenja (B) (Tablica 16).

Tablica 17. Koncentracije vezanih hlapljivih spojeva arome (µg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Vezani spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKS16
Monoterpeni				
trans-furan oksid linalola[S]	F	2,269	2,311	2,373
	B	2,338	2,300	2,429
cis-furan oksid linalola[S]	F	0,767	0,797	0,751
	B	0,842 a	0,760 b	0,784 ab
linalol	F	8,612 *	7,964	8,306
	B	6,478	6,025	6,161
hotrienol[S]	F	1,850	2,245	2,055
	B	1,814	2,352	2,329
α-terpineol	F	1,351	1,395	1,404

	B	1,330 ab	1,327 b	1,384 a
trans-piran oksid linalola[S]	F	5,721	5,848	5,874
	B	5,724	5,767	6,040
citronelol	F	1,027	0,662	1,066
	B	0,694	1,044	0,318
nerol	F	7,447	7,688	8,013
	B	7,612	7,524	7,807
geraniol	F	43,486	45,476	45,747
	B	41,761	43,132	42,966
terpendiol I[S]	F	1,684	1,334	1,418
	B	1,436	1,321	1,391
trans-8-hidroksi-linalol[S]	F	29,597	29,551	28,603
	B	21,403	26,669	24,526
7-hidroksi-geraniol[S]	F	21,916	23,226	24,128
	B	19,401	23,475	24,850
cis-8-hidroksi-linalol[S]	F	92,777	99,874	101,670
	B	83,504	100,344	101,932
trans-geranijska kiselina[S]	F	8,372	9,366	9,139
	B	8,118 b	9,541 a	9,265 ab
C_{13}-norizoprenoidi				
β-damaskenon	F	0,144	0,102	0,150
	B	0,119 b	0,132 ab	0,142 a
3-hidroksi-β-damaskon[S]	F	177,555 *	179,754	178,457
	B	130,081	135,159	145,364
3-okso-α-jonol[S]	F	59,229	62,705	60,803
	B	59,096	60,956	61,635
3-hidroksi-7,8-dihidro-β-jonol[S]	F	50,450	53,445	53,466
	B	47,417	52,070	52,523
vomifoliol[S]	F	20,284	25,323	22,716
	B	17,073	20,814	20,067
Alkoholi				
1-heksanol	F	88,109	86,977	87,692
	B	86,353	87,485	87,307
trans-3-heksenol[S]	F	1,157	1,098	1,118
	B	1,180	1,164	1,136
cis-3-heksenol[S]	F	13,289	13,463	13,730
	B	12,806	13,168	13,666
trans-2-heksenol[S]	F	15,182	16,374	16,575
	B	15,267 b	16,880 a	16,204 ab
1-okten-3-ol[S]	F	2,491	2,597	2,552
	B	2,530	2,510	2,390
1-oktanol[S]	F	200,436	192,749	178,832
	B	210,644	180,566	172,444
2-feniletanol[S]	F	322,719 a	266,701 b	284,727 b
	B	305,423	273,109	289,711
Ostali				

benzaldehid[S]	F	5,087	2,582	2,427
	B	3,124	2,313	2,786
4-vinilgvajakol[S]	F	12,291	16,199	17,463
	B	10,362	13,413	11,245
triptofol[S]	F	10,091	13,790	12,051
	B	10,624	12,641	11,625

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije jednom cjelovitom dozom bentonita, BKS16 - mošt djelomično bistren u drugoj polovini trajanja fermentacije u ukupnoj dozi jednakoj kao i BK16, ali raspodijeljenoj u tri manje, jednake doze.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

S obzirom na koncentracije vezanih spojeva arome nakon fermentacije (F) između vina BK16 i BKS16 nije bilo značajnih razlika (Tablica 17). Oba vina sadržavala su značajno manje vezanog 2-feniletanola od vina kontrolnog tretmana K16.

Nakon dodatnog bistrenja (B) viša koncentracija monoterpena α-terpineola pronađena je u vinu BKS16 u odnosu na vino BK16 tretmana (Tablica 17). Vino BK16 razlikovalo se od vina kontrolnog tretmana K16 na osnovi niže koncentracije vezanog *cis*-furan oksida linalola te više koncentracije vezane *trans*-geranijske kiseline i vezanog *trans*-2-heksenola, dok je u vinu BKS16 tretmana pronađena viša koncentracija vezanog β-damaskenona u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16.

4.2.5. Senzorska svojstva

Tablica 18. Rezultati kvantitativne deskriptivne analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKS16
Svojstva mirisa				
cvjetni	F	6,9 b	7,2 ab	7,4 a
	B	6,6	7,2	6,8
voćni	F	6,4 c	6,9 b	7,5 a*
	B	6,5	7,0	6,7
biljni	F	2,0 b	2,5 a	2,6 a
	B	2,2	2,4	2,4
začinski / aromatično bilje	F	1,5 b	1,7 ab	2,3 a
	B	1,8	2,2	2,2
sovinjonski	F	3,2 b	3,5 ab	4,0 a
	B	3,1	3,4	3,3
muškatni	F	3,5	3,6	3,9
	B	3,5	3,6	3,5

med	F	1,5 b	2,1 ab	3,0 a
	B	2,0	2,8	2,4
vosak	F	2,3	2,8	3,3*
	B	1,8	2,5	1,7
Svojstva okusa				
svježina	F	7,3	7,4 *	7,5 *
	B	7,1	7,0	6,9
kiselost	F	5,9	5,8	5,8
	B	5,5	5,7	5,5
tijelo / punoća	F	7,8	8,2	8,4
	B	7,7	8,1	8,1
slatkoća	F	6,5	6,5	7,1
	B	6,5	6,8	6,6
viskozitet	F	7,3 b	7,6 ab	7,9 a
	B	7,5	7,7	7,8
gorčina	F	3,2	3,3	3,3
	B	3,4 *	3,4	3,2
astringentnost	F	2,8	2,6	2,9
	B	2,4	2,7	2,5

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije jednom cjelovitom dozom bentonita, BKS16 - mošt djelomično bistren u drugoj polovini trajanja fermentacije u ukupnoj dozi jednakoj kao i BK16, ali raspodijeljenoj u tri manje, jednake doze.

Nakon fermentacije (F), vina BKS16 i BK16 razlikovala su se samo na osnovi intenziteta mirisa koji podsjeća na *voće* koji je bio značajno izraženiji u vinu BKS16 tretmana (Tablica 18). Pored toga, vino BKS16 tretmana opisano je s višim intenzitetima mirisa *začina* i *aromatičnog bilja*, *sovinjonskog* mirisa te mirisa koji podsjeća na med, kao i osjeta *viskoznosti* u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16, što nije utvrđeno za vino tretmana BK16.

Nakon dodatnog bistrenja (B), vina BKS16, BK16 i kontrolnog tretmana K16 nisu se statistički značajno razlikovala na osnovi intenziteta ni jednog svojstva mirisa i okusa (Tablica 18).

Tablica 19. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova i test nizanja) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

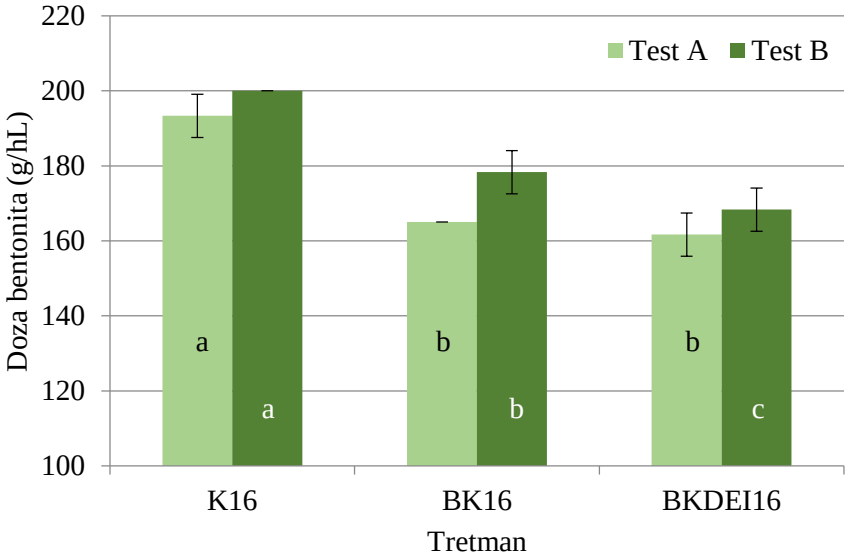
	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKS16
Bodovi	F	83,0 b	86,1 a	87,5 a*
	B	83,6 b	85,6 a	84,8 ab
Poredak	F	3	2	1
	B	3	1	2

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije jednom cjelovitom dozom bentonita, BKS16 - mošt djelomično bistren u drugoj polovini trajanja fermentacije u ukupnoj dozi jednakoj kao i BK16, ali raspodijeljenoj u tri manje, jednake doze.

Vino BKS16 nije se razlikovalo od vina BK16 tretmana na osnovi broja bodova ni nakon fermentacije (F) ni nakon dodatnog bistrenja (B) (Tablica 19). Nakon fermentacije (F) najviše preferirano bilo je vino BKS16 tretmana, a nakon dodatnog bistrenja (B) vino BK16 tretmana. Nakon fermetacije (F) vino kontrolnog tretmana K16 ocijenjeno je manjim brojem bodova od ostalih vina, a nakon dodatnog bistrenja (B) samo u odnosu na vino BK16 tretmana, te je u oba slučaja bilo najmanje preferirano od strane ocjenjivača.

4.3. Učinak načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji

4.3.1. Doza bentonita



Slika 8. Ukupne doze bentonita primijenjene u tretmanima proizvodnje vina kultivara malvazija istarska u berbi 2016. godine

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u vodovodnoj vodi, BKDEI16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u deioniziranoj vodi.

Tretman u kojem je bentonit pripremljen namakanjem u deioniziranoj vodi, BKDEI16, pokazao je sličnu učinkovitost kao tretman s upotrijebljenom vodovodnom vodom BK16 u značajnom smanjenju ukupne doze bentonita u odnosu na kontrolni tretman K16 (Slika 8). U slučaju testiranja proteinske stabilnosti zagrijavanjem s taninom, BKDEI16 se pokazao uspješnijim od BK16 tretmana jer je zahtijevao najmanju ukupnu dozu bentonita.

4.3.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri

Tablica 20. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKDEI16
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9895	0,9893	0,9890
	B	0,9894	0,9895	0,9892
Alkohol (vol. %)	F	15,04 *	15,09 *	15,07 *
	B	14,69	14,66	14,64
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	22,6 *	22,4	21,5
	B	21,5	21,7	20,9
Reducirajući šećeri (g/L)	F	3,4	3,7	3,3
	B	3,4 ab	3,5 a	2,9 b
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	19,2 a*	18,7 ab*	18,3 b
	B	18,2	18,2	18,0
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,5 a*	5,2 b*	5,3 b*
	B	5,0	5,0	5,0
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,67	0,69	0,68
	B	0,65	0,66	0,64
pH	F	3,33 b	3,34 a	3,33 ab
	B	3,36 a*	3,31 b	3,33 ab

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u vodovodnoj vodi, BKDEI16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u deioniziranoj vodi.

Nakon fermentacije (F) vina tretmana BKDEI16 i BK16 nisu se značajno razlikovala ni po jednom od određivanih fizikalno-kemijskih parametara (Tablica 20). U vinu kontrolnog tretmana K16 koncentracija ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera bila je značajno viša nego u vinu BKDEI16 tretmana, a koncentracija ukupne kiselosti od onih pronađenih u vinima oba tretmana koja su uključivala bistrenje pred kraj fermentacije.

Dodatnim bistrenjem (B) značajno su sniženi volumni udio alkohola i koncentracija ukupne kiselosti u svim vinima (Tablica 20). Snižene su i koncentracije ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera, a vina BK16 i BKDEI16 značajno su se razlikovala na osnovi koncentracije reducirajućih šećera pri čemu je vino tretmana BKDEI16 imalo najnižu izmjerenu koncentraciju.

4.3.3. Fenolni spojevi

Tablica 21. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKDEI16
Hidroksibenzojeve kiseline				
galna kiselina	F	2,380	2,900	2,993
	B	2,973 b	2,976 b	3,409 a*
protokatehinska kiselina	F	1,724 a	1,054 b	0,994 b
	B	1,195	1,189 *	1,161 *
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,538 a	0,340 b	0,342 b
	B	0,520 a	0,382 b*	0,369 b
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,116 a	0,051 b	0,043 b
	B	0,125 a	0,078 b*	0,058 c
siringinska kiselina	F	0,105	0,113	0,109
	B	0,137 b*	0,157 a*	0,118 c
Hidroksicimetne kiseline				
cis-kaftarna kiselina[S]	F	1,720 *	1,807 *	1,785 *
	B	1,189	1,098	1,107
trans-kaftarna kiselina	F	12,762 b	19,132 a	19,516 a
	B	12,791 b	19,227 a	19,651 a
cis-kutarna kiselina[S]	F	0,815 c*	0,868 b*	0,882 a*
	B	0,746 b	0,768 b	0,806 a
trans-kutarna kiselina[S]	F	0,082 b	0,230 a	0,245 a
	B	0,086 b	0,227 a	0,239 a
kafeinska kiselina	F	4,877 a	3,643 b	3,499 b
	B	5,535 a*	4,037 b*	3,919 b*
cis-fertarna kiselina[S]	F	0,374 *	0,374 *	0,373 *
	B	0,249	0,250	0,246
trans-fertarna kiselina[S]	F	1,641 b	1,765 a	1,774 a
	B	1,896 b*	1,949 a*	1,972 a*
p-kumarna kiselina	F	0,854 a	0,561 b	0,566 b
	B	1,123 a*	0,591 b*	0,688 b*
ferulinska kiselina	F	1,053 a	0,881 b	0,855 b
	B	1,015 a	0,858 b	0,849 b
Flavan-3-oli				
katehin + tirosol (kao katehin)	F	21,476 a	20,803 b	20,662 b
	B	21,281 a	20,348 b	20,611 ab
epikatehin	F	0,781	0,787	0,796
	B	0,944 b	1,165 a*	0,855 b
procijanidin B1	F	1,605 b	1,696 a	1,651 ab
	B	1,600	1,754	1,715
procijanidin B2	F	0,501 c	0,602 b	0,651 a
	B	0,740 b*	1,516 a*	0,811 b*

Ostali				
taksifolin	F	0,155 a	0,108 b	0,096 c
	B	0,172 a*	0,114 b*	0,107 c
trans-piceid	F	0,129 b*	0,172 a	0,170 a
	B	0,111 b	0,174 a	0,175 a
Ukupni fenoli‡	F	195,636 a	181,697 b	171,576 c
	B	214,970 a*	200,273 b*	178,939 c*

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u vodovodnoj vodi, BKDEI16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u deioniziranoj vodi.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.
[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

U odnosu na kontrolni tretman K16, tretman BKDEI16 pokazao je sličan utjecaj na sastav fenolnih spojeva kao i tretman BK16, što je uglavnom opisano u poglavlju 4.1.3. Nakon fermentacije (F) u vinu tretmana BKDEI16 bilo je značajno više *cis*-kutarne kiseline i procijanidina B2 te značajno manje taksifolina, ali i ukupnih fenola u odnosu na vino BK16 tretmana (Tablica 21).

Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracija galne kiseline značajno je porasla u vinu tretmana BKDEI16 pa je bila i značajno viša od onih pronađenih u ostalim vinima (Tablica 21). Koncentracije 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline i siringinske kiseline porasle su u manjoj mjeri u vinu BKDEI16 tretmana u odnosu na vino BK16 tretmana u kojem su nakon dodatnog bistrenja zbog toga bile značajno više. Za većinu hidroksicimetnih kiselina zadržao se podjednak odnos koncentracija, *cis*-hidroksicinamoiltartarata je uglavnom bilo značajno manje nego nakon fermentacije (F), dok je koncentracija *trans*-fertarne kiseline, kao i koncentracije slobodnih hidroksicimetnih kiselina, nakon dodatnog bistrenja (B) porasla. Epikatehina je bilo značajno manje u stabilnom vinu tretmana BKDEI16 s obzirom da je njegova koncentracija u vinu BK16 tretmana značajno porasla nakon dodatnog bistrenja (B). U odnosu na koncentracije nakon fermentacije (F) značajno su porasle i koncentracije procijanidina B2 na način da ga je nakon dodatnog bistrenja (B) bilo manje u vinu tretmana BKDEI16. Slično je utvrđeno i za taksifolin, uz razliku da je odnos između tretmana u pogledu njegove koncentracije ostao jednak. Koncentracija ukupnih fenola značajno je porasla u vinima svih tretmana, pa je odnos koncentracija između vina ostao jednak.

4.3.4. Hlapljivi spojevi arome

Tablica 22. Koncentracije slobodnih hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Slobodni spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKDEI16
Monoterpeni				
linalol	F	24,405 a	22,920 b	23,070 b
	B	29,675	29,242 *	27,292 *
α-terpineol	F	9,506 b	10,179 a	9,691 b
	B	12,444	11,921 *	12,383 *
α-terpinolen^{S}	F	0,838	0,972	0,525
	B	0,892	1,351	0,933
citronelol	F	7,811	8,043	7,784
	B	7,676	7,585	7,453
terpendiol I^{S}	F	86,778 *	85,801 *	83,713 *
	B	77,585	76,090	77,807
C_{13}-norizoprenoid				
β-damaskenon	F	3,100	3,510 *	2,901
	B	2,287	2,322	2,068
Alkoholi				
1-heksanol (mg/L)	F	2,023	1,973 *	1,979
	B	1,976	1,912	1,900
trans-3-heksenol^{S}	F	134,293	133,372 *	134,488
	B	132,984 a	127,304 b	129,108 ab
cis-3-heksenol^{S}	F	84,702	83,260 *	84,056
	B	83,090 a	78,587 b	80,433 ab
1-oktanol^{S}	F	14,832	14,461	13,350
	B	18,618	15,009	14,169
benzil-alkohol^{S}	F	51,588 a	28,122 b	28,009 b
	B	60,788 a*	28,230 b	28,237 b
2-feniletanol (mg/L)	F	29,900 *	28,770	28,952
	B	27,993	28,140	27,717
Masne kiseline				
butanska kiselina (mg/L)	F	1,784	1,835	1,811
	B	1,751	1,737	1,774
heksanska kiselina (mg/L)	F	3,920	4,107	4,142
	B	3,900	3,939	3,968
oktanska kiselina (mg/L)	F	5,357 b	5,963 a	5,812 ab
	B	5,615	5,676	5,572
dekanska kiselina (mg/L)	F	1,597	1,759	1,482
	B	1,842	1,766	1,638
dodekanska kiselina^{S}	F	52,434 a*	27,413 b	20,138 b
	B	36,627	22,642	27,423

Etil esteri				
etil-butanoat (mg/L)	F	0,289	0,330	0,305
	B	0,312	0,317	0,320
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,492	0,572	0,493
	B	0,598	0,586	0,576
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,213	0,242	0,212
	B	0,268 *	0,246	0,359
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,037 a	0,031 b	0,027 b
	B	0,039	0,037	0,047
Acetatni esteri				
izoamil-acetat (mg/L)	F	0,911 c	1,141 a*	0,987 b
	B	0,986	0,993	0,971
heksil-acetat	F	67,142 b	90,817 a	70,638 b
	B	82,899	80,056	72,380
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	0,118 b	0,149 a	0,143 a
	B	0,138	0,141	0,142
Ostali esteri				
etil-laktat (mg/L)	F	5,759	5,513	5,715
	B	7,595 *	7,599 *	7,683 *
etil-3-hidroksibutanoat^{S} (mg/L)	F	0,251	0,256 *	0,256
	B	0,250	0,244	0,251
dietil-sukcinat^{S} (mg/L)	F	0,435	0,406	0,404
	B	0,693 *	0,670 *	0,692 *
metil-4-hidroksibutanoat^{S}	F	22,823 *	25,063 *	25,299 *
	B	18,078	19,606	17,924
etil-4-hidroksibutanoat^{S} (mg/L)	F	6,706	7,460 *	7,416 *
	B	5,439	5,590	5,402
dietil-malat^{S} (mg/L)	F	0,311	0,294	0,302
	B	0,586 *	0,564 *	0,583 *
monometil-sukcinat^{S}	F	80,313 a	65,988 b	68,955 ab
	B	79,255	72,433	75,520
monoetil-sukcinat^{S} (mg/L)	F	21,270 a	19,548 b	19,648 b
	B	26,480 *	26,297 *	25,970 *
etil-*p*-kumarat^{S} (mg/L)	F	0,445 a	0,400 ab	0,358 b
	B	0,489 a*	0,415 b	0,406 b
Ostali				
benzaldehid^{S}	F	9,263	9,216	9,491
	B	8,521	8,795	8,774
gvajakol^{S}	F	0,951	0,974	1,345
	B	0,942	1,239	0,974
4-vinilgvajakol^{S}	F	366,144 b	439,502 ab	499,892 a*
	B	382,427	417,905	317,847
acetoin^{S}	F	29,514 a	24,282 ab	22,765 b
	B	28,764 a	24,624 ab	22,557 b
3-hidroksi-2-pentanon^{S}	F	38,297	34,832	37,902
	B	36,903	35,033	36,358

γ-butirolakton[S]	F	191,042	215,531	217,167
	B	232,534	234,584	255,379
pantolakton[S]	F	45,073	46,794	44,405
	B	46,878	45,903	45,090
3-metiltiopropanol[S] (mg/L)	F	1,059	1,053	1,047
	B	1,058	1,021	1,015
triptofol[S] (mg/L)	F	0,746 b	1,068 a*	0,976 a
	B	0,922	0,837	0,793

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u vodovodnoj vodi, BKDEI16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u deioniziranoj vodi.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

Vino BKDEI16 se nakon fermentacije (F) razlikovalo od vina BK16 tretmana na osnovi značajno niže koncentracije α-terpineola te izoamil- i heksil-acetata (Tablica 22). Vino kontrolnog tretmana K16 imalo je značajno više koncentracije linalola, benzil-alkohola, dodekanske kisleine, etil-dekanoata i značajno niže koncentracije većine acetantnih estera i triptofola od vina oba tretmana koja su uključivala primjenu bentonita u fermentaciji. Na osnovi koncentracija pojedinih estera, 4-vinil-gvajakola i acetoina značajno se razlikovalo ili od BK16 ili od BKDEI16 vina.

Nakon dodatnog bistrenja (B), u vinima BK16 i BKDEI16 tretmana zabilježene su slične promjene u odnosu na sastav odgovarajućih vina nakon fermentacije (Tablica 22). Vino tretmana BK16 imalo je značajno nižu koncentraciju C_6-alkohola, vino BKDEI16 značajno nižu koncentraciju acetoina, dok su oba vina imala značajno niže koncentracije benzil-alkohola u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16.

Tablica 23. Koncentracije vezanih hlapljivih spojeva arome (μg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Vezani spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKDEI16
Monoterpeni				
trans-furan oksid linalola[S]	F	2,269	2,311	2,461
	B	2,338	2,300	2,384
cis-furan oksid linalola[S]	F	0,767	0,797	0,849
	B	0,842	0,760	0,845
linalol	F	8,612 *	7,964	8,622 *
	B	6,478	6,025	5,937
hotrienol[S]	F	1,850	2,245	2,341
	B	1,814	2,352	2,225

α-terpineol	F	1,351	1,395	1,490
	B	1,330	1,327	1,356
trans-piran oksid linalola[S]	F	5,721	5,848	5,850
	B	5,724	5,767	5,773
citronelol	F	1,027	0,662	0,992
	B	0,694	1,044	0,640
nerol	F	7,447	7,688	7,413
	B	7,612	7,524	7,317
geraniol	F	43,486	45,476	45,473
	B	41,761	43,132	43,564
terpendiol I[S]	F	1,684	1,334	1,580
	B	1,436	1,321	1,192
trans-8-hidroksi-linalol[S]	F	29,597	29,551	26,446
	B	21,403	26,669	20,908
7-hidroksi-geraniol[S]	F	21,916	23,226	23,779
	B	19,401	23,475	22,747
cis-8-hidroksi-linalol[S]	F	92,777	99,874	98,967
	B	83,504	100,344	94,400
trans-geranijska kiselina[S]	F	8,372	9,366	9,808
	B	8,118	9,541	8,286
C_{13}-norizoprenoidi				
β-damaskenon	F	0,144	0,102	0,156
	B	0,119 ab	0,132 a	0,107 b
3-hidroksi-β-damaskon[S]	F	177,555 *	179,754	182,622
	B	130,081	135,159	128,712
3-okso-α-jonol[S]	F	59,229	62,705	63,056
	B	59,096	60,956	59,168
3-hidroksi-7,8-dihidro-β-jonol[S]	F	50,450	53,445	51,996
	B	47,417	52,070	49,769
vomifoliol[S]	F	20,284	25,323	19,969
	B	17,073	20,814	19,275
Alkoholi				
1-heksanol	F	88,109	86,977	89,633
	B	86,353	87,485	86,345
trans-3-heksenol[S]	F	1,157	1,098	1,134
	B	1,180	1,164	1,184
cis-3-heksenol[S]	F	13,289	13,463	14,337
	B	12,806	13,168	13,871
trans-2-heksenol[S]	F	15,182 b	16,374 ab	16,931 a
	B	15,267 b	16,880 a	16,748 ab
1-okten-3-ol[S]	F	2,491	2,597	2,606 *
	B	2,530	2,510	2,317
1-oktanol[S]	F	200,436	192,749	226,977
	B	210,644	180,566	183,083
2-feniletanol[S]	F	322,719 a	266,701 b	281,298 b
	B	305,423	273,109	279,359

Ostali				
benzaldehid[S]	F	5,087	2,582	2,805
	B	3,124	2,313	3,292
4-vinilgvajakol[S]	F	12,291	16,199	12,447
	B	10,362	13,413	12,174
triptofol[S]	F	10,091 b	13,790 a	12,329 ab
	B	10,624	12,641	11,494

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u vodovodnoj vodi, BKDEI16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u deioniziranoj vodi.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

Nakon fermentacije (F) vina BKDEI16 i BK16 tretmana nisu se bitno razlikovala s obzirom na koncentracije glikozidno vezanih spojeva arome (Tablica 23). Vino BKDEI16 tretmana značajno se razlikovalo od vina kontrolnog tretmana K16 na osnovi više koncentracije vezanog *trans*-2-heksenola i niže koncentracije vezanog 2-feniletanola.

Nakon dodatnog bistrenja (B) vino BKDEI16 imalo je nižu koncentraciju vezanog β-damaskenona od vina BK16 tretmana, a vino kontrolnog tretmana K16 značajno nižu koncentraciju vezanog *trans*-2-heksenola od vina BK16 tretmana (Tablica 23).

4.3.5. Senzorska svojstva

Tablica 24. Rezultati kvantitativne deskriptivne analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKDEI16
Svojstva mirisa				
cvjetni	F	6,9 b	7,2 ab	7,4 a
	B	6,6	7,2	7,0
voćni	F	6,4 b	6,9 b	7,8 a*
	B	6,5	7,0	6,8
biljni	F	2,0 b	2,5 a	2,5 a
	B	2,2	2,4	1,9
začinski / aromatično bilje	F	1,5 b	1,7 ab	2,3 a
	B	1,8	2,2	1,8
sovinjonski	F	3,2	3,5	4,8
	B	3,1	3,4	3,4
muškatni	F	3,5	3,6	4,0
	B	3,5	3,6	3,5
med	F	1,5	2,1	2,7
	B	2,0	2,8	2,2

vosak	F	2,3	2,8	2,9
	B	1,8	2,5	2,3
Svojstva okusa				
svježina	F	7,3	7,4*	8,0
	B	7,1	7,0	7,3
kiselost	F	5,9	5,8	6,4
	B	5,5	5,7	5,8
tijelo / punoća	F	7,8	8,2	8,3
	B	7,7 b	8,1 a	8,3 a
slatkoća	F	6,5	6,5	7,0
	B	6,5	6,8	6,7
viskozitet	F	7,3	7,6	7,9
	B	7,5 b	7,7 ab	8,1 a
gorčina	F	3,2	3,3	3,4
	B	3,4*	3,4	3,5
astringentnost	F	2,8	2,6	3,0
	B	2,4 b	2,7 ab	2,9 a

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u vodovodnoj vodi, BKDEI16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u deioniziranoj vodi.

Nakon fermentacije (F) vino BKDEI16 značajno se razlikovalo od vina BK16 tretmana na osnovi intenzivnijeg *voćnog* mirisa (Tablica 24). Za razliku od BK16, vino BKDEI16 tretmana opisano je višim intenzitetima *cvjetnog* mirisa te mirisa *začinskog* i *aromatičnog bilja* u odnosu na kontrolni tretman K16. Razlika u svojstvima okusa nije bilo.

Nakon dodatnog bistrenja (B), većine razlika između tretmana koje su utvrđene nakon fermentacije (F) više nije bilo, a vrijedi istaknuti značajno sniženje intenziteta *voćnog* mirisa u vinu BKDEI16 tretmana (Tablica 24). Nije bilo značajnih razlika u svojstvima okusa između vina BKDEI16 i BK16, ali je vino BKDEI16 tretmana ocijenjeno intenzivnijim u odnosu na kontrolni tretman K16 po pitanju osjeta *viskoznosti* i *astringencije*, što nije utvrđeno za vino BK16 tretmana.

Tablica 25. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova i test nizanja) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

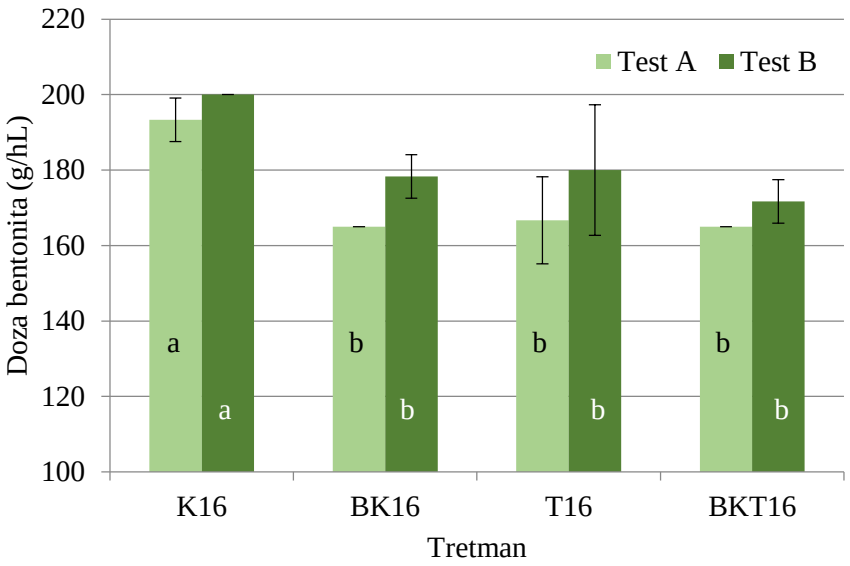
	Uzorkovanje	Tretman		
		K16	BK16	BKDEI16
Bodovi	F	83,0 b	86,1 a	88,2 a
	B	83,6 b	85,6 a	86,0 a
Poredak	F	3	2	1
	B	3	2	1

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u vodovodnoj vodi, BKDEI16 - mošt djelomično bistren u završnoj fazi fermentacije bentonitom pripremljenim namakanjem u deioniziranoj vodi.

Vina BKDEI16 se na osnovi ukupnog broja bodova dobivenih u senzorskoj analizi nisu značajno razlikovala od vina BK16 tretmana ni nakon fermentacije (F) ni nakon dodatnog bistrenja (B), ali su se vina oba tretmana značajno razlikovala od vina kontrolnog tretmana koje je ocijenjeno s najmanjim brojem bodova (Tablica 25). Vino BKDEI16 tretmana bilo je najviše, a vino kontrolnog tretmana K16 najmanje preferirano od ocjenjivača i nakon fermentacije (F) i nakon dodatnog bistrenja (B).

4.4. Učinak primjene tanina u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji

4.4.1. Doza bentonita



Slika 9. Ukupne doze bentonita primijenjene u tretmanima proizvodnje vina kultivara malvazija istarska u berbi 2016. godine

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije, T16 – dodavanje pripravka tanina u tri obroka tijekom fermentacije, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BKT16 – dodavanje pripravka tanina kao u tretmanu T16 i djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije kao u tretmanu BK16. Proteinska stabilnost svih vina postignuta je bistrenjem dodatnim dozama bentonita nakon fermentacije.

Svi tretmani koji su uključivali primjenu bentonita (BK16) i/ili tanina (BKT16, T16) u fermentaciji ostvarili su značajno smanjenje ukupne doze bentonita u odnosu na kontrolni tretman K16, dok se međusobno nisu razlikovali, i to neovisno o testu provjere proteinske stabilnosti (Slika 9).

4.4.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri

Tablica 26. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman			
		K16	BK16	T16	BKT16
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9895 ab	0,9893 b	0,9898 a	0,9895 ab
	B	0,9894 b	0,9895 ab	0,9898 a	0,9896 ab
Alkohol (vol. %)	F	15,04 *	15,09 *	14,98 *	14,94 *
	B	14,69	14,66	14,61	14,67
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	22,6 b*	22,4 b	23,4 a	22,5 b
	B	21,5	21,7	22,3	22,0
Reducirajući šećeri (g/L)	F	3,4 b	3,7 b	4,2 a	3,5 b
	B	3,4 b	3,5 ab	4,0 a	3,6 ab
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	19,2 a*	18,7 b*	19,1 a*	19,0 ab*
	B	18,2	18,2	18,3	18,4
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,5 a*	5,2 b*	5,3 b	5,4 ab*
	B	5,0 b	5,0 b	5,1 a	5,1 a
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,67	0,69	0,65	0,62
	B	0,65	0,66	0,63	0,65
pH	F	3,33 b	3,34 a	3,31 c	3,31 c
	B	3,36 a*	3,31 b	3,32 ab	3,32 ab

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije, T16 – dodavanje pripravka tanina u tri obroka tijekom fermentacije, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BKT16 – dodavanje pripravka tanina kao u tretmanu T16 i djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije kao u tretmanu BK16.

Nakon fermentacije (F) vino T16 tretmana imalo je višu relativnu gustoću u odnosu na vino BK16 tretmana (Tablica 26). U vinu T16 pronađene su najviše koncentracije ukupnog ekstrakta i reducirajućih šećera, dok je koncentracija ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera imala najniže vrijednosti u vinu BK16 tretmana koji se na osnovi tog parametra razlikovao od vina T16 i kontrolnog tretmana K16. Vina T16 i BKT16 tretmana imala su najniže pH vrijednosti.

Nakon dodatnog bistrenja (B) došlo je do određenih promjena. Sniženi su volumni udio alkohola te koncentracije ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera i ukupne kiselosti u vinima većine tretmana, tako da se određene statistički značajne razlike između tretmana nisu održale (ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera), a pojavile su se nove (ukupna kiselost) (Tablica 26). Promjene pH vrijednosti bile su takve da se vina BK16, T16 i BKT16 tretmana više nisu značajno razlikovala s obzirom na taj parametar.

4.4.3. Fenolni spojevi

Tablica 27. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman			
		K16	BK16	T16	BKT16
Hidroksibenzojeve kiseline					
galna kiselina	F	2,380 c	2,900 c	46,622 a	43,960 b
	B	2,973 c	2,976 c	50,507 a*	47,324 b*
protokatehinska kiselina	F	1,724 a	1,054 b	1,136 b	0,961 b
	B	1,195	1,189 *	1,384 *	1,154 *
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,538 a	0,340 c	0,530 a	0,450 b
	B	0,520 b	0,382 c*	0,592 a	0,503 b*
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,116 a	0,051 c	0,092 b	0,041 c
	B	0,125 a	0,078 b*	0,115 a*	0,058 b
siringinska kiselina	F	0,105 c	0,113 c	1,517 b*	1,892 a*
	B	0,137 c*	0,157 c*	0,752 b	0,972 a
Hidroksicimetne kiseline					
cis-kaftarna kiselina[S]	F	1,720 ab*	1,807 a*	1,669 b*	1,789 a*
	B	1,189	1,098	1,122	1,109
trans-kaftarna kiselina	F	12,762 d	19,132 b	15,535 c	21,113 a
	B	12,791 d	19,227 b	15,430 c	21,345 a
cis-kutarna kiselina[S]	F	0,815 c*	0,868 b*	0,925 a*	0,929 a*
	B	0,746 b	0,768 b	0,815 a	0,817 a
trans-kutarna kiselina[S]	F	0,082 d	0,230 b	0,125 c	0,394 a
	B	0,086 d	0,227 b	0,127 c	0,392 a
kafeinska kiselina	F	4,877 a	3,643 c	4,453 b	2,948 d
	B	5,535 a*	4,037 c*	5,002 b*	3,134 d*
cis-fertarna kiselina[S]	F	0,374 a*	0,374 a*	0,344 b*	0,349 ab*
	B	0,249 a	0,250 a	0,234 ab	0,224 b
trans-fertarna kiselina[S]	F	1,641 c	1,765 ab	1,724 bc	1,847 a
	B	1,896 b*	1,949 a*	1,894 b*	1,963 a*
p-kumarna kiselina	F	0,854 a	0,561 b	0,875 a	0,546 b
	B	1,123 a*	0,591 b*	1,012 a*	0,598 b
ferulinska kiselina	F	1,053 a	0,881 b	1,045 a	0,849 b
	B	1,015 a	0,858 b	0,999 a	0,831 b
Flavan-3-oli					
katehin + tirosol (kao katehin)	F	21,476	20,803	20,730	20,666
	B	21,281 a	20,348 b	20,418 b	20,451 b
epikatehin	F	0,781	0,787	0,645	0,846
	B	0,944 b	1,165 a*	0,783 c*	0,736 c
procijanidin B1	F	1,605 b	1,696 b	7,392 a	7,587 a
	B	1,600 b	1,754 b	7,176 a	7,282 a
procijanidin B2	F	0,501 b	0,602 a	0,252 d	0,370 c
	B	0,740 b*	1,516 a*	0,549 c*	0,607 c*

Ostali					
taksifolin	F	0,155 a	0,108 c	0,145 b	0,113 c
	B	0,172 a*	0,114 c*	0,154 b*	0,111 c
trans-piceid	F	0,129 c*	0,172 a	0,156 b*	0,159 b
	B	0,111 d	0,174 b	0,128 c	0,199 a*
Neidentificirani[S]					
T1	F	n. d.	n. d.	22,925 a	22,240 b
	B	n. d.	n. d.	24,169 a*	23,333 b*
T2	F	n. d.	n. d.	15,079 a	13,488 b
	B	n. d.	n. d.	18,615 a*	16,488 b*
T3	F	n. d.	n. d.	15,639 a	13,554 b
	B	n. d.	n. d.	19,839 a*	17,233 b*
T4	F	n. d.	n. d.	79,283*	79,521
	B	n. d.	n. d.	76,191	77,636
T5	F	n. d.	n. d.	37,361*	38,916
	B	n. d.	n. d.	35,055	36,294
T6	F	n. d.	n. d.	5,559 b	5,933 a
	B	n. d.	n. d.	6,969 *	6,841*
T7	F	n. d.	n. d.	3,628 b*	4,636 a*
	B	n. d.	n. d.	1,403 b	2,015 a
T8	F	n. d.	n. d.	3,393 b*	4,014 a*
	B	n. d.	n. d.	2,187 b	2,415 a
T9	F	n. d.	n. d.	33,380 a	29,009 b
	B	n. d.	n. d.	38,560 a*	33,588 b
Ukupni flavonoidi	F	166,283 b*	115,854 c*	584,985 a	558,178 a*
	B	86,108 b	59,410 c	540,379 a	522,581 a
Ukupni fenoli[‡]	F	195,636 b	181,697 b	309,242 a	314,848 a
	B	214,970 b*	200,273 c*	331,485 a	330,818 a

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije, T16 – dodavanje pripravka tanina u tri obroka tijekom fermentacije, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BKT16 – dodavanje pripravka tanina kao u tretmanu T16 i djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije kao u tretmanu BK16.

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1, osim u slučaju neidentificiranih spojeva T1 - T9 čije su koncentracije izražene kao ekvivalenti procijanidina B1 uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1; n. d. - nije detektiran.

[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

Nakon fermentacije (F) utvrđene su brojne statistički značajne razlike između koncentracija fenolnih spojeva u vinima tretmana BK16, T16 i BKT16, a također i u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 (Tablica 27). U vinu BKT16 tretmana koncentracije većine hidroksibenzojevih kiselina bile su niže nego u vinu T16 tretmana, ali su za pojedine spojeve iz ove skupine također bile više od onih u vinu BK16 tretmana. Vrlo veliki porast zabilježen je za koncentracije galne i siringinske kiseline u vinima tretmana u kojima je tijekom fermentacije dodavan tanin (T16 i BKT16) u odnosu na vina ostalih tretmana. Koncentracije

trans-hidroksicinamoiltartarata uglavnom su bile značajno više u vinima BKT16 i BK16 tretmana te najviše u vinu BKT16 tretmana, dok je vino kontrolnog tretmana K16 sadržavalo uglavnom najniže koncentracije. Značajne razlike utvrđene su i u slučaju koncentracija slobodnih hidroksicimetnih kiselina. Najniže koncentracije pronađene su u vinima oba tretmana u kojima se primijenio bentonit u fermentaciji (BK16 i BKT16), a najviše u vinu kontrolnog tretmana K16, pri čemu uglavnom podjednake kao i u vinu T16 tretmana. Procijanidina B1 bilo je značajno više u vinima tretmana u kojima je dodavan tanin (T16 i BKT16), a koncentracije procijanidina B2 značajno su se razlikovale u vinima svih tretmana, pri čemu su bile niže u vinima tretmana u kojima je dodavan tanin (T16 i BKT16). Koncentracija taksifolina bila je značajno viša u vinu kontrolnog tretmana K16 u odnosu na ostale, a najniže koncentracije pronađene su u vinima oba tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji (BK16 i BKT16). Koncentracija *trans*-piceida bila je najniža vinu kontrolnog tretmana K16 te istovremeno niža u vinima tretmana u kojima je dodavan tanin (T16 i BKT16) u odnosu na vino BK16 tretmana. U vinima tretmana s dodatkom tanina (T16 i BKT16) detektirano je 9 neidentificiranih fenolnih spojeva koji nisu pronađeni u tretmanima K16 i BK16. S obzirom na njihove koncentracije vina T16 i BKT16 tretmana većinom su se značajno međusobno razlikovala. Neidentificirani spojevi pronađeni u relativno višim koncentracijama (T1, T2, T3, T9) uglavnom su bili nižih, a spojevi pronađeni u relativno nižim koncentracijama (T6, T7 i T8) uglavnom su bili viših koncentracija u vinu BKT16 u odnosu na vino T16 tretmana. Koncentracije ukupnih flavonoida nakon fermentacije (F) bile su značajno više u vinima tretmana s dodatkom tanina (T16 i BKT16) u odnosu na ostala vina, a najniža koncentracija zabilježena je u vinu BK16 tretmana. Slično tome, na osnovi značajno više koncentracije ukupnih fenola, vina tretmana T16 i BKT16 razlikovala su se od vina BK16 i kontrolnog tretmana K16.

Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracije hidroksibenzojevih kiselina nisu se značajno mijenjale ili su porasle u vinima nekih tretmana te su odnosi koncentracija većinom ostali očuvani (Tablica 27). Izuzetak je bio značajan pad koncentracije siringinske kiseline nakon dodatnog bistrenja (B) vina tretmana u kojima je dodavan tanin (T16 i BKT16), uz istovremeni porast u vinima ostalih tretmana (K16, BK16). U skupini hidroksicimetnih kiselina također su se očuvali odnosi koncentracija. Koncentracije *cis*-hidroksicinamoiltartarata uglavnom su se značajno snizile, a *trans*-hidroksicinamoiltartarata se nisu mijenjale ili su značajno porasle u slučaju *trans*-fertarne kiseline, što je utvrđeno i za koncentracije većine slobodnih hidroksicimetnih

kiselina s izuzetkom ferulinske. Odnosi koncentracija između tretmana u većini slučajeva ostali su očuvani. Epikatehina je nakon dodatnog bistrenja (B) bilo manje u vinima tretmana u kojima je dodavan tanin (T16 i BKT16), iako su koncentracije uglavnom značajno porasle u odnosu na koncentracije nakon fermentacije (F). Stanje s koncentracijama procijanidina B1 bilo je slično kao i nakon fermentacije (F), dok su koncentracije procijanidina B2 nakon dodatnog bistrenja (B) bile značajno više u odnosu na one utvrđene nakon fermentacije (F), s približno jednakim međusobnim odnosima. Koncentracija taksifolina nije se mijenjala jedino u vinu BKT16 tretmana, dok je u drugima značajno porasla. *Trans*-piceida je nakon dodatnog bistrenja (B) i dalje bilo više u vinima tretmana s dodavanjem bentonita u fermentaciji, s tim da je u vinu BKT16 tretmama njegova koncentracija značajno porasla, dok se u vinima T16 i kontrolnog tretmana K16 snizila. Dodatno bistrenje (B) utjecalo je na koncentracije većine od 9 neidentificiranih spojeva. Pojedine koncentracije su se snizile, a pojedine porasle, međutim, njihovi su odnosi između vina različitih tretmana nakon dodatnog bistrenja većinom ostali očuvani. Koncentracije ukupnih flavonoida snizile su se nakon dodatnog bistrenjem (B), ali u slučaju vina T16 tretmana sniženje nije bilo statistički značajno. Relativno sniženje koncentracija ukupnih flavonoids bilo je izraženije u vinima tretmana koji nisu uključivali dodatak tanina, K16 i BK16. Odnosi koncentracija ukupnih flavonoida među vinima različitih tretmana ostali su jednaki. Koncentracije ukupnih fenola porasle su u svim vinima za otprilike 15 do 20 mg/L, ali bez statističke značajnosti u vinima tretmana T16 i BKT16. Nakon dodatnog bistrenja (B), vina tretmana u kojima je primijenjen tanin u fermentaciji (T16 i BKT16) i dalje su imala najvišu koncentraciju, dok je najniža koncentracija ukupnih fenola zabilježena uvinu BK16 tretmana.

4.4.4. Hlapljivi spojevi arome

Tablica 28. Koncentracije slobodnih hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Slobodni spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman			
		K16	BK16	T16	BKT16
Monoterpeni					
linalol	F	24,405 ab	22,920 b	24,782 a	24,790 a
	B	29,675	29,242 *	29,558 *	28,700
α-terpineol	F	9,506	10,179	10,446	9,970
	B	12,444	11,921 *	11,977	12,226 *
α-terpinolen^{S}	F	0,838	0,972	0,862	1,199
	B	0,892	1,351	0,856	0,851
citronelol	F	7,811	8,043	7,851	7,730
	B	7,676	7,585	7,390	7,443
terpendiol I^{S}	F	86,778 *	85,801 *	83,697 *	86,620 *
	B	77,585	76,090	75,699	73,615
C_{13}-norizoprenoid					
β-damaskenon	F	3,100	3,510 *	3,199 *	3,353 *
	B	2,287	2,322	2,297	2,447
Alkoholi					
propanol (mg/L)	F	28,306	28,250	27,143	26,670
	B	29,150 a	29,370 a	29,017 a	25,584 b
izobutanol (mg/L)	F	18,497	18,849	18,796	20,589
	B	19,632	19,783	19,323	19,703
izoamil-alkohol (mg/L)	F	196,986	199,844	204,384	211,370
	B	205,993	205,522	206,430	205,939
1-heksanol (mg/L)	F	2,023	1,973 *	1,939	1,991
	B	1,976	1,912	1,866	1,960
trans-3-heksenol^{S}	F	134,293	133,372 *	133,050	132,413
	B	132,984	127,304	128,123	129,217
cis-3-heksenol^{S}	F	84,702 a	83,260 a*	80,919 ab	74,106 b
	B	83,090 a	78,587 ab	77,737 ab	72,531 b
1-oktanol^{S}	F	14,832	14,461	12,694	15,919
	B	18,618	15,009	11,959	14,023
benzil-alkohol^{S}	F	51,588 a	28,122 c	45,842 b	28,236 c
	B	60,788 a*	28,230 c	52,825 b*	27,778 c
2-feniletanol (mg/L)	F	29,900 *	28,770	29,636 *	29,975
	B	27,993	28,140	27,520	28,618
Masne kiseline					
butanska kiselina (mg/L)	F	1,784 a	1,835 a	1,788 a	1,571 b
	B	1,751	1,737	1,705	1,540
heksanska kiselina (mg/L)	F	3,920	4,107	4,289	3,882
	B	3,900	3,939	4,050	3,667

oktanska kiselina (mg/L)	F	5,357	5,963	6,036	5,511
	B	5,615	5,676	5,813	5,204
dekanska kiselina (mg/L)	F	1,597 b	1,759 ab	1,906 a	1,672 b
	B	1,842	1,766	1,887	1,678
dodekanska kiselina^{S}	F	52,434 a*	27,413 b	42,708 ab	27,255 b
	B	36,627 a	22,642 b	32,207 ab	24,047 b
Etil esteri					
etil-butanoat (mg/L)	F	0,289	0,330	0,307	0,270
	B	0,312	0,317	0,317	0,262
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,492 b	0,572 ab	0,584 a	0,511 ab
	B	0,598	0,586	0,615	0,553
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,213	0,242	0,254	0,229
	B	0,268 *	0,246	0,267	0,256
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,037 ab	0,031 b	0,043 a	0,033 b
	B	0,039	0,037	0,043	0,037
Acetatni esteri					
etil-acetat (mg/L)	F	18,004	20,269	20,163	23,529
	B	29,178 *	21,863	22,763	22,170
izoamil-acetat (mg/L)	F	0,911	1,141 *	1,121	0,894
	B	0,986	0,993	1,009	0,790
heksil-acetat	F	67,142 b	90,817 ab	95,087 a	70,290 ab
	B	82,899	80,056	89,110	69,195
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	0,118	0,149	0,149	0,127
	B	0,138	0,141	0,140	0,115
Ostali esteri					
etil-laktat (mg/L)	F	5,759	5,513	5,767	5,654
	B	7,595 *	7,599 *	7,630 *	7,911 *
etil-3-hidroksibutanoat^{S} (mg/L)	F	0,251	0,256 *	0,246	0,280
	B	0,250	0,244	0,237	0,274
dietil-sukcinat^{S} (mg/L)	F	0,435	0,406	0,417	0,464
	B	0,693 ab*	0,670 b*	0,714 ab*	0,777 a*
metil-4-hidroksibutanoat^{S}	F	22,823 b*	25,063 a*	22,902 b*	19,617 c*
	B	18,078 ab	19,606 a	15,730 bc	14,225 c
etil-4-hidroksibutanoat^{S} (mg/L)	F	6,706 ab	7,460 a*	6,628 ab*	5,799 b
	B	5,439 a	5,590 a	4,860 ab	4,240 b
dietil-malat^{S} (mg/L)	F	0,311	0,294	0,301	0,320
	B	0,586 *	0,564 *	0,598 *	0,604 *
monometil-sukcinat^{S}	F	80,313	65,988	77,135	84,805
	B	79,255 ab	72,433 b	78,802 ab	89,670 a
monoetil-sukcinat^{S} (mg/L)	F	21,270	19,548	19,010	21,057
	B	26,480 *	26,297 *	25,848 *	26,891 *
etil-*p*-kumarat^{S} (mg/L)	F	0,445 a	0,400 a	0,445 a	0,315 b
	B	0,489 a*	0,415 b	0,507 a	0,334 c
Ostali					
acetaldehid (mg/L)	F	43,040	44,217	42,947	47,061
	B	44,188	48,921	46,783	49,489

benzaldehid[S]	F	9,263	9,216	9,025	9,114
	B	8,521	8,795	8,330	8,675
metanol (mg/L)	F	48,308	44,418	44,631	51,649
	B	48,913	52,158	49,271	47,119
gvajakol[S]	F	0,951	0,974	0,950	0,701
	B	0,942	1,239	0,967	0,960
4-vinilgvajakol[S]	F	366,144	439,502	433,065 *	435,792
	B	382,427	417,905	324,534	392,870
acetoin[S]	F	29,514 ab	24,282 b	33,482 a	29,856 ab
	B	28,764 ab	24,624 b	32,064 a	31,460 a
3-hidroksi-2-pentanon[S]	F	38,297 ab	34,832 b	43,728 ab	48,911 a
	B	36,903 b	35,033 b	42,481 ab	49,619 a
γ-butirolakton[S]	F	191,042	215,531	201,759	185,990
	B	232,534 ab	234,584 a	229,544 ab	200,729 b
pantolakton[S]	F	45,073	46,794	42,513	46,818
	B	46,878	45,903	44,800	44,780
3-metiltiopropanol[S] (mg/L)	F	1,059	1,053	1,106	1,123
	B	1,058	1,021	1,057	1,084
triptofol[S] (mg/L)	F	0,746 b	1,068 a*	1,075 a	1,152 a
	B	0,922	0,837	0,923	0,981

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije, T16 – dodavanje pripravka tanina u tri obroka tijekom fermentacije, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BKT16 – dodavanje pripravka tanina kao u tretmanu T16 i djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije kao u tretmanu BK16.

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

Nakon fermentacije (F) vina T16 i BKT16 imala su značajno višu koncentraciju linalola od vina BK16 tretmana (Tablica 28). Vino BKT16 tretmana sadržavalo je značajno nižu koncentraciju *cis*-3-heksenola od vina kontrolnog K16 i BK16 tretmana. Benzil-alkohola bilo je značajno više u vinu kontrolnog tretmana K16 nego u ostalim vinima, među kojima je značajno niža koncentracija pronađena u vinima BK16 i BKT16 nego u vinu T16 tretmana. Butanske kiseline bilo je značajno manje u BKT16 nego u ostalim vinima, dekanske kiseline značajno više u T16 nego u vinima kontrolnog K16 i BKT16 tretmana te dodekanske kiseline značajno više u vinu kontrolnog tretmana K16 nego u BK16 i BKT16 vinima. Etil-heksanoata bilo je značajno više u T16 vinu nego u vinu kontrolnog tretmana K16, a etil-dekanoata također u T16 nego u BK16 i BKT16 vinima. Heksil-acetata bilo je značajno više u T16 nego u vinu kontrolnog tretmana K16. Od ostalih estera metil-4- i etil-4-hidroksibutanoat bili su značajno viših koncentracija u vinu BK16 nego u vinu BKT16 tretmana, a etil-*p*-kumarata pronađeno je najmanje u vinu BKT16 u odnosu na vina ostalih tretmana. Acetoina i 3-hidroksi-2-pentanona bilo je značajno manje u vinu BK16 nego u vinu BKT16 tretmana, a triptofola značajno manje u vinu kontrolnog tretmana K16 nego u vinima ostalih tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B), koncentracije pojedinih glavnih monoterpenola porasle su u vinima određenih tretmana, dok je koncentracija terpendiola I snižena u svim vinima (Tablica 28). Vino BKT16 tretmana razlikovalo se od vina kontrolnog tretmana K16 na osnovi značajno niže koncentracije *cis*-3-heksenola. Vina BKT16 i BK16 tretmana sadržavala su značajno manje benzil-alkohola od T16 i vina kontrolnog tretmana K16, te značajno manje dodekanske kiseline od vina kontrolnog tretmana K16. Što se tiče ostalih estera, utvrđene su pravilnosti u promjenama koncentracija pojedinih spojeva nakon dodatnog bistrenja (B): koncentracije etil-laktata, dietil-sukcinata, dietil-malata i monoetil-sukcinata porasle su, dok je koncentracija metil-4-hidroksibutanoata snižena u vinima svih tretmana. U vinu BKT16 tretmana pronađena je viša koncentracija dietil-sukcinata u odnosu na vino BK16 tretmana, metil-4-hidroksibutanoata je bilo najviše u BK16 i najmanje u vinu BKT16 tretmana, etil-4-hidroksibutanoata značajno više u vinima kontrolnog K16 i BK16 tretmana nego u vinu BKT16 tretmana te monometil-sukcinata značajno više u vinu BKT16 nego u vinu BK16 tretmana. Vino BKT16 tretmana sadržavalo je najnižu koncentraciju etil-*p*-kumarata, dok su vina K16 i T16 tretmana sadržavala više koncentracije nego vino BK16 tretmana. Odnos koncentracija acetoina i 3-hidroksi-2-pentanona između tretmana ostao je podjednak, a značajno manje γ-butirolaktona pronađeno je u vinu BKT16 nego u vinu BK16 tretmana.

Tablica 29. Koncentracije vezanih hlapljivih spojeva arome (µg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Vezani spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman			
		K16	BK16	T16	BKT16
Monoterpeni					
trans-furan oksid linalola^{S}	F	2,269	2,311	2,388	2,418
	B	2,338 b	2,300 b	2,547 ab	2,681 a
cis-furan oksid linalola^{S}	F	0,767 b	0,797 ab	0,889 a	0,874 ab
	B	0,842 b	0,760 c	0,905 b	1,040 a*
linalol	F	8,612 *	7,964	7,928 *	5,802
	B	6,478 a	6,025 a	4,781 ab	3,802 b
hotrienol^{S}	F	1,850	2,245	2,477	2,432
	B	1,814	2,352	2,376	2,274
α-terpineol	F	1,351 b	1,395 b	1,859 a	2,075 a
	B	1,330 c	1,327 c	1,706 b	2,024 a
trans-piran oksid linalola^{S}	F	5,721	5,848	6,094	5,888
	B	5,724	5,767	5,913	6,270
citronelol	F	1,027 ab	0,662 ab	1,180 a	0,312 b
	B	0,694	1,044	0,301	0,622
nerol	F	7,447	7,688	7,464	7,742

	B	7,612	7,524	7,250	7,868
geraniol	F	43,486	45,476	40,042	43,351
	B	41,761	43,132	39,068	39,937
terpendiol I[S]	F	1,684	1,334	1,096	0,937
	B	1,436	1,321	0,920	1,819
trans-8-hidroksi-linalol[S]	F	29,597	29,551	27,042	24,570
	B	21,403	26,669	19,253	31,374
7-hidroksi-geraniol[S]	F	21,916	23,226	21,849	22,965
	B	19,401	23,475	21,585	41,953
cis-8-hidroksi-linalol[S]	F	92,777	99,874	91,859	91,944
	B	83,504	100,344	82,179	158,338
trans-geranijska kiselina[S]	F	8,372	9,366	8,691	9,357
	B	8,118	9,541	7,979	9,882
C_{13}-norizoprenoidi					
β-damaskenon	F	0,144	0,102	0,172 *	0,172
	B	0,119	0,132	0,124	0,074
3-hidroksi-β-damaskon[S]	F	177,555 *	179,754	183,228 *	183,418
	B	130,081	135,159	130,389	129,279
3-okso-α-jonol[S]	F	59,229	62,705	61,105	58,098
	B	59,096	60,956	54,791	58,876
3-hidroksi-7,8-dihidro-β-jonol[S]	F	50,450	53,445	51,136	53,082
	B	47,417	52,070	48,445	66,343
vomifoliol[S]	F	20,284 ab	25,323 a	22,506 ab	18,844 b
	B	17,073	20,814	18,193	47,682
Alkoholi					
1-heksanol	F	88,109	86,977	89,533	90,305 *
	B	86,353	87,485	84,532	86,448
trans-3-heksenol[S]	F	1,157	1,098	1,202	1,134
	B	1,180	1,164	1,182	1,099
cis-3-heksenol[S]	F	13,289	13,463	13,938	14,816
	B	12,806 b	13,168 b	12,741 b	14,306 a
trans-2-heksenol[S]	F	15,182 b	16,374 ab	15,628 b	17,464 a
	B	15,267	16,880	15,505	16,805
1-okten-3-ol[S]	F	2,491 b	2,597 ab	2,889 a	2,619 ab
	B	2,530	2,510	2,523	2,751
1-oktanol[S]	F	200,436	192,749	191,798	163,962
	B	210,644	180,566	199,649	166,081
2-feniletanol[S]	F	322,719 a	266,701 b	318,079 a	279,587 b
	B	305,423	273,109	309,064	287,039
Ostali					
benzaldehid[S]	F	5,087 a	2,582 ab	1,846 b	2,824 ab
	B	3,124 ab	2,313 b	3,149 ab	4,395 a
4-vinilgvajakol[S]	F	12,291	16,199	14,828 *	12,434
	B	10,362	13,413	10,130	47,284
triptofol[S]	F	10,091 b	13,790 ab	13,100 ab	14,397 a
	B	10,624	12,641	11,984	15,008

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije, T16 – dodavanje pripravka tanina u tri obroka tijekom fermentacije, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BKT16 – dodavanje pripravka tanina kao u tretmanu T16 i djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije kao u tretmanu BK16.

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

Među glikozidno vezanim spojevima arome, vino T16 tretmana je nakon fermentacije (F) imalo značajno više vezanog *cis*-furan oksida linalola nego vino kontrolnog tretmana K16 i značajno više vezanog citronelola nego vino BKT16 tretmana (Tablica 29). U vinu BK16 tretmana pronađeno je više vezanog vomifoliola nego u vinu BKT16, dok je potonje vino sadržavalo više vezanog *trans*-2-heksenola nego vina kontrolnog K16 i T16 tretmana. Vino T16 tretmana imalo je značajno više vezanog 1-okten-3-ola nego vino kontrolnog tretmana K16, dok su vina kontrolnog K16 i T16 tretmana imala značajno više vezanog 2-feniletanola nego vina BK16 i BKT16 tretmana. Vezanog benzaldehida je bilo više u vinu kontrolnog K16 nego u vinu T16 tretmana, a vezanog triptofola više u vinu BKT16 nego u vinu kontrolnog tretmana K16.

Nakon dodatnog bistrenja (B), BKT16 vino imalo je značajno više vezanog *trans*-furan oksida linalola nego vina K16 i BK16 tretmana te značajno više vezanog *cis*-furan oksida linalola nego sva ostala vina uz naznaku da je vino BK16 sadržavalo najnižu koncentraciju (Tablica 29). Isto vino sadržavalo je višu koncentraciju vezanog α-terpineola u odnosu na ostala vina te nižu koncentraciju vezanog linalola u odnosu na vina K16 i BK16 tretmana. Vezani *cis*-3-heksenol pronađen je u najvišoj koncentraciji u vinu BKT16 tretmana. Vezanog benzaldehida je bilo značajno više u vinu BKT16 nego u vinu BK16 tretmana.

4.4.5. Senzorska svojstva

Tablica 30. Rezultati kvantitativne deskriptivne analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman			
		K16	BK16	T16	BKT16
Svojstva mirisa					
cvjetni	F	6,9 b	7,2 ab	7,5 a*	7,4 a*
	B	6,6 ab	7,2 a	6,3 b	6,9 ab
voćni	F	6,4 c	6,9 b	7,5 a	7,3 ab
	B	6,5	7,0	6,4	6,8
biljni	F	2,0 c	2,5 b	3,0 a	2,9 ab
	B	2,2	2,4	2,5	2,4
začinski / aromatično bilje	F	1,5 b	1,7 b	2,7 a	2,4 ab
	B	1,8 b	2,2 ab	2,1 ab	2,7 a
sovinjonski	F	3,2 b	3,5 ab	4,5 a	3,9 ab
	B	3,1	3,4	2,9	3,4
muškatni	F	3,5	3,6	4,2 *	3,7
	B	3,5 ab	3,6 a	3,1 b	3,5 ab
med	F	1,5 c	2,1 bc	3,3 a*	3,1 ab*
	B	2,0	2,8	1,8	2,2
vosak	F	2,3	2,8	3,5 *	2,8
	B	1,8	2,5	1,6	1,7
Svojstva okusa					
svježina	F	7,3	7,4 *	7,7 *	7,7
	B	7,1	7,0	6,8	7,3
kiselost	F	5,9	5,8	6,0	5,9
	B	5,5	5,7	5,7	5,9
tijelo / punoća	F	7,8 b	8,2 ab	8,5 a*	8,1 ab
	B	7,7	8,1	8,0	8,0
slatkoća	F	6,5	6,5	7,1	6,7
	B	6,5 b	6,8 a	6,8 ab	6,8 ab
viskozitet	F	7,3	7,6	7,9	7,7
	B	7,5	7,7	7,8	7,5
gorčina	F	3,2 b	3,3 b	4,0 a	3,5 b
	B	3,4 *	3,4	3,5	3,4
astringentnost	F	2,8 b	2,6 b	3,3 a	3,0 ab
	B	2,4 b	2,7 ab	3,0 a	2,7 b

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije, T16 – dodavanje pripravka tanina u tri obroka tijekom fermentacije, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BKT16 – dodavanje pripravka tanina kao u tretmanu T16 i djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije kao u tretmanu BK16.

S obzirom na svojstva mirisa i okusa, vina T16 i BKT16 su se nakon fermentacije (F) značajno razlikovala samo na osnovi intenziteta osjeta *gorčine* koji je bio viši u vinu T16

tretmana (Tablica 30). Vino T16 tretmana opisano je višim intenzitetima većine pozitivnih mirisnih svojstava u odnosu na vina kontrolnog K16 i/ili BK16 tretmana. Vino T16 se ujedno odlikovalo i izraženijim *tijelom / punoćom*, *gorčinom* i *astringencijom*, uglavnom, ali ne i isključivo u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16.

Nakon dodatnog bistrenja (B) intenziteti većine pozitivnih senzorskih svojstava mirisa vina T16 tretmana uglavnom su sniženi, u pojedinim slučajevima i izraženo (Tablica 30). Posljedica toga bila je da se potonje vino više nije isticalo među ostalim vinima po tom pitanju. Slično je utvrđeno i za svojstva okusa, osim u slučaju *astringencije* na osnovi čijeg se intenziteta vino T16 i dalje razlikovalo od vina BKT16 tretmana. Nakon dodatnog bistrenja, osjet *slatkoće* bio je izraženiji u vinu BK16 u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16.

Tablica 31. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova i test nizanja) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

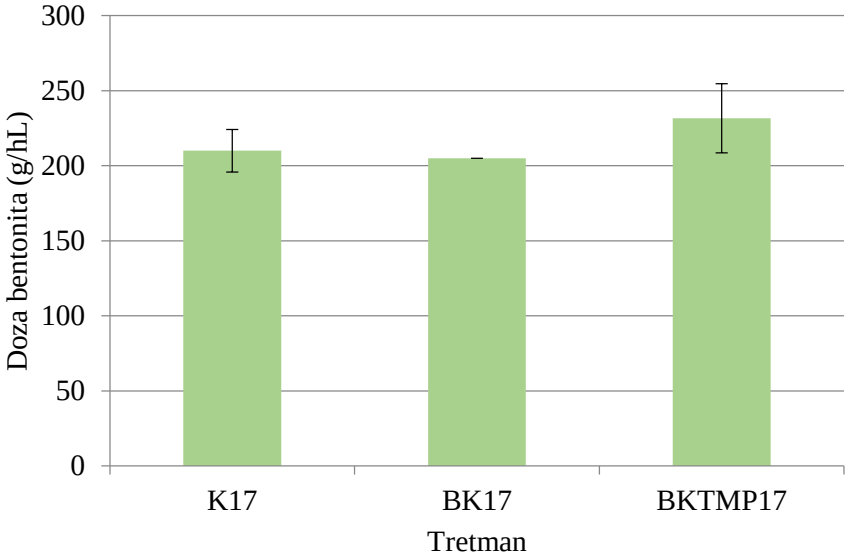
	Uzorkovanje	Tretman			
		K16	BK16	T16	BKT16
Bodovi	F	83,0 d	86,1 c	88,9 a*	87,3 b*
	B	83,6 b	85,6 a	83,3 b	85,0 ab
Poredak	F	4	3	1	2
	B	3	1	4	2

Skraćenice: K16 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK16 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije, T16 – dodavanje pripravka tanina u tri obroka tijekom fermentacije, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BKT16 – dodavanje pripravka tanina kao u tretmanu T16 i djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije kao u tretmanu BK16.

Nakon fermentacije (F), razlike između vina različitih tretmana bile su izraženije nego nakon dodatnog bistrenja (B) (Tablica 31). Vino kontrolnog tretmana K16 je nakon fermentacije (F) ocijenjeno s najmanjim brojem bodova te je bilo najmanje preferirano. Najviše bodova nakon fermentacije (F) dodijeljeno je vinu T16 tretmana koje je u toj fazi bilo i najviše preferirano. Međutim, stabilna vina (B) T16 i BKT16 tretmana ocijenjena su značajno nižim brojem bodova što je promijenilo odnose tj. poredak vina prema kvaliteti, odnosno preferencijama ocjenjivača. Nakon dodatnog bistrenja (B) vino BK16 tretmana ocijenjeno je većim brojem bodova od vina kontrolnog K16 i T16 tretmana, dok se vino BKT16 tretmana nije značajno razlikovalo od ostalih. Stabilno vino (B) BK16 tretmana bilo je najviše preferirano, vino BKT16 tretmana nešto manje, dok je vino T16 tretmana bilo najmanje preferirano.

4.5. Učinak temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji

4.5.1. Doza bentonita



Slika 10. Ukupne doze bentonita primijenjene u tretmanima proizvodnje vina kultivara malvazija istarska u berbi 2017. godine

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 16 °C, BKTPM17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 18 °C.

Nisu utvrđene statistički značajne razlike između ukupnih doza potrebnih za postizanje potpune proteinske stabilizacije vina kontrolnog tretmana K17, vina tretmana djelomičnog bistrenja bentonitom tijekom fermentacije na 16 °C, BK17, i vina tretmana djelomičnog bistrenja bentonitom tijekom fermentacije na 18 °C, BKTMP17 (Slika 10).

4.5.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri

Tablica 32. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman		
		K17	BK17	BKTMP17
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9905	0,9905	0,9903
	B	0,9906	0,9906	0,9905
Alkohol (vol. %)	F	13,41 b*	13,42 b*	13,56 a*
	B	13,18	13,24	13,24
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	20,7	20,7	20,6
	B	20,2	20,3	20,1
Reducirajući šećeri (g/L)	F	3,0 b	3,5 a	3,6 a
	B	2,9 b	3,4 ab	3,6 a
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	17,8 a	17,2 b	17,0 b
	B	17,3	16,9	16,5
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,5 a*	5,4 b	5,2 c
	B	5,3 a	5,3 a	5,1 b
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,43	0,36	0,43
	B	0,54 a*	0,43 b*	0,52 a*
pH	F	3,22 c	3,23 b*	3,24 a
	B	3,21 a	3,14 b	3,22 a

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 16 °C, BKTPM17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 18 °C.

Vino BKTMP17 tretmana sadržavalo je značajno viši volumni udio alkohola u odnosu na vina BK17 i kontrolnog tretmana K17 koja se međusobno nisu značajno razlikovala na osnovi tog parametra, značajno nižu koncentraciju ukupne kiselosti od vina BK17 i K17 tretmana, od kojih je potonji sadržavao najvišu koncentraciju, te najvišu pH vrijednost, čija je najniža vrijednost zabilježena u vinu K17 (Tablica 32). Vina BK17 i BKTMP17 tretmana imala su značajno višu koncentraciju reducirajućih šećera i značajno nižu koncenctraciju ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera od vina kontrolnog tretmana K17.

Nakon dodatnog bistrenja (B), značajno se snizio volumni udio alkohola te povisila koncentracija hlapljive kiselosti u vinima svih tretmana (Tablica 32). Zbog značajnog snižavanja vrijednosti ukupne kiselosti u kontrolnom vinu K17, ono se više nije razlikovalo po tom pitanju od vina BK17 tretmana. Povišenje koncentracije hlapljive kiselosti bilo je značajnije za kontrolno vino K17 i BKTMP17 tako da je u vinu BK17 pronađena najniža koncentracija za taj parametar. Nakon dodatnog bistrenja najniža pH vrijednost izmjerena je u vinu BK17 tretmana.

4.5.3. Fenolni spojevi

Tablica 33. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman		
		K17	BK17	BKTMP17
Hidroksibenzojeve kiseline				
galna kiselina	F	0,522 b	0,559 b	0,767 a
	B	0,577	0,711	0,601
protokatehinska kiselina	F	3,331	3,201	3,284 *
	B	3,237	3,190	3,139
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,252 *	0,259 *	0,245
	B	0,226	0,232	0,230
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,051 a	0,044 b	0,044 b*
	B	0,043	0,039	0,035
siringinska kiselina	F	0,187 b	0,237 a	0,250 a
	B	0,219 b*	0,252 a	0,242 a
Hidroksicimetne kiseline				
cis-kaftarna kiselina[S]	F	0,920 *	0,882 *	0,959 *
	B	0,594	0,624	0,587
trans-kaftarna kiselina	F	9,323 b	9,483 b	10,959 a*
	B	9,259 b	11,270 a	10,442 ab
cis-kutarna kiselina[S]	F	0,857	0,829	0,888 *
	B	0,784	0,831	0,794
trans-kutarna kiselina[S]	F	0,737 b	0,807 ab	0,887 a
	B	0,689 b	0,896 a	0,823 ab
kafeinska kiselina	F	0,314	0,185	0,268
	B	0,265	0,247 *	0,231
cis-fertarna kiselina[S]	F	0,364 *	0,358 *	0,370 *
	B	0,265	0,267	0,258
trans-fertarna kiselina[S]	F	1,672	1,695	1,813
	B	1,763	1,947 *	1,829
p-kumarna kiselina	F	0,155 a	0,079 b	0,104 b
	B	0,163	0,115 *	0,117
ferulinska kiselina	F	0,529 a	0,368 b	0,393 b
	B	0,457	0,399	0,339
Flavan-3-oli				
katehin + tirosol (kao katehin)	F	15,085 a	13,959 b	14,565 a*
	B	14,688 a	13,877 b	13,850 b
epikatehin	F	3,202 b	3,292 ab	3,468 a*
	B	2,972	3,100	3,003
procijanidin B1	F	0,436	0,371	0,536
	B	0,361 b	0,481 a	0,399 ab
procijanidin B2	F	0,448	0,478 *	0,487
	B	0,451 ab	0,455 a	0,437 b

Ostali				
taksifolin	F	0,075	0,068	0,086
	B	0,063 b	0,077 a	0,071 ab
trans-piceid	F	0,046 ab	0,044 b	0,056 a
	B	0,041 b	0,052 a	0,048 a
Ukupni fenoli[‡]	F	129,152 a*	114,818 b	113,121 b
	B	122,818 a	115,152 ab	111,212 b

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 16 °C, BKTPM17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 18 °C.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.
[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

Tretman BKTMP17 rezultirao je vinom koje se nakon fermentacije (F) vrlo malo razlikovalo od vina BK17 tretmana te je u odnosu na njega sadržavalo značajno višu koncentraciju galne i *trans*-kaftarne kiseline, katehina s tirosolom te *trans*-piceida (Tablica 33). Koncentracije tih spojeva ujedno su bile više nego u vinu kontrolnog tretmana K17, osim u slučaju katehina. Povrh toga, vino kontrolnog tretmana K17 sadržavalo je više koncentracije 2,5-dihidroksibenzojeve, *p*-kumarne i ferulinske kiseline, odnosno niže koncentracije siringinske kiseline u odnosu na tretmane s primjenom bentonita u fermentaciji, te niže koncentracije glavnih hidroksicinamoiltartarata, *trans*-kaftarne i *trans*-kutarne kiseline, u odnosu na tretman s bistrenjem na višoj temperaturi fermentacije BKTMP17. Vina BK17 i BKTMP17 tretmana imala su podjednake koncentracije ukupnih fenola, značajno niže od onih pronađenih u vinu kontrolnog tretmana K17.

Nakon dodatnog bistrenja (B) vino BKTMP17 značajno se razlikovalo od vina BK17 samo na osnovi niže koncentracije procijanidina (Tablica 33). Vino kontrolnog tretmana K17 imalo je i dalje najnižu koncentraciju siringinske kiseline. Na osnovi nižih koncentracija hidroksicinamoiltartarata, procijanidina B1 i taksifolina značajno se razlikovalo od vina BK17 tretmana, a na osnovi više koncentracije katehina s tirosolom i niže koncentracije *trans*-piceida od oba vina koja su uključivala bistrenje u fermentaciji, BK17 i BKTMP17. Nakon dodatnog bistrenja (B) značajno se snizila koncentracija ukupnih fenola u vinu kontrolnog tretmana K17, pa je bila viša jedino od one pronađene u vinu BKTMP17 tretmana. Stabilno vino (B) BK17 tretmana nije se razlikovalo od ostalih na osnovi koncentracije ukupnih fenola.

4.5.4. Hlapljivi spojevi arome

Tablica 34. Koncentracije hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Hlapljivi spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman		
		K17	BK17	BKTMP17
Monoterpeni				
β-pinen^{S}	F	6,387 a	4,587 c	5,534 b
	B	8,755 *	7,935 *	8,820 *
D-limonen^{S}	F	3,676	2,696	1,692
	B	4,071 b	5,590 a*	5,514 ab*
3-karen^{S}	F	0,572 a	0,377 b	0,362 b
	B	0,712 *	0,697 *	0,724 *
linalol	F	22,081 b	28,445 a*	23,292 b
	B	21,485 b	24,310 a	23,973 a
α-terpineol	F	16,156 a	14,123 a	8,425 b
	B	19,495 *	20,753 *	22,005 *
citronelol	F	8,322 b	9,956 a*	7,148 b
	B	7,341	8,375	7,705
nerol	F	8,527 b	13,174 a*	7,834 b
	B	7,091	7,922	8,354
geraniol	F	7,119 b	17,000 a*	5,253 b
	B	8,961	7,944	7,642
C_{13}-norizoprenoid				
β-damaskenon	F	1,693 *	1,865 *	1,654
	B	1,048	1,222	1,246
Viši alkoholi				
1-heksanol (mg/L)	F	1,388 a	1,363 a	1,135 b
	B	1,399 a	1,306 ab	1,207 b
cis-3-heksenol	F	68,013	67,025	74,406
	B	57,234 b	72,686 a*	66,735 a
2-feniletanol (mg/L)	F	25,845	25,619	23,039
	B	24,806 b	25,278 ab	26,616 a*
Masne kiseline				
butanska kiselina	F	89,963	75,951	76,166
	B	85,119	87,818	86,196
heksanska kiselina (mg/L)	F	5,675	5,700	5,704
	B	5,331 b	5,977 a	6,139 a
oktanska kiselina (mg/L)	F	7,888 b	9,256 a	9,551 a
	B	8,000 c	9,143 b	10,789 a*
dekanska kiselina (mg/L)	F	4,084 b	4,418 b	5,414 a
	B	4,617 c	5,592 b*	6,422 a*
Etil-esteri				
etil-izobutanoat	F	2,545	2,279	2,102

	B	2,867 a	2,888 a*	1,954 b
etil-butanoat (mg/L)	F	0,361	0,380	0,408
	B	0,366	0,372	0,404
etil-2-metilbutanoat	F	4,869	4,278	5,694
	B	7,395	6,707 *	5,202
etil-3-metilbutanoat	F	17,334	14,641	13,906
	B	22,623 a	20,680 ab*	18,463 b*
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,774 b	0,819 ab	0,921 a
	B	0,748	0,824	0,903
etil-heptanoat[S]	F	31,079	31,525	29,576
	B	30,480 c	34,646 a*	32,171 b*
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,541 b	0,564 b	0,677 a
	B	0,535 b	0,593 ab	0,732 a
etil-nonanoat[S]	F	8,068 ab	6,187 b	12,523 a*
	B	9,473	6,387	6,077
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,350	0,321	0,352
	B	0,322	0,387	0,417
Acetatni esteri				
izobutil-acetat	F	12,230 ab	10,948 b*	14,647 a
	B	10,942	10,356	12,929
izoamil-acetat (mg/L)	F	2,943 b	3,173 b	4,361 a
	B	2,811 b	3,376 b	4,566 a*
heksil-acetat (mg/L)	F	0,190 b	0,211 b	0,295 a
	B	0,210 b	0,239 b	0,320 a
cis-4-heksenil-acetat[S] (mg/L)	F	0,058 b	0,071 b	0,116 a
	B	0,061 b	0,072 b	0,119 a
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	2,623 b	2,875 b	4,148 a
	B	2,198 b	2,705 b	4,562 a
Ostali esteri				
izoamil-izobutanoat[S]	F	12,672	14,300	14,160
	B	17,682 *	19,474 *	46,981
dietil-sukcinat (mg/L)	F	0,570 a	0,536 a	0,371 b
	B	0,757	0,781 *	0,678 *
Hlapljivi fenoli				
4-vinilgvajakol[S]	F	23,814	29,853 *	29,353
	B	15,356 c	23,599 b	31,254 a
4-vinilfenol[S]	F	1,111 b	1,788 a*	1,234 ab
	B	0,745 b	0,983 b	1,308 a

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 16 °C, BKTPM17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 18 °C.
[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti spojeva slične kemijske strukture uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

Vina BK17 i BKTMP17 tretmana su se nakon fermentacije (F) značajno razlikovala na osnovi koncentracije većine monoterpena koje su uglavnom bile više u vinu BK17 tretmana (Tablica 34). Vino kontrolnog tretmana K17 sadržavalo je više koncentracije β-pinena i 3-karena u

odnosu na ostala vina, koncentracije većine monoterpena značajno niže od vina BK17 te koncentraciju α-terpineola značajno višu od vina BKTMP17 tretmana. Vino BKTMP17 tretmana sadržavalo je značajno manje 1-heksanola od vina kontrolnog K17 i BK17 tretmana. Koncentracije oktanske i dekanske kiseline bilo su značajno niže u vinu kontrolnog tretmana K17 nego u ostalim vinima. Vino BKTMP17 sadržavalo je najviše koncentracije pojedinih etilnih, ali i svih acetatnih estera. Među ostalim esterima, vina BK17 i kontrolnog tretmana K17 sadržavala su značajno više dietil-sukcinata nego vino BKTMP17, dok razlike između vina BK17 i kontrolnog tretmana K17 u pogledu estera nisu bile izražene. Kontrolno vino K17 sadržavalo je značajno nižu koncentraciju 4-vinilfenola u odnosu na vino BK17 tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđen je porast koncentracija pojedinih monoterpena (β-pinen, 3-karen i α-terpineol), dekanske kiseline i pojedinih estera (etil-3-metilbutanoat, etil-heptanoat, izoamil-izobutanoat i dietil-sukcinat) u vinima većine tretmana, dok je sniženje koncentracije zabilježeno za β-damaskenon (Tablica 34). Najmanje značajnih promjena u odnosu na sastav nakon fermentacije (F) uočeno je u vinu kontrolnog tretmana K17. Nakon dodatnog bistrenja (B) vino BK17 sadržavalo je značajno višu koncentraciju D-limonena, a vina BK17 i BKTMP17 značajno više koncentracije linalola nego vino kontrolnog tretmana K17. 1-Heksanola je pronađeno više u vinu kontrolnog tretmana K17 u odnosu na koncentraciju pronađenu u vinu BKTMP17 tretmana, dok je obrnuto utvrđeno za koncentracije *cis*-3-heksenola i 2-feniletanola. Odnosi koncentracija masnih kiselina ostali su slični kao i nakon fermentacije, ali su, za razliku od situacije nakon fermentacije (F), više koncentracije oktanske i dekanske kiseline pronađene u vinu BKTMP17 u odnosu na vino BK17 tretmana. Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđene su manje promjene odnosa koncentracija etilnih estera u vinima različitih tretmana u odnosu na sastav utvrđen nakon fermentacije (F). Vrijedi istaknuti da su se najviše koncentracije acetatnih estera zadržale u vinu BKTMP17, dok su u vinima kontrolnog K17 i BK17 tretmana i dalje bile podjednake. Hlapljivih fenola pronađeno je najmanje u vinu kontrolnog tretmana K17.

4.5.5. Senzorska svojstva

Tablica 35. Rezultati kvantitativne deskriptivne analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman		
		K17	BK17	BKTMP17
Svojstva mirisa				
cvjetni	F	5,5 b*	6,5 a*	6,7 a
	B	5,1 b	5,8 a	6,0 a
voćni	F	5,8 b	6,7 a	6,9 a
	B	6,0	6,3	6,2
biljni	F	1,9	2,1	2,5
	B	2,0	2,0	2,0
začinski / aromatično bilje	F	1,2 b	2,1 a	2,0 ab
	B	1,3	2,0	1,9
sovinjonski	F	2,8 b	3,4 a	3,6 a*
	B	2,7	3,0	2,9
muškatni	F	3,0 c	3,4 b	3,9 a
	B	3,2	3,5	3,6
med	F	1,7 b	3,1 a*	3,1 a
	B	1,5 b	2,1 a	2,0 ab
vosak	F	0,9 c	2,1 b*	2,6 a*
	B	0,4	0,8	1,4
Svojstva okusa				
svježina	F	7,0	7,0	7,1 *
	B	6,6 b	7,0 a	6,6 b
kiselost	F	5,3	5,5	5,5
	B	5,5 ab	6,0 a*	5,2 b
tijelo / punoća	F	6,4 b	6,9 a*	7,0 a*
	B	6,1	6,3	6,2
slatkoća	F	5,1 b	5,6 a	5,4 ab
	B	5,1	5,0	5,1
viskozitet	F	6,2 b	6,6 ab*	6,9 a*
	B	5,9	5,8	6,0
gorčina	F	2,4 a	2,1 ab	2,0 b
	B	2,4	2,3	2,1
astringentnost	F	2,0	2,0	2,0
	B	2,1	2,1	2,0

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 16 °C, BKTPM17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 18 °C.

Nakon fermentacije (F) vino BKTMP17 se od vina BK17 tretmana značajno razlikovalo na osnovi viših intenziteta mirisa koji podsjećaju na mirise vina *muškatnih* kultivara i voska, dok su vina oba tretmana koji su uključivali bistrenje u fermentaciji (BK17 i BKTMP17) bila

opisana višim intenzitetima velike većine pozitivnih svojstava mirisa u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 35). Vina BKTMP17 i BK17 tretmana nisu se razlikovala na osnovi intenziteta svojstava okusa. Vino kontrolnog tretmana K17 isticalo se slabije izraženim *tijelom / punoćom* u odnosu na vina ostalih tretmana, manje intenzivnim osjetom *slatkoće* u odnosu na vino BK17 kao i *viskoziteta* u odnosu na vino BKTMP17 tretmana, dok je u odnosu na posljednje spomenuto vino opisano višim intenzitetom *gorčine*.

Nakon dodatnog bistrenja (B), vina BKTMP17 i BK17 tretmana nisu se više značajno razlikovala na osnovi svojstava mirisa a umanjene su i razlike između tih vina i onog kontrolnog tretmana K17 (Tablica 35). Vina BKTMP17 i donekle K17 tretmana odlikovala su se slabijom *svježinom* i manje izraženom *kiselosti* u odnosu na vino BK17 tretmana.

Tablica 36. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova i test nizanja) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

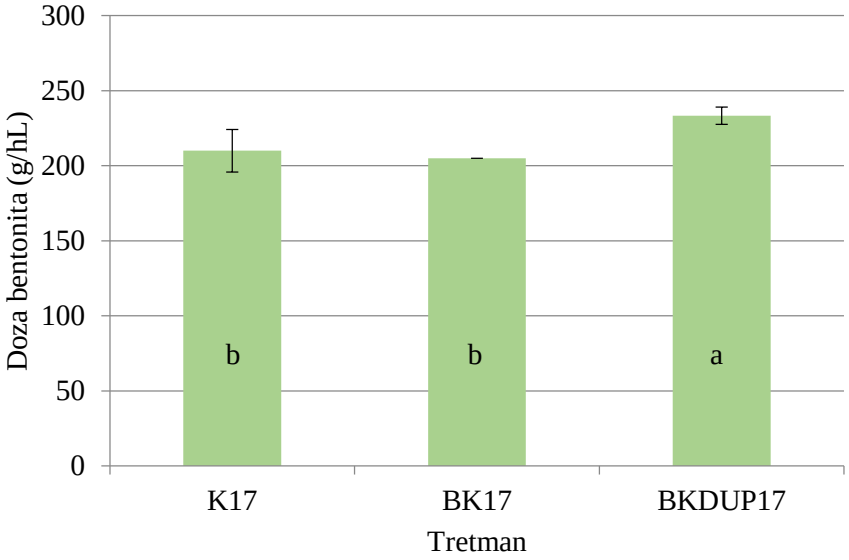
	Uzorkovanje	Tretman		
		K17	BK17	BKTMP17
Bodovi	F	80,9 c	84,9 b*	85,9 a*
	B	81,3 b	82,9 a	82,7 a
Poredak	F	3	2	1
	B	3	1	2

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 16 °C, BKTPM17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije na 18 °C.

Vino BKTMP17 tretmana je nakon fermentacije (F) ocijenjeno najvećim, a vino kontrolnog tretmana (K17) najmanjim brojem bodova, što je popraćeno i odgovarajućim nizanjem prema preferencijama. Nakon dodatnog bistrenja (B), vina BKTMP17 i BK17 tretmana ocijenjena su manjim brojem bodova u odnosu na bodove dodijeljene nakon fermentacije (F), međusobno se više nisu statistički značajno razlikovala, ali su i dalje bila ocijenjena višim ocjenama nego kontrolno vino K17 (Tablica 36). Za razliku od situacije nakon fermentacije (F), stabilno vino (B) BK17 tretmana bilo je najviše preferirano, dok se status vina kontrolnog tretmana K17 nije promijenio te je ono i dalje bilo najmanje prefrirano od ocjenjivača.

4.6. Učinak primjene dvostruke doze tijekom bistrenja u fermentaciji (prebistrenje)

4.6.1. Doza bentonita



Slika 11. Ukupne doze bentonita primijenjene utretmanima proizvodnje vina kultivara malvazija istarska u berbi 2017. godine

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - mošt djelomično bistren standardnom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije, BKDUP17 – mošt bistren dvostrukom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije.

Vino tretmana s dvostrukom dozom bentonita primijenjenom u fermentaciji BKDUP17 zahtijevalo je značajno višu ukupnu dozu za postizanje proteinske stabilnosti u odnosu na vino tretmana standardnom dozom BK17 i vino kontrolnog tretmana K17, koja se međusobno nisu značajno razlikovala (Slika 11).

4.6.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri

Tablica 37. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman		
		K17	BK17	BKDUP17
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9905 a	0,9905 ab	0,9902 b
	B	0,9906 ab	0,9906 a	0,9903 b
Alkohol (vol. %)	F	13,41 b*	13,42 b*	13,53 a*
	B	13,18 b	13,24 ab	13,32 a
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	20,7	20,7	20,2
	B	20,2	20,3	19,9
Reducirajući šećeri (g/L)	F	3,0 b	3,5 a	3,4 ab
	B	2,9	3,4	3,5
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	17,8 a	17,2 b	16,8 b
	B	17,3 a	16,9 ab	16,5 b
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,5 a*	5,4 b	5,2 c
	B	5,3 ab	5,3 a	5,2 b
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,43 ab	0,36 b	0,45 a
	B	0,54 a*	0,43 b*	0,47 b
pH	F	3,22	3,23 *	3,22 *
	B	3,21 a	3,14 b	3,19 a

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - mošt djelomično bistren standardnom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije, BKDUP17 – mošt bistren dvostrukom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije.

Nakon fermentacije (F) vino BKDUP17 tretmana sadržavalo je najviši volumni udio alkohola, najnižu koncentraciju ukupne i najvišu koncentraciju hlapljive kiselosti, u većini slučajeva uz statistički značajnu razliku (Tablica 37). Vino kontrolnog tretmana K17 sadržavalo je najviše koncentracije ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera i ukupne kiselosti te je u njemu izmjerena viša relativna gustoća u odnosu na vino BKDUP17 tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B) zabilježeno je sniženje volumnog udjela alkohola u vinima svh tretmana te sniženje pH vrijednosti odnosno povišenje hlapljive kiselosti u vinima većine tretmana (Tablica 37). Promjene vrijednosti spomenutih kao i drugih parametara u odnosu na sastav utvrđen nakon fermentacije (F) uzrokovale su promjene i u odnosima njihovih vrijednosti između stabilnih vina (B) različitih tretmana.

4.6.3. Fenolni spojevi

Tablica 38. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman		
		K17	BK17	BKDUP17
Hidroksibenzojeve kiseline				
galna kiselina	F	0,522 b	0,559 b	0,720 a
	B	0,577	0,711	0,630
protokatehinska kiselina	F	3,331	3,201	3,183
	B	3,237	3,190	3,091
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,252 *	0,259 *	0,247
	B	0,226	0,232	0,230
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,051 a	0,044 b	0,035 c
	B	0,043	0,039	0,036
siringinska kiselina	F	0,187 c	0,237 b	0,263 a
	B	0,219 b*	0,252 a	0,261 a
Hidroksicimetne kiseline				
cis-kaftarna kiselina^{S}	F	0,920 *	0,882 *	0,963 *
	B	0,594	0,624	0,604
trans-kaftarna kiselina	F	9,323 b	9,483 b	11,158 a
	B	9,259	11,27	11,285
cis-kutarna kiselina^{S}	F	0,857	0,829	0,888
	B	0,784	0,831	0,822
trans-kutarna kiselina^{S}	F	0,737 b	0,807 b	0,936 a
	B	0,689 b	0,896 a	0,936 a
kafeinska kiselina	F	0,314	0,185	0,218
	B	0,265	0,247 *	0,222
cis-fertarna kiselina^{S}	F	0,364 *	0,358 *	0,369 *
	B	0,265	0,267	0,260
trans-fertarna kiselina^{S}	F	1,672	1,695	1,813
	B	1,763	1,947 *	1,931
p-kumarna kiselina	F	0,155 a	0,079 b	0,081 b
	B	0,163 a	0,115 b*	0,101 b
ferulinska kiselina	F	0,529 a	0,368 b	0,382 b
	B	0,457 a	0,399 ab	0,365 b
Flavan-3-oli				
katehin + tirosol (kao katehin)	F	15,085 a	13,959 b	13,557 b
	B	14,688 a	13,877 b	13,297 b
epikatehin	F	3,202 b	3,292 ab	3,487 a*
	B	2,972 b	3,100 ab	3,151 a
procijanidin B1	F	0,436	0,371	0,469
	B	0,361 b	0,481 a	0,477 a
procijanidin B2	F	0,448 b	0,478 ab *	0,499 a
	B	0,451	0,455	0,463

Ostali				
taksifolin	F	0,075 ab	0,068 b	0,085 a
	B	0,063	0,077	0,076
trans-piceid	F	0,046 b	0,044 b	0,054 a
	B	0,041 b	0,052 a	0,053 a
Ukupni fenoli[‡]	F	129,152 a*	114,818 b	119,545 b*
	B	122,818 a	115,152 a	103,303 b

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - mošt djelomično bistren standardnom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije, BKDUP17 – mošt bistren dvostrukom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije.

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

Nakon fermentacije (F) vino iz tretmana bistrenja dvostrukom dozom bentonita u fermentaciji BKDUP17 značajno se razlikovalo od vina tretmana bistrenja standardnom dozom BK17 na osnovi viših koncentracija galne, siringinske, *trans*-kaftarne i *trans*-kutarne kiseline, taksifolina i *trans*-piceida te niže koncentracije 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline. Za većinu spomenutih spojeva utvrđen je sličan odnos koncentracija pronađenih u vinu BKDUP17 u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 38). Vino BKDUP17 tretmana nije se značajno razlikovalo od vina BK17 tretmana na osnovi koncentracije ukupnih fenola koja je u vinima oba spomenuta tretmana bila niža od one pronađene u vinu kontrolnog tretmana K17.

Nakon dodatnog bistrenja (B) više nije bilo značajnih razlika između vina BKDUP17 i BK17 tretmana, dok je vino kontrolnog tretmana K17 sadržavalo nižu koncentraciju siringinske i *trans*-kutarne kiseline, procijanidina B1 i *trans*-piceida te višu koncentraciju katehina s tirosolom i *p*-kumarne kiseline od vina ostala dva tretmana (Tablica 38). Vino BKDUP17 tretmana sadržavalo je višu koncentraciju epikatehina i nižu koncentraciju ferulinske kiseline u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17. U stabilnom vinu (B) BKDUP17 tretmana značajno se snizila koncentracija ukupnih fenola te je bila značajno niža od koncentracija pronađenih u vinima kontrolnog K17 i BK17 tretmana, a koje se, za razliku od situacije nakon fermentacije (F), više nisu značajno razlikovale.

4.6.4. Hlapljivi spojevi arome

Tablica 39. Koncentracije hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Hlapljivi spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman		
		K17	BK17	BKDUP17
Monoterpeni				
β-pinen[S]	F	6,387 a	4,587 b	5,336 b
	B	8,755 *	7,935 *	7,436
D-limonen[S]	F	3,676 a	2,696 ab	2,105 b
	B	4,071	5,590 *	4,081
3-karen[S]	F	0,572 a	0,377 b	0,296 c
	B	0,712 *	0,697 *	0,621 *
linalol	F	22,081 b	28,445 a*	23,612 b
	B	21,485 b	24,310 a	24,141 ab
α-terpineol	F	16,156 a	14,123 a	9,313 b
	B	19,495 *	20,753 *	17,023 *
citronelol	F	8,322	9,956 *	6,296
	B	7,341	8,375	7,060
nerol	F	8,527 b	13,174 a*	8,523 b
	B	7,091	7,922	6,377
geraniol	F	7,119 b	17,000 a*	9,715 b*
	B	8,961 a	7,944 ab	5,110 b
C_{13}-norizoprenoid				
β-damaskenon	F	1,693 *	1,865 *	1,561 *
	B	1,048	1,222	1,090
Viši alkoholi				
1-heksanol (mg/L)	F	1,388 a	1,363 a	1,208 b
	B	1,399	1,306	1,295
cis-3-heksenol	F	68,013	67,025	75,041
	B	57,234 b	72,686 a*	65,376 ab
2-feniletanol (mg/L)	F	25,845	25,619	23,150
	B	24,806	25,278	23,933
Masne kiseline				
butanska kiselina	F	89,963 a	75,951 b	79,466 ab
	B	85,119	87,818	90,143
heksanska kiselina (mg/L)	F	5,675 b	5,700 b	6,557 a
	B	5,331 b	5,977 a	6,172 a
oktanska kiselina (mg/L)	F	7,888 b	9,256 a	9,988 a
	B	8,000 b	9,143 a	9,115 a
dekanska kiselina (mg/L)	F	4,084 b	4,418 ab	4,838 a
	B	4,617 b	5,592 a*	5,694 a
Etil-esteri				
etil-izobutanoat	F	2,545	2,279	2,051

	B	2,867	2,888 *	2,618
etil-butanoat (mg/L)	F	0,361 b	0,380 ab	0,422 a
	B	0,366	0,372	0,428
etil-2-metilbutanoat	F	4,869	4,278	4,112
	B	7,395	6,707 *	5,525 *
etil-3-metilbutanoat	F	17,334 a	14,641 ab	12,168 b
	B	22,623 a	20,68 ab*	18,296 b*
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,774	0,819	0,801
	B	0,748	0,824	0,810
etil-heptanoat[S]	F	31,079	31,525	30,845
	B	30,480	34,646 *	31,841
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,541	0,564	0,543
	B	0,535	0,593	0,583
etil-nonanoat[S]	F	8,068	6,187	10,656
	B	9,473	6,387	8,098
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,350	0,321	0,311
	B	0,322	0,387	0,352
Acetatni esteri				
izobutil-acetat	F	12,230 b	10,948 b*	14,599 a
	B	10,942 ab	10,356 b	13,431 a
izoamil-acetat (mg/L)	F	2,943 b	3,173 b	4,083 a
	B	2,811 b	3,376 ab	3,888 a
heksil-acetat (mg/L)	F	0,190 b	0,211 ab	0,257 a
	B	0,210	0,239	0,277
cis-4-heksenil-acetat[S] (mg/L)	F	0,058	0,071	0,093
	B	0,061	0,072	0,102
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	2,623 b	2,875 b	3,683 a
	B	2,198 b	2,705 b	3,789 a
Ostali esteri				
izoamil-izobutanoat[S]	F	12,672	14,300	14,408
	B	17,682 *	19,474 *	17,956
dietil-sukcinat (mg/L)	F	0,570 a	0,536 a	0,417 b
	B	0,757	0,781 *	0,642 *
Hlapljivi fenoli				
4-vinilgvajakol[S]	F	23,814	29,853 *	34,053
	B	15,356 b	23,599 ab	29,354 a
4-vinilfenol[S]	F	1,111 b	1,788 a*	1,438 ab
	B	0,745 b	0,983 ab	1,251 a

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - mošt djelomično bistren standardnom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije, BKDUP17 – mošt bistren dvostrukom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije.

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti spojeva slične kemijske strukture uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

Nakon fermentacije (F) najviše koncentracije pojedinih glavnih monoterpenola, kao što su linalol, α-terpineol, nerol i geraniol, pronađene su u vinu BK17 tretmana (Tablica 39). Vino

kontrolnog tretmana K17 sadržavalo je više koncentracije β-pinena, D-limonena, 3-karena i α-terpineola u odnosu na vino BKDUP17 tretmana. Najniža koncentracija 1-heksanola pronađena je u vinu BKDUP17 tretmana. Većina masnih kiselina pronađena je u nižim koncentracijama u vinu kontrolnog tretmana K17 u odnosu na oba vina djelomično bistrena u fermentaciji koja su sadržavala podjednake koncentracije. Nisu utvrđene razlike između koncentracija glavnih etilnih estera u vinima različitih tretmana. Etil-butanoata bilo je značajno više, a etil-3-metilbutanoata značajno manje u vinu BKDUP17 nego u vinu kontrolnog tretmana K17. U vinu BKDUP17 tretmana pronađene su najviše koncentracije većine acetatnih estera te najniža koncentracija dietil-sukcinata u odnosu na ostala vina. Koncentracija 4-vinilfenola bila je viša u vinu BK17 nego u vinu kontrolnog tretmana K17.

Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđen je porast koncentracija 3-karena, α-terpineola, etilnih estera kratkog razgranatog lanca (etil-2- i etil-3-metilbutanoat) te ostalih estera (izoamil-izobutanoat i dietil-sukcinat) u vinima svih ili većine tretmana (Tablica 39). S druge strane, koncentracija β-damaskenona se značajno snizila, također u svim vinima. Promjene koncentracija spomenutih kao i drugih hlapljivih spojeva u odnosu na sastav utvrđen nakon fermentacije uzrokovale su promjene i u odnosima njihovih vrijednosti između vina različitih tretmana. Nakon dodatnog bistrenja (B), linalola i *cis*-3-heksenola pronađeno je više u vinu BK17 nego u vinu kontrolnog tretmana K17, dok je koncentracija geraniola bila viša u vinu kontrolnog K17 nego u vinu BKDUP17 tretmana. Vino kontrolnog tretmana K17 i dalje je sadržavalo najniže koncentracije većine masnih kiselina. Za većinu ostalih spojeva odnosi koncentracija između tretmana ostali su podjednaki.

4.6.5. Senzorska svojstva

Tablica 40. Rezultati kvantitativne deskriptivne analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman		
		K17	BK17	BKDUP17
Svojstva mirisa				
cvjetni	F	5,5 b*	6,5 a*	6,3 a*
	B	5,1 b	5,8 a	5,3 b
voćni	F	5,8 b	6,7 a	6,8 a*
	B	6,0 ab	6,3 a	5,8 b
biljni	F	1,9 b	2,1 ab	2,5 a*
	B	2,0	2,0	1,7
začinski / aromatično bilje	F	1,2 b	2,1 a	2,3 a
	B	1,3	2,0	2,0

sovinjonski	F	2,8	3,4	3,3 *
	B	2,7	3,0	2,6
muškatni	F	3,0 b	3,4 a	3,6 a*
	B	3,2 ab	3,5 a	3,0 b
med	F	1,7 b	3,1 a*	3,3 a*
	B	1,5 b	2,1 a	2,0 ab
vosak	F	0,9 b	2,1 a*	2,3 a*
	B	0,4	0,8	1,2
Svojstva okusa				
svježina	F	7,0	7,0	7,0
	B	6,6 b	7,0 a	6,9 a
kiselost	F	5,3 b	5,5 a	5,2 b
	B	5,5 ab	6,0 a*	5,1 b
tijelo / punoća	F	6,4 b	6,9 ab*	7,2 a*
	B	6,1	6,3	6,2
slatkoća	F	5,1	5,6	5,5
	B	5,1	5,0	5,1
viskozitet	F	6,2 b	6,6 a*	6,5 ab*
	B	5,9	5,8	5,7
gorčina	F	2,4	2,1	2,1
	B	2,4	2,3	2,0
astringentnost	F	2,0	2,0	2,0
	B	2,1	2,1	2,0

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - mošt djelomično bistren standardnom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije, BKDUP17 – mošt bistren dvostrukom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije.

Između vina BK17 i BKDUP17 tretmana nakon fermentacije (F) je statistički značajna razlika utvrđena samo po pitanju intenziteta osjeta *kiselosti*, koji je ocijenjen izraženijim u vinu BK17 tretmana (Tablica 40). Gotovo sva svojstva mirisa bila su značajno slabije izražena u kontrolnom vinu K17 nego u vinima BK17 i BKDUP17 tretmana. Vino kontrolnog tretmana K17 okarakterizirano je nižim intenzitetima *kiselosti* i *viskoziteta* u odnosu na vino BK17 te nižim intenzitetom osjeta *tijela / punoće* u odnosu na vino BKDUP17 tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B) sniženi su intenziteti pozitivnih senzorskih svojstava u vinima BK17 i BKDUP17 tretmana, kao što su *cvjetni*, *voćni*, *sovinjonski* i *muškatni* mirisi te mirisi koji podsjećaju na med i na vosak, i to u većini slučajeva uz statističku značajnost (Tablica 40). Slično je utvrđeno i za pojedina okusna svojstva. Spomenute promjene uzrokovale su pojavu razlika u intenzitetima pojedinih svojstava mirisa između vina BK17 i BKDUP17 tretmana, gdje je BK17 vino opisano višim intenzitetima, te su umanjile razlike u intenzitetima svojstava okusa između sva tri uspoređivana vina.

Tablica 41. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova i test nizanja) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

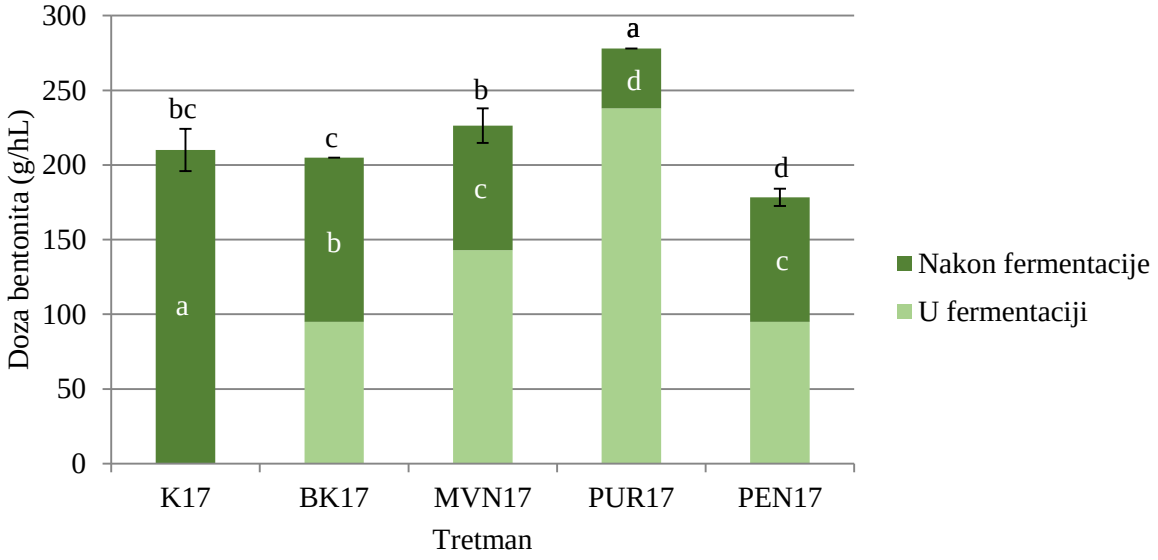
	Uzorkovanje	Tretman		
		K17	BK17	BKDUP17
Bodovi	F	80,9 b	84,9 a*	85,6 a*
	B	81,3 b	82,9 a	81,7 b
Poredak	F	3	2	1
	B	3	1	2

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - mošt djelomično bistren standardnom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije, BKDUP17 – mošt bistren dvostrukom dozom bentonita u završnoj fazi fermentacije.

Vina BK17 i BKDUP17 tretmana se nakon fermentacije (F) nisu statistički značajno razlikovala na osnovi broja bodova, ali im je dodijeljen značajno veći broj bodova nego vinu kontrolnog tretmana K17 (Tablica 41). Nakon dodatnog bistrenja (B) vina BK17 i BKDUP17 ocijenjena su značajno manjim brojem bodova u odnosu na vina istih tretmana nakon fermentacije (F), ali je vino BK17 ocijenjeno najvećim brojem bodova, dok se broj bodova dodijeljen vinima kontrolnog K17 i BKDUP17 tretmana nije razlikovao. Za razliku od situacije nakon fermentacije (F), nakon dodatnog bistrenja (B) najviše preferirano vino bilo je ono BK17 tretmana. Vino kontrolnog tretmana K17 bilo je najmanje preferirano i nakon fermentacije (F) i nakon dodatnog bistrenja (B).

4.7. Učinak primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji

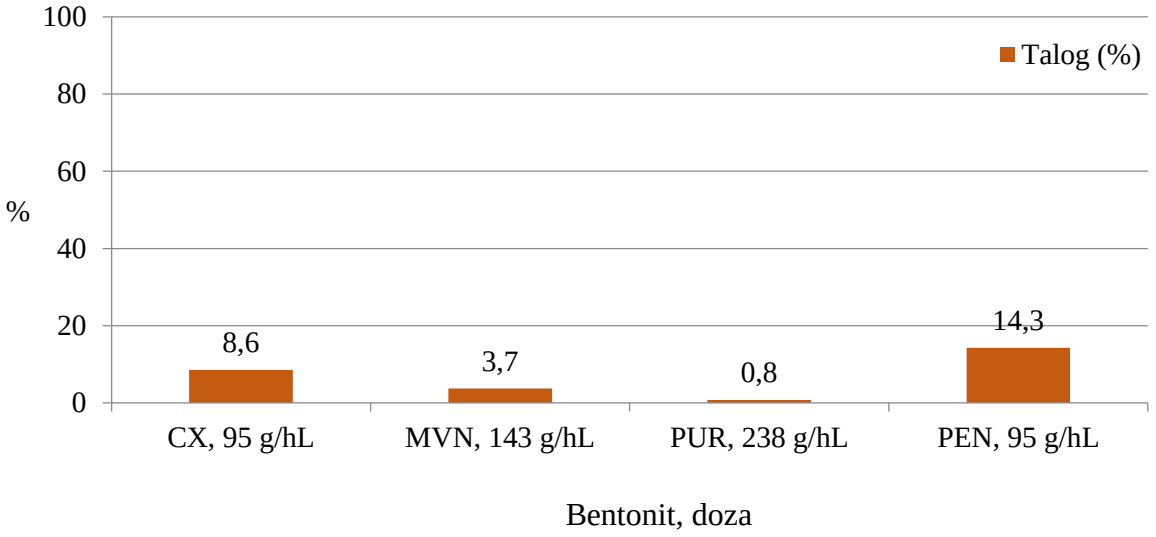
4.7.1. Doza bentonita



Slika 12. Doze bentonita primijenjene u pet tretmana proizvodnje vina berbe 2017.
Svjetlije obojen dio stupca predstavlja dozu primijenjenu u fermentaciji (različiti bentoniti), a tamnije obojen dio stupca predstavlja dodatnu dozu primijenjenu nakon fermentacije (bentonit CX u svim tretmanima). Različita mala slova unutar stupaca predstavljaju statistički značajne razlike među tretmanima pri razini značajnosti $p < 0,05$ (univarijantna ANOVA i LSD test) utvrđene s obzirom na dodatne doze nakon fermentacije određene standardnim testom proteinske stabilnosti zagrijavanjem (tamniji dijelovi stupaca, bijela slova) te s obzirom na ukupne doze bentonita primijenjene u tretmanima (slova iznad stupaca). Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije standardnim bentonitom CX, MVN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom MVN, PUR17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom PUR, PEN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom PEN.

Nakon primjene različitih doza različitih tipova bentonita u fermentaciji koje su se pokazale ekvivalentnima u bistrenju mošta prije fermentacije, utvrđeno je da je najnižu dodatnu dozu standardnog bentonita CX za postizanje proteinske stabilnosti bilo potrebno primijeniti u tretmanu bistrenja bentonitom PUR (PUR17; 40 g/hL) (Slika 12). Tretmani u kojima su primjenjivani MVN (MVN17) i PEN (PEN17) bentoniti trebali su dvostruko višu dodatnu dozu standardnog bentonita (83 g/hL) i po tome su se značajno razlikovali od PUR17 tretmana, ali i od BK17 tretmana u kojem je dodatna potrebna doza standardnog bentonita bila viša nego u ostalim tretmanima bistrenja u fermentaciji (110 g/hL). Najviša ukupna doza bentonita (zbrojene doze dva različita bentonita, osim u slučaju BK17 tretmana gdje je korišten jednak bentonit) bila je potrebna u PUR17 tretmanu (278 g/hL), a najniža u PEN17 tretmanu (178 g/hL). Ti su se tretmani na osnovi potrebne doze značajno razlikovali od

MVN17, BK17 i kontrolnog tretmana, K17, u kojima su ukupne potrebne doze bile 226 g/hL, 205 g/hL i 210 g/hL. Potrebna doza u MVN17 tretmanu bila je značajno veća od potrebne doze u BK17 tretmanu.



Slika 13. Udio taloga (%) nakon tretiranja mošta dozom od 95 g/hL CX bentonita i ekvivalentnim dozama ostalih bentonita prema preliminarnom određivanju stabilnosti mošta
Skraćenice: CX – bentonit CX Special Grain, MVN – bentonit Mastervin Compact, PUR – bentonit SIHA Puranit, PEN – bentonit Pentagel.

Probama bistrenja mošta kultivara malvazija istarska u laboratorijskim uvjetima preliminarno su određene doze različitih bentonita za postizanje proteinske stabilnosti. Na temelju najmanjih testiranih doza kojima se postigla proteinska stabilnost mošta postavljen je omjer jednako učinkovitih doza različitih bentonita, CX : MVN : PUR : PEN = 1 : 1,5 : 2,5 : 1. Prema tom omjeru i prema već primjenjivanoj dozi bentonita CX u 2016. godini (95 g/hL) izračunate su vrijednosti doza za primjenu u tretmanima bistrenja ostalim bentonitima tijekom fermentacije u 2017. godini: 143 g/hL bentonita MVN, 238 g/hL bentonita PUR i 95g/hL bentonita PEN.

U preliminarnom određivanju doza različitih bentonita potrebnih za postizanje proteinske stabilnosti mošta kultivara malvazija istarska u laboratorijskim uvjetima uvrđeni su i postoci taloga od ukupnog volumena suspenzije nakon tretiranja mošta određenom dozom (primijenjenom u fermentaciji) i spontanog taloženja (Slika 13). Najmanji udio taloga utvrđen je za tretman bentonitom PUR, nešto veći za MVN, još veći za CX, dok je najveći udio taloga utvrđen za bentonit PEN.

4.7.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri

Tablica 42. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman				
		K17	BK17	MVN17	PUR17	PEN17
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9905	0,9905	0,9902	0,9903	0,9904
	B	0,9906	0,9906	0,9904	0,9904	0,9905
Alkohol (vol. %)	F	13,41 b*	13,42 b*	13,56 a*	13,51 a*	13,52 a*
	B	13,18	13,24	13,23	13,27	13,20
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	20,7	20,7	20,5*	20,3	20,8*
	B	20,2	20,3	19,8	19,9	20,0
Reducirajući šećeri (g/L)	F	3,0 b	3,5 ab	3,2 ab	3,1 ab	3,6 a
	B	2,9 b	3,4 ab	3,1 ab	3,1 ab	3,6 a
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	17,8	17,2	17,3 *	17,2	17,1 *
	B	17,3 a	16,9 ab	16,7 ab	16,8 ab	16,4 b
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,5 a*	5,4 b	5,4 b*	5,3 c	5,2 d
	B	5,3 a	5,3 a	5,2 b	5,2 b	5,1 c
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,43	0,36	0,40	0,40	0,42
	B	0,54 a*	0,43 b*	0,39 bc	0,51 a	0,49 ab
pH	F	3,22 b	3,23 a*	3,23 a*	3,21 c*	3,23 a
	B	3,21 a	3,14 c	3,18 b	3,18 b	3,23 a

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije standardnim bentonitom, CX Special Grain, MVN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom Mastervin Compact, PUR17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom SIHA Puranit, PEN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom Pentagel.

Nakon fermentacije (F) vina MVN17, PUR17 i PEN17 tretmana imala su značajno više (međusobno ne značajno različite) volumne udjele alkohola u odnosu na vina BK17 i kontrolnog tretmana K17 (Tablica 42). Najviša koncentracija ukupne kisleosti pronađena je upravo u kontrolnom vinu K17, najniža u vinu PEN17, dok su vina BK17 i MVN17 sadržavala više koncentracije nego vino PUR17 tretmana. Vina BK17, MVN17 i PEN17 tretmana imala su viši pH od ostalih vina, dok je najniža pH vrijednost izmjerena u vinu PUR17 tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B) značajno se snizio volumni udio alkohola u svim vinima, a u pojedinim slučajevima i koncentracije ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera i ukupne kiselosti te pH vrijednost (Tablica 42). Vino kontrolnog tretmana K17 sadržavalo je višu koncentraciju ukupnog suhog ekstrakta bez reducirajućih šećera nego vino PEN17 tretmana. Odnosi ukupne kiselosti su nakon dodatnog bistrenja (B) ostali slični kao i nakon fermentacije

(F) iako s nešto manjim razlikama između vina različitih tretmana. Koncentracija hlapljive kiselosti bila je najviša u vinima kontrolnog K17 i PUR17 tretmana i značajno različita u odnosu na onu utvrđenu u vinima BK17 i MVN17 tretmana. Najviša pH vrijednost nakon dodatnog bistrenja izmjerena je u vinima kontrolnog K17 i PEN17 tretmana, a najniža u vinu BK17 tretmana.

4.7.3. Fenolni spojevi

Tablica 43. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja različitim bentonitima u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman				
		K17	BK17	MVN17	PUR17	PEN17
Hidroksibenzojeve kiseline						
galna kiselina	F	0,522	0,559	0,617	0,616	0,652
	B	0,577	0,711	0,653	0,624	0,681
protokatehinska kiselina	F	3,331	3,201	3,212	3,204	3,189
	B	3,237 a	3,190 a	3,136 ab	3,087 b	3,146 ab
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,252 a*	0,259 a*	0,226 b	0,230 b	0,230 b
	B	0,226	0,232	0,229	0,222	0,232
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,051 a	0,044 b	0,045 b*	0,040 bc	0,037 c
	B	0,043 a	0,039 ab	0,034 b	0,034 b	0,037 ab
siringinska kiselina	F	0,187 c	0,237 b	0,239 b	0,278 a	0,232 b
	B	0,219 d*	0,252 b	0,242 bc	0,266 a	0,237 c
Hidroksicimetne kiseline						
cis-kaftarna kiselina^{S}	F	0,920 *	0,882 *	0,909 *	0,887 *	0,892 *
	B	0,594 ab	0,624 a	0,600 ab	0,549 b	0,591 ab
trans-kaftarna kiselina	F	9,323	9,483	10,344	10,616	10,381
	B	9,259 b	11,270 a	11,305 a	10,823 a	11,289 a
cis-kutarna kiselina^{S}	F	0,857	0,829	0,858	0,863	0,855
	B	0,784	0,831	0,821	0,791	0,817
trans-kutarna kiselina^{S}	F	0,737 c	0,807 bc	0,873 ab	0,915 a	0,884 ab
	B	0,689 b	0,896 a	0,915 a	0,939 a	0,927 a
kafeinska kiselina	F	0,314	0,185	0,195	0,235	0,193
	B	0,265	0,247 *	0,233	0,249	0,220
cis-fertarna kiselina^{S}	F	0,364 *	0,358 *	0,354 *	0,351 *	0,358 *
	B	0,265 a	0,267 a	0,258 a	0,238 b	0,258 a
trans-fertarna kiselina^{S}	F	1,672	1,695	1,754	1,774	1,755
	B	1,763 b	1,947 a*	1,941 a*	1,879 ab	1,933 a*
p-kumarna kiselina	F	0,155 a	0,079 b	0,078 b	0,077 b	0,074 b
	B	0,163 a	0,115 b*	0,120 b*	0,100 b*	0,100 b*
ferulinska kiselina	F	0,529 a	0,368 b	0,348 b	0,367 b	0,337 b
	B	0,457 a	0,399 b	0,353 c	0,354 c	0,333 c

Flavan-3-oli						
katehin + tirosol (kao katehin)	F	15,085 a	13,959 b	14,011 b	13,681 b	14,027 b
	B	14,688 a	13,877 b	13,891 b	13,644 b	13,950 b
epikatehin	F	3,202	3,292	3,311 *	3,430 *	3,305 *
	B	2,972 b	3,100 a	3,039 ab	3,034 ab	3,056 ab
procijanidin B1	F	0,436	0,371	0,393	0,477	0,423
	B	0,361 b	0,481 ab	0,423 ab	0,399 ab	0,503 a
procijanidin B2	F	0,448	0,478 *	0,467	0,488	0,465
	B	0,451 a	0,455 a	0,453 a	0,414 b	0,473 a
Ostali						
taksifolin	F	0,075	0,068	0,073	0,081	0,079
	B	0,063 c	0,077 a	0,074 ab	0,065 bc	0,074 ab
trans-piceid	F	0,046	0,044	0,049	0,053	0,048
	B	0,041 b	0,052 a	0,053 a	0,055 a	0,052 a
Ukupni fenoli[‡]	F	129,152 a*	114,818 bc	113,515 bc	110,485 c	118,000 b
	B	122,818 a	115,152 ab	117,394 ab	106,909 b	111,545 ab

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije standardnim bentonitom, CX Special Grain, MVN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom Mastervin Compact, PUR17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom SIHA Puranit, PEN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom Pentagel.

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

Nakon fermentacije (F) utvrđeno je da su tretmani MVN17, PUR17 i PEN17 imali negativan utjecaj na koncentraciju *p*-hidroksibenzojeve kiseline u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 43). Tretman PEN17 imao je najznačajniji negativan utjecaj na koncentraciju 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline, posebno u odnosu na tretmane BK17 i MVN17. Siringinska kiselina pronađena je u najnižoj koncentraciji u vinu kontrolnog tretmana K17, a najviša koncentracija zabilježena je u vinu PUR17 tretmana. Od hidroksicinamoiltartarata, utvrđene su razlike samo za koncentraciju *trans*-kutarne kiseline, pri čemu su tretmani koji su uključivali bistrenje bentonitom tijekom fermentacije imali pozitivan učinak, najveći u slučaju tretmana PUR17. Većina slobodnih hidroksicimetnih kiselina pronađena je u višim koncentracijama u vinu kontrolnog tretmana K17. Tretmani bistrenja različitim bentonitima podjednako su umanjili koncentraciju katehina s tirosolom u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17. Svi tretmani bistrenja s različitim tipovima bentonita značajno su umanjili koncentraciju ukupnih fenola u odnosu na kontrolni tretman K17. Niža koncentracija ukupnih fenola pronađena je u vinu PUR17 u odnosu na vino PEN17 tretmana.

Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđeno je sniženje koncentracija *cis*-kaftarne i *cis*-fertarne kiseline u vinima svih tretmana, dok su pojedini tretmani rezultirali povišenjem koncentracija

trans-fertarne i *p*-kumarne kiseline (Tablica 43). Za pojedine spojeve nisu potvrđene statistički značajne razlike utvrđene nakon fermentacije (F), međutim u puno je više slučajeva dodatno bistrenje (B) uzrokovalo pojavu novih razlika između vina različitih tretmana. Vrijedi istaknuti najniže koncentracije većine hidroksicinamoiltartarata u vinu kontrolnog tretmana K17, osim u slučaju *cis*-fertarne kiseline koje je bilo najmanje u vinu PUR17 tretmana. Kontrolno vino K17 i dalje je sadržavalo najviše većine koncentracije slobodnih hidroksicimetnih kiselina. Značajne razlike pojavile su se i u slučaju flavan-3-ola, pa je tako najvišu koncentraciju katehina s tirosolom sadržavalo vino K17 kontrolnog tretmana, dok je najmanje procijanidina B2 pronađeno u vinu PUR17 tretmana. Vino kontrolnog tretmana K17 imalo je i najnižu koncentraciju ostalih fenola taksifolina i *trans*-piceida. Koncentracije ukupnih fenola nisu se značajno promijenile nakon dodatnog bistrenja, osim u kontrolnom tretmanu K17, tako da je jedina značajna razlika uočena između vina kontrolnog tretmana K17 i vina tretmana PUR 17.

4.7.4. Hlapljivi spojevi arome

Tablica 44. Koncentracije hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja različitim bentonitima u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Hlapljivi spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman				
		K17	BK17	MVN17	PUR17	PEN17
Monoterpeni						
β-pinen^{S}	F	6,387 a	4,587 b	5,059 b	5,187 ab	4,279 b
	B	8,755 a*	7,935 a*	8,820 a*	6,660 b	5,982 b*
D-limonen^{S}	F	3,676	2,696	3,533	3,066	3,049
	B	4,071 bc	5,590 ab*	6,098 a*	4,153 bc	3,530 c
3-karen^{S}	F	0,572 a	0,377 b	0,360 b	0,457 ab	0,408 b
	B	0,712 ab*	0,697 bc*	0,782 a*	0,627 cd*	0,576 d*
linalol	F	22,081 c	28,445 a*	24,779 b	26,734 ab*	27,905 a
	B	21,485 b	24,310 a	23,975 a	23,704 a	25,028 a
α-terpineol	F	16,156 ab	14,123 ab	8,071 c	11,259 bc	16,749 a
	B	19,495 *	20,753 *	22,227*	18,194	18,572
citronelol	F	8,322 b	9,956 a*	7,872 b	9,017 ab*	8,401 b
	B	7,341	8,375	8,356	7,481	7,714
nerol	F	8,527 b	13,174 b*	9,034 b	11,155 b*	30,394 a*
	B	7,091	7,922	8,273	7,519	6,205
geraniol	F	7,119 b	17,000 a*	7,276 b	9,888 b	5,980 b
	B	8,961 a	7,944 a	7,339 a	3,803 b	3,525 b
C_{13}-norizoprenoid						
β-damaskenon	F	1,693 *	1,865 *	1,699 *	1,931 *	1,926 *
	B	1,048 b	1,222 ab	1,320 a	1,025 b	1,158 ab
Viši alkoholi						
1-heksanol (mg/L)	F	1,388 a	1,363 a	1,203 b	1,284 ab	1,312 a*
	B	1,399 a	1,306 ab	1,218 bc	1,306 ab	1,183 c
cis-3-heksenol	F	68,013	67,025	73,123 *	76,708 *	76,420
	B	57,234 c	72,686 a*	63,010 bc	59,407 c	67,870 ab
2-feniletanol (mg/L)	F	25,845	25,619	23,854	25,081	25,720
	B	24,806 ab	25,278 ab	27,329 a*	22,710 b	26,084 ab
Masne kiseline						
butanska kiselina	F	89,963 ab	75,951 bc	70,324 c	95,326 a	84,949 abc
	B	85,119	87,818	82,278	75,121	82,650
heksanska kiselina (mg/L)	F	5,675 ab	5,700 ab	5,213 b	5,996 a	5,845 a
	B	5,331 b	5,977 a	5,716 ab*	5,792 ab	5,852 a
oktanska kiselina (mg/L)	F	7,888 c	9,256 ab	8,573 bc	9,379 ab	9,588 a
	B	8,000 c	9,143 b	10,421 a*	8,461 bc	9,300 b
dekanska kiselina (mg/L)	F	4,084 c	4,418 bc	4,386 bc	5,199 a	4,983 ab
	B	4,617 c	5,592 b*	6,474 a*	4,888 bc	5,660 ab
Etil-esteri						
etil-izobutanoat	F	2,545 a	2,279 ab	2,501 a	2,066 b	2,257 ab

	B	2,867 ab	2,888 ab*	2,837 ab	3,082 a*	2,376 b
etil-butanoat (mg/L)	F	0,361 c	0,380 bc	0,417 ab	0,414 ab	0,439 a*
	B	0,366	0,372	0,397	0,417	0,386
etil-2-metilbutanoat	F	4,869	4,278	6,210	4,078	4,635
	B	7,395 a	6,707 ab*	6,109 ab	6,116 ab*	4,840 b
etil-3-metilbutanoat	F	17,334	14,641	14,385	15,097	15,846
	B	22,623 a	20,68 ab*	19,714 ab*	21,616 ab*	18,324 b
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,774 c	0,819 bc	0,857 abc	0,913 ab	0,973 a
	B	0,748	0,824	0,863	0,762	0,834
etil-heptanoat[S]	F	31,079	31,525	30,742	29,745	30,954
	B	30,480 c	34,646 a*	32,332 bc*	31,198 bc	32,851 ab
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,541 c	0,564 bc	0,666 a	0,616 ab*	0,642 a
	B	0,535 b	0,593 b	0,742 a	0,484 b	0,577 b
etil-nonanoat[S]	F	8,068 bc	6,187 c	15,413 a*	11,857 ab	7,625 bc
	B	9,473	6,387	6,599	6,509	8,720
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,350	0,321	0,327	0,290	0,355
	B	0,322	0,387	0,414 *	0,356	0,351
Acetatni esteri						
izobutil-acetat	F	12,230 bc	10,948 c*	13,632 ab	13,471 ab	15,418 a
	B	10,942	10,356	12,228	12,222	12,043
izoamil-acetat (mg/L)	F	2,943 c	3,173 bc	4,062 a	3,737 ab	4,218 a
	B	2,811 b	3,376 ab	3,878 a	3,673 a	3,914 a
heksil-acetat (mg/L)	F	0,190 b	0,211 b	0,274 a	0,263 a	0,294 a
	B	0,210 b	0,239 ab	0,289 a	0,262 ab	0,290 a
cis-4-heksenil-acetat[S] (mg/L)	F	0,058 c	0,071 bc	0,100 a	0,091 ab	0,117 a
	B	0,061 b	0,072 ab	0,099 a	0,089 ab	0,105 a
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	2,623 c	2,875 c	3,859 ab	3,640 b	4,448 a
	B	2,198 d	2,705 cd	4,029 ab	3,329 bc	4,129 a
Ostali esteri						
izoamil-izobutanoat[S]	F	12,672 b	14,300 ab	16,133 a	13,231 b	17,049 a
	B	17,682 *	19,474 *	20,488	20,478	25,113
dietil-sukcinat (mg/L)	F	0,570 a	0,536 a	0,459 b	0,520 ab	0,455 b
	B	0,757	0,781 *	0,854 *	0,753 *	0,724 *
Hlapljivi fenoli						
4-vinilgvajakol[S]	F	23,814 b	29,853 ab*	32,739 ab	36,299 a*	34,688 a
	B	15,356 c	23,599 b	33,382 a	25,738 ab	28,746 ab
4-vinilfenol[S]	F	1,111 c	1,788 a*	1,323 bc	1,631 ab*	1,468 abc
	B	0,745 c	0,983 bc	1,404 a	1,075 b	1,123 ab

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije standardnim bentonitom, CX Special Grain, MVN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom Mastervin Compact, PUR17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom SIHA Puranit, PEN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom Pentagel.

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti spojeva slične kemijske strukture uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

Nakon fermentacije (F) vino kontrolnog tretmana K17 sadržavalo je više koncentracije β-pinena i 3-karena (Tablica 44). Od najvažnijih monoterpenola, linalol je pronađen u najnižoj koncentraciji u vinu K17, dok su vina BK17 i PEN17 tretmana sadržavala više koncentracije nego vino MVN17 tretmana. Najviše citronelola i geraniola pronađeno je u vinu BK17, a α-terpineola i nerola u vinu PEN17 tretmana. Nešto niža koncentracija 1-heksanola u odnosu na većinu ostalih vina pronađena je u vinu MVN17 tretmana. Više koncentracije većine masnih kiselina pronađene su uglavnom u vinima PUR17 i PEN17 tretmana, a najniže uglavnom u vinima kontrolnog K17 i BK17 tretmana, uz iznimke za koje nije potvrđena statistički značajna razlika. Najviše koncentracije većine ravnolančanih etil-estera pronađene su u vinu PEN17 tretmana, iako u rijetkim slučajevima uz statistički značajnu razliku u odnosu na koncentracije pronađene u vinima MVN17 i PUR17 tretmana. U vinu BK17 i posebno u vinu kontrolnog tretmana K17 pronađene su uglavnom niže koncentracije. Slično je utvrđeno i za većinu acetatnih estera. Od ostalih estera, izoamil-izobutanoata je pronađeno više u vinima MVN17 i PEN17 u odnosu na vina K17 i PUR17 tretmana, dok je dietil-sukcinat pronađen u višoj koncentraciji u vinima K17 i BK17 u odnosu na vina MVN17 i PEN17 tretmana. Hlapljivi fenoli pronađeni su u najnižoj koncentraciji u vinu kontrolnog tretmana K17.

Nakon dodatnog bistrenja (B) značajno su porasle koncentracije β-pinena, D-limonena, 3-karena i α-terpineola u vinima većine tretmana, dok su u vinima pojedinih tretmana snižene koncentracije pojedinih glavnih monoterpenola (Tablica 44). Izraženo je snižena koncentracija β-damaskenona u vinima svih tretmana. U vinu MVN17 tretmana porasla je koncentracija većine masnih kiselina srednjeg lanca, kao i koncentracije pojedinih etilnih estera. Koncentracija dietil-sukcinata porasla je u vinima većine tretmana, slično je utvrđeno i za izoamil-izobutanoat, dok su koncentracije hlapljivih fenola snižene, ali samo u pojedinim slučajevima uz statističku značajnost. Nakon dodatnog bistrenja (B) vino PEN17 tretmana isticalo se značajno nižim koncentracijama pojedinih monoterpena, uglavnom uz statistički značajnu razliku. Vino MVN17 imalo je najvišu koncentraciju D-limonena i 3-karena. Najniža koncentracija linalola pronađena je u vinu kontrolnog tretmana K17. Geraniola je pronađeno manje u vinima PUR17 i PEN17 u odnosu na vina ostalih tretmana. Vina MVN17 i PEN17 sadržavala su značajno nižu koncentraciju 1-heksanola u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17. Viša koncentracija *cis*-3-heksenola pronađena je u vinima BK17 i PEN17 u odnosu na vina K17 i PUR17 tretmana, a 2-feniletanola je bilo više u vinu MVN17 u odnosu na vino PUR17 tretmana. Masne kiseline su u većini slučajeva u najnižoj koncentraciji

pronađene u vinu kontrolnog tretmana K17. Esteri razgranatog lanca, etil-2- i etil-3-metilbutanoat, pronađeni su u višoj koncentriji u vinu kontrolnog K17 u odnosu na vino PEN17 tretmana. Dodatno bistrenje (B) ujednačilo je koncentracije ostalih etil-estera u vinima različitih tretmana te uglavnom nisu pronađene značajne razlike među njima. Većina acetatnih estera pronađena je nižoj koncentraciji u vinu kontrolnog tretmana K17 nego u vinima MVN17 i PEN17, a za manji broj slučajeva i nego u vinu PUR17 tretmana. Hlapljivi fenoli i dalje su se u vinu kontrolnog tretmana K17 nalazili u koncentraciji nižoj od onih pronađenih u vinima većine ostalih tretmana.

4.7.5. Senzorska svojstva

Tablica 45. Rezultati kvantitativne deskriptivne analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja različitim bentonitima u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman				
		K17	BK17	MVN17	PUR17	PEN17
Svojstva mirisa						
cvjetni	F	5,5 c*	6,5 ab*	7,0 a	6,3 b	6,3 b
	B	5,1 d	5,8 c	6,8 a	5,7 c	6,2 b
voćni	F	5,8 c	6,7 b	7,7 a	6,8 b*	7,1 b*
	B	6,0 d	6,3 c	7,4 a	5,9 d	6,8 b
biljni	F	1,9 c	2,1 bc	2,6 a	2,1 bc	2,4 ab
	B	2,0 ab	2,0 ab	2,5 a	1,8 b	2,5 a
začinski / aromatično bilje	F	1,2 c	2,1 b	2,5 ab	2,3 ab	2,8 a
	B	1,3 b	2,0 ab	2,8 a	2,1 ab	2,7 a
sovinjonski	F	2,8 c	3,4 bc	4,5 a	3,4 bc	3,8 ab
	B	2,7 c	3,0 bc	3,8 a	2,7 c	3,4 ab
muškatni	F	3,0 c	3,4 b	4,0 a	3,6 b*	3,7 ab
	B	3,2 c	3,5 b	3,9 a	3,2 c	3,9 a*
med	F	1,7 c	3,1 b*	4,2 a*	2,8 b	3,3 b
	B	1,5 c	2,1 b	3,0 a	1,8 bc	3,1 a
vosak	F	0,9 c	2,1 b*	2,8 a*	1,9 b*	2,3 ab
	B	0,4 b	0,8 b	1,9 a	0,5 b	2,0 a
Svojstva okusa						
svježina	F	7,0 c	7,0 c	7,5 a	7,2 bc*	7,3 ab*
	B	6,6 c	7,0 b	7,3 a	6,7 c	7,0 b
kiselost	F	5,3 b	5,5 a	5,4 ab	5,4 ab	5,3 ab
	B	5,5 ab	6,0 a*	5,5 ab	5,5 ab	5,4 b
tijelo / punoća	F	6,4 d	6,9 c*	8,0 a	7,0 c*	7,5 b*
	B	6,1 cd	6,3 bc	7,5 a	5,9 d	6,6 b
slatkoća	F	5,1 c	5,6 bc	6,3 a	5,5 bc	5,9 ab*

	B	5,1 b	5,0 b	6,0 a	5,4 b	5,4 b
viskozitet	F	6,2 c	6,6 bc*	7,3 a	6,7 bc*	7,0 ab*
	B	5,9 c	5,8 c	6,8 a	5,6 c	6,4 b
gorčina	F	2,4 a	2,1 b	2,0 b	2,0 b	2,1 b
	B	2,4	2,3	2,4 *	2,3 *	2,1
astringentnost	F	2,0	2,0	2,0	2,0	2,1
	B	2,1	2,1	2,1	2,1	2,0

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije standardnim bentonitom, CX Special Grain, MVN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom Mastervin Compact, PUR17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom SIHA Puranit, PEN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom Pentagel.

Nakon fermentacije (F) najvišim intenzitetima velike većine svojstava mirisa opisano je vino MVN17 tretmana i to uz statistički značajne razlike u odnosu na vina BK17 i PUR17 tremana u mnogim, a u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 u svim slučajevima (Tablica 45). Vino PEN17 uglavnom se nije razlikovalo od vina MVN17 tretmana. Slično je utvrđeno i za svojstva okusa, osim za svojstvo *gorčine* koje je bilo intenzivnije u vinu kontrolnog tretmana K17.

Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđeni su slični odnosi između intenziteta različitih svojstava u vinima različitih tretmana. Značajnije su bile izražene razlike između vina PUR17 tretmana i vina bistrenih drugim tipovima bentonita tijekom fermentacije, što je za posljedicu imalo nestanak većine razlika između vina PUR17 i vina kontrolnog tretmana K17 koja su opisana uglavnom najnižim intenzitetima (Tablica 45).

Tablica 46. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova i test nizanja) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja različitim bentonitima u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B)

	Uzorkovanje	Tretman				
		K17	BK17	MVN17	PUR17	PEN17
Bodovi	F	80,9 c	84,9 b*	89,1 a	84,8 b*	86,2 b
	B	81,3 d	82,9 c	87,2 a	81,8 d	85,3 b
Poredak	F	5	3	1	4	2
	B	5	3	1	4	2

Skraćenice: K17 - kontrolni tretman, bentonit nije primijenjen u fermentaciji, BK17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije standardnim bentonitom CX Special Grain, MVN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom Mastervin Compact, PUR17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom SIHA Puranit, PEN17 - djelomično bistren mošt u završnoj fazi fermentacije bentonitom Pentagel.

Sva vina bistrena različitim bentonitima u fermentaciji su nakon fermentacije (F) ocijenjena većim brojem bodova nego vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 46). Najbolje je ocijenjeno

vino tretmana MVN17 koje je bilo i najviše preferirano. Potpuno stabilna vina (B) BK17 i PUR17 tretmana bila su ocijenjena nižim ocjenama u odnosu na ocjene djelomično bistrenih vina istih tretmana nakon fermentacije (F), tako da su razlike između pojedinih vina postale izraženije, dok neke razlike utvrđene nakon fermentacije (F) nakon dodatnog bistrenja (B) više nisu bile značajne. Vino MVN17 tretmana ponovno je ocijenjeno najvišom prosječnom ocjenom te je bilo najviše preferirano, nešto manji broj bodova zaslužilo je vino PEN17, nakon njega BK17, dok su najmanjim brojem bodova ocijenjena vina K17 i PUR17 tretmana koja se nisu značajno razlikovala. Vino kontrolnog tretmana K17 bilo je najmanje preferirano od ocjenjivača.

5. RASPRAVA

5.1. Proteinska stabilnost vina

Usporedbom rezultata testiranja proteinske stabilnosti vina za određivanje potrebnih doza bentonita, test zagrijavanjem s taninom pretežno je rezultirao višim vrijednostima zamućenja, pa su, prema tome, doze potrebne za postizanje potpune stabilnosti određene tim testom bile više nego doze određene standardnim testom zagrijavanjem (Slike 5 – 9). Navedeno je u skladu s očekivanjima prema informacijama iz literature (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). U ranijim istraživanjima pokazano je da mnogi čimbenici u vinu (pH, ukupna koncentracija proteina, koncentracija iona željeza, kalija i bakra, itd.) utječu na rezultate testa s taninom pa on stoga nije preporučljiv za određivanje konačne doze bentonita (Sarmento i sur., 2000). Standardni test zagrijavanjem prepoznat je kao pouzdaniji i prikladniji i najviše je u praktičnoj primjeni. U primjeni je više protokola s različitim temperaturama i trajanjem zagrijavanja uzorka tijekom testiranja proteinske stabilnosti (Cosme i sur., 2020). Pocock i Waters (2006) preporučili su grijanje na 80 °C tijekom 2 sata, iako su utvrdili da u pojedinim slučajevima već i to vrijeme može dovesti do procjene više doze od potrebne. McRae i sur. (2018) utvrdili su da se pouzdani i ponovljivi rezultati mogu dobiti grijanjem na temperaturi od 80 °C tijekom 2 sata i zatim hlađenjem na 20 °C tijekom 3 sata, čime se skraćuje uobičajena procedura od 6 sati česta u australskoj vinarskoj industriji. U ovom istraživanju, doza bentonita potrebna za dodatno bistrenje nakon fermentacije redovito je procjenjivana na osnovi standardnog testa zagrijavanjem kako bi se izbjeglo tzv. prebistrenje, odnosno primjena doza bentonita viših od potrebnih za postizanje proteinske stabilizacije. Rezultati dvaju primijenjenih testova stabilnosti pozitivno su korelirali (Slike 5 – 9). Uočena sniženja ukupno potrebnih doza bentonita kao posljedica bistrenja tijekom fermentacije bila su uglavnom niža, sudeći prema standardnom testu zagrijavanjem u odnosu na test s taninom u prvoj godini istraživanja, dok je u drugoj godini istraživanja u pojedinim slučajevima utvrđeno i obrnuto (Prilog 4).

5.1.1. Utjecaj trenutka primjene bentonita u fermentaciji

Istraživanjem učinka trenutka primjene bentonita utvrđeno je da je u prve dvije godine istraživanja primjenom tretmana bistrenja u fermentaciji postignuto značajno smanjenje ukupne potrebne količine bentonita u odnosu na kontrolni tretman (Prilog 4). Navedenu

potencijalnu prednost ovakve nestandardne primjene bentonita utvrdili su još u osamdesetim godinama prošlog stoljeća Ewart i sur. (1980) istraživanjem provedenim s kultivarom *riesling* i to bistrenjem mošta i ostavljanjem bentonita u moštu tijekom fermentacije. Tridesetak godina kasnije određeni broj istraživanja potvrdio je mogućnost učinkovitijeg bistrenja bentonitom primjenom pred kraj fermentacije, što je potvrđeno i u ovom radu. Lambri i sur. (2012b) su istraživanjem s kultivarom *chambave muscat* utvrdili da postoji mogućnost smanjenja ukupne potrebne doze bentonita primjenom u moštu uz uklanjanje bentonita iz mošta prije početka fermentacije, za razliku od primjene nakon fermentacije ili dvostruke, kombinirane primjene (prije pa nakon fermentacije). Pocock i sur. (2011) su slično istraživanje proveli s kultivarima grožđa *sauvignon blanc*, *semillon* i *riesling*. Usporedbom tretmana bistrenja mošta prva dva spomenuta kultivara (pri čemu je bentonit također uklonjen prije fermentacije) te tretmana bistrenja u početnoj i završnoj fazi fermentacije utvrdili su da je primjena bentonita tijekom fermentacije učinkovitija. U istom istraživanju trenutak doziranja u fermentaciji nije se pokazao značajnim, a za bistrenje dodavanjem bentonita u mošt prije fermentacije bile su potrebne najviše doze. Istraživanjem primjene bistrenja u dvije faze potvrđen je pozitivan učinak bistrenja ranije tijekom fermentacije čime se postiglo smanjenje doze od 18 % za *sauvignon blanc* i 17 % za *riesling* u odnosu na bistrenje vina nakon fermentacije. Vela i sur. (2017) su bistrenjem mošta kultivara *sauvingnon blanc* u ranoj fazi fermentacije stabilan konačan proizvod dobili s 50, odnosno 33 % višom dozom (ovisno o godini berbe) u odnosu na bistrenje nakon završetka fermentacije. Tretman bistrenja mošta prije fermentacije u ovom istraživanju BGS15 pokazao se učinkovitijim od standardnog bistrenja vina nakon fermentacije u kontrolnom tretmanu K15, pri čemu je značajna razlika utvrđena između doza određenih pomoću testa s taninom (Slika 5). Takav rezultat nije bio u slaganju s rezultatima studije Pococoka i sur. (2011) gdje su slični tretmani prije fermentacije bili najmanje (*sauvignon blanc*) ili podjednako učinkoviti (*riesling*) kao i bistrenje vina nakon fermentacije. Rezultati Salazara i sur. (2017) u istraživanju s kultivarom *sauvignon blanc* potvrdili su rezultate Pococka i sur. (2011): i u tom su istraživanju utvrđene manje potrebe za bentonitom u slučaju bistrenja vina nakon fermentacije u odnosu na bistrenje mošta prije fermentacije. Na osnovi spomenutih neslaganja može se pretpostaviti da su razlike između kultivara ili ostalih čimbenika kao što su zemljopisno podrijetlo, godina berbe, klimatski uvjeti i slično, imale utjecaj i na razlike u proteinskom sastavu i na razlike u učinkovitosti različitih tretmana bentonitom. Lira i sur. (2015) postigli su izvrsne rezultate bistrenjem u fermentaciji pri proizvodnji vina kultivara *albariño*. U odnosu na standardno bistrenje, pojedini tretmani bistrenja tijekom fermentacije doveli su do smanjenja ukupne potrebne doze

bentonita za čak 43 %, dok se tretman bistrenja mošta prije fermentacije ponovno nije pokazao uspješnijim od kontrolnog tretmana. Osim toga, utvrdili su značajan utjecaj trenutka primjene bentonita tijekom fermentacije na učinkovitost bistrenja: najbolje rezultate dobili su tretmanima bentonitom u sredini i pred kraj trajanja fermentacije. S time su u suglasju i rezultati ovog istraživanja u pojedinim godinama: u proizvodnji vina iz berbe 2015. godine primjenom bentonita u sredini trajanja fermentacije u tretmanu BS15 i u posljednjoj trećini fermentacije u tretmanu BK15 postignuto je najučinkovitije sniženje ukupne doze od 14 i 16 %, odnosno 19 i 21 %, ovisno o primijenjenom testu stabilnosti (Prilog 4), što je u razini rezultata koje su postigli Pocock i sur. (2011) tretmanom bistrenja u ranijoj fazi fermentacije.

U drugoj godini istraživanja s vinima iz berbe 2016. godine također se istaknuo tretman primjene bentonita u posljednjoj trećini fermentacije BK16 koji je zahtijevao najnižu dozu i u odnosu na kontrolni tretman K16 i u odnosu na tretman s dodatkom bentonita u srednjem dijelu fermentacije BS16 (Slika 6). Tretman dodavanja bentonita u sredini trajanja fermentacije BS16 također je zahtijevao nižu ukupnu dozu u odnosu na kontrolni tretman K16 uz statistički značajnu razliku na osnovi standardnog testa zagrijavanjem te se pokazao nešto manje učinkovitim nego prve godine (6 %, Prilog 4). U trećoj godini istraživanja s vinima iz berbe 2017. godine tretman bistrenja u posljednjoj trećini fermentacije BK17 nije rezultirao značajnim smanjenjem ukupne doze bentonita kao prijašnjih godina, tj. nije se pokazao učinkovitijim u odnosu na kontrolni tretman K17 (Slika 10, Prilog 4). Između ostalog, pretpostavljena je mogućnost da su pedo-klimatski i ostali uvjeti te godine doveli do promjena u sastavu grožđa, odnosno mošta, a samim time i mošta u fermentaciji u odnosu na ranije godine, osobito sadržaja i sastava nestabilnih proteina, što je mogao biti ključan uzrok utvrđenog odstupanja.

Pretpostavljeno je da je sastav mošta, odnosno vina, koji je zasigurno varirao tijekom trajanja fermentacije i bio različit u njenim različitim fazama, imao značajan utjecaj na različitu učinkovitost bistrenja u odnosu na tretnutak primjene bentonita u fermentaciji utvrđenu u ovom istraživanju. Ranije se pokazalo da razni sastojci vina, poput određenih iona (Dordoni i sur., 2015a), tanina (Marangon i sur., 2010; Dordoni i sur., 2015b) i polisaharida (Gazzola i sur., 2012), značajno utječu na stabilnost i agregaciju proteina. Promjenjive količine drugih kationa u vinu koji su u kompeticiji s nestabilnim proteinima za adsorpciju na aktivna mjesta na bentonitu, poput iona alkalijskih i zemnoalkalijskih metala, aminokiselina, pojedinih peptida i drugih proteina, također su mogle imati određeni učinak, kao što su ranije pretpostavili Blade i Boulton (1988). Vrijednost pH vina ranije se pokazala važnim

čimbenikom koji određuje aktivnost bentonita, osobito u slučaju proteina srednjih i većih molekulskih masa, bilo izravno ili utjecanjem na razmjenu natrijevih i kalijevih iona između bentonita i vina (Dordoni i sur., 2015a). Čak i manje promjene pH, sastava iona metala, kao i njihova interakcija tijekom fermentacije, mogli su utjecati na razlike između učinkovitosti bentonita u različitim tretmanima tijekom fermentacije u ovom istraživanju. Ukupna količina proteina mošta smanjuje se tijekom fermentacije (Pocock i sur., 2011), tako da je moguće da je dio bentonita, u slučaju kada je primijenjen ranije (npr. u tretmanima BGS15 i BP15), bio iskorišten za adsorpciju određenih proteina koji nisu odgovorni ili su manje odgovorni za pojavu zamućenja, a prisutni su u višoj koncentraciji u toj, ranijoj fazi fermentacije. Među glavnim komponentama mošta, odnosno vina, sigurno je da su se volumni udio etanola i koncentracija reducirajućih šećera značajno mijenjali tijekom fermentacije i bili različiti u trenutcima primjene bentonita svojstvenim za pojedine tretmane. Sun i sur. (2007) istražili su utjecaj volumnog udjela etanola u modelnom vinu na adsorpciju proteina na bentonit. Pokazalo se da bentonit pokazuje maksimalni kapacitet adsorpcije proteina ovalbumina u modelnom vinu volumnog udjela etanola 12 vol. % (ispitani udjeli bili su 4, 8, 12, 16 i 20 %), odnosno u području između 10 i 12 vol. % prema procijenjenoj krivulji ovisnosti kapaciteta adsorpcije na bentonit o volumnom udjelu etanola, što bi u ovom istraživanju odgovaralo alkoholnoj jakosti vina u posljednjoj trećini fermentacije u prvoj godini istraživanja (procijenjeno na osnovi konačnog volumnog udjela etanola i koncentracije ostatka reducirajućih šećera u trenutku primjene). U drugoj je godini istraživanja volumni udio etanola prilikom primjene bentonita u istoj fazi fermentacije procijenjen na 12 – 12,5 vol. % te nije utvrđena značajnija promjena u učinkovitosti bistrenja u odnosu na prvu godinu (Slike 5 i 6, Prilog 4). U istoj je fazi fermentacije u trećoj godini istraživanja volumni udio etanola (10,5 – 11 vol. %) također bio unutar pretpostavljenog idealnog raspona sudeći prema onome što su objavili Sun i sur. (2007), međutim, bistrenje u toj fazi nije rezultiralo značajnim smanjenjem ukupne doze u odnosu na kontrolni tretman (Slika 10, Prilog 4) pa se može naslutiti da na konačan učinak ne utječe samo volumni udio etanola već i niz drugih čimbenika, posebno sastav ostalih sastojaka u moštu, odnosno vinu. Blade i Boulton (1988) objasnili su da etanol poboljšava bubrenje i povećava adsorpcijski kapacitet bentonita istiskivanjem manjih molekula vode prisutnih među slojevima bentonita. Pokazalo se da se adsorpcija manjih proteina na bentonit povećava s povećanjem volumnog udjela etanola do 10 vol. % za albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) i do 12 vol. % za lizozim, dok udio etanola nije imao značajan utjecaj na adsorpciju ovalbumina (Achaerandio i sur., 2001). Kontradiktorni rezultati za ovalbumin (Achaerandio i sur., 2001; Sun i sur., 2007)

idu u prilog objašnjenju Dordoni i sur. (2015a; 2015b) i Lambri i sur. (2010) koji su istaknuli da i drugi čimbenici, kao što su vrsta bentonita i sastav vina, mogu imati velik utjecaj. Muhlack i sur. (2016) također nisu ustanovili utjecaj volumnog udjela etanola na adsorpcijski kapacitet bentonita za VVTL1 protein (iz skupine TL proteina) iz soka grožđa, u modelnom vinu s 10 i 13% vol. etanola. Frakcije nestabilnih proteina uglavnom su među manjim proteinima u vinu (20–30 kDa, Pashova i sur., 2004), pa se može pretpostaviti da etanol ima sposobnost odvajanja slojeva bentonita dovoljno da do određene mjere poboljša njihovu adsorpciju. Moguće je da je različitost u alkoholnoj jakosti u pojedinim fazama fermentacije doista bila glavni razlog smanjenja ukupne potrebne doze bentonita u prve dvije godine istraživanja. Takav je rezultat u suglasju s rezultatima Lire i sur. (2015) koji su također utvrdili da je dodavanje bentonita kasnije tijekom fermentacije učinkovitije od njegove primjene prije, na početku i nakon fermentacije. Lira i sur. (2015) postigli su smanjenje ukupne potrebne doze bentonita za 43 % dodavanjem u kasnoj fazi fermentacije u odnosu na kontrolni tretman za vino kultivara *albariño*, što je bilo učinkovitije od maksimalnog 16 %-tnog smanjenja ukupne doze (prema standardnom testu zagrijavanjem) za vino malvazije istarske postignutog u ovom radu (Slika 5, Prilog 4).

5.1.2. Utjecaj načina primjene bentonita u fermentaciji

Postupnim dodavanjem bentonita u tretmanu BKS16 u drugoj polovini trajanja fermentacije u ukupnoj dozi jednakoj kao i za ostale tretmane bistrenja u fermentaciji, ali raspodijeljenoj u tri manja obroka, željelo se postići slične pozitivne učinke, između ostalog i smanjenje ukupno potrebne doze, koje su Muhlack i sur. (2006) postigli kontinuiranim protočnim (*in-line*) postupkom dodavanja bentonita pomoću posebno dizajniranog uređaja. Pretpostavljeno je da prilikom postupka standardnog dodavanja bentonita u jednoj dozi/obroku izlijevanjem s vrha tanka, gdje bentonit reagira s proteinima u relativno kratkom razdoblju tijekom slobodnog pada do dna tanka pod utjecajem sile gravitacije, određen udio aktivnih mjesta na česticama bentonita ne postigne potpunu zasićenost proteinima te ostane neiskorišten. S druge strane u automatiziranom, kontinuiranom i protočnom (*in-line*) postupku dodavanja bentonita (Muhlack i sur., 2006) ni u jednom se trenutku ne uspostavlja suvišak koncentracije bentonita u određenom volumenu vina te je pretpostavka da bentonit može imati bolju učinkovitost. Isti autori (Muhlack i sur., 2006) pretpostavili su da je *in-line* doziranjem bentonita moguće postići stabilnost vina uz manju primijenjenu dozu, ako se nestabilni proteini brže adsorbiraju. Takvim načinom primjene bentonita ostvaruje se intenzivnije miješanje, odnosno bolji

kontakt čestica bentonita i vina, zbog čega se također očekuje učinkovitije bistrenje. S druge strane, nakon standardnog, šaržnog načina dodavanju bentonita, bentonit i manji dio volumena vina (ako se vino povremeno ne miješa) dulje su u kontaktu na dnu tanka, uslijed čega se adsorbirani proteini mogu i desorbirati (Zoecklein, 1988) što posljedično može povećati potrebu za bentonitom. U ovom istraživanju postupno dodavanje bentonita u fermentaciji u tretmanu BKS16 nije se pokazalo učinkovito u sniženju ukupne doze bentonita u odnosu na kontrolni tretman bistrenja nakon fermentacije K16. Isti je tretman bio manje učinkovit od tretmana BK16 koji je uključivao primjenu jedne cjelovite doze pri kraju fermentacije (Slika 7, Prilog 4). Pretpostavljena je mogućnost da je tretman BK16 bio učinkovitiji jer je cjelokupna doza primijenjena pri kraju fermentacije, za što je u ovom istraživanju već utvrđeno da može imati veću učinkovitost u odnosu na primjenu u ostalim fazama fermentacije (Slike 5 i 6). S druge strane, tretman BKS16 je podrazumijevao postupno dodavanje bentonita u tri faze uključujući i dodavanje 1/3 ukupne doze u sredini trajanja fermentacije, za što je u ovom istraživanju utvrđeno da može imati nešto manju učinkovitost u odnosu na primjenu u završnoj fazi fermentacije (Slike 5 i 6).

5.1.3. Utjecaj načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji

Plavša i Palman (2011) pokazali su da način pripreme bentonita u odnosu na upotrijebljenu vodu može bitno utjecati na učinkovitost bistrenja vina malvazije istarske nakon fermentacije. Za potpunu proteinsku stabilizaciju vina upotrijebili su 33 % manje natrijevog bentonita pripremljenog s deioniziranom vodom u odnosu na isti bentonit pripremljen s vodovodnom vodom. Tvrda vodovodna voda sadrži veće količine Ca^{2+} iona koji mogu zamijeniti Na^{+} ione u strukturi bentonita čime se pojačavaju veze između slojeva bentonita i njegova moć bubrenja slabi. Navedeno podrazumijeva slabiju sposobnost vezanja proteina i potrebu za većom dozom tako pripremljenog bentonita za proteinsku stabilizaciju istog vina (Kawatra i Ripke, 2003; Plavša i Palman, 2011). U ovom istraživanju, bistrenje u fermentaciji primjenom natrijevog bentonita pripremljenog s deioniziranom vodom u tretmanu BKDEI16 bilo je učinkovitije u odnosu na kontrolni tretman bistrenja nakon fermentacije K16, ali je pokazalo mnogo manju prednost u odnosu na tretman BK16 sa suspenzijom bentonita pripremljenom u vodovodnoj vodi u usporedbi s istraživanjem Plavše i Palman (2011), i to samo u slučaju kad je stabilnost određena testom zagrijavanja s taninom (6 %) (Slika 8, Prilog 4). Mogući izvor spomenutih razlika između dva istraživanja je i blago različita tvrdoća vodovodne vode. S obzirom na postignuto poboljšanje, potrebno je nastaviti s istraživanjima u ovom pravcu,

posebno vezano uz izučavanje utjecaja stupnja tvrdoće vodovodne vode, ali i vezano uz potencijalnu isplativost samog postupka dovodeći u vezu eventualna poboljšanja u postupku bistrenja s troškovima nabave deionizirane vode.

5.1.4. Utjecaj primjene tanina u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji

Tanini koji se u obliku komercijalnih pripravaka koriste u vinarstvu, kao i tanini općenito, dijele se na dvije glavne skupine, tzv. kondenzirane i hidrolizirajuće tanine (Vignault i sur., 2019). Kondenzirani tanini podrijetlom su uglavnom iz kožica i koštica grožđa i čine ih oligomeri i polimeri sastavljeni od flavan-3-olnih monomera, točnije katehina i epikatehina te epikatehin-galata i epigalokatehina. Jedinice hidrolizirajućih tanina, galotanina i elagitanina, sastavljene su od središnje molekule glukoze supstituirane molekulama galne (npr. pentagaloil-glukoza), odnosno elaginske kiseline. Galotanini su uglavnom podrijetlom iz egzotičnih orašastih plodova, a elagitanini iz drveta hrasta i kestena (Harbertson i sur., 2012). Neki su enološki taninski pripravci relativno čisti ekstrakti pojedinih vrsta, dok su drugi mješavine tanina iz nekoliko izvora i mogu obuhvaćati i kondenzirane i hidrolizirajuće tanine (Obreque-Slíer i sur., 2009). Iako su prvenstveno odobreni kao enološko sredstvo za poboljšanje bistrenja mošta i vina (OIV, 2015), danas se tanini u vinarstvu koriste u različite svrhe, npr. za stabilizaciju boje, poboljšanje okusa, zaštitu od oksidacije, kontrolu aktivnosti lakaze i eliminaciju reduktivnih mirisa (Sonni i sur., 2009; Sonni i sur., 2011; Canuti i sur., 2012; Larcher i sur., 2015). Interesantno, dokaza o njihovim interakcijama s nestabilnim proteinima iz grožđa i učinkovitosti u poboljšanju proteinske stabilnosti vina u suvremenoj literaturi gotovo da i nema. U ovom istraživanju primijenjen je enološki preparat na osnovi hidrolizirajućih tanina deklariran kao čisti galotanin. Ranija istraživanja pokazala su da galotanini reagiraju i talože BSA i proteine iz ljudske sline. Soares i sur. (2017) utvrdili su da je crno vino nakon primjene komercijalnog enološkog pripravka galotanina sadržavalo manji udio tanina koji reagiraju s BSA od vina tretiranih s ekvivalentnom dozom kondenziranih tanina, dok je suprotno utvrđeno za njihovu reaktivnost s proteinima iz sline. Autori su pretpostavili da su utvrđene razlike posljedica načina vezanja tanina s različitim proteinima, naglašavajući da u interakciji s proteinima sline dominiraju hidrofobne interakcije stabilizirane vodikovim vezama. Harbertson i sur. (2012) uspoređivali su različite komercijalno dostupne enološke pripravke s taninima te utvrdili da hidrolizirajući i kondenzirani tanini pokazuju različitu dinamiku taloženja proteina (BSA) u ovisnosti o primijenjenoj dozi: za razliku od linearnog odnosa koncentracije primijenjene doze

kondenziranih tanina i istaloženog BSA, za hidrolizirajuće tanine je utvrđena sigmoidna funkcija. Takav rezultat slagao se s ranijim saznanjima od Hagerman i sur. (1998a) koji su utvrdili da su glavne sile na osnovi kojih međudjeluju hidrolizirajući tanini i proteini u svojoj osnovi hidrofobne, dok su u slučaju kondenziranih tanina to vodikove veze. Harbertson i sur. (2012) utvrdili su da je većina istraživanih komercijalnih pripravaka tanina sadržavala relativno maleni udio tanina koji mogu taložiti proteine te pretpostavili da je razlog tome bio relativno visok udio tanina manjih molekulskih masa, kao što su dimeri i trimeri kondenziranih tanina ili jednostavne galoil-glukoze, elagitaninski dimeri i slično, što su već ranije utvrdili Obreque-Slíer i sur. (2009). Dodavanje komercijalno dostupnih enoloških tanina tijekom predfermentativne prerade grožđa malvazije istarske Radeka i sur. (2009) ocijenili su relativno uspješnim u postizanju djelomične proteinske stabilizacije i smanjenja ukupne potrebne doze bentonita nakon fermentacije u odnosu na kontrolni tretman. Primijenjeni su katehinski tanini porijeklom iz lista vinove loze i zelenog čaja, proantocijanidinski i katehinski tanini porijeklom iz pokožica grožđa te elagotanin iz francuskog hrasta kojim se postiglo najveće smanjenje potrebne doze bentonita u odnosu na kontrolni tretman od 7 %. U ovom istraživanju tretman primjene tanina bez bentonita T16, kao i kombinirane primjene tanina i bentonita BKT16, pri čemu su i tanin i bentonit dodavani tijekom, a bentonit uvijek u posljednjoj trećini fermentacije, pokazali su se podjednako učinkoviti kao i tretman primjene bentonita u posljednjoj trećini fermentacije BK16 (Slika 9, Prilog 4). Moguće je da je dodani tanin vezanjem u komplekse poboljšao taloženje određenog dijela proteina u razdoblju od završetka fermentacije do završnog, naknadnog bistrenja te na taj način utjecao na smanjenje ukupne doze u tretmanu bez bentonita T16. Isto tako, pretpostavljena je i mogućnost da je bistrenje bentonitom poslije fermentacije bilo učinkovitije nakon tog tretmana u odnosu na kontrolni tretman K16 jer su stvoreni protein-tanin kompleksi bili bolji supstrat za adsorpciju na bentonit u odnosu na čiste proteine. S druge strane, postotak postignutog umanjenja ukupno potrebne doze bentonita nije se značajno razlikovao između tretmana u fermentaciji s taninom T16, bentonitom BK16 i njihove kombinacije BKT16, sugerirajući da bentonit i dodani tanini nisu postigli sinergijski učinak u djelovanju na nestabilne proteine.

5.1.5. Utjecaj temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji

U ovom dijelu istraživanja izučavan je utjecaj povišene temperature mošta u fermentaciji na djelotvornost bistrenja bentonitom. Rezultati proba bistrenja pokazali su da tretmanom s

povišenom temperaturom tijekom djelomičnog bistrenja mošta BKTMP17 nije postignuto smanjenje ukupne potrebne doze bentonita (Slika 10, Prilog 4). Muhlack i sur. (2016) su u ranijem istraživanju došli do zaključaka da se proces bistrenja bentonitom može optimirati provedbom pri višoj temperaturi (25 u odnosu na 5 °C) koja može povećati adsorpcijski kapacitet bentonita. Navedeni rezultat nije se podudarao s rezultatima Bladea i Boultona (1988) koji su istraživanjem pomoću modelnog vina i BSA kao modelnim proteinom ustanovili da temperatura (-4 °C i 25 °C) ne utječe na adsorpcijski kapacitet bentonita. U ovom istraživanju nije uočeno poboljšanje učinkovitosti bistrenja pri povišenoj temperaturi fermentacije pa je zaključeno da je utjecaj tako male promjene temperature (18 u odnosu na 16 °C) na adsorpcijski kapacitet bentonita vjerojatno bio nedovoljno značajan da bi se primijetila razlika u učinkovitosti bistrenja. Vrijedi istaknuti da je u ovom istraživanju bilo važno da su primijenjene temperature unutar raspona dokazano primjerenih i uobičajenih za fermentaciju mošta bijelog grožđa (15 – 18 °C), prvenstveno radi ciljane sinteze i očuvanja senzorski važnih hlapljivih spojeva arome kao što su, na primjer, hlapljivi esteri (Killian i Ough, 1979; Kunkee, 1984), te je upravo to bio razlog relativno male razlike između primijenjenih temperatura. Zbog ograničenog raspona temperature pri kojem se u suvremenom vinarstvu preporuča provođenje alkoholne fermentacije, potencijal ovog pristupa s ciljem postizanja poboljšanja proteinske stabilnosti vina prilično je ograničen.

5.1.6. Utjecaj primjene dvostruke doze bentonita u fermentaciji (prebistrenje)

Do danas nije dovoljno istraženo je li doza primijenjenog bentonita linearno proporcionalna poboljšanju proteinske stabilnosti, posebno tijekom fermentacije. Sauvage i sur. (2010) su na osnovi istraživanja adsorpcije proteina iz vina kultivara *chardonnay* na bentonit ustanovili da se različite skupine proteina nejednako i nejednoliko uklanjanju iz vina ovisno o primijenjenoj dozi bentonita. Bistrenjem vina rastućim dozama do 150 g/hL uklonjeno je više od 50 % ukupnih proteina dozom od 50 g/hL i 85 % ukupnih proteina dozom od 100 g/hL. Primjenom najviše doze od 150 g/hL u vinu je ostalo još oko 15 % neadsorbiranih proteina te je analizom potvrđeno da se radilo o određenoj podskupini proteina nalik taumatinu (TL). U istom istraživanju pokazalo se da je adsorpcija proteina na bentonit selektivna. Vrlo niskim dozama bentonita iz vina su u potpunosti uklonjene glukanaze te manji dio TL proteina i neidentificiranih proteina nižih molekulskih masa (14 kDa). Primjenom dodatnih doza započela je adsorpcija hitinaza koje su u potpunosti uklonjene dozom od 60 g/hL. Dozama od 60 do 80 g/hL bentonita uklonjeno je oko 70 % TL proteina što je bio maksimalni postotak

njihovog uklanjanja. Pri 80 g/hL adsorbirali su se svi proteini mase 14 kDa. Invertaze su se počele adsorbirati pri 20 g/hL bentonita i potpuno su se adsorbirale pri 100 g/hL. Uklanjanje proteinskih frakcija u ovisnosti o koncentraciji bentonita dovelo se u vezu i sa osjetljivošću proteina na povišenje temperature, gdje je samo za određene skupine proteina utvrđena pozitivna korelacija između ovisnosti o dva spomenuta čimbenika. Razlike u ponašanju proteina iz istih skupina, ovdje osobito važnih hitinaza i TL proteina, objašnjene su na osnovi postojanja mnoštva tzv. mikroheterogenosti u njihovim strukturama koje su mogle uvjetovati njihovu različitu adsorptivnost, a za koje se pretpostavlja da su posljedica ograničene proteolize prekursora proteina tijekom prerade grožđa (Monteiro i sur., 2001). U ovom istraživanju, tretman bistrenja dvostrukom dozom tijekom fermentacije BKDUP17 pokazao se kao manje učinkovit u odnosu na tretman standardnom jednostrukom dozom BK17, ali i u odnosu na kontrolni tretman s bistrenjem nakon fermentacije K17 (Slika 11). Doza i poboljšanje proteinske stabilnosti nisu bili u proporcionalnom odnosu. Razlog tome moglo je biti spomenuto diferencijalno vezanje različitih skupina proteina, odnosno različitih proteina iz iste skupine s ključnim mikroheterogenostima u strukturi (Sauvage i sur., 2010). Moguće je da su se jednostrukom dozom u tretmanu BK17 preferencijalno adsorbirali proteini najvećeg afiniteta prema bentonitu, dok su u moštu tretmana BKDUP17, nakon adsorpcije proteina s najvećim afinitetom, preostali proteini koji se slabije vežu na bentonit ili zahtijevaju višu dozu za uklanjanje, a koje suvišak bentonita primijenjen u tom tretmanu nije adsorbirao s jednakom učinkovitošću.

5.1.7. Utjecaj primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji

Doze različitih bentonita koje su u preliminarnom bistrenju mošta prije fermentacije određene kao ekvivalentne, odnosno jednako učinkovite u postizanju njegove proteinske stabilnosti (Slika 13), nisu se pokazale takvima nakon primjene u fermentaciji. Pokazalo se da su doze bentonita Pentagel (PEN17), Mastervin Compact (MVN17) i SIHA Puranit (PUR17) tijekom fermentacije bile učinkovitije nego u moštu prije fermentacije u odnosu na primijenjenu dozu CX Special Grain bentonita (BK17), jer su za postizanje potpune proteinske stabilnosti vina PEN17, MVN17 i PUR17 tretmana dodatnim bistrenjem bile potrebne manje dodatne doze CX bentonita nego za vino BK17 tretmana (Slika 12). Razlike u učinkovitosti različitih bentonita u dva medija vjerojatno su proizašle iz različitog sastava mošta tijekom fermentacije u odnosu na početni sastav mošta, osobito iz razlika u sastavu i sadržaju nestabilnih proteina do kojih dolazi tijekom fermentacije (Monteiro i sur., 2001; Pocock i sur., 2011). Na osnovi

odnosa doza različitih bentonita primijenjenih u fermentaciji i dodatnih doza CX bentonita potrebnih za dodatnu stabilizaciju nakon fermentacije, procijenjene su doze različitih bentonita koje su po učinkovitosti u fermentaciji bile ekvivalentne dozi od 95 g/hL bentonita CX u tretmanu BK17[1]: 74 g/hL bentonita Pentagel u tretmanu PEN17 (koji je prema tome bio najučinkovitiji po jedinici koncentracije), 112 g/hL bentonita Mastervin Compact u tretmanu MVN17 te 138 g/hL bentonita SIHA Puranit u tretmanu PUR17 (koji je prema tome bio najmanje učinkovit po jedinici koncentracije). Prema toj procjeni, doza bentonita Pentagel od 95 g/hL primijenjena u tretmanu PEN17 bila je 1,28 puta učinkovitija, doza bentonita Mastervin Compact od 143 g/hL primijenjena u tretmanu MVN17 također 1,28 puta učinkovitija te doza bentonita SIHA Puranit od 238 g/hL primijenjena u tretmanu PUR17 1,72 puta učinkovitija od doze bentonita CX Special Grain od 95 g/hL primijenjene u fermentaciji u okviru tretmana BK17. Sličan omjer utvrdili su Plavša i Palman (2011) za ukupne doze bentonita SIHA Puranit i standardnog prirodnog natrijevog bentonita u proteinskoj stabilizaciji vina malvazije istarske, pri čemu su morali primijeniti 1,7 puta veću dozu bentonita SIHA Puranit. Isto tako, Salazar i sur. (2017) odredili su da je za stabilizaciju mošta *sauvignon blanc* bilo potrebno 1,6 puta više aktiviranog natrijevog bentonita Na-Ca sastava nego standardnog natrijevog bentonita. Slabiji adsorpcijski kapacitet Ca i Na-Ca bentonita za proteine u odnosu na Na bentonit utvrđen je i ranije (Rankine i Emerson, 1963; Blade i Boulton, 1988). Rezultati ovog istraživanja potvrdili su prethodno objavljena saznanja kao i praktično stečena iskustva da bentoniti s povećanim udjelom Ca^{2+} kationa (tzv. Ca ili Na-Ca bentoniti) imaju slabiju sposobnost vezanja nestabilnih proteina iz mošta i vina nego natrijev i aktivirani natrijev bentonit (Na tip). Specifikacije pojedinih komercijalno dostupnih bentonita relativno su oskudne i bez dodatnih specifičnih fizikalno-kemijskih analiza koje u ovom istraživanju nisu obavljene nije bilo moguće saznati njihov točan sastav. Bentonit upotrijebljen u tretmanu PUR17, SIHA Puranit, deklariran je kao Na-Ca bentonit, što znači da je sadržavao značajan udio Ca^{2+} kationa u svojoj lamelarnoj strukturi. Navedena činjenica najvjerojatnije je uzrok relativno najslabijoj učinkovitosti SIHA Puranit bentonita u odnosu na ostale bentonite istraživane u ovom radu. Bentonit Mastervin Compact (MVN17) aktivirani je

[1] Primjer izračuna: nakon primjene početne doze od 95 g/hL bentonita CX Special Grain u fermentaciji (tretman BK17), prosječna dodatna doza bentonita CX primijenjena nakon fermentacije kako bi se postigla konačna proteinska stabilnost bila je 110 g/hL, iz čega proizlazi da je u tretmanu BK17 primijenjena prosječna ukupna doza od 205 g/hL. Nakon primjene iste doze Pentagela u fermentaciji (95 g/hL) u tretmanu PEN17, prosječna dodatna doza bentonita CX primijenjena nakon fermentacije za postizanje konačne proteinske stabilnosti vina tog tretmana bila je 83 g/hL, iz čega je preračunom proizašlo da je učinkovitost 95 g/hL Pentagela u fermentaciji bila otprilike jednaka učinkovitosti 122 g/hL bentonita CX (205 - 83 = 122 g/hL). Prema tome, bentonit Pentagel bio je relativno 1,28 puta učinkovitiji od bentonita CX (122/95), pa je doza Pentagela jednake učinkovitosti kao i 95 g/hL bentonita CX izračunata dijeljenjem doze bentonita CX od 95 g/hL s 1,28, što je iznosilo 74 g/hL.

natrijev bentonit koji u svojoj strukturi ima umrežen silicij s ciljem poboljšanja parametara taloženja kao što su volumen i kompaktnost taloga. Pretpostavljeno je da je silicij umetnut u postupku aktivacije bentonita mogao djelomično istisnuti aktivne katione natrija Na^+ iz prostora između lamela strukture bentonita, što je posljedično moglo rezultirati smanjenom moći adsorpcije bentonita u odnosu na ostale aktivirane natrijeve bentonite uključene u istraživanje, CX Special Grain (BK17) i Pentagel (PEN17). Osim na osnovi omjera udjela Na^+/Ca^{2+} kationa, učinkovitost istraživanih bentonita u uklanjanju nestabilnih proteina vjerojatno je bila određena i drugim svojstvima za koja se zna da mogu utjecati na njihov adsorpcijski kapacitet, poput specifične površine, naboja po jedinici površine, indeksa bubrenja, pH bentonita i slično (Sun i sur., 2007; Lambri i sur., 2016). Na primjer, Dordoni i sur. (2015a) su bistrenjem različitim tržišno dostupnim aktiviranim natrijevim bentonitima u uvjetima raspona pH u području tipičnom za vino (3,00, 3,17, 3,30 i 3,60) pokazali da pH vina može izmijeniti učinkovitost bentonita utječeući na izoelektričnu točku proteina vina, ali i na promjenue u strukturi i gustoći naboja površine slojeva bentonita. U tom istraživanju najučinkovitiji su bili bentoniti kojima je struktura bila manje narušena u određenim uvjetima pH vina, a takvi su bentoniti i sami bili niže pH vrijednosti. Drugi važan čimbenik u uspoređivanju učinkovitosti bistrenja različitim bentonitima i procjeni isplativosti cjelokupnog postupka bistrenja je količina taloga koji nastaje nakon bistrenja. Iako je PEN17 tretmanom postignuto najznačajnije smanjenje ukupne doze bentonita (Slika 12), isplativost njegove primjene donekle je dovedena u pitanje činjenicom da je u laboratorijskim probama bistrenje mošta bentonitom Pentagel (PEN17) rezultiralo slabijim taloženjem i najvećim volumenom taloga (Slika 13). Na primjer, primjenom jednake doze Pentagela (PEN17) u odnosu na CX bentonit (BK17) dobiven je talog gotovo dvostruko većeg volumena. Za 50 % (1,5 puta) veća primijenjena doza Mastervin Compact bentonita (MVN17) proizvela je za 57 % manji udio taloga u odnosu na bentonit CX (BK17). Pretpostavljeno je da je djelomičan uzrok tome i specifičan sastav Mastervin Compact bentonita s umetnutim silicijem u njegovoj strukturi. Talog nakon bistrenja SIHA Puranit bentonitom (PUR17) bio je najmanjeg volumena i najkompaktniji te je njegov postotak u volumenu bistrenog mošta bio 4,6 puta manji u odnosu na Mastervin Compact (MVN17), 10,8 puta manji u odnosu na CX (BK17) i 17,9 puta manji u odnosu na Pentagel (PEN17). Takav rezultat potvrdio je ranije spoznaje da bentoniti s višim udjelom Ca^{2+} kationa, a SIHA Puranit je jedini od bentonita uključenih u istraživanje deklariran kao Na-Ca bentonit, imaju manju moć bubrenja i stvaraju manje voluminozne i kompaktnije taloge (Kawatra i Ripke, 2003; Plavša i Palman, 2011). Manji udio taloga nakon bistrenja vina SIHA Puranit bentonitom u odnosu na bistrenje vina

prirodnim natrijevim bentonitom zabilježili su i Plavša i Palman (2011). Salazar i sur. (2017) su usporedbom učinka bistrenja natrijevim i aktiviranim natrijevim bentonitom na proteinsku stabilnost te na volumen formiranog taloga, aktivirani natrijev bentonit ocijenili kao učinkovitiji jer je stvarao manju količinu taloga. Utvrđene razlike između različitih tipova bentonita dostupnih na tržištu potvrdile su da se tijekom planiranja postupka bistrenja mora uzeti u obzir nekoliko čimbenika, od kojih su među najvažnijim svakako učinkovitost bentonita u uklanjanju nestabilnih proteina i količina nastalog taloga. Međutim, za procjenu uspješnosti bistrenja bentonitom ključno je utvrditi i učinak na kemijski sastav i kvalitetu vina, za što se ranije pokazalo da može značajno ovisiti o tipu bentonita (Lambri i sur., 2010; Salazar i sur., 2017). Također, u računicu bi trebalo uključiti i nabavnu cijenu pojedinog tipa bentonita te je dovesti u vezu s ekonomskom vrijednosti potencijalnih očuvanja količine i fizikalno-kemijske, odnosno senzorske kvalitete vina.

5.2. Standardni fizikalno-kemijski parametri

Glavne razlike utvrđene između vina različitih tretmana s primjenom bentonita tijekom fermentacije uglavnom su se odnosile na dva fizikalno-kemijska parametra važna za kvalitetu vina, koncentraciju ukupnog suhog ekstrakta bez reducirajućih šećera (koji je mjerodavniji podatak od ukupnog suhog ekstrakta) i koncentraciju ukupne kiselosti. U većini slučajeva, nakon fermentacije (F) su pronađene više koncentracije ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera u vinima kontrolnih tretmana iz različitih godina istraživanja, K15, K16 i K17, u odnosu na vina djelomično bistrena u fermentaciji (Tablice 2, 3, 14, 20, 32 i 37). Negativan utjecaj primjene bentonita na koncentraciju ukupnog ekstrakta u vinu ranije su utvrdili i Salazar i sur. (2006), dok Lambri i sur. (2012b) nisu zabilježili značajno sniženje njegove koncentracije nakon bistrenja bentonitom. Poznato je da djelovanje bentonita u vinu nije selektivno te da, osim proteina, bentonit može adsorbirati i druge makromolekule, kao što su npr. fenolni spojevi viših molekulskih masa (Gonçalves i Jordão, 2009; Chagas i sur., 2012) i druge kemijske vrste, posebno one s pozitivnim nabojem (Zoecklein i sur., 1990; Main i Morris, 1991). Pretpostavljeno je da je u ovom istraživanju bentonit primijenjen u fermentaciji u okviru različitih tretmana osim proteina adsorbirao i druge spojeve koji sačinjavaju suhi ekstrakt te tako prouzročio opadanje njihovih koncentracija u vinu nakon fermentacije (F). Takav rezultat donekle je očekivan jer su vina kontrolnih tretmana, iako uzorkovana nakon dva mjeseca spontanog taloženja, zasigurno sadržavala viši udio čvrstih čestica i makromolekula iz grožđa, stanica kvasca, itd. Izuzetak je zapažen u vinima u kojima

je u fermentaciji dodavan tanin, T16 i BKT16, gdje nije zabilježena niža koncentracija ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 nakon fermentacije (F). Kako je u vinu tretmana s primjenom bentonita ali bez dodatka tanina BK16 koncentracija bila niža, pretpostavljeno je da je u vinu BKT16 tretmana dodana količina tanina nadoknadila dio uklonjene suhe tvari (Tablica 26). U dijelu istraživanja u kojem je istraživan učinak primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana, iako je zapažen isti trend kao i u ostalim pokusima (Tablica 42). Nakon dodatnog bistrenja (B), u stabilnim je vinima u velikom broju slučajeva utvrđena niža koncentracija ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera u odnosu na koncentraciju u istom vinu nakon fermentacije (F) (Tablice 3, 14, 20, 26 i 42), što je također najvjerojatnije bila posljedica kombiniranog utjecaja daljnjeg taloženja i spontane stabilizacije a posebno dodatnog bistrenja bentonitom. U više slučajeva utjecaj dodatne stabilizacije (B) bio je relativno izraženiji u vinima kontrolnih tretmana koja su prije dodatnog bistrenja sadržavala višu koncentraciju ekstrakta, što je uzrokovalo da neke razlike između vina različitih tretmana u odnosu na vina kontrolnih tretmana utvrđene nakon fermentacije (F) nisu utvrđene za stabilna vina (B) (Tablice 2, 14, 20, 26, 32). S druge strane, dodatno bistrenje (B) naglasilo je razlike u koncentraciji ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera između vina djelomično bistrenih u fermentaciji različitim tipovima bentonita, pa je tako niža koncentracija pronađena u vinu PEN17 u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 42).

Primjena bentonita s ciljem djelomičnog bistrenja vina u fermentaciji u većini je slučajeva uzrokovala i sniženje koncentracije ukupne kiselosti u odnosu na vino kontrolnog tretmana nakon fermentacije (F) (Tablice 2, 3, 14, 20, 32, 37 i 42). Negativan utjecaj primjene bentonita na koncentraciju ukupne kiselosti u vinu ranije su utvrdili i Ribéreau-Gayon i sur. (2006b), Lira i sur. (2015) i Ma i sur. (2020), dok Salazar i sur. (2017) i Vela i sur. (2017) nisu zabilježili značajnije učinke bentonita. Lira i sur. (2015) su opaženo sniženje koncentracije ukupne kiselosti od 0,52 g/L opisali kao zanemarivo značajno u praktičnom smislu. Poznato je da djelovanje bentonita u vinu nije selektivno pa je postojala mogućnost da je bentonit adsorbirao i određen udio organskih kiselina koje čine ukupnu kiselost. Wu i sur. (2011) u svojem su istraživanju utvrdili da je bistrenje crnog vina bentonitom uklonilo u prosjeku 12,39 % vinske, 9,80 % jabučne, 7,27 % mliječne i 6,27 % jantarne kiseline, dok je najznačajnije sniženje koncentracije od 15,42 % utvrđeno za octenu kiselinu. Autori su pretpostavili da su funkcionalne skupine silicij i/ili aluminij oksida s površine bentonita mogle stupiti u interakciju s hidroksilnim skupinama organskih kiselina te ih na taj način adsorbirati

i ukloniti iz vina. Moguće je da je bentonit adsorbirao i uklonio određeni udio drugih različitih kemijskih spojeva u vinu koji mogu djelovati poput zaštitnih koloida i osiguravati bolju tartaratnu stabilnost, kao što su određeni proteini, glikoproteini, fenoli i polisaharidi (Berg i Akiyoshi, 1971; Lambri i sur., 2016), te na taj način pospješio gubitak vinske kiseline taloženjem u obliku kalijevih soli (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). U ovom istraživanju utvrđene su razlike u učinku različitih tretmana na ukupnu kiselost. Tretman s primjenom bentonita na višoj temperaturi BKTMP17 te tretman s dvostrukom dozom bentonita BKDUP17 prouzročili su značajnije sniženje njene koncentracije u vinu nakon fermentacije (F) u odnosu na tretman jednostrukom dozom na nižoj temperaturi BK17 (Tablice 32 i 37). Pretpostavljena je mogućnost da je viša temperatura bistrenja u tretmanu BKTMP17 poboljšala interakcije između bentonita i organskih kiselina i/ili zaštitnih koloida te na taj način pospješila njihovo uklanjanje, dok je u slučaju tretmana BKDUP17 učinak bentonita na sniženje koncentracije ukupne kiselosti jednostavno korelirao s primijenjenom dozom. Primjena različitih tipova bentonita rezultirala je različitim učinkom na ukupnu kiselost (Tablica 42). Tretmani BK17 i MVN17 snizili su njenu koncentraciju, tretman PUR17 je to učinio još izraženije, dok je u vinu tretmana PEN17 zabilježena najniža koncentracija. Utvrđene razlike vjerojatno su bile posljedica različitih adsorptivnih svojstava različitih bentonita kao funkcije njihovog različitog sastava i strukture. Salazar i sur. (2017) su također utvrdili nejednak učinak bistrenja različitim tipovima bentonita nakon fermentacije na koncentraciju ukupne kiselosti u vinu. Nakon dodatnog bistrenja (B) u vinima pojedinih tretmana utvrđeno je sniženje koncentracije ukupne kiselosti (Tablice 2, 3 14, 20, 26, 32, 37), vjerojatno kao posljedica taloženja njenih soli u kratkotrajnom razdoblju dozrijevanja vina između dva termina uzorkovanja (F i B) (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b), iako mogućnost adsorpcije na bentonit nije u potpunosti isključena. Takvim promjenama je u pojedinim slučajevima poništen učinak nekih tretmana utvrđen nakon fermentacije (F), dok su se u drugim slučajevima značajne razlike zadržale i nakon dodatnog bistrenja (B). Vrijedi istaknuti slučaj u kojem nakon fermentacije (F) nisu utvrđene značajne razlike po pitanju koncentracije ukupne kiselosti između tretmana, dok su nakon dodatnog bistrenja više koncentracije pronađene u vinima tretmana u kojima je primijenjen tanin, T16 i BKT16, u odnosu na vina BK16 i kontrolnog tretmana K16 (Tablica 26). Pretpostavljeno je da su dodani tanini poslužili kao zaštitni koloidi (Berg i Akiyoshi, 1971) i umanjili stupanj taloženja kalijevih soli vinske kiseline koje se inače spontano odvija tijekom završne dorade i stabilizacije vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

Od ostalih parametara vrijedi izdvojiti značajne učinke različitih tretmana s primjenom bentonita na hlapljivu kiselost i pH vrijednost, gdje nisu utvrđeni ponavljajući, jasni obrasci, kako u vinima nakon fermentacije (F), tako i nakon dodatnog bistrenja (B). Tako je npr. tretman BK15 uzrokovao sniženje hlapljive kiselosti u odnosu na vino kontrolnog tretmana K15, što je u skladu s rezultatima Wu i sur. (2011), dok nakon primjene istovjetnog tretmana BK16 u narednoj godini istraživanja to nije utvrđeno. Razlike u pH vrijednosti između vina različitih tretmana samo su donekle odgovarale, odnosno bile obrnuto proporcionalne onima utvrđenim za ukupnu kiselost, tako da je moguće da je bentonit reagirao i s drugim kiselinama koje slabije disociraju od vinske, kao što su npr. jabučna i limunska kiselina.

U svim vinima utvrđeno je sniženje volumnog udjela alkohola nakon dodatnog bistrenja (B) u odnosu na udio zabilježen nakon fermentacije (F) (Tablice 2, 3, 14, 20, 26, 32, 37 i 42). Pretpostavljeno je da je glavni razlog tome bilo njegovo djelomično isparenje tijekom završne dorade, posebno tijekom pretoka vina (F i B). Iako su u pojedinim slučajevima nakon fermentacije (F) utvrđene razlike u volumnim udjelima alkohola u vinima različitih tretmana (Tablice 2, 14, 32, 37 i 42), one se u velikoj većini slučajeva nisu održale u stabilnim vinima (B).

5.3. Fenolni spojevi

5.3.1. Utjecaj trenutka primjene bentonita u fermentaciji

U prve dvije godine istraživanja (berbe 2015. i 2016. godine) nakon fermentacije (F) je koncentracija većine hidroksibenzojevih kiselina bila niža u vinima djelomično bistrenim u fermentaciji u odnosu na vina kontrolnog tretmana K15, odnosno K16 (Tablice 4 i 5). Iako su Main i Morris (1994) utvrdili da bistrenje bentonitom gotovo i nema utjecaj na neflavonoidne fenolne spojeve u koje se ubrajaju i fenolne kiseline, na osnovi rezultata drugih istraživanja pretpostavljena je mogućnost da je u ovom istraživanju došlo do izravne adsorpcije određenog udjela hidroksibenzojevih kiselina na dodani bentonit koji je zatim uklonjen taloženjem (Zoecklein i sur., 1990; Main i Morris, 1991; Salazar i sur., 2006). Osim toga, pretpostavljena je i mogućnost neizravnog uklanjanja udjela hidroksibenzojevih kiselina iz vina djelomično bistrenih u fermentaciji nakon njihovog vezanja na hidrofobna mjesta unutar strukture proteina i uklanjanja takvih kompleksa adsorpcijom na bentonit, što su za strukturno relativno sličnu kafeinsku kiselinu u ranijem istraživanju utvrdili Toledo i sur. (2017). Slične interakcije bentonita s fenolima i s kompleksima proteina i fenola najvjerojatnije su

djelomično prouzročile i promjene u koncentracijama hidroksibenzojevih kiselina utvrđene nakon dodatnog bistrenja (B) (Tablice 4 i 5). Nakon dodatnog bistrenja (B) u više je slučajeva utvrđen porast koncentracije protokatehinske kiseline (Tablice 4 i 5), što je mogla biti posljedica pretvorbe drugih fenola (Main i Morris, 1994). Razlike u odzivu istih hidroksibenzojevih kiselina na primjenu bentonita među različitim godinama istraživanja vjerojatno su djelomično posljedica i varijacija u cjelokupnom sastavu istraživanih vina iz dvije različite berbe, koje su zasigurno utjecale na ranije spomenute interakcije. Najočitiji primjer bila je promjena koncentracije siringinske kiseline koja se dodatnim bistrenjem (B) značajno snizila u vinima svih tretmana u prvoj (Tablica 4), značajno povisila u vinima većine tretmana u drugoj godini istraživanja (Tablica 5), dok se u trećoj godini istraživanja značajno povisila samo u vinu kontrolnog tretmana K17 (Tablica 33).

Trans-kaftarna kiselina potvrđena je kao često prevladavajuća fenolna kiselina u bijelom vinu (Cheynier i sur., 1991; Garrido i Borges, 2013) u sve tri godine istraživanja (Tablice 4, 5 i 33). Više koncentracije glavnih hidroksicinamoiltartarata (*trans*-kaftarne, *trans*-kutarne i *trans*-fertarne kiseline) pronađene u vinima tretmana bistrenja bentonitom prije (BGS15) i tijekom fermentacije (BP15, BS15 i BK15 (Tablica 4), BS16 i BK16 (Tablica 5) te BK17 (Tablica 33)) u odnosu na vino odgovarajućeg kontrolnog tretmana (K15, K16 ili K17), odnosno više koncentracije slobodnih hidroksicimetnih kiselina (kafeinske, *p*-kumarne i ferulinske kiseline) pronađene u vinima kontrolnih tetmana, najvjerojatnije su bile rezultat djelovanja bentonita na aktivnost odgovarajućih enzima tijekom i nakon fermentacije (F). Pretpostavljeno je da je bentonit, poznat po svom inhibicijskom djelovanju prema enzimima (Main i Morris, 1991; Jaeckels i sur., 2015), smanjio aktivnost esteraza odgovornih za hidrolizu hidroksicinamoiltartarata, odnosno ograničio oslobađanje hidroksicimetnih kiselina iz esterskih kompleksa vinske kiseline. Kako hidroksicinamoiltartarati doprinose antioksidacijskom kapacitetu vina, bistrenje tijekom fermentacije potencijalno je poboljšalo opću oksidativnu stabilnost vina, uključujući i zaštitu hlapljivih spojeva od oksidacije. Isti odnos koncentracija hidroksicinamoiltartarata u vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji i u kontrolnom vinu uglavnom se zadržao i nakon dodatnog bistrenja (B). Međutim, dodatnim bistrenjem (B) došlo je do sniženja koncentracija pojedinih hidroksicinamoiltartarata u vinima većine tretmana, osobito *trans*-kutarne i *trans*-kaftarne kiseline u prvoj godini istraživanja (Tablica 4). Kako se koncentracije odgovarajućih slobodnih oblika (kafeinska i *p*-kumarna kiselina) nakon dodatnog bistrenja (B) nisu značajno povisile, pretpostavljena je mogućnost da se dio hidroksicinamoiltartarata adsorbirao na

bentonit i tako uklonio, kao što su općenito za polifenole utvrdili Dordoni i sur. (2015a), ili da je došlo do njihova gubitka uslijed oksidacije i konverzije u *o*-kinone i druge produkte (Zoecklein i sur., 1990; Cheynier i sur., 1991). U drugoj godini istraživanja nakon dodatnog bistrenja (B) nije bilo značajne promjene koncentracija *trans*-kutarne i *trans*-kaftarne kiseline u vinima tretmana s primjenom bentonita u sredini trajanja (BS16) i u posljednjoj trećini fermentacije (BK16), dok je koncentracija *trans*-fertarne kiseline u navedenim vinima nakon dodatnog bistrenja (B) značajno porasla (Tablica 5). Koncentracije odgovarajućih slobodnih oblika (kafeinska i *p*-kumarna kiselina), osim ferulinske kiseline koja je ostala nepromijenjena, značajno su porasle. S obzirom da nije došlo do gubitka odgovarajućih hidroksicinamoiltartarata pored povišenja koncentracije slobodnih kiselina, pretpostavljeno je da je ovaj put prevladao pozitivan učinak bentonita te da nije došlo do značajnije adsorpcije *trans*-hidroksicinamoiltartarata na bentonit ili njihove hidrolize. Pritom je pretpostavljena i mogućnost da je određeni udio slobodnih kiselina, kafeinske i *p*-kumarne, nastao raspadom *cis*-vezanih oblika čije su koncentracije snižene dodatnim bistrenjem (B), odnosno da se dogodila djelomična konverzija *cis*- oblika u *trans*- oblik fertarne kiseline (Garrido i Borges, 2013). Niža koncentracija ferulinske kiseline u vinu BK17 nakon fermentacije (F) (Tablica 33) u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 mogla je biti posljedica adsorpcije na bentonit, a značajno povišenje koncentracije *trans*-fertarne kiseline nakon dodatnog bistrenja (B) u vinu BK17 posljedica moguće djelomične konverzije *cis*- oblika u *trans*- oblik (Garrido i Borges, 2013). Značajno sniženje koncentracije *cis*-kaftarne kiseline dodatnim bistrenjem (B) moglo se dogoditi uslijed adsorpcije na bentonit ili oksidacije, djelomično i uslijed hidrolize, uslijed čega se značajno povisila koncentracija kafeinske kiseline u vinu BK17 tretmana. Dodatno bistrenje (B) značajno je povisilo koncentraciju *p*-kumarne kiseline u vinu BK17 tretmana što je moglo biti posljedica konverzije pojedinih drugih fenola, jer se nisu značajno promijenile koncentracije njenih prekursora, *trans*- i *cis*-kutarne kiseline.

Pronađene su relativno male razlike između koncentracija monomernih i dimernih flavan-3-ola u vinima različitih tretmana, nakon fermentacije (F) i nakon dodatnog bistrenja (B). Procijanidin B1 potvrđen je kao prevladavajući dimer flavan-3-ola u vinu (Siebert, 2009) u prvoj i drugoj godini istraživanja (Tablice 4 i 5). Pozitivan učinak primjene bentonita u fermentaciji na koncentracije procijanidina B1 i B2 u fermentaciji (F) i nakon dodatnog bistrenja (B) u drugoj godini istraživanja najvjerojatnije je posljedica ograničavajućeg utjecaja bentonita na aktivnost enzima polifenol-oksidaze, bilo utjecanjem na fizikalne promjene u strukturi enzima ili adsorpcijom i taloženjem enzima, kao što je pokazano ranije upravo za

polifenol-oksidazu (Ough i sur., 1969), ali i kateholazu (Main i Morris, 1994). Poznato je da tirosol nastaje iz aminokiseline tirozin metaboličkom aktivnosti kvasca (Ribereau-Gayon i sur., 2006b). Izgledno je da na koncentraciju tirosola nisu utjecali ni primjena bentonita ni trenutak doziranja. U prve dvije godine istraživanja, koncentracija flavanonola taksifolina određena nakon fermentacije (F) bila je značajno niža u vinima tretmana s primjenom bentonita prije (BGS15) i tijekom fermentacije (BP15, BS15 i BK15) u odnosu na vino kontrolnog tretmana K15 te je u svim vinima ostala na sličnim razinama nakon dodatnog bistrenja (B) (Tablica 4). U vinima tretmana bistrenja bentonitom iz druge godine istraživanja BS16 i BK16 koncentracija taksifolina je nakon fermentacije (F) također bila niža u odnosu na onu utvrđenu u vinu kontrolnog tretmana K16, ali se i značajno povisila nakon dodatnog bistrenja (B) u svim tretmanima (Tablica 5). Pretpostavljena je mogućnost da je tijekom fermentacije bentonit stupio u interakciju s određenim prekursorima taksifolina ili izravno adsorpcijom ili posredno otežavanjem njegove hidrolize reduciranjem aktivnosti odgovarajućih enzima. Povećanje koncentracije taksifolina nakon dodatnog bistrenja (B) moglo se dogoditi uslijed pretvorbe drugih fenolnih spojeva. Koncentracija *trans*-piceida, koji je identificiran samo u vinima iz druge i treće godine istraživanja, uglavnom je bila viša u vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji u odnosu na kontrolni tretman, s izraženijim učinkom u 2016. godini (Tablice 5 i 33). *Trans*-piceid pripada skupini stilbena i glukozid je *trans*-resveratrola, prirodno se pojavljuje u grožđu i moštu (Romero-Pérez i sur., 1999; Jackson, 2008) te tijekom proizvodnje vina može hidrolizirati pod utjecajem enzima β-glukozidaze čime se povećava koncentracija *trans*-resveratrola u vinu (Jeandet i sur., 1994). Moguće je da je bentonit umanjio aktivnost β-glukozidaze i spriječio veći stupanj hidrolize *trans*-piceida u *trans*-resveratrol i šećerni ostatak.

Iako nije zabilježen statistički značajan utjecaj, u prvoj godini istraživanja (2015.) uočena je tendencija sniženja koncentracija ukupnih fenola u vinima tretmana s bentonitom u fermentaciji u usporedbi s kontrolnim tretmanom K15 (Tablica 4), što je išlo u prilog tvrdnji autora Gonçalves i Jordão (2009) da bentonit spada u grupu bistrila koja uklanjaju fenolne spojeve u manjoj mjeri. U istovjetnim tretmanima iz druge godine istraživanja (2016.) utjecaj na ukupne fenole bio je značajan (Tablica 5). Tretmani s bentonitom u fermentaciji BS16 i BK16 uklonili su podjednaku koncentraciju ukupnih fenola u odnosu na kontrolni tretman K15, što je potvrdilo ranija saznanja da bentonit uklanja dio fenolnih spojeva, o čemu su izvijestili Main i Morris (1994), Yildirim (2011) te Chagas i sur. (2012). Razlike između koncentracija ukupnih fenola pronađenih u različitim vinima nisu odgovarale zbroju razlika

utvrđenih za pojedinačne fenolne spojeve određene tekućinskom kromatografijom. Pretpostavljeno je da je bentonit uklonio i određenu količinu fenola koji nisu analizirani u ovom radu, između ostalih i one većih molekulskih masa, kao što su to naglasili Gonçalves i Jordão (2009) i Zoecklein i sur. (1990). Slično je u tvrđeno i u trećoj godini istraživanja (2017.) gdje su tretmani s primjenom bentonita u posljednjoj trećini trajanja fermentacije snizili koncentraciju ukupnih fenola u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 33). U stabilnim vinima (B) tretmana BK16 i kontrolnog tretmana K16 utvrđen je porast koncentracije ukupnih fenola u odnosu na vina istih tretmana nakon fermentacije (F), što su ranije zabilježili i Dordoni i sur. (2015b) iako bez statističke značajnosti. Pretpostavljena je mogućnost da se u razdoblju od završetka fermentacije (F) do nakon konačnog bistrenja (B) određen udio fenolnih spojeva desorbirao s bentonita i/ili ostalih čvrstih čestica na koje je mogao biti adsorbiran tijekom fermentacije.

Vrijedi naglasiti da je većina dosadašnjih istraživanja međudjelovanja fenola i bentonita i/ili proteina kao kontrolni parametar pratila koncentraciju ukupnih fenola ili taninske frakcije, a da su istraživanja o odzivu fenolnih spojeva manjih molekulskih masa u tom kontekstu bila iznimno rijetka. U ovom dijelu istraživanja utvrđen je jasan utjecaj primjene bentonita u fermentaciji na koncentracije različitih fenolnih spojeva prvenstveno u odnosu na kontrolni tretman. Razlike između pojedinih tretmana s različitim terminima primjene bentonita u fermentaciji bile su manje izražene, ali su utvrđene u više slučajeva. Prepostavljeno je da su te razlike prvenstveno bile posljedica promjena u vinu tijekom fermentacije, i to ne samo promjena u sastavu i koncentraciji fenola i proteina, već i u sastavu ostatka matrice vina koji je zasigurno utjecao na interakcije fenolnih spojeva s proteinima i s bentonitom. Analogne pojave najvjerojatnije su bile uzrok i razlikama u ponašanju određenih fenolnih spojeva u istim tretmanima u različitim godinama berbe.

5.3.2. Utjecaj načina primjene bentonita u fermentaciji

Fenolni sastav vina tretmana s postupnim dodavanjem bentonita u tri doze tijekom druge polovine trajanja fermentacije BKS16 većinom se nije razlikovao od onog dobivenog tretmanom primjene bentonita u jednoj cjelovitoj dozi u posljednjoj trećini fermentacije BK16: tretman BKS16 uglavnom je imao iste učinke kao i BK16 u odnosu na kontrolni tretman K16 (Tablica 15). Oba tretmana su tijekom fermentacije rezultirala značajnim sniženjem koncentracija većine hidroksibenzojevih kiselina u odnosu na kontrolni tretman K16, očuvanjem koncentracija hidroksicinamoiltartarata i sniženjem koncentracija slobodnih

hidroksicimetnih kiselina, sniženjem koncentracije katehina i taksifolina, očuvanjem koncentracija dimera flavan-3-ola i *trans*-piceida, te sniženjem koncentracije ukupnih fenola. Iz dobivenih rezultata bilo je očito da postupno bistrenje u tri doze u tretmanu BKS16 nije rezultiralo značajnijim dodatnim učinkom na koncentracije fenolnih kiselina u odnosu na bistrenje u jednoj dozi u tretmanu BK16, iako je očekivano da će se zbog načina primjene bentonita u BKS16 tretmanu (prva doza dodana je ranije, a tri doze dodavane su postupno pa je ostvaren dulji kontakt čestica bentonita i vina nego u tretmanu BK16) dogoditi i ranija i trajnija inhibicija djelovanja esteraza u fermentaciji te da će taj tretman rezultirati višom koncentracijom očuvanih *trans*-hidroksicinamoiltartarata. Vjerojatno je i inhibicijski učinak na polifenil-oksidaze (Main i Morris, 1994) bio podjednak u oba tretmana, što se najviše iskazalo nakon fermentacije prilikom pretoka kroz očuvane više koncentracije fenolnih spojeva u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16. Nakon fermentacije (F), vina tretmana BK16 i BKS16 razlikovala su se jedino na osnovi koncentracije *trans*-kutarne kiseline koja je bila niža u vinu BKS16, ali i dalje viša nego u vinu kontrolnog tretmana K16, te na osnovi koncentracije taksifolina koja je bila najniža u vinima tretmana postupnog bistrenja u tri doze BKS16. Spomenute manje razlike između vina BK16 i BKS16 tretmana mogle su djelomično biti posljedica upravo različite dinamike dodavanja bentonita i adsorpcije fenola na bentonit tijekom fermentacije. Nakon dodatnog bistrenja (B), među hidroksibenzojevim kiselinama, koncentracija galne kiseline bila je značajno viša, a koncentracija siringinske kiseline niža u tretmanu postupnog bistrenja BKS16 u odnosu na tretman s cjelovitom dozom bentonita BK16. Koncentracija epikatehina se nakon dodatnog bistrenja značajno povisila samo u vinu BK16 tretmana. Nakon dodatnog bistrenja (B) razlike između vina BKS16 i BK16 tretmana bile su nešto izraženije u odnosu na odgovarajuća djelomično stabilna vina nakon fermentacije (F). U većini slučajeva, nakon dodatnog bistrenja više koncentracije fenolnih spojeva pronađene su u vinu BK16 tretmana. Dodatno bistrenje (B) nije značajno utjecalo na koncentraciju ukupnih fenola u vinu BKS16 tretmana, za razliku od značajnog pozitivnog utjecaja u vinu BK16 tretmana. Moguće je da su se zbog različitog načina primjene bentonita tijekom fermentacije (F) određeni (različiti) fenolni spojevi na različit način adsorbirali na bentonit i/ili druge čestice u vinima BK16 i BKS16 tretmana, što je uvjetovalo različit stupanj njihove desorpcije u razdoblju između dva uzorkovanja (F i B). Općenito je pretpostavljeno da je nakon fermentacije (F) između vina tretmana BK16 i BKS16 moglo biti razlika u sastavu spojeva koji nisu istraživani, što je moglo utjecati na razliku u učinku bentonita pri dodatnom bistrenju (B).

5.3.3. Utjecaj načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji

Tretman bistrenja u fermentaciji s bentonitom pripremljenim u deioniziranoj vodi BKDEI16 uglavnom je imao vrlo slične učinke kao i tretman s bentonitom pripremljenim u vodovodnoj vodi BK16 u odnosu na kontrolni tretman K16. Utvrđeno je značajno sniženje koncentracija većine hidroksibenzojevih kiselina, očuvanje koncentracija hidroksicinamoiltartarata, smanjenje koncentracija slobodnih hidroksicimetnih kiselina, smanjenje koncentracije katehina i taksifolina, očuvanje koncentracija dimera flavan-3-ola i *trans*-piceida te sniženje koncentracija ukupnih fenola (Tablica 21). Nakon fermentacije (F) vino BKDEI16 tretmana imalo je značajno višu koncentraciju *cis*-kutarne kiseline i procijanidina B2 te nižu koncentraciju taksifolina i ukupnih fenola u odnosu na vino BK16 tretmana. Kationi kalcija (Ca^{2+}) iz vodovodne vode relativno visokog stupnja tvrdoće (320 mg/L u odnosu na 0 mg/L $CaCO_3$ u deioniziranoj vodi) mogli su zamijeniti katione natrija Na^+ između lamela bentonita, što je moglo imati utjecaj na njegovu strukturu i adsorptivna svojstva (Kawatra i Ripke, 2003) te rezultirati različitim djelovanjem bentonita pripremljenog u vodovodnoj vodi i bentonita pripremljenog u deioniziranoj vodi na pojedine, odnosno ukupne fenolne spojeve. Vrijedi imati na umu da su za adsorpciju fenolnih spojeva manjih molekulskih masa kakvi su istraživani u ovom radu zaslužni manji tzv. džepovi izražene hidrofobnosti (Di Gaspero i sur., 2020) na čiju aktivnost zamjena kationa može imati relativno značajan utjecaj. Razlike između stabilnih vina (B) tretmana BKDEI16 i BK16 bile su izraženije u odnosu na odgovarajuća djelomično stabilna vina nakon fermentacije (F). U većini slučajeva, više koncentracije fenolnih spojeva pronađene su u vinu BK16 tretmana. Nakon dodatnog bistrenja utvrđena povišenja koncentracija pojedinih kao i ukupnih fenola mogla su biti posljedica njihove desorpcije s čvrstih čestica u razdoblju između dva uzorkovanja (F i B).

5.3.4. Utjecaj primjene tanina u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji

Tretmani u kojima je istraživan učinak primjene enoloških tanina T16, odnosno kombinirane primjene tanina i bentonita u fermentaciji BKT16, rezultirali su određenim značajnim razlikama u odnosu na tretman primjene bentonita u zadnjoj trećini fermentacije bez dodatka tanina BK16 i kontrolni tretman K16 (Tablica 27). Među hidroksibenzojevim kiselinama, u vinima tretmana u kojima je dodavan tanin T16 i BKT16 isticale su se izrazito više koncentracije galne i siringinske kiseline. Kako je primijenjeni enološki pripravak deklariran kao čisti galotanin, što znači da njegovu strukturu čine središnja molekula glukoze supstituirana s jedinicama galne kiseline (npr. pentagaloil-glukoza) (Harbertson i sur., 2012),

galna kiselina mogla se tijekom fermentacije osloboditi hidrolizom galotanina (Jourdes i sur., 2013), ali je moguće i da je već bila u sastavu pripravka tanina u slobodnom obliku. Neves i sur. (2010) također su pronašli više koncentracije galne kiseline u crnim vinima nakon primjene pripravaka s taninima iz grožđa u fermentaciji i nakon fermentacije, i to u slučaju kada je galna kiselina bila sastojak pripravka, ali i u slučaju kada nije identificirana u ekstraktu pripravka. Potonji rezultat autori su pojasnili činjenicom da je upotrijebljeni taninski pripravak sadržavao visoku koncentraciju polimernih proantocijanidina koje karakterizira visok stupanj galoilacije i iz kojih se tijekom vinifikacije pri pH vina mogu osloboditi značajne količine slobodne galne kiseline. Većina ostalih hidroksibenzojevih kiselina, kao što su protekatehuinska, *p*-hidroksibenzojeva i 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina, očuvana je u višim koncentracijama u vinu kontrolnog tretmana K16, dok je najizraženije sniženje utvrđeno u vinima tretmana u kojima je primijenjen bentonit u fermentaciji BK16 i BKT16, najvjerojatnije zbog adsorpcije spomenutih fenola na bentonit. Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracija galne kiseline u vinima tretmana s dodatkom tanina T16 i BKT16 porasla je. Moguće je da je konačna koncentracija galne kiseline u gotovim, proteinski stabilnim vinima (B) bila rezultat dvaju pretpostavljenih utjecaja sa suprotnim predznakom: konačnog bistrenja dodatnom dozom bentonita pri čemu je dio galne kiseline uklonjen adsorpcijom na bentonit i taloženjem, nasuprot hidrolizi prirodno prisutnih i/ili dodanih tanina tijekom kratkotrajnog dozrijevanja vina pri čemu je oslobođena viša koncentracija slobodnog oblika galne kiseline u odnosu na onu uklonjenu. Slični procesi (adsorpcija i kemijske promjene) vjerojatno su utjecali i na promjene u koncentraciji siringinske kiseline, koja je, međutim, u stabilnim vinima (B) bila niža nego nakon fermentacije (F), iako i dalje značajno viša u vinima T16 i BKT16 u odnosu na vina K16 i BK16 tretmana.

Kao i u prethodnim slučajevima u ovom istraživanju, uočen je karakterističan obrazac promjena koncentracija hidroksicinamoiltartarata i odgovarajućih slobodnih hidroksicimetnih kiselina: vina tretmana koji su uključivali primjenu bentonita u fermentaciji BK16 i BKT16 sadržavala su više koncentracije glavnih hidroksicinamoiltartarata (*trans*-kaftarne, *trans*-kutarne i *trans*-fertarne kiseline) u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16, što je vjerojatno posljedica već spomenute inhibicijske aktivnosti bentonita prema hidrolitičkim enzimima (Main i Morris, 1991; Jaeckels i sur., 2015) (Tablica 27). U ovom slučaju primijećen je i pozitivan učinak tretmana s dodatkom tanina bez bentonita T16 na koncentracije spomenutih fenola, iako manje izražen u odnosu na tretmane s bentonitom. Dio hidroksicinamoiltartata, prvenstveno kaftarna kiselina, jako je podložan oksidaciji pri čemu

nastaju *o*-kinoni i drugi produkti oksidacije (Cheynier i sur., 1991). Tanini su poznati kao antioksidansi (Hagerman i sur., 1998b) i moguće je da su svojim antioksidativnim djelovanjem zaštitili hidroksicinamoiltartarate od oksidacije. Najviše koncentracije pronađene su u vinima tretmana s kombiniranom primjenom tanina i bentonita BKT16, a najniže u vinima kontrolnog tretmana K16, i to nakon fermentacije (F) i nakon dodatnog bistrenja (B). Činjenica da su i tanin i bentonit primijenjeni u fermentaciji u zasebnim tretmanima T16 i BK16 imali značajan pozitivan učinak te da su najviše koncentracije glavnih predstavnika, kao što su *trans*-kaftarna i *trans*-kutarna kiselina, pronađene u kombiniranom tretmanu BKT16, dokazala je njihov sinergijski učinak na očuvanje koncentracija hidroksicinamoiltartarata. Nakon dodatnog bistrenja (B) odnosi koncentracija spomenutih hidroksicinamoiltartarata između tretmana ostali su uglavnom isti, uz manji porast primijećen za *trans*-fertarnu kiselinu u vinima svih tretmana. Međutim, koncentracije *cis*- oblika, a pogotovo *cis*-kaftarne kiseline, dodatnim su bistrenjem (B) značajno snižene što je moglo biti posljedica adsorpcije na bentonit, iako je vjerojatno da je došlo i do njihove hidrolize tijekom pretoka ili kratkotrajnog dozrijevanja vina (Monagas i sur., 2005). Koncentracije odgovarajućih slobodnih hidroksicimetnih kiselina, kafeinske, *p*-kumarne i ferulinske kiseline, bile su više u vinima koja nisu bistrena bentonitom u fermentaciji, K16 i T16, i nakon fermentacije (F) i nakon dodatnog bistrenja (B). Tanin je u fermentaciji u tretmanu T16 pokazao zaštitni učinak na koncentracije slobodnih hidroksicimetnih kiselina, iako je moguće da su više koncentracije u odnosu na tretmane s bentonitom BK16 i BKT16 posljedica većeg stupnja hidrolize hidroksicinamoiltartarata. Vrijedi istaknuti nižu koncentraciju kafeinske kiseline u vinu T16 u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16, što se može izravno dovesti u vezu s obrnutim odnosom koncentracija njenog prekursora *trans*-kaftarne kiseline u vinima dva spomenuta tretmana, odnosno pretpostavljenim smanjenim stupnjem hidrolize *trans*-kaftarne kiseline u vinu T16 tretmana. Nižu koncentraciju kafeinske kiseline u vinu proizvedenom s dodatkom tanina u odnosu na vino kontrolnog tretmana pronašli su i Neves i sur. (2010), dok Ghanem i sur. (2017) u analognom eksperimentu nisu utvrdili razlike. U stabilnim vinima (B) primijećene su značajno više koncentracije kafeinske i *p*-kumarne kiseline u odnosu na ista vina nakon fermentacije (F), što je moguće posljedica hidrolize *cis*-izomera kaftarne i kutarne kiseline, dok je koncentracija ferulinske kiseline ostala otprilike ista u većini tretmana.

U ovom istraživanju nije utvrđen učinak tretmana s primjenom tanina T16 i BKT16 na koncentracije monomernih flavan-3-ola nakon fermentacije (F), što je bilo u skladu s

rezultatima koje su dobili Ghanem i sur. (2017), ali ne i s rezultatima Neves i sur. (2010) koji su utvrdili porast koncentracija katehina i epikatehina proporcionalan koncentraciji dodanog pripravka s taninom. U potonjoj studiji visoke koncentracije katehina i epikatehina pronađene su i u ekstraktima oba istraživana pripravka na osnovi tanina. Nakon fermentacije (F), značajne razlike između tretmana utvrđene su za koncentracije procijanidina B1 i B2 (Tablica 27). Značajno viša koncentracija procijanidina B1 pronađena je u vinima tretmana u kojima je tanin primijenjen u fermentaciji, T16 i BKT16. Procijanidin B1 mogao je biti sastavni dio pripravka tanina ili nastati hidrolizom taninskih polimera (Haslam, 1980) iz pripravka. Obreque-Slíer i sur. (2009) su analizirajući različite komercijalne enološke pripravke tanina primijetili da se u nekim slučajevima stvaran kemijski sadržaj pripravka značajno razlikuje od navedenih informacija na deklaraciji. Svi pripravci enoloških tanina analizirani u spomenutom istraživanju su pored samih tanina sadržavali i značajne količine galne kiseline i monomernih i dimernih flavan-3-ola, pa je moguće da je pripravak primijenjen u ovom istraživanju, iako deklariran kao čisti galotanin, osim fenolnih kiselina sadržavao i flavan-3-ole. S druge strane, koncentracija procijanidina B2 bila je najniža u vinima tretmana u kojima je tanin primijenjen u fermentaciji, T16 i BKT16 (Tablica 27). Jedna od pretpostavljenih mogućnosti je i interakcija procijanidina B2 s drugim taninima iz enološkog pripravka, uključujući adsorpciju i kompleksiranje te moguće naknadno učinkovitije uklanjanje takvih kompleksa bentonitom. Takav rezultat bio je u suglasju sa saznanjima Ghanem i sur. (2017) koji su pretpostavili da je utvrđeni negativan učinak primjene komercijalnog enološkog pripravka na bazi kondenziranih tanina iz grožđa na koncentraciju procijanidina B2 u crnom vinu (-34,1 %) u njihovom istraživanju bio posljedica polimerizacije tanina i procijanidina B2. Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracije procijanidina B1 nisu se promijenile, dok su koncentracije procijanidina B2 značajno porasle (Tablica 27), moguće zbog hidrolize određenih tanina iz enološkog pripravka ili hidrolize polimera ili kompleksa tanina i procijanidina B2 nastalih tijekom fermentacije, tijekom kratkog perioda dozrijevanja između dva uzorkovanja (F i B).

Fermentacija uz prisutnost bentonita (F) utjecala je na sniženje koncentracije taksifolina (Tablica 27). Moguće je da je bentonit tijekom fermentacije adsorbirao određeni udio prekursora taksifolina i na takav način umanjio njegovu koncentraciju, jer je povišenje koncentracije istog spoja nakon dodatnog bistrenja (B) ukazalo na mogućnost da bentonit izravno ne uklanja taksifolin u značajnijoj mjeri. Moguće je da je povišenje koncentracije taksifolina u vinima nakon dodatnog bistrenja (B) bilo rezultat transformacije drugih spojeva. Tretmani s bentonitom u fermentaciji rezultirali su višim koncentracijama *trans*-piceida u

odnosu na kontrolni tretman K16, najvjerojatnije jer je bentonit djelomično ograničio djelovanje hidrolitičkih enzima, iako je i u vinu tretmana T16 utvrđena viša koncentracija nego u vinu kontrolnog tretmana K16. Suprotno tome, u istraživanju Neves i sur. (2010) utvrđen je relativno slab, ali statistički značajan negativan utjecaj primjene pripravaka s taninom na koncentraciju *trans*-piceida.

Niz neidentificiranih fenolnih spojeva detektiran u vinima tretmana T16 i BKT16 u kojima je primijenjen tanin u fermentaciji s i bez bentonita upućivao je na kompleksan sastav korištenog komercijalnog enološkog pripravka s taninima. Moguće je da su navedeni neidentificirani spojevi u istraživana vina dospjeli izravno iz pripravka u neizmijenjenom obliku, da su bili rezultat hidrolize dodanih tanina ili pak rezultat nepoznatih interakcija sastojaka dodanog pripravka s drugim spojevima prisutnim u vinu. Iako je pripravak dodavan u jednakim koncentracijama i na isti način, koncentracije pojedinačnih neidentificiranih spojeva porijeklom iz dodanog taninskog pripravka u vinima tretmana T16 i BKT16 značajno su se razlikovale. Pojedini neidentificirani spojevi bili su zastupljeniji u tretmanu bez primjene bentonita T16 (T1, T2, T3 i T9), dok je za ostale utvrđeno suprotno (T6, T7 i T8). Isto tako, koncentracije pojedinih neidentificiranih spojeva nakon dodatnog bistrenja (B) bile su niže (T1, T2, T3, T6, i T9), dok su koncentracije ostalih (T4, T5, T7 i T8) bile povišene u odnosu na koncentracije nakon fermentacije (F). Kako je prisutnost bentonita jedini čimbenik na osnovi kojeg su se dva uspoređivana tretmana razlikovala, jasno je da je tijekom i nakon fermentacije došlo do značajnih interakcija između bentonita i tanina, što je potvrdilo ranija saznanja o tome (Yıldırım, 2011; Dordoni i sur., 2015b).

Sukladno očekivanjima, koncentracije ukupnih flavonoida i fenola bile su značajno najviše u vinima tretmana T16 i BKT16 u kojima je tijekom fermentacije dodana doza pripravka s taninima, iz jednostavnog razloga jer je određena količina flavonoida, odnosno ukupnih fenola u vina spomenutih tretmana dospjela iz dodanog pripravka. Tretman s primjenom bentonita bez dodatka tanina u fermentaciji BK16 imao je značajan negativan utjecaj na koncentraciju ukupnih flavonoida u odnosu na kontrolni tretman K16, što nije utvrđeno za koncentraciju ukupnih fenola. Koncentracija ukupnih flavonoida u vinu BK16 tretmana nakon fermentacije (F) bila je za otprilike 30 % niža od one pronađene u vinu kontrolnog tretmana K16. Navedeno upućuje da je primijenjeni bentonit pokazao značajniji afinitet ka adsorpciji flavonoida nego nekih drugih skupina fenola. Značajno sniženje koncentracije ukupnih flavonoida nakon dodatnog bistrenja (B) u vinima većine tretmana, a posebno u vinima BK16 i kontrolnog K16 tretmana gdje je iznosilo otprilike 50 % u odnosu na koncentracije nakon

fermentacije (F), potvrdilo je negativan utjecaj bentonita na fenolne spojeve iz te skupine. Slično su primijetili i Main i Morris (1994) koji su zabilježili sniženje koncentracije flavonoida od 21 % bistrenjem bijelog vina bentonitom u fermentaciji te su utvrdili da je bentonit imao veći utjecaj na sniženje koncentracije flavonoida nego neflavonoidnih fenolnih spojeva. Manji gubitak ukupnih polifenola, flavonoida i neflavonoida (5, 6 i 4 %) primijetili su Puig-Deu i sur. (1996) kao posljedicu primjene bentonita prije fermentacije mošta bijelog grožđa. Pretpostavljeno da je glavnina flavonoida uklonjenih iz vina BK16 tretmana u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 pripadala skupinama većih molekulskih masa, jer analogan obrazac nije utvrđen za većinu flavonoida nižih molekulskih masa (npr. flavan-3-ola) koji su u ovom istraživanju određeni tekućinskom kromatografijom. Povišenje koncentracija ukupnih fenola nakon dodatnog bistrenja (B) koje je bilo statistički značajno u vinima BK16 i kontrolnog K16 tretmana najvjerojatnije je bilo posljedica desorpcije određenih skupina fenola tijekom kratkotrajnog razdoblja dozrijevanja između dva termina uzorkovanja (F i B).

5.3.5. Utjecaj temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji

Povišenje temperature tijekom bistrenja u fermentaciji (F) pozitivno je djelovalo na koncentraciju galne kiseline te je viša koncentracija pronađena u tretmanu BKTMP17 (18 °C) u odnosu na tretman BK17 (16 °C) (Tablica 33). Temperatura bistrenja nije utjecala na koncentracije ostalih fenolnih kiselina. Koncentracija katehina s tirosolom također je bila viša u vinu tretmana BKTMP17 nego u vinu tretmana BK17, odnosno podjednaka s onom u kontrolnom tretmanu K17. Dobiveni rezultati djelomično su u skladu sa saznanjima Liu i sur. (2018) i Samoticha i sur. (2019) koji su pri višim temperaturama fermentacije u proizvodnji vina od grožđa, odnosno kakija pronašli više koncentracije brojnih fenolnih spojeva, uključujući galnu kiselinu i katehin, odnosno ukupne fenolne kiseline. Iako je u ovom istraživanju trajanje fermentacije pri različitim temperaturama bilo relativno kratko (48 h) te je i sama razlika u temperaturi bila relativno mala (2 °C), nije isključena mogućnost da je viša temperatura fermentacije utjecala na slabiju adsorpciju galne kiseline i katehina na aktivna mjesta na bentonitu. Također je pretpostavljena mogućnost da je viša temperatura pospješila hidrolizu tanina podrijetlom iz grožđa i oslobađanje njihovih građevnih jedinica, uključujući galnu kiselinu i katehin. Povišenje temperature također je utjecalo na razlike u koncentraciji *trans*-piceida kojeg je pronađeno više u vinu tretmana BKTMP17 nego u vinu tretmana BK17. Navedeno je donekle u neslaganju s činjenicom da aktivnost β-glukozidaze raste s povišenjem temperature, postižući optimum na puno višim temperaturama od onih

primijenjenih u ovom istraživanju (Baffi i sur., 2013), međutim nije isključena ni mogućnost da je pri višoj temperaturi bentonit imao slabiji inhibitorni učinak na djelovanje β-glukozidaze i hidrolizu *trans*-piceida.

Na razini ukupnih fenola povišenje temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji u tretmanu BKTMP17 nije imalo značajno drugačiji utjecaj u odnosu na tretman BK17. Takav rezultat bio je u skladu s prethodnim istraživanjima. Povišena temperatura fermentacije od 20 u odnosu na 15 °C u istraživanju Liu i sur. (2018) rezultirala je samo 4 % višom koncentracijom ukupnih fenola, ali bez statistički značajne razlike. U istraživanju Samotiche i sur. (2019) prosječna koncentracija ukupnih fenola u vinu nakon fermentacije pri 20 °C bila je čak 37 % viša nego nakon fermentacije pri 12 °C, međutim, niti ta razlika nije bila statistički značajna. Koncentracija ukupnih fenola u vinu kontrolnog tretmana K17 porasla je nakon dodatnog bistrenja (B). Pretpostavljena je mogućnost da je dodatnim bistrenjem (B) uklonjena dodatna količina fenolnih spojeva te da je takva pojava imala snažniji utjecaj u kvantitativnom smislu od desorpcije fenola s čvrstih čestica, koja je bila pretpostavljeni uzrok povišenja koncentracije ukupnih fenola nakon dodatnog bistrenja (B) u vinima pojedinih tretmana u prethodnim godinama istraživanja, što je opisano u prethodnim poglavljima. Kao osnovni uzrok navedenim odstupanjima pretpostavljene su razlike između polazišnih sastava grožđa i mošta iz različitih godina istraživanja.

5.3.6. Utjecaj primjene dvostruke doze bentonita u fermentaciji (prebistrenje)

Tretman bistrenja tijekom fermentacije dvostrukom dozom bentonita u tretmanu BKDUP17 u odnosu na tretman s izvornom, jednostrukom dozom BK17 rezultirao je značajno višom koncentracijom galne kiseline (Tablica 38). Navedeno nije bilo u slaganju s podacima iz prve godine istraživanja gdje je utvrđeno da bistrenje tijekom fermentacije uzrokuje sniženje koncentracije galne kiseline u vinu (Tablica 4) uz pretpostavljenu adsorpciju određenog udjela te fenolne kiseline na bentonit. Primjena dvostruke doze bentonita uzrokovala je i povišenje koncentracije siringinske kiseline što je u skladu s rezultatima iz druge godine istraživanja (Tablica 5). S druge strane, moguće je da je utvrđeno sniženje koncentracije 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline (Tablica 38) djelomično posljedica njene adsorpcije na bentonit ili na molekule proteina koje su zatim uklonjene bentonitom, kao što je ranije pokazano za kafeinsku kiselinu (Toledo i sur., 2017).

Za razliku od istovjetnog tretmana u prve dvije godine istraživanja (Tablice 4 i 5), bistrenje izvornom dozom bentonita BK17 nije rezultiralo očuvanjem viših koncentracija

hidroksicinamoiltartarata u odnosu na one pronađene u vinu kontrolnog tretmana K17. Navedeno je ipak postignuto primjenom dvostruke doze u tretmanu BKDUP17 te je vino tog tretmana sadržavalo najviše koncentracije dva najvažnija predstavnika ove skupine fenola, *trans*-kaftarne i *trans*-kutarne kiseline (Tablica 38). S druge strane, koncentracija većine slobodnih hidroksicimentnih kiselina bila je viša u vinu kontrolnog tretmana K17, a bentonit u fermentaciji je djelovao jednako negativno neovisno o dozi, odnosno tretmanu. Takav rezultat potvrdio je osnovanost pretpostavke da je bentonit, poznat po svom inhibicijskom djelovanju prema enzimima (Main i Morris, 1991; Jaeckels i sur., 2015), umanjio aktivnost esteraza odgovornih za hidrolizu hidroksicinamoiltartarata, odnosno ograničio oslobađanje slobodnih hidroksicimetnih kiselina iz esterskih kompleksa s vinskom kiselinom.

Najviše koncentracije epikatehina i procijanidina B2 u tretmanu s primijenjenom dvostrukom dozom bentonita BKDUP17 nisu bile u skladu s općenitom tezom da bentonit adsorbira i uklanja fenole iz vina (Main i Morris, 1994; Gonçalves i Jordão, 2009), odnosno da se procijanidin B2 može vezati za nestabilni protein nalik taumatinu iz grožđa VVTL1 (*Vitis vinifera* Thaumatin-Like-1) u kompleks koji se naknadno može ukloniti bentonitom (Di Gaspero i sur., 2020). Pretpostavljena je mogućnost da je viša, odnosno dvostruka doza bentonita dodatno ograničila djelovanje polifenol-oksidaza odgovornih za oksidaciju različitih fenola pa tako i flavan-3-ola (Cheynier i sur., 1991; Motta i sur., 2014), kao i da su do takvih promjena dovele u trenutku istraživanja nerazjašnjive složene interakcije između bentonita s fenolnim i ostalim spojevima. Primjena dvostruke doze pozitivno je utjecala i na koncentraciju *trans*-piceida što je poduprijelo pretpostavku da je primjena bentonita, ovaj put proporcionalno primijenjenoj dozi, umanjila aktivnost glukozidaza koje pokazuju hidrolitičku aktivnost prema tom spoju i razgrađuju ga na *trans*-resveratrol i šećerni ostatak (Jeandet i sur., 1994).

Bentonit u fermentaciji imao je podjednak negativan učinak na koncentraciju ukupnih fenola, neovisno o primijenjenoj dozi. Sniženje koncentracije od otprilike 11 % utvrđeno je u vinu BK17, odnosno otprilike 7,4 % u vinu BKDUP17 tretmana u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17. Za razliku od toga, 16 % viša doza primijenjena za dodatno bistrenje (B) nego tijekom fermentacije (F) u tretmanu BK17 (110 u odnosu na 95 g/hL) nije imala učinak na koncentraciju ukupnih fenola, a više nego dvostruko veća doza primijenjena za potpuno bistrenje vina kontrolnog tretmana K17 (210 u odnosu na 95 g/hL) rezultirala je sniženjem koncentracije ukupnih fenola od samo 5 %. Međutim, u tretmanu BKDUP17 uz više nego dvostruko nižu primijenjenu dozu bentonita za dodatno bistrenje (B) (43 g/hL) u odnosu na

ostala dva tretmana (210 i 110 g/hL), postignuto je značajnije sniženje koncentracije ukupnih fenola (14 %). Suprotno tome, Yildrim i sur. (2011) postigli su izraženije sniženje koncentracije ukupnih fenola primjenom dvostruke doze bentonita nakon fermentacije (14 % s 200 g/hL u odnosu na 7 % sa 100 g/hL). Ovakva neujednačenost odnosa primjenjene količine bentonita i stupnja sniženja koncentracije fenola utvrđenih u ovom i u prethodnim istraživanjima ukazala je na vjerojatnost značajnog utjecaja različitih drugih čimbenika na njihovu interakciju.

5.3.7. Utjecaj primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji

U istraživanju Dordoni i sur. (2015a) utvrđena je korelacija između stupnja uklanjanja proteina i stupnja uklanjanja polifenola iz vina nakon bistrenja bentonitom. Navedeno nije iznenađujuće jer je dokazano da fenolni spojevi i proteini stupaju u interakciju (Salazar i sur., 2006), pa se primjerice tanini, u uvjetima kad su hidrofobna vezna mjesta na proteinima dostupna (ponajviše nakon zagrijavanja i redukcije, Marangon i sur., 2010), hidrofobnim interakcijama mogu povezuti s proteinima (Siebert i sur., 1996b). Gline poput bentonita imaju hidrofilnu površinu (Schoonheydt i Johnston, 2013) i stoga slabiji kapacitet za vezanje organskih spojeva kakvi su i fenolni spojevi (Jiang i sur., 2002). Međutim, promjene kemijskog afiniteta površine bentonita mogu povećati učinkovitost uklanjanja neproteinskih organskih spojeva, uključujući i fenole. Kad se proteini adsorbiraju i prekriju površinu bentonita mijenjaju se karakteristike površine te je tako, posredstvom proteina, omogućeno uklanjanje hidrofobnih molekula iz vina i slojevita adsorpcija (Shamsuddin i sur., 2014). Ipak, uklanjanje fenolnih spojeva može se dogoditi i bez posredstva proteina, što podrazumijeva njihovu izravnu adsorbciju na bentonit, kao što su pokazali Dordoni i sur. (2015a). Oni su na primjeru bistrenja natrijem aktiviranim, a izvorno kalcijevim bentonitima, s određenim razlikama u elementarnom sastavu i bitnim fizikalnim karakteristikama, pokazali da je moguće postići različit stupanj uklanjanja proteina, ali i polifenola, ovisno o tipu bentonita. Stupanj uklanjanja polifenola ovisio je o karakteristikama bentonita i o pH vrijednosti vina te je u većoj ili manjoj mjeri bio u korelaciji sa stupnjem uklanjanja proteina, opet ovisno o pH vrijednosti. Bentonit s najvećom specifičnom površinom i najvećim negativnim nabojem površine pokazao se najučinkovitijim u uklanjanju fenolnih spojeva, čak i kad nije došlo do uklanjanja proteina, što govori da su se vrlo vjerojatno dogodile snažne kemijske interakcije, tj. izravna adsorpcija fenola na bentonit (Lambri i sur., 2013; Dordoni i sur., 2015a).

U ovom istraživanju različiti tipovi bentonita pokazali su različito djelovanje na koncentracije određenih fenolnih spojeva (Tablica 43). Sve značajne razlike utvrđene između tretmana s različitim bentonitima u odnosu na kontrolni tretman K17 imale su jednak predznak, neovisno o tipu bentonita. Primjena bentonita Mastervin Compact, SIHA Puranit i Pentagel (tretmani MVN17, PUR17 i PEN17) imala je negativan utjecaj na koncentraciju *p*-hidroksibenzojeve kiseline za razliku od CX Special Grain bentonita u tretmanu BK17 koji u fermentaciji nije utjecao na koncentraciju tog spoja. Tretman PEN17 imao je najznačajniji negativan utjecaj na koncentraciju 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline, posebno u odnosu na tretmane s BK17 i MVN17. Siringinska kiselina pronađena je u najnižoj koncentraciji u vinu kontrolnog tretmana K17, a najviša je koncentracija zabilježena nakon tretmana PEN17. Od hidroksicinamoiltartarata, utvrđene su razlike samo za koncentraciju *trans*-kutarne kiseline, pri čemu su tretmani koji su uključivali bistrenje bentonitom tijekom fermentacije imali pozitivan učinak, najizraženiji u slučaju PUR17 tretmana. Većina slobodnih hidroksicimetnih kiselina pronađena je u višim koncentracijama u vinu kontrolnog tretmanu, K17. Tretmani s primjenom različitih bentonita u fermentaciji jednako su značajno reducirali njihove koncentracije. Navedeno ponovno ide u prilog već iznesenoj pretpostavci da bentonit ograničava aktivnost hidrolitičkih enzima (Main i Morris, 1991; Jaeckels i sur., 2015) i oslobađanje slobodnih hidroksicimetnih kiselina iz esterskih kompleksa s vinskom kiselinom, iako razlike u koncentracijama hidroksicinamoiltartarata između vina tretmana s primjenom bentonita u odnosu na vino kontrolnog tretmana nisu utvrđene, osim u slučaju *trans*-kutarne kiseline. Tretmani bistrenja s različitim bentonitima podjednako su umanjili koncentraciju katehina s tirosolom u odnosu na kontrolni tretman K17. Nakon fermentacije (F), tretmani koji su uključivali bistrenje s različitim tipovima bentonita snizili su koncentraciju ukupnih fenola u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17, a utvrđeno je i da je utjecaj tretmana PUR17 bio izraženiji od onog tretmana PEN17. Dodatnim bistrenjem (B) snižena je koncentracija ukupnih fenola u vinu kontrolnog tretmana K17, dok isto nije zabilježeno u stabilnim vinima (B) ostalih tretmana. Pretpostavljeno je da je doza upotrijebljena za potpuno bistrenje vina kontrolnog tretmana K17 od 210 g/hL bila dovoljno visoka da adsorbira određeni udio fenola, dok su doze od 83, 40 i 83 g/hL primijenjene u tretmanima MVN17, PUR17 i PEN17 bile nedovoljne za takav učinak.

Utvrđene razlike u učinku na pojedinačne i ukupne fenole vjerojatno su bile posljedica različitih svojstava bentonita, prvenstveno različitih udjela Na^+ i Ca^{2+} kationa u strukturi koji utječu na razmak između lamela i time na adsorptivna svojstva bentonita, a zatim i njegovog specifičnog naboja po jedinici površine, specifične površine, indeksa bubrenja, pH bentonita i

ostalih svojstava (Kawatra i Ripke, 2003; Sun i sur., 2007; Lambri i sur., 2016) koja u ovom istraživanju nisu analizirana. Na primjer, SIHA Puranit upotrijebljen za djelomično bistrenje u fermentaciji u tretmanu PUR17 deklariran je kao Na-Ca bentonit te je sadržavao viši udio Ca^{2+} kationa u svojoj lamelarnoj strukturi u odnosu na natrijem aktivirane (Na) bentonite iz tretmana BK17 i PEN17. Bentonit Mastervin Compact (tretman MVN17) također je aktivirani natrijev (Na) bentonit, ali u svojoj strukturi sadrži umrežen silicij koji je vjerojatno zaslužan za određene specifičnosti u adsorptivnosti. Valja istaknuti da primijenjene doze različitih bentonita u fermentaciji nisu bile ekvivalentne ni prema upotrijebljenoj količini ni prema relativnoj učinkovitosti u djelomičnom uklanjanju nestabilnih proteina u fermentaciji, pa je pretpostavljeno da je i to jedan od uzroka utvrđenih razlika u njihovom utjecaju na fenolni sastav istraživanih vina.

5.4. Hlapljivi spojevi arome

5.4.1. Utjecaj trenutka primjene bentonita u fermentaciji

U ovom dijelu istraživanja utvrđen je značajan učinak trenutka primjene bentonita u fermentaciji na koncentracije slobodnih hlapljivih spojeva arome (Tablice 6, 7 i 34). Utvrđeni su određeni ponavljajući obrasci, ali je, nasuprot tome, odziv pojedinih spojeva na primjenu istih tretmana bio različit u različitim godinama istraživanja. Slično su već ranije utvrdili Lambri i sur. (2012b) te Vela i sur. (2017) pa je pretpostavljeno da su značajnu ulogu odigrali i čimbenici kao što je različita godina berbe, odnosno različit sastav polaznog mošta i promjene njegova sastava tijekom fermentacije.

Prve godine istraživanja (2015.) nakon fermentacije (F) je uočen negativan učinak bistrenja bentonitom tijekom fermentacije na koncentraciju slobodnog citronelola u vinu (Tablica 6), dok je u drugoj godini (2016.) bistrenje u posljednjoj trećini trajanja fermentacije u tretmanu BK16 negativno utjecalo na koncentraciju slobodnog linalola (Tablica 7). Treće godine istraživanja (2017.) istovjetni tretman bistrenja BK17 negativno je utjecao na koncentracije slobodnih β-pinena i 3-karena (Tablica 34), a pozitivno na koncentraciju slobodnog linalola (za razliku od negativnog učinka zabilježenog druge godine istraživanja (Tablica 7)), odnosno citronelola i geraniola (za razliku od prve godine istraživanja kada je zabilježem negativan učinak, odnosno nije bilo učinka (Tablica 6)).

Nakon dodatnog bistrenja (B) povisile su se koncentracije pojedinih monoterpena u vinima svih ili većine tretmana, što je bilo izraženije u prvoj godini istraživanja (Tablica 6).

Pretpostavljena je mogućnost da uočen porast koncentracija nije bio rezultat izravnog djelovanja bentonita, već postupnog oslobađanja hlapljivih (slobodnih) aglikona nakon kemijske hidrolize odgovarajućih glikozidiranih prekursora (vezani linalol, α-terpineol i citronelol) ili oksidacije i drugih pretvorbi ostalih monoterpena (vezani hotrienol, α-terpineol i oksidi linalola) tijekom kratkog razdoblja dozrijevanja (Zoecklein i sur., 1997a). Izraženo sniženje koncentracija vezanih oblika većine najzastupljenijih monoterpenola (linalol, citronelol, nerol i geraniol) zabilježeno u prvoj godini istraživanja nakon dodatnog bistrenja (B) vina većine tretmana (Tablica 8) djelomično je potkrijepilo tu tezu. Dodatni tretman bentonitom (B) imao je negativan utjecaj na koncentraciju slobodnog geraniola u vinima pojedinih tretmana iz berbe 2015. godine (Tablica 6) te na koncentraciju terpendiola I u vinima iz berbe 2016. godine (Tablica 7). Dodatnim bistrenjem (B) u trećoj godini (2017.) značajno su se povisile koncentracije brojnih slobodnih monoterpena, a značajno snizile koncentracije većine najvažnijih monoterpena samo u BK17 tretmanu, tako da stabilna (B) vina BK17 i kontrolnog tretmana K17 nisu bila značajno različita na osnovi njihovih koncentracija (Tablica 34). Razlike nisu utvrđene niti između stabilnih (B) vina BS16, BK16 i K16 tretmana u drugoj godini istraživanja (Tablica 7). Značajnije razlike između stabilnih vina (B) različitih tretmana utvrđene su uglavnom u prvoj godini istraživanja, pri čemu je vino tretmana BK15 imalo najviše koncentracije linalola, hotrienola i α-terpineola, a najmanju koncentraciju citronelola (Tablica 6). Navedeni podatak je važan i iz razloga što najzastupljeniji monoterpenoli mogu značajno izravno doprinijeti mirisu i aromi vina. U ovom istraživanju koncentracija linalola u svim proizvedenim vinima bila je viša od odgovarajućeg praga osjetljivosti mirisa od 15 μg/L (Guth, 1997), iz čega slijedi da je utjecaj tog monoterpenola na aromu gotovih, stabilnih vina (B) pojedinih tretmana koji su uključivali bistrenje bentonitom u fermentaciji, kao što su BP15, BS15 i BK15 (Tablica 6), odnosno BK17 (Tablica 34), bio veći nego kod vina odgovarajućih kontrolnih tretmana, K15, odnosno K17. Iako koncentracije ostalih najzastupljenijih monoterpenola nisu prelazile odgovarajuće pragove osjetljivosti (α-terpineol 250 μg/L – Ferreira i sur., 2000b; citronelol 18 μg/L, geraniol 30 μg/L – Guth, 1997; nerol 15 μg/L – Zalacain i sur., 2007), njihov doprinos istraživanim vinima bio je moguć zahvaljujući ranije dokazanom tzv. sinergijskom utjecaju monoterpena na aromu (Ribérau-Gayon i sur., 2006b). Mirisi linalola i ostalih najzastupljenijih slobodnih monoterpenola obično se opisuju kao *cvjetni* ili nalik na miris ruže, osim α-terpineola čiji je miris uspoređivan i s mirisom kamfora te citronelola čiji miris podsjeća na *citruse* (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Lukić i sur., 2016). U svim je godinama istraživanja u vinima velike većine tretmana nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđen porast

koncentracije slobodnog α-terpineola (Tablice 6, 7 i 34). Za razliku od drugih najzastupljenijih monoterpenola, nije utvrđeno istovremeno sniženje koncentracije njegovog glikozidno vezanog oblika (Tablice 8 i 9), tako da je u ovom slučaju vjerojatnost hidrolize vezanog α-terpineola odbačena. U ranijim istraživanjima utvrđeno je da slobodni α-terpineol tijekom dozrijevanja vina nastaje konverzijom ostalih monoterpenola (Zoecklein i sur., 1997a; Oliveira i sur., 2008) što je najvjerojatnije i bio uzrok spomenutog porasta njegove koncentracije nakon dodatnog bistrenja (B).

Do danas objavljeni podaci o utjecaju bistrenja bentonitom na koncentracije monoterpena donekle su kontradiktorni. U većini istraživanja utvrđeno je da bistrenje bentonitom može sniziti koncentraciju monoterpena (Puig i Deu, 1996; Armada i Falque, 2007; Lambri i sur., 2012b; Burin i sur., 2016). Armada i Falqué (2007) primijetili su sniženje koncentracije linalola, nerola i geraniola te porast koncentracije α-terpineola i citronelola nakon bistrenja mošta kultivara *albariño* sa 60 g/hL bentonita, a Burin i sur. (2016) su nakon sličnog tretmana utvrdili sniženje koncentracije svih najzastupljenijih monoterpena. U dvogodišnjem istraživanju, Lambri i sur. (2012b) uočili su značajne gubitke ukupnih i pojedinačnih monoterpenola nakon bistrenja mošta prije fermentacije sa 100 g/hL bentonita, s tim da je učinak pretežno bio značajan samo u jednoj godini istraživanja, osim za linalol čije su se koncentracije snizile u obje godine. U oba slučaja, i kad je mošt bistren bentonitom i kad nije, vina su dodatno bistrena nakon fermentacije, što je imalo različit učinak ovisno o promatranom monoterpenu i o godini berbe. U nedavnom istraživanju, Ma i sur. (2020) utvrdili su da je bistrenje tzv. ledenog vina nakon fermentacije sa 100 g/hL bentonita do potpune proteinske stabilnosti dovelo do značajnog sniženja koncentracije nekolicine monoterpena. Slobodni linalol nije identificiran u bistrenom vinu iako je njegova koncentracija u vinu kontrolnog tretmana iznosila čak 500 μg/L, dok bentonit uopće nije utjecao na koncentraciju α-terpineola i citronelola. S druge strane, iako su zaključili da je hidrofobnost molekule važno svojstvo koje doprinosi adsorpciji hlapljivog spoja na bentonit, Vincenzi i sur. (2015) nisu utvrdili učinak bentonita na koncentracije monoterpena, koji su u osnovi hidrofobne molekule. U ovom istraživanju je za pojedine monoterpene nakon negativnog učinka bistrenja bentonitom tijekom fermentacije (F) uslijedio pozitivan učinak i porast koncentracije nakon dodatnog bistrenja (B) i obrnuto, što ide u prilog tezi da razlike između sastava mošta u fermentaciji i vina, odnosno razlike između sastava vina različitih kultivara, zemljopisnog podrijetla, berbi i slično, mogu biti odlučujući čimbenik o kojem ovise interakcije bentonita, proteina, hlapljivih spojeva arome, ali i ostalih spojeva iz

mošta/vina, kao i učinci bistrenja. Vrijedi istaknuti da je moguće da je bentonit, osim putem adsorpcije ili inhibicije enzimatske hidrolize odnosno oslobađanja iz glikozidno vezanih monoterpena, na koncentracije slobodnih hlapljivih monoterpena djelovao i posredno, utječući na ostale procese koji definiraju njihovu završnu koncentraciju u vinu, kao što su izomerizacija i ostale transformacije (Croteau, 1984; Zoecklein i sur., 1997b) te interakcija s kvascem (Di Stefano i sur., 1992).

Senzorski najznačajniji C_{13}-norizoprenoid, slobodni β-damaskenon, u prvoj je godini istraživanja nakon fermentacije (F) pronađen u višoj koncentraciji u vinima tretmana s primjenom bentonita tijekom fermentacije (BP15, BS15 i BK15) u odnosu na vina tretmana s primjenom bentonita prije fermentacije BGS15 i kontrolnog tretmana K15 (Tablica 6). Rezultati analognih tretmana u naredne dvije godine istraživanja pokazali su slične tendencije, iako blage i bez statističke značajnosti (Tablice 7 i 34). Moguće je da je bentonit dodan u mošt u tretmanu BGS15 adsorpcijom uklonio dio prekursora β-damaskenona, kao što su za prekursore terpena pretpostavili Lira i sur. (2015) nakon utvrđenog gubitka određene frakcije ukupnih terpena nakon bistrenja mošta. Različiti autori nisu utvrdili statistički značajan utjecaj bistrenja mošta i vina bentonitom na β-damaskenon (Vela i sur., 2017; Ma i sur., 2020), iako su Vela i sur. (2017) u jednoj od dvije godine istraživanja zabilježili jasne tendencije povišenja njegove koncentracije u vinima dobivenim nakon bistrenja u odnosu na nebistreno vino kontrolnog tretmana. Ranije se pokazalo da je pojava β-damaskenona u vinu, odnosno njegovo oslobađanje iz prekursora podrijetlom iz grožđa povezano s udjelom čvrstih čestica u fermentacijskom mediju te je pretpostavljeno da određene čestice mogu djelovati inhibicijski kao kompetitivni supstrati ili inhibitori procesa oslobađanja slobodnog β-damaskenona, odnosno adsorbirajući njegove prekursore (Lukić i sur., 2017b). Moguće je da su takve pojave bile uzrok više koncentracije β-damaskenona nakon fermentacije (F) u vinima tretmana BP15, BS15 i BK15 iz prve godine istraživanja u kojima je dio čvrstih čestica uklonjen bentonitom tijekom fermentacije (Tablica 6).

Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracija β-damaskenona u vinima svih tretmana u sve tri godine istraživanja značajno je snižena, ali su se istovremeno izmijenili i odnosi koncentracija u različitim vinima na način da više nije bilo značajnih razlika između tretmana (Tablice 6, 7 i 44). Navedeni podatak je posebno bitan i iz razloga jer je β-damaskenon zbog izuzetno niskog praga osjetljivosti od samo 0,05 μg/L (Guth, 1997) jedan od najutjecajnijih hlapljivih spojeva arome vina kojoj doprinosi mirisom nalik na mirise *voća*, posebno pirjane jabuke i šljive, te meda (Clarke i Bakker, 2004; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b, Li i sur., 2007). U vinima

proizvedenim u okviru ovog istraživanja koncentracije β-damaskenona bile su dva reda veličine više od spomenutog praga, što znači da je taj C_{13}-norizoprenoid imao vrlo važan i približno jednak utjecaj na miris i aromu gotovih, stabilnih vina (B) svih tretmana. Koncentracija β-damaskenona mogla se djelomično sniziti uslijed reakcije sa sumporovim dioksidom tijekom kratkog razdoblja dozrijevanja vina između dva termina uzorkovanja (F i B), kao što su ranije objavili Oliveira i sur. (2008). S druge strane, Armada i Falque (2007) zabilježili su povišenje koncentracije β-damaskenona u vinu nakon bistrenja bentonitom u odnosu na nebistreno vino kontrolnog tretmana. Koncentracije drugih C_{13}-norizoprenoida identificiranih u vinima u prvoj godini istraživanja (2015.), poput različitih izomera vitispirana i aktinidola koji su od manjeg značaja za senzorsku kvalitetu vina jer njihove koncentracije obično ne dostižu odgovarajuće pragove osjetljivosti, značajno su porasle nakon dodatnog bistrenja (B) (Tablica 6). Spomenuti porast vjerojatno je bio rezultat transformacije određenih norizoprenoidnih prekursora tijekom dozrijevanja, kako su pretpostavili Oliveira i sur. (2008).

U prvoj godini istraživanja (2015.), nakon fermentacije (F) najniža koncentracija slobodnih C_6-alkohola pronađena je u vinu tretmana BGS15 s primjenom bentonita u moštu prije fermentacije u odnosu na vina tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji (Tablica 6). Dobiveni rezultat bio je u skladu s rezultatima Armada i Falqué (2007) i Lira i sur. (2015) koji su također primijetili sniženje njihove koncentracije nakon bistrenja mošta prije fermentacije. Bentonit primijenjen u tako ranoj fazi proizvodnje vina vjerojatno je ograničio djelovanje enzima koji su odgovorni za cijepanje dugolančanih masnih kiselina i stvaranje C_6-aldehida i alkohola, lipoksigenaze i alkohol-dehidrogenaze, i to adsorpcijom i taloženjem ili izmjenom strukture kao što je ranije utvrđeno za druge enzime (Ough i sur., 1969; Main i Morris, 1994). Lambri i sur. (2010) primijetili su značajno sniženje koncentracije 1-heksanola nakon bistrenja vina bentonitom, međutim, bistrenje tijekom fermentacije i dodatno bistrenje vina nakon fermentacije u prvoj godini ovog istraživanja, kao i istovjetni tretmani BS16 i BK16 u drugoj i BK17 u trećoj godini istraživanja (Tablice 6, 7 i 44) očito nisu uklonili dovoljnu količinu ovog spoja da bi se utvrdile značajne razlike između vina pojedinih tretmana. Od identificiranih C_6-alkohola, samo je 1-heksanol pronađen u koncentracijama višim od odgovarajućeg praga osjetljivosti mirisa od 1,62 mg/L (Noguerol-Pato i sur., 2013), što znači da je izravno doprinosio aromi većine proizvedenih eksperimentalnih vina mirisima koji podsjećaju na svježe pokošenu zelenu travu, lišće i *bilje* (Moyano i sur., 2002; Clarke i Bakker, 2004; Moreno-Arribas i Polo, 2009). U prve dvije godine istraživanja u vinima

tretmana s primjenom bentonita nakon fermentacije (F) pronađena je niža koncentracija benzil-alkohola nego u vinima kontrolnih tretmana K15 i K16 (Tablice 6 i 7). Pretpostavljena je mogućnost da je bentonit u fermentaciji ograničio djelovanje hidrolitičkih enzima, uglavnom β-glukozidaza odgovornih za cijepanje glikozida benzil-alkohola tijekom fermentacije (Martin i sur., 2016) ili adsorbirao dio glikozida. Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracija benzil-alkohola u vinima različitih tretmana porasla je (Tablice 6 i 7), međutim odgovarajuće sniženje koncentracije glikozidno vezanog oblika benzil-alkohola nije utvrđeno (Tablice 8 i 9). Nakon dodatnog bistrenja (B) porasla je i koncentracija 1-okten-4-ola (Tablica 6).

Općenito, tretmani s primjenom bentonita tijekom fermentacije značajno su utjecali na sintezu i očuvanje hlapljivih spojeva fermentacijske arome. U prvoj godini istraživanja, nakon fermentacije (F) su u vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji pronađene više koncentracije 2-feniletanola u odnosu na vina kontrolnog tretmana K15 i tretmana bistrenja mošta prije fermentacije BGS15 (Tablica 6). Međutim, nakon dodatnog bistrenja (B) razlike više nisu bile statistički značajne. U druge dvije godine istraživanja nisu utvrđene razlike u koncentraciji 2-feniletanola između vina različitih tretmana (Tablice 7 i 34). 2-Feniletanol je alkohol koji uglavnom nastaje u fermentaciji dekarboksilacijom i redukcijom odgovarajuće α-ketokiseline, intemedijera u biosintezi i katabolizmu aminokiseline fenilalanin (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Sintezi viših alkohola pogoduje prisutnost čvrstih čestica u fementacijskom mediju (Aleixandre-Tudo i sur., 2015) na osnovi čega se ne bi mogle razjasniti razlike utvrđene u prvoj godini istraživanja, gdje je mošt kontrolnog tretmana K15 fermentirao nebistren i na kraju sadržavao najnižu koncentraciju (Tablica 6). Spomenuta pojava mogla je pak biti razlogom niže koncentracije 2-feniletanola u vinu BGS15 tretmana čiji je mošt bistren najranije, prije početka fermentacije. Međutim, vrijedi istaknuti da je u nedavnoj studiji pokazano da je bistroća mošta među najzastupljenijim višim alkoholima najmanji utjecaj imala upravo na koncentraciju 2-feniletanola u vinu (Lukić i sur., 2017b). U ovom istraživanju koncentracija 2-feniletanola u svim eksperimentalnim vinima bila je viša od utvrđenog praga osjetljivosti mirisa od 10 mg/L (Moreno i sur., 2005), što znači da je taj viši alkohol značajno doprinio njihovoj aromi. Miris 2-feniletanola obično je uspoređivan s mirisom cvijeta ruže (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a). Osim sintezom ili razgradnjom odgovarajuće aminokiseline u fermentaciji, manje količine 2-feniletanola dospijevaju u vino i hidrolizom glikozidnih prekursora iz grožđa, a dio ostaje u vinu u vezanom obliku te može hidrolizirati tijekom dozrijevanja vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). U prvoj godini

istraživanja utvrđene su značajne razlike između koncentracija vezanog oblika 2-feniletanola u vinima različitih tretmana koje nisu razjašnjene (Tablica 8). U drugoj godini niže koncentracije pronađene su u vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji BS16 i BK16 (Tablica 9), za što je pretpostavljeno da je posljedica adsorpcije glikozida 2-feniletanola na bentonit u fermentaciji.

Hlapljive kiseline nastaju u fermentaciji djelovanjem kvasca i bakterija. Kratkolančane se povezuju s bakterijskim kvarenjem vina (butanska, propanska i veći udio octene kiseline), a srednjelančane (heksanska, oktanska, dekanska i dodekanska) s djelovanjem kvasca, točnije metabolizmom lipida (Ribéreau-Gayon, 2006b). U odnosu na vina kontrolnog tretmana, vina tretirana bentonitom sačuvala su više koncentracije glavnih hlapljivih kiselina nakon fermentacije (F) u svim godinama, ali i nakon dodatnog bistrenja (B) u prvoj i trećoj godini istraživanja (Tablice 6, 7 i 34). Ranije je pokazano da prisutnost čvrstih čestica u fermentacijskom mediju može imati negativan učinak na koncentraciju hlapljivih kiselina u vinu. Pretpostavljeno je da je u tom slučaju u mediju prisutno više različitih supstrata koji se u odnosu na prekursore masnih kiselina ponašaju kompetitivno i ograničavaju njihovu sintezu, ili da čvrste čestice adsorbiraju masne kiseline (Callejón i sur., 2012; Lukić i sur., 2017b). Valero i sur. (2001) pokazali su da čvrsti dijelovi grožđa prisutni u moštu mogu inhibirati biosintezu hlapljivih masnih kiselina u stanicama kvasca, koji zbog toga moraju asimilirati masne kiseline već prisutne u moštu, što posljedično rezultira nižim koncentracijama u vinu. Ipak, objavljeni su podaci i o pozitivnoj korelaciji između udjela čvrste (suhe) tvari u moštu i koncentracija hlapljivih masnih kiselina u proizvedenom vinu (Callejón i sur., 2012; Wang i sur., 2016). U ovom istraživanju, nebistreni mošt kontrolnog tretmana cijelo je vrijeme trajanja fermentacije sadržavao najviši udio čvrste tvari, što se moglo povezati s ranije spomenutim negativnim utjecajem i smanjenom razinom sinteze, odnosno povećanom adsorpcijom masnih kiselina na čvrstu tvar (Valero i sur., 2001; Callejón i sur., 2012; Lukić i sur., 2017b). Međutim, relativno niže koncentracije masnih kiselina u vinu tretmana BGS15 čiji je mošt izbistren najranije, prije fermentacije, u kontradikciji su s takvim zaključkom. Unatoč tome što je ranije pokazano da bentonit može adsorbirati i ukloniti dio hlapljivih masnih kiselina (Lambri i sur., 2010; Ma i sur., 2020), moguće je da je primjena bentonita u fermentaciji ipak imala glavni pozitivni utjecaj na koncentracije masnih kiselina pronađene u vinima BP15, BS15, BK15, BS16, BK16 i BK17 tretmana, kao što je utvrđeno i za neke druge hlapljive spojeve (Tablice 6, 7 i 34). Slične pozitivne učinke bistrenja u različitim razdobljima fermentacije u odnosu na bistrenje mošta prije fermentacije i nebistreno

kontrolno vino na koncentracije predvadavajućih masnih kiselina srednjeg lanca utvrdili su i Lira i sur. (2015). Hlapljive masne kiseline čije su koncentracije u svim vinima višestruko premašivale odgovarajuće pragove osjetljivosti mirisa od 0,42 mg/L, odnosno 0,50 mg/L (Ferreira i sur., 2000b) bile su heksanska, odnosno oktanska kiselina, što upućuje da je njihov utjecaj na aromu bio izražen. Butanska i dekanska kiselina pronađene su u koncentracijama višim od odgovarajućih pragova osjetljivosti od 0,173 mg/L, odnosno 1 mg/L (Ferreira i sur., 2000b) samo u pojedinim vinima. Mirisi hlapljivih masnih kiselina opisivani su kao mirisi koji podjećaju na sir, masno i užeglo (Peinado i sur. 2004; Francis i Newton, 2005), iako se u nekim istraživanjima spominje i njihova *voćna* nota (Lorenzo i sur., 2015; Liu i sur., 2019). Bez obzira što njihovi mirisi nisu ugodnog karaktera kao npr. mirisi hlapljivih estera, ranije je utvrđeno da koncentracije ove dvije skupine spojeva obično međusobno koreliraju jer nastaju iz istih prekursora u fermentaciji te se podudaraju s višom senzorskom kvalitetom vina (Lukić i sur., 2008).

Hlapljivi esteri nastaju enzimskom esterifikacijom tijekom fermentacije i kemijskom esterifikacijom tijekom dozrijevanja vina. Najvažniji hlapljivi esteri nastaju esterifikacijom masnih kiselina i etanola (etilni esteri) te reakcijom acetil-CoA i viših alkohola (acetatni esteri) (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Među najvažnijim su spojevima koji sudjeluju u *cvjetnim* i *voćnim* notama mirisa i arome, posebno mladih i svježih bijelih vina, te jedan od jasnih kemijskih pokazatelja njegove kvalitete (Ferreira i sur., 1995). U vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji u prve dvije godine istraživanja (2015. i 2016.) sačuvane su više koncentracije većine prevladavajućih i najznačajnijih hlapljivih etilnih i acetatnih estera u odnosu na vina kontrolnih tretmana K15 i K16 nakon fermentacije (F) (Tablice 6 i 7). Navedeni učinak tretmana s bentonitom u fermentaciji bio je osobito izražen u slučaju acetatnih estera u prvoj godini istraživanja (Tablica 6). U trećoj godini istraživanja uočeni su slični trendovi, ali uglavnom bez statističke značajnosti (Tablica 34). Lukić i sur. (2017b) primijetili su da čvrste čestice u fermentacijskom mediju inhibiraju stvaranje estera, što bi moglo biti povezano s nižim koncentracijama estera u vinima kontrolnog tretmana K15 i K16 koja su proizvedena iz nebistrenog mošta, u odnosu na vina ostalih tretmana nakon fermentacije (F) (Tablice 6 i 7). U odnosu na vina tretirana s bentonitom u fermentaciji, u prvoj godini istraživanja se kao izuzetak istaknuo tretman bistrenja mošta prije fermentacije BGS15 koji je rezultirao nižim koncentracijama pojedinih estera (Tablica 6). Burin i sur. (2016) primijetili su negativan učinak bistrenja mošta kultivara *chardonnay* sa 70 g/hL bentonita na koncentracije hlapljivih estera koji su pripisali sniženju ukupnog sadržaja

njihovih prekursora, različitih spojeva s kvascu dostupnim dušikom. Rezultati tog kao i ovog istraživanja uglavnom su u skladu s onima Lire i sur. (2015) koji su otkrili da su vina tretirana bentonitom u kasnijim razdobljima fermentacije bogatija hlapljivim mirisnim esterima nego netretirana vina i vina u čijoj je proizvodnji bistren mošt prije fermentacije. Jedan od mogućih razloga tome bio je zaštitni učinak bentonita od djelovanja staničnih esteraza odgovornih za hidrolizu hlapljivih estera, koje su aktivnije pri kraju fermentacije (Mauricio i sur., 1993). Moguće je da je očuvanje koncentracije estera bilo povezano i s inhibitornim djelovanjem bentonita na aktivnost enzima polifenol-oksidaze u kasnijim razdobljima fermentacije, što je u prethodnom poglavlju (5.3.) povezano s ograničenjem oksidacije fenola. Polifenol-oksidaze pokreću niz kemijskih reakcija u kojima nastaju radikali semikinona i kinona, a u prisutnosti prijelaznih metala kisik se reducira u vodikov peroksid, što može dovesti do oksidacije estera i sniženja njihove koncentracije (Patrianakou i Roussis, 2013).

Nakon konačnog bistrenja bentonitom (B) i postizanja proteinske stabilnosti, koncentracije etilnih i acetatnih estera značajno su se snizile u prvoj godini istraživanja (Tablica 6). Unatoč tome što su vina bila zaštićena sumpornim dioksidom, do hidrolize estera je djelomično moglo doći uslijed oksidacije, jer pri postupcima pretoka i punjenja u boce u ograničenim eksperimentalnim uvjetima nije bilo moguće u potpunosti ograničiti prisutnost kisika iz zraka. Izgledno je da je sniženje koncentracija različitih estera nakon dodatnog bistrenja (B) barem djelomično bila i izravna posljedica primjene bentonita. Takva pretpostavka u skladu je s ranijim istraživanjima Vincenzi i sur. (2015) koji su pokazali da se primjenom bentonita u otopini modelnog vina značajno snižava koncentracija hlapljivih estera. Lambri i sur. (2010) primijetili su prilično velike gubitke većine važnih hlapljivih spojeva nakon bistrenja vina s bentonitom, ovisno o kojem se spoju radilo te o vrsti i dozi bentonita. Obje skupine autora (Lambri i sur., 2010; Vincenzi i sur., 2015) pretpostavile su mogućnost gubitka hlapljivih tvari deproteinizacijom, odnosno neizravnim uklanjanjem pri kojem se hidrofilniji esteri vodikovim vezama vežu na površinu, a hidrofobniji na vezna mjesta unutar strukture proteina i nakon toga uklanjaju bentonitom. Di Gaspero i sur. (2017) potvrdili su da se pojedini etilni esteri mogu vezati za VVTL1 protein pa su etil-oktanoat, etil-dekanoat i etil-dodekanoat poboljšavali, a etil-heksanoat slabio stabilnost strukture tog proteina. Lambri i sur. (2013) pokazali su da se različiti hlapljivi spojevi mogu i fizikalnim i kemijskim mehanizmima adsorbirati izravno na površinu bentonita, bez posredstva proteina ili drugih makromolekula. Autori su ustvrdili da se, primjerice, adsorpcija etilnih estera uglavnom odvija na osnovi kemijskih interakcija. Pokazali su da stupanj adsorpcije više ovisi o svojstvima bentonita,

poput omjera specifične površine i gustoće naboja, nego o svojstvima spoja. Time su se mogli objasniti i različitih rezultati, ovisni o godini berbe, koje su dobili Vela i sur. (2017), prema kojima su se u nekim slučajevima nakon primjene tretmana bentonitom nakon fermentacije koncentracije određenih estera povisile. U posljednje dvije godine istraživanja, u vinima tretmana koji su uključivali bistrenje u fermentaciji BS16, BK16 i BK17, nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđene su određene promjene u koncentracijama estera (Tablice 7 i 34) koje su bile puno manjeg intenziteta u usporedbi s istim promjenama u prvoj godini istraživanja (Tablica 6), ali su rezultirale time da se potpuno stabilna vina (B) iz druge i treće godine uglavnom nisu značajno razlikovala ni međusobno niti od vina kontrolnih tretmana K16 i K17. Različiti slučajevi u kojima bentonit nije utjecao na koncentraciju hlapljivih spojeva arome u suglasju su s istraživanjem Sanborn i sur. (2010) koji su nakon bistrenja vina kultivara *chardonnay* utvrdili manje ili nikakve promjene za veliku većinu istraživanih hlapljivih spojeva arome. Koncentracije pojedinih estera iz skupine ostalih estera povisile su se nakon dodatnog bistrenja (B) u pojedinim ili svim godinama istraživanja, vjerojatno prvenstveno zbog spontanih reakcija esterifikacije s ciljem postizanja ravnotežnih koncentracija u odnosu na koncentracije prekursora – alkohola i kiselina (Díaz-Maroto i sur., 2005; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

Etilni esteri masnih kiselina srednjeg lanca značajno doprinose aromi mladih i svježih, bijelih vina. Etil-oktanoat je zbog najnižeg praga osjetljivosti mirisa od 0,005 mg/L (Ferreira i sur., 2000b) i relativno visokih koncentracija u vinu najdominantniji po tom pitanju, što je potvrđeno i u ovom istraživanju (Tablice 6, 7 i 34). Njegov miris se obično opisuje kao *voćni*, a može podsjećati na jabuku, breskvu, krušku, ananas i bananu (Sánchez Palomo i sur., 2007). Etil-heksanoat je nositelj nijansi mirisa koji podsjećaju na zelenu jabuku te su njegove koncentracije pronađene u ovom istraživanju također višestruko premašivale odgovarajući prag osjetljivosti od 0,014 mg/L (Ferreira i sur., 2000b). Etil-butanoat, u godinama istraživanja u kojima je analiziran, te etil-dekanoat pronađeni su u koncentracijama koje su prelazile odgovarajuće pragove od 0,020 mg/L (Guth, 1997), odnosno 0,200 mg/L (Ferreira i sur., 2000b), te su vjerojatno dodatno doprinijeli voćnoj komponenti arome većine proizvedenih eksperimantalnih vina. Kao prag osjetljivosti mirisa etil-3-metilbutanoata, identificiranog jedino u trećoj godini istraživanja (Tablica 34), u ranijoj je studiji određena koncentracija od 3 μg/L, što znači da je taj ester također izravno sudjelovao u stvaranju arome vina proizvedenih u ovom istraživanju i to mirisom koji podsjeća na šumsko voće (Ferreira i sur., 2000b). Od acetatnih estera, zbog relativno najnižeg praga osjetljivosti (0,03 mg/L; Guth,

1997) u odnosu na pronađene koncentracije, najveći utjecaj na aromu proizvedenih vina najvjerojatnije je imao izoamil-acetat, čiji se miris redovito uspoređuje s mirisom banane (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Pronađena koncentracija 2-feniletil-acetata kretala se u rasponu čije su granice bile bliske odgovarajućem pragu osjetljivosti od 0,25 mg/L (Guth, 1997), što upućuje da je taj ester mogao doprinijeti aromi proizvedenih vina i izravno, ali vjerojatnije kroz sinergijsko djelovanje s esterima sličnog, *cvjetnog* mirisa. Koncentracija dietil-sukcinata u nijednom se proizvedenom vinu nije približila njegovom pragu osjetljivosti od 6 mg/L (Perestrelo i sur., 2006) pa je pretpostavljeno da utjecaj tog estera na aromu proizvedenih vina nije bio ključan. Koncentracije ostalih identificiranih estera bile su znatno niže od odgovarajućih pragova osjetljivosti ili pragovi osjetljivosti njihovih mirisa do danas nisu utvrđeni vjerojatno zbog zanemarivog utjecaja na aromu vina, pa je stoga zaključeno da njihov utjecaj u ovom istraživanju nije bilo izravan ni ključan, već da je mogao doprinijeti kompleksnosti arome.

Glikozidno vezani hlapljivi spojevi arome predstavljaju takozvanu pričuvu sortne arome jer mogu postupno hidrolizirati i otpuštati hlapljive, mirisne aglikone tijekom dozrijevanja vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Učinak tretmana bentonitom tijekom fermentacije (F) na koncentracije vezanih hlapljivih spojeva arome u prvoj je godini istraživanja bio uglavnom slab do umjeren (Tablica 8), u drugoj vrlo slab (Tablica 9), dok u trećoj godini vezani spojevi arome nisu istraživani. Među mnogim specifičnim ishodima od upitnog praktičnog značaja valja istaknuti utjecaj primijenjenih tretmana na koncentracije vezanih citronelola i nerola nakon fermentacije (F) u prvoj godini istraživanja, koje su bile najniže u vinu kontrolnog tretmana K15 (Tablica 8). Niže koncentracije tih spojeva uvjetno su mogle biti povezane s najvišom koncentracijom slobodnog citronelola zabilježenom u vinu kontrolnog tretmana K15 nakon fermentacije (F) (Tablica 6). Pretpostavljeno je da se u odsutnosti bentonita u moštu kontrolnog tretmana K15 enzimska hidroliza glikozidnog prekursora odvijala neometano te da je došlo do višeg stupnja hidrolize citronelola nego u vinima ostalih tretmana gdje je moguće da je bentonit ograničio aktivnost β-glukozidaze. Slično je opaženo i za druge, manje važne vezane spojeve (Tablica 8). U drugoj godini istraživanja uočen je suprotan slučaj s koncentracijom vezanog 2-feniletanola koja je bila niža u vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji nego u vinu kontrolnog tretmana K16 (Tablica 9). Pretpostavljeno je da utvrđene razlike nisu bile posljedica hidrolize glikozida, posebno zato jer nisu utvrđene odgovarajuće razlike u koncentraciji slobodnog 2-feniletanola (Tablica 7). Vjerojatnije je da se dio glikozidno vezanog 2-feniletanola adsorbirao na bentonit te je zatim uklonjen

taloženjem. Iako dokazi o međudjelovanju glikozidno vezanih spojeva arome i bentonita nisu pronađeni u literaturi, Zoecklein i sur. (1997a) i McMahon i sur. (1999) su kao jedan od razloga za opadanje koncentracije ukupnih glikozida tijekom fermentacije naveli njihovu adsorpciju na stanice kvasca i čvrste čestice podrijetlom iz grožđa te taloženje. Na osnovi toga pretpostavljeno je da je adsorpcija glikozidno vezanog 2-feniletanola na bentonit tijekom fermentacije mošta tretmana BS16 i BK16 bila i te kako moguća. Također je vjerojatno da su se koncentracije glikozidno vezanih spojeva arome tijekom fermentacije mijenjale i zbog ostalih čimbenika za koje je utvrđeno da na to utječu, kao što su npr. različite međusobne konverzije katalizirane kiselim medijem (Zoecklein i sur., 1997a).

U prvoj godini istraživanja, nakon dodatnog bistrenja (B) najznačajnije sniženje zabilježeno je za koncentraciju vezanog linalola, a zatim i za koncentracije citronelola, nerola, geraniola i 3-hidroksi-β-damaskona (Tablica 8). Negativan utjecaj dodatnog bistrenja (B) na koncentraciju vezanog 3-hidroksi-β-damaskona zabilježen je i u drugoj godini istraživanja (Tablica 9). Sniženje koncentracije linalola i citronelola otprilike je odgovaralo porastu koncentracija opaženom za njihove slobodne oblike nakon dodatnog bistrenja i kratkog dozrijevanja vina (B) (Tablica 6), pa je pretpostavljeno da se opisano dogodilo kao posljedica spontane kemijske hidrolize glikozidiranih prekursora, što su ranije razjasnili Zoecklein i sur. (1997a). Primjena bentonita u postupku dodatnog bistrenja također je mogla imati utjecaja jer je ranije dokazano da se glikozidi mogu adsorbirati na čvrste čestice u fermentaciji (Zoecklein i sur., 1997a; McMahon i sur., 1999) i tijekom postfermentacijske dorade vina (Zoecklein i sur., 1997b).

5.4.2. Utjecaj načina primjene bentonita u fermentaciji

S obzirom na način doziranja bentonita u BKS16 tretmanu (postupna primjena bentonita u tri doze tijekom druge polovine trajanja fermentacije u odnosu na tretman BK16 s jednom, ukupno jednakom dozom dodanom u posljednjoj trećini fermentacije), kao što je već opisano u poglavlju 5.3.1, pretpostavljena je mogućnost ranije inhibicije djelovanja različitih enzima i, prema tome, dugotrajnije zaštite hlapljivih spojeva fermentativne arome od razgradnje, odnosno hidrolize (ponajviše estera) te dugotrajnija zaštita od oksidacije tijekom fermentacije. S druge strane, isti tretman BKS16 podrazumijevao je povećan rizik od oksidacije uslijed višestrukog izlaganja mošta u fermentaciji kisiku iz zraka prilikom dodavanja bentonita u tri navrata. Tretman BKS16 nije pokazao značajno drugačiji učinak od tretmana BK16 na koncentracije slobodnih i vezanih spojeva arome te su dva odgovarajuća vina nakon

fermentacije (F) imala vrlo sličan sastav, s razlikama ograničenim samo na koncentracije za aromu manje važnih spojeva, etil-3-hidroksibutanoata i metil-4-hidroksibutanoata te triptofola (Tablice 16 i 17). Vrlo male razlike između vina BKS16 i BK16 tretmana najvjerojatnije su bile posljedica različitog načina primjene bentonita koji je rezultirao različito izraženim inhibicijskim učinkom bentonita na biokemijske pretvorbe, različitim stupnjem oksidacijskih promjena te različito izraženim adsorpcijskim interakcijama s pojedinim hlapljivim spojevima uvjetovanih duljinom trajanja kontakta bentonita i mošta u fermentaciji. U odnosu na kontrolni tretman K16, tretman BKS16 je, slično kao i BK16, očuvao više koncentracije etil-heksanoata i svih acetatnih estera u odgovarajućem vinu (Tablica 16). Navedeno je posebno značajno jer su spomenuti esteri pronađeni u koncentracijama višim od pragova osjetljivosti njihovih mirisa, što bi značilo da je tzv. *voćno-cvjetna* aroma trebala biti izraženija u vinu BKS16 nego u vinu kontrolnog tretmana K16. Pretpostavljeno je da je postupna primjena bentonita u tri doze tijekom druge polovine trajanja fermentacije u tretmanu BKS16 osigurala sličnu razinu zaštite od djelovanja staničnih esteraza (Mauricio i sur., 1993), odnosno polifenol-oksidaze (Patrianakou i Roussis, 2013) na hidrolizu estera, odnosno oksidaciju tijekom fermentacije, kao i tretman BK16 s jednom, ukupno jednakom dozom dodanom u posljednjoj trećini fermentacije, što je već pojašnjeno u poglavlju 5.3.1. Vino BKS16 tretmana sadržavalo je niže koncentracije hlapljivih spojeva od manjeg značaja za aromu vina, benzil-alkohola, dodekanske kiseline, etil-dekanoata, etil-3-hidroksibutanoata, dietil-malata, monometil-sukcinata, monoetil-sukcinata, etil-*p*-kumarata i acetoina, u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16.

Nakon dodatnog bistrenja bentonitom (B) i postizanja proteinske stabilnosti utvrđene su određene promjene u koncentracijama etilnih i acetatnih estera (Tablica 16) koje su, iako značajno slabijeg intenziteta u usporedbi sa sličnim promjenama u prvoj godini istraživanja (Tablica 6), uzrokovale da se potpuno stabilna vina (B) BK16 i BKS16 tretmana uglavnom nisu značajno razlikovala ni međusobno niti od vina kontrolnog tretmana K16 u odnosu na koje su se zadržale jedino razlike u koncentracijama benzil-alkohola, dodekanske kiseline i acetoina. Moguće je da je jedan od uzroka bilo upravo djelovanje bentonita koji je mogao utjecati na sniženje koncentracija hlapljivih spojeva, kao što su za bistrenje nakon fermentacije ranije utvrdili Lambri i sur. (2010), Lambri i sur. (2013), Vincenzi i sur. (2015) te Di Gaspero i sur. (2017). Koncentracije pojedinih važnih i manje važnih spojeva su se nakon dodatnog bistrenja (B) čak i povisile, kao npr. etil-oktanoata u vinima tretmana K16 i BKS16, što su ranije zabilježili Vela i sur. (2017). Pretpostavljeno je da je uzrok tome moglo

biti naknadno otpuštanje hlapljivih spojeva arome uslijed autolize kvasca (Alexandre i Guilloux-Benatier, 2006) te desorpcije s različitih makromolekula i ostalih preostalih čvrstih čestica tijekom kratkog dozrijevanja u razdoblju između dva uzorkovanja (F i B). Osim djelovanja bentonita, hidroliza estera i ostale promjene uslijed oksidacije tijekom pretoka i punjenja u boce također su mogle utjecati na oblikovanje sastava proteinski stabilnih vina (B).

Tretman BKS16 je tijekom fermentacije (F) pokazao vrlo sličan učinak na koncentracije vezanih spojeva arome (Tablica 17) kao i tretman BK16. Utvrđeno je samo značajno sniženje koncentracije glikozidno vezanog 2-feniletanola u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16, vjerojatno uslijed djelomične adsorpcije spomenutog glukozida na bentonit, iako su kao adsorbens mogle poslužiti i stanice kvasca ili čvrste čestice podrijetlom iz grožđa (Zoecklein i sur., 1997a; McMahon i sur., 1999). Dodatna primjena bentonita (B) uzrokovala je određene manje promjene u koncentracijama, pa je tako stabilno vino BKS16 tretmana sadržavalo višu koncentraciju vezanog α-terpineola u odnosu na stabilno vino BK16 tretmana, odnosno višu koncentraciju vezanog β-damaskenona u odnosu na stabilno vino kontrolnog tretmana K16.

Zaključeno je da tretman BKS16 s postupnom primjenom bentonita u tri manje doze tijekom druge polovine trajanja fermentacije nije rezultirao značajnijim unaprjeđenjem sastava hlapljivih spojeva arome u odnosu na tretman BK16 s jednom, ukupno jednakom dozom dodanom u posljednjoj trećini fermentacije. Isto tako, oba tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji pokazala su se perspektivnim za postizanje poboljšanja u očuvanju viših koncentracija hlapljivih, mirisnih estera vrlo važnih za aromu vina u odnosu na kontrolni tretman K16 sa standardnim bistrenjem nakon fermentacije. Međutim, poboljšanja utvrđena neposredno nakon fermentacije (F) nisu očuvana tijekom daljnje dorade vina (B), što upućuje da bi se daljnja istraživanja trebala usredotočiti na unaprjeđenje te kritične točke u proizvodnji.

5.4.3. Utjecaj načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji

Bistrenje bentonitom pripremljenim u deioniziranoj vodi tijekom fermentacije u tretmanu BKDEI16 pokazalo je približno jednak učinak na koncentracije hlapljivih spojeva arome kao i bistrenje bentonitom pripremljenim u vodovodnoj vodi u tretmanu BK16. Tretmanom BKDEI16 značajno su snižene koncentracije linalola, benzil-alkohola, dodekanske kiseline, etil-dekanoata monoetil-sukcinata i etil-*p*-kumarata, a značajno povišene koncentracije izoamil-acetata, 2-feniletil-acetata, 4-vinilgvajakola i triptofola u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 neposredno nakon fermentacije (F) (Tablica 22). Vino tretmana BKDEI16

razlikovalo se od onog tretmana BK16 na osnovi niže koncentracije α-terpineola, izoamil-acetata i heksil-acetata. Kao što je već navedeno u prethodnom poglavlju (5.3.), pretpostavljeno je da je zbog veće tvrdoće vodovodne vode moglo doći do zamjene Na^+ kationa između slojeva bentonita Ca^{2+} kationima iz vodovodne vode čime su modificirana adsorpcijska svojstva bentonita na način da je bentonit pripremljen u vodovodnoj vodi mogao imati slabiju sposobnost adsorpcije proteina (Kawatra i Ripke, 2003), a uz to moguće je da se izmijenio i njegov afinitet za adsorpciju drugih spojeva, između ostalih i hlapljivih spojeva arome. Moguće je da su razlike između koncentracija hlapljivih spojeva arome utvrđene u ovom istraživanju posljedica upravo višeg udjela Na^+ kationa u strukturi bentonita primijenjenog u tretmanu BKDEI16 u odnosu na tretman BK16. Iako u nešto manjoj mjeri u odnosu na vino tretmana BK16, očuvanje viših koncentracija važnih acetatnih estera u vinu tretmana BKDEI16 u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 (Tablica 22) posebno je značajno jer su spomenuti esteri pronađeni u koncentracijama višim od pragova osjetljivosti njihovih mirisa, što bi značilo da je tzv. *voćno-cvjetna* aroma trebala biti izraženija u vinu BKDEI16 tretmana nego u vinu kontrolnog tretmana K16. Pretpostavljeno je da je primjena bentonita u tretmanu BKDEI16 osigurala sličnu razinu zaštite od djelovanja staničnih esteraza (Mauricio i sur., 1993), odnosno polifenol-oksidaze (Patrianakou i Roussis, 2013) na hidrolizu estera, odnosno oksidaciju tijekom fermentacije kao i tretman BK16, što je već pojašnjeno u prethodnim poglavljima. Moguće je da povišenje koncentracije 4-vinilgvajakola u vinu tretmana BKDEI16 nije bilo rezultat izravnog učinka dodanog bentonita. Hlapljivi fenol 4-vinilgvajakol nastaje tijekom fermentacije dekarboksilacijom prekursora (u ovom slučaju ferulinske kiseline) posredstvom kvasca ili bakterija enzimom cinamat-dekarboksilazom, što može biti inhibirano katehinima i katehinskim (kondenziranim) taninima te kiselinskom i enzimskom hidrolizom glikozidno vezanog prekursora porijeklom iz grožđa (Winterhalter i sur., 1990; Chatonnet i sur., 1993). Viša koncentracija katehina (s tirosolom) u vinu kontrolnog tretmana K16 u fermentaciji mogla je rezultirati snažnijom inhibicijom nastajanja 4-vinilgvajakola. Povišenje koncentracije 4-vinilgvajakola u BK16 i BKDEI16 (Tablica 22) otprilike je odgovaralo sniženju koncentracije ferulinske kiseline u istim tretmanima (Tablica 21). Nakon dodatnog bistrenja (B) bentonitom i postizanja proteinske stabilnosti utvrđene su određene promjene u koncentracijama acetatnih estera koje su uzrokovale da se potpuno stabilna vina (B) BK16 i BDEI16 tretmana uglavnom nisu značajno razlikovala ni međusobno niti od vina kontrolnog tretmana K16 na osnovi koncentracija acetatnih estera (Tablica 22). Moguće je da je jedan od uzroka bilo upravo djelovanje bentonita koji je mogao utjecati na sniženje koncentracija tih i sličnih spojeva, kao

što su za bistrenje nakon fermentacije ranije utvrdili Lambri i sur. (2010), Lambri i sur. (2013), Vincenzi i sur. (2015), Di Gaspero i sur. (2017) te Ma i sur. (2020). Slično je bilo i s ostalim hlapljivim spojevima pa je između stabilnih vina (B) zabilježeno samo nekoliko razlika od manje važnosti u vidu njihovog potencijalnog učinka na senzorsku kvalitetu.

Učinak tretmana BKDEI16 i BK16 na koncentracije vezanih spojeva arome bio je također vrlo sličan pa se odgovarajuća vina nakon fermentacije (F) po tom pitanju uopće nisu razlikovala (Tablica 23). U odnosu na vino kontrolnog tretmana K16, vino BKDEI16 tretmana sadržavalo je višu koncentraciju glikozidno vezanog *trans*-2-heksenola što je mogla biti posljedica inhibitornog učinka bentonita na njegovu hidrolizu. Nešto više koncentracije slobodnih oblika ostalih izomera nezasićenih C_6-alkohola pronađene u vinu kontrolnog tretmana K16 nakon fermentacije (F) (Tablica 22) donekle su potkrijepile takvu pretpostavku. U vinu BKDEI16 tretmana nakon fermentacije (F) pronađena je niža koncentracija vezanog 2-feniletanola (Tablica 23), vjerojatno kao posljedica djelomične adsorpcije spomenutog glukozida na bentonit, iako su kao adsorbens mogle poslužiti i stanice kvasca ili čvrste čestice podrijetlom iz grožđa što je utvrđeno u ranijim istraživanjima (Zoecklein i sur., 1997a; McMahon i sur., 1999). Nakon dodatnog bistrenja (B) vino BKDEI16 imalo je značajno nižu koncentraciju β-damaskenona u odnosu na vino BK16 tretmana, dok su koncentracije nakon fermentacije (F) bile gotovo obrnute, iako bez statistički značajne razlike. Kako je za dodatno bistrenje (B) vina svih tretmana upotrijebljen bentonit pripremljen s vodovodnom vodom, nije se moglo zaključiti da je učinak deionizirane vode korištene u BKDEI16 tretmanu imao izravan učinak. Povišenje koncentracije glikozidnog β-damaskenona u vinu tog tretmana moglo je biti posljedica njegove desorpcije s različitih čestica, kao što su kvasci, čvrsti dijelovi grožđa ili određene makromolekule, tijekom kratkotrajnog razdoblja dozrijevanja između dva uzorkovanja (F i B).

Zaključeno je da tretman BKDEI16, koji je uključivao pripremu bentonita s deioniziranom vodom s ciljem poboljšanja njegove djelotvornosti na osnovi očuvanja višeg udjela Na^+ kationa u svojoj strukturi, nije rezultirao značajnijim unaprjeđenjem sastava hlapljivih spojeva arome u odnosu na tretman BK16 s bentonitom pripremljenim vodovodnom vodom relativno visoke tvrdoće. Kao i u slučaju tretmana BK16 i BKS16, poboljšanje u vidu očuvanih viših koncentracija pojedinih važnih acetatnih estera u odnosu na kontrolni tretman K16 utvrđeno neposredno nakon fermentacije (F) nije očuvano u daljnjoj doradi vina (B), što upućuje da bi se daljnja istraživanja trebala usredotočiti na unaprjeđenje te kritične točke u proizvodnji.

5.4.4. Učinak primjene tanina u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji

U ovom dijelu istraživanja uspoređen je učinak primjene enoloških tanina u obliku komercijalno dostupnog pripravka u tretmanu T16 te kombinacije primjene pripravka s taninom i bentonita u fermentaciji u tretmanu BKT16 s učinkom već ranije opisanih tretmana (poglavlja 4.1.4., 4.2.4., 4.3.4. i 5.4.1-5.4.3.), primjene bentonita u fermentaciji u tretmanu BK16 i kontrolnog tretmana K16 bez primjene tanina i bentonita u fermentaciji, na sastav hlapljivih spojeva arome. Podataka u znanstvenoj literaturi o utjecaju primjene tanina prije, tijekom i nakon fermentacije na hlapljive spojeve arome u vinu općenito, a posebno onom od kultivara bijelog grožđa gotovo da i nema, stoga nije bilo moguće u potpunosti razjasniti određene zapažene pojave. Nakon fermentacije (F), među slobodnim spojevima sortne arome značajna razlika utvrđena je samo za koncentraciju linalola, koja je bila najviša u vinima tretmana s primjenom tanina, T16 i BK16, iako ne statistički značajno različita od one pronađene u vinu kontrolnog tretmana K16 (Tablica 28). Pretpostavljeno je da je tanin mogao stupiti u interakciju s bentonitom i izmijeniti njegovu površinsku strukturu i naboj (Zoeckleinu i sur., 1990; Chagas i sur., 2012) što je na određeni način moglo umanjiti adsorpcijsku moć bentonita prema linalolu utvrđenu u ranijim istraživanjima (Puig i Deu, 1996; Armada i Falque, 2007; Lambri i sur., 2012b; Burin i sur., 2016; Ma i sur., 2020). Značajno sniženje koncentracije slobodnog *cis*-3-heksenola u vinu tretmana BKT16 u odnosu na koncentracije u vinima kontrolnog K16 i BK16 tretmana nakon fermentacije (F) moglo je biti posljedica sinergijskog djelovanja primijenjenog pripravka tanina i bentonita. Već je spomenuto da bistrenje bentonitom može sniziti koncentraciju C_6-alkohola, najvjerojatnije njihovom adsorpcijom i taloženjem (Armada i Falqué, 2007; Lira i sur., 2015; Lambri i sur., 2010; Ma i sur., 2020), dok je pretpostavljena i mogućnost da je bentonit mogao ograničiti aktivnost enzima koji su odgovorni za stvaranje C_6-alkohola iz dugolančanih masnih kiselina, lipoksigenaze i alkohol-dehidrogenaze, kao što je ranije uvtrđeno za druge enzime (Ough i sur., 1969; Main i Morris, 1994; Jaeckels i sur., 2015). U jednoj od rijetkih studija u kojima je izučavan učinak tanina na hlapljive spojeve arome, utvrđeno je da je primjena određenih taninskih pripravaka snizila koncentraciju 1-heksanola, iako većina ispitanih tanina nije utjecala na njegovu koncentraciju (Chen i sur., 2016). Ranije je pokazano da može doći do interakcija polifenolnih spojeva i hlapljivih spojeva arome (Pozo-Bayón i Reineccius, 2009) pa je moguće da je to bio slučaj i u ovom istraživanju. U vinima tretmana koji su uključivali primjenu bentonita, BK16 i BKT16, pronađene su niže koncentracije benzil-alkohola, dok je najviša koncentracija pronađena u vinu kontrolnog tretmana K16. Pretpostavljena je

mogućnost da je bentonit u fermentaciji ograničio djelovanje hidrolitičkih enzima, uglavnom β-glukozidaza odgovornih za cijepanje glikozida benzil-alkohola tijekom fermentacije (Martin i sur., 2016), ili da je adsorbirao dio glikozida. Moguće je i da je dodani tanin međudjelovao s benzil-alkoholom i snizio njegovu koncentraciju u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16. Tretman s kombiniranom primjenom bentonita i tanina BKT16 imao je negativan učinak na koncentraciju slobodne butanske kiseline, tretmani koji su uključivali bentonit, BK16 i BKT16, značajno su snizili koncentraciju dodekanske kiseline, dok je tretman s primjenom tanina bez bentonita T16 očuvao najvišu koncentraciju dekanske kiseline. Nakon fermentacije (F) vino T16 tretmana sadržavalo je najviše koncentracije nekolicine važnih hlapljivih estera, kao što su etil-heksanoat, etil-dekanoat i heksil-acetat, iako u pojedinim slučajevima bez statistički značajne razlike. Za koncentracije estera od ključne važnosti za *voćno-cvjetnu* aromu bijelog vina, etil-oktanoat i izoamil-acetat, u vinu tretmana T16 uočene su slične tendencije ka višim koncentracijama, iako također bez statističke značajnosti. Moguće je da je očuvanje koncentracije estera bilo povezano i s antioksidacijskim djelovanjem tanina, između ostalog i na aktivnost enzima polifenol-oksidaze, ali i na oksidativne promjene kemijskog karaktera (Bellachioma i sur., 2008; Sonni i sur., 2011; Versari i sur., 2013; Jeremic i sur., 2020). Polifenol-oksidaze pokreću niz kemijskih reakcija u kojima nastaju radikali semikinona i kinona, a u prisutnosti prijelaznih metala kisik se reducira u vodikov peroksid, što može dovesti do oksidacije estera i sniženja njihove koncentracije (Patrianakou i Roussis, 2013). Chen i sur. (2016) pokazali su da je primjena svih taninskih pripravaka uključenih u njihovo istraživanje povisila koncentraciju etil-acetata, pojedini pripravci su imali pozitivan utjecaj na koncentraciju izoamil-acetata, dok ni jedan pripravak nije utjecao na koncentraciju 2-feniletil-acetata. Različiti tretmani s primjenom bentonita i/ili tanina u ovom istraživanju uzrokovali su određene razlike između odgovarajućih vina i po pitanju koncentracija određenih ostalih estera i ostalih spojeva. Tako je vino BK16 tretmana nakon fermentacije (F) sadržavalo najvišu, a vino kombiniranog tretmana BKT16 najnižu koncentraciju metil-4-hidroksibutanoata. Slično je utvrđeno i za etil-*p*-kumarat. Najviša koncentracija acetoina, iako ne u svim slučajevima uz statističku značajnost, pronađena je također u vinu tretmana s primjenom tanina T16, što je u suprotnosti s rezultatima Chena i sur. (2016) koji su zabilježili da primjena taninskih pripravaka snizuje koncentraciju tog spoja. Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđene su uglavnom već ranije opisane promjene. Porast koncentracije linalola, u pojedinim slučajevima i statistički značajan (Tablica 28), najvjerojatnije je bio posljedica hidrolize njegovih glikozidnih pekursora tijekom kratkotrajnog razdoblja dozrijevanja između

dva uzorkovanja (F i B) (Zoecklein i sur., 1997a; Ribereau-Gayon i sur., 2006b). Takav zaključak djelomično je potkrijepljen sniženjem koncentracija vezanog oblika linalola u istim vinima (Tablica 29). Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracija α-terpineola porasla je u vinima većine tretmana (Tablica 28) što je najvjerojatnije bila posljedica konverzije ostalih glavnih monoterpenola (Zoecklein i sur., 1997a; Oliveira i sur., 2008). Koncentracija terpendiola I snizila se u svim vinima, moguće nakon njegove konverzije u druge monoterpenske oblike (Zoecklein i sur., 1997a), ali i nakon interakcije s naknadno primijenjenim bentonitom (B). Kao i u prethodnim slučajevima, nakon dodatnog bistrenja (B) zabilježeno je sniženje koncentracije β-damaskenona u vinima većine tretmana, najvjerojatnije kao posljedica njegove interakcije sa sumpornim dioksidom (Oliveira i sur., 2008). Koncentracija benzil-alkohola porasla je u vinima tretmana u kojima nije primijenjen bentonit u fermentaciji, K16 i T16, dok se u vinima tretmana s bentonitom BK16 i BKT16 nije mijenjala. Pretpostavljeno je da se tijekom fermentacije dogodio značajniji stupanj adsorpcije prekursora benzil-alkohola na bentonit u vinima tretmana BK16 i BKT16, ali nije isključena ni mogućnost da je u tim tretmanima bentonit u fermentaciji deaktivirao aktivnost β-glukozidaze i/ili ostalih enzima koji kataliziraju cijepanje glikozidnih veza. Nakon dodatnog bistrenja (B) nije više bilo značajnih razlika između koncentracija etilnih i acetatnih estera u vinima različitih tretmana. Moguće je da je jedan od uzroka bilo upravo djelovanje naknadno primijenjenog bentonita (B) koji je mogao utjecati na koncentracije tih i sličnih spojeva, kao što su za bistrenje nakon fermentacije ranije utvrdili Lambri i sur. (2010), Lambri i sur. (2013), Vincenzi i sur. (2015), Di Gaspero i sur. (2017) te Ma i sur. (2020). Koncentracije različitih estera iz skupine ostalih estera, a vrijedi izdvojiti etil-laktat i dietil-sukcinat, porasle su vinima svih tretmana, vjerojatno prvenstveno kao rezultat spontanih reakcija esterifikacije s ciljem postizanja ravnotežnih koncentracija u odnosu na koncentracije prekursora – alkohola i kiselina (Díaz-Maroto i sur., 2005; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). S druge strane, u vinima svih tretmana utvrđeno je sniženje koncentracije metil-4-hidroksibutanoata.

Tretmani s primjenom tanina T16 i BKT16 pokazivali su tendenciju očuvanja viših koncentracija glikozidno vezanih oksida linalola u odgovarajućim vinima nakon fermentacije (F), iako samo u nekim slučajevima uz statističku značajnost (Tablica 29). Navedeno je bilo još izraženije u slučaju vezanog α-terpineola. Pretpostavljena je mogućnost da je dodatak tanina ograničio adsorpciju spomenutog glikozida na bentonit ili njegovu hidrolizu. U nedavnom istraživanju utvrđeno je da komercijalni pripravci s kondenziranim taninima iz

grožđa mogu u sebi sadržavati značajne količine prekursora hlapljivih tiola koji se kasnije mogu osloboditi u slobodan, hlapljivi oblik i značajno utjecati na aromu vina (Larcher i sur., 2015). Na osnovi tog saznanja uzeta je u obzir i mogućnost da je galotanin iz šire skupine hidrolizirajućih tanina primijenjen u ovom istraživanju mogao sadržavati određen udio glikozida monoterpena, uobičajenih sastojaka različitih biljnih materijala. Tretmani koji su uključivali primjenu bentonita u fermentaciji BK16 i BKT16 prouzročili su sniženje koncentracije vezanog citronelola u odgovarajućim vinima nakon fermentacije (F). Takav učinak bio je još izraženiji u slučaju vezanog 2-feniletanola. Kao što je već ranije spomenuto, dokazi o međudjelovanju glikozidno vezanih spojeva arome i bentonita nisu pronađeni u literaturi. Međutim, Zoecklein i sur. (1997a) te McMahon i sur. (1999) su kao jedan od razloga za opadanje koncentracije glikozida tijekom fermentacije naveli njihovu adsorpciju na stanice kvasca i čvrste čestice podrijetlom iz grožđa te taloženje. Na osnovi toga pretpostavljeno je da je adsorpcija glikozidno vezanog citronelola ili 2-feniletanola na bentonit tijekom fermentacije (F) mošta tretmana BK16 i BKT16 bila moguća. Nakon dodatnog bistrenja (B) koncentracije oksida linalola bile su značajno više u vinu BKT16 nego u vinu BK16 tretmana što je mogla biti posljedica utjecaja primjene tanina (Tablica 29). Utvrđene su i niže koncentracije vezanog linalola u tretmanima koji su uključivali primjenu tanina, T16 i BKT16. Moguće je da je u kratkom razdoblju između dva uzorkovanja (F i B) dio glikozida linalola kompleksirao s dodanim taninom te da su takvi spojevi bili bolji supstrat za adsorpciju na naknadno primijenjeni bentonit (B). Pretpostavljena je i mogućnost da je sniženje koncentracije 3-hidroksi-β-damaskona opaženo u vinima većine tretmana nakon dodatnog bistrenja (B) posljedica njegove adsorpcije na naknadno dodan bentonit (B), ali i konverzije u druge C_{13}-norizoprenoidne oblike (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

5.4.5. Utjecaj temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji

Nakon fermentacije (F) nije primijećen značajniji utjecaj tretmana s povišenom temperaturom tijekom bistrenja u fermentaciji BKTMP17 u odnosu na kontrolni tretman bez primjene bentonita u fermentaciji K17 s obzirom na koncentracije većine važnih slobodnih hlapljivih spojeva sortne arome tijekom fermentacije (linalol, citronelol, nerol i geraniol), a za koje je, nasuprot tome, tretman BK17 pokazao pozitivan učinak (Tablica 34). Iako razlika u temperaturi između tretmana BK17 i BKTMP17 tijekom bistrenja nije bila velika (2 °C), moguće je da je povišena temperatura primijenjena u tretmanu BKTMP17 uzrokovala povećani stupanj isparenja monoterpena tijekom tog razdoblja fermentacije. S druge strane,

niže koncentracije glavnih monoterpena pronađene u vinu kontrolnog tretmana K17 nisu se mogle razjasniti na osnovi takve mogućnosti. Isto tako, pozitivan učinak bistrenja u posljednjoj trećini fermentacije u trećoj godini istraživanja u tretmanu BK17 bio je u djelomičnoj suprotnosti s rezultatima iz ranijih godina za analogne tretmane BK15 i BK16, pa je pretpostavljeno da su značajnu ulogu u tome ponovno imali i čimbenici kao što je različita godina berbe, odnosno različit sastav polaznog mošta i promjene njegova sastava tijekom fermentacije. Tretman BKTMP17 rezultirao je sniženim koncentracijama slobodnog α-terpineola i 1-heksanola u odnosu na vina BK17 i K17 tretmana nakon fermentacije (F). Moguće je da je povišenje temperature tijekom bistrenja u fermentaciji pospješilo njihovu adsorpciju na bentonit ili je utjecalo na djelovanje bentonita prema enzimima. Aktivnost enzima hidroperoksid-liaze koji sudjeluje u pretvorbama dugolančanih kiselina u C_6-spojeve optimalna je pri 15 °C (Clodoveo i sur., 2014; Salas i Sánchez, 1999) dok je više temperature inhibiraju (Angerosa i sur., 2001). Navedeno saznanje upućuje na mogućnost da je slabija aktivnost spomenutog enzima pri višoj temperaturi u dijelu fermentacije mogla biti uzrokom niže koncentracije 1-heksanola u vinu tretmana BKTMP17. Oba tretmana s bistrenjem u fermentaciji, BK17 i BKTMP17, djelovala su pozitivno na koncentracije oktanske i dekanske kiseline u odgovarajućim vinima nakon fermentacije (F). Ranije je pokazano da prisutnost čvrstih čestica u fermentacijskom mediju može imati negativan učinak na koncentraciju hlapljivih kiselina u vinu (Valero i sur., 2001; Callejón i sur., 2012; Lukić i sur., 2017b). Pretpostavljena je mogućnost da je tretman bistrenja tijekom fermentacije u tretmanima BK17 i BKTMP17 snizio koncentraciju čvrstih čestica u fermentacijskom mediju i time osigurao bolje uvjete za sintezu masnih kiselina. Ranije je pokazano da bentonit može adsorbirati i ukloniti dio hlapljivih masnih kiselina (Lambri i sur., 2010; Ma i sur., 2020), ali je moguće je da je primjena bentonita u fermentaciji ipak imala uglavnom pozitivan utjecaj na koncentracije masnih kiselina pronađene u vinima BK17 i BKTMP17 tretmana, kao što je utvrđeno i za neke druge hlapljive spojeve (Tablice 6, 7 i 34). Pozitivne učinke sličnih tretmana na koncentracije predvadavajućih masnih kiselina srednjeg lanca u vinu utvrdili su i Lira i sur. (2015). Dok učinak temperature tijekom bistrenja u fermentaciji nije utjecao na masne kiseline, koncentracije hlapljivih estera nakon fermentacije (F) bile su značajno različite u vinima BK17 i BKTMP17 tretmana. U vinu tretmana s povišenom temperaturom bistrenja BKTMP17 pronađene su više koncentracije za aromu vrlo važnih estera, etil-heksanoata i etil-oktanoata, odnosno svih identificiranih acetatnih estera. Iako se radi ograničavanja hlapljenja i boljeg očuvanja hlapljivih estera, odnosno *voćno-cvjetne* arome u bijelom vinu preporučuju niže temperature fermentacije, pokazano je da *Saccharomyces*

cerevisiae općenito pokazuje najbolji rast pri značajno višoj temperaturi od 32 °C (Salvadó i sur., 2011; López-Malo i sur., 2013). Međutim, Molina i sur. (2007) pokazali su da se pri temperaturi fermentacije od 15 °C sintetiziraju značajno više koncentracije hlapljivih estea u vinu nego pri temperaturi od 28 °C. Više autora utvrdilo je da je sinteza estera najintenzivnija u fazi eksponencijalnog rasta kvasca u ranijim fazama fermentacije, dok je u kasnijoj stacionarnoj fazi manje izražena, stagnira ili čak dolazi do sniženja njihovih koncentracija (Molina i sur., 2007; Lukić i sur., 2017b). Iako je bistrenje bentonitom pri višoj temperaturi u tretmanu BKTMP17 obavljeno u kasnijem razdoblju fermentacije nakon eksponencionalne faze rasta kvasca, nije u potpunosti odbačena mogućnost da je viša temperatura ipak pospješila aktivnost kvasca te da je u isto vrijeme bila dovoljno niska da osigura očuvanje hlapljivih estera od isparavanja. Također, pretpostavljena je i mogućnost da je povišenje temperature pogodovalo adsorpciji enzima s nepovoljnim djelovanjem na koncentracije estera, npr. esteraza i polifenol-oksidaze, na bentonit u završnom dijelu fermentacije (Mauricio i sur., 1993; Patrianakou i Roussis, 2013).

Vina su se nakon dodatnog bistrenja (B) značajno manje razlikovala na osnovi koncentracija spojeva sortne arome (Tablica 34). Porast koncentracija pojedinih monoterpena mogao je biti rezultat oslobađanja iz glikozidnh prekursora, koji nisu analizirani u trećoj godini istraživanja (2017.), dok je porast koncentracije α-terpineola u vinima svih tretmana najvjerojatnije bio rezultat konverzije ostalih monoterpenola (Zoecklein i sur., 1997a; Oliveira i sur., 2008). Koncentracije glavnih monoterpenola u vinu BK17 tretmana značajno su snižene i to do razina podjednakih onima pronađenim u vinima kontrolnog K17 i BKTMP17 tretmana. Kao mogući uzrok tome pretpostavljena je njihova adsorpcija na naknadno dodani bentonit (B), što su ranije zabilježili različiti autori (Armada i Falqué, 2007; Lambri i sur., 2012b; Burin i sur., 2016; Ma i sur., 2020). Kao i u prethodnim slučajevima, nakon dodatnog bistrenja (B) zabilježeno je sniženje koncentracije β-damaskenona u vinima većine tretmana, najvjerojatnije kao posljedica njegove interakcije sa sumpornim dioksidom (Oliveira i sur., 2008). Više koncentracije masnih kiselina ponovno su pronađene u vinima tretmana koji su uključivali bistrenje s bentonitom u fermentaciji, iako su nakon dodatnog bistrenja (B) u vinu BKTMP17 tretmana pronađene više koncentracije oktanske i dekanske kiseline, što nije bio slučaj u vinima neposredno nakon fermentacije (F). U stabilnim vinima (B) nisu utvrđene značajnije razlike između koncentracija etilnih estera, za razliku od acetata koji su kao i nakon fermentacije pronađeni u višim koncentracijama u vinu BKTMP17 tretmana. Pretpostavljeno je da je, ako se i dogodila, djelomična adsorpcija hlapljivih estera na bentonit primijenjen

tijekom dodatnog bistrenja (B) bila obrnuto proporcionalna njihovoj koncentraciji u proizvedenim vinima.

5.4.6. Utjecaj primjene dvostruke doze bentonita u fermentaciji (prebistrenje)

Imajući na umu ranije dokazanu mogućnost adsorpcije hlapljivih spojeva arome na bentonit (Armada i Falqué, 2007; Lambri i sur., 2012b; Burin i sur., 2016; Ma i sur., 2020), nakon primjene dvostruko veće doze bentonita u tretmanu BKDUP17 u odnosu na uobičajeno primjenjivanu u ovom istraživanju, kao jedan od ishoda očekivao se i snažniji utjecaj tog tretmana na pojedine hlapljive spojeve arome nego u tretmanu BK17. Navedeno je primijećeno za pojedine monoterpene u vinima nakon fermentacije (F): D-limonen, 3-karen i α-terpineol pronađeni su u najnižim koncentracijama u vinu tretmana s dvostrukom dozom bentonita BKDUP17 (Tablica 39). Pretpostavljeno je da je jedan od mogućih razloga bila njihova djelomična adsorpcija na bentonit, nakon čega su takvi kompleksi uklonjeni taloženjem. Koncentracije većine glavnih monoterpenola (linalol, nerol, geraniol) bile su najviše u vinu BK17 tretmana. Vrijedi istaknuti razlike između koncentracija β-damaskenona koje nakon usporedbe sva tri tretmana (K17, BK17, BKDUP17) nisu bile značajne, ali je *t*-testom utvrđeno da je nakon fermentacije (F) vino BK17 tretmana sadržavalo višu koncentraciju od vina BKDUP17 tretmana (podatak nije prikazan u tablici), što je moglo biti posljedica adsorpcije tog spoja na bentonit. Niže koncentracije 1-heksanola pronađene u vinu tretmana BKDUP17 nakon fermentacije (F) također su mogle biti posljedica značajnijeg stupnja adsorpcije tog hlapljivog spoja na bentonit, ili snažnijeg negativnog utjecaja dvostruke doze bentonita na aktivnost enzima koji su odgovorni za stvaranje C_6-alkohola iz dugolančanih masnih kiselina, lipoksigenaze i alkohol-dehidrogenaze, kao što je ranije uvtrđeno za druge enzime (Ough i sur., 1969; Main i Morris, 1994; Jaeckels i sur., 2015). Oba tretmana s bistrenjem u fermentaciji, BK17 i BKDUP17, djelovala su pozitivno na koncentracije oktanske i dekanske kiseline u odgovarajućim vinima u odnosu na vino kontrolnog tretmana nakon fermentacije (F). Kao što je već ranije pretpostavljeno, moguće je da je sniženi sadržaj čvrstih čestica u moštu tretmana BK17 i BKDUP17 nakon djelomičnog bistrenja u fermentaciji (F) u odnosu na nebistreni mošt kontrolnog tretmana K17 pogodovao sintezi hlapljivih masnih kiselina, što su ranije utvrdili drugi autori (Valero i sur., 2001; Callejón i sur., 2012; Lukić i sur., 2017b). Unatoč tome što je ranije pokazano da bentonit može adsorbirati i ukloniti dio hlapljivih masnih kiselina (Lambri i sur., 2010; Ma i sur., 2020), moguće je da je primjena bentonita u fermentaciji ipak imala prevladavajući pozitivni

utjecaj na koncentracije masnih kiselina pronađene u vinima BK17 i BKDUP17 tretmana. Slične pozitivne učinke bistrenja u različitim razdobljima fermentacije na koncentracije hlapljivih masnih kiselina srednjeg lanca utvrdili su i Lira i sur. (2015). Među etilnim esterima, značajan utjecaj bistrenja dvostrukom dozom bentonita u fermentaciji u tretmanu BKDUP17 zabilježen je samo za etil-butanoat čija je koncentracija u tom vinu bila viša nego u vinu kontrolnog tretmana K17 te za etil-3-metilbutanoat za koji je utvrđeno obrnut odnos. Moguće je da je uzrok spomenutih razlika bila upravo bistroća mošta u posljednjoj trećini fermentacije, jer je ranije pokazano da manji udio čvrstih čestica u fermentacijskom mediju pogoduje nastanku ravnolančanih hlapljivih spojeva, dok povećan udio čestica u mediju doprinosi sintezi molekula s razgranatim ugljikovodičnim lancem (Lukić i sur., 2017b). U vinu tretmana s primjenom dvostruke doze bentonita u fermentaciji BKDUP17 nakon fermentacije (F) su pronađene više koncentracije za aromu vrlo važnih acetatnih estera, kao što su izobutil-acetat i 2-feniletil-acetat te posebno izoamil-acetat. Pretpostavljena je mogućnost da je dvostruka doza bentonita na osnovi većeg stupnja adsorpcije značajnije ograničila djelovanje enzima koji su mogli negativno utjecati na sintezu i očuvanje hlapljivih estera, kao što su stanične esteraze (Mauricio i sur., 1993) i polifenol-oksidaza (Patrianakou i Roussis, 2013). Glavni uzrok niže koncentracije dietil-sukcinata pronađene u vinu BKDUP17 tretmana u odnosu na ostala vina mogao je biti povećan stupanj adsorpcije spomenutog estera na dvostruko veću ukupnu površinu bentonita prisutnu u moštu tog tretmana tijekom fermentacije (F).

U stabilnim vinima (B) svih tretmana utvrđene su određene promjene u odnosu na vina nakon fermentacije (F) (Tablica 39). Porast koncentracija pojedinih monoterpena nakon dodatnog bistrenja (B) mogao je biti rezultat oslobađanja iz glikozidnih prekursora koji nisu analizirani u trećoj godini istraživanja (2017.), dok je porast koncentracije α-terpineola u vinima svih tretmana najvjerojatnije bio rezultat konverzije ostalih monoterpenola tijekom kratkotrajnog razdoblja između dva uzorkovanja (F i B) (Zoecklein i sur., 1997a; Oliveira i sur., 2008). Koncentracije glavnih monoterpenola u vinu BK17 tretmana značajno su snižene i to do razina podjednakih onima pronađenim u vinima kontrolnog K17 i BKDUP17 tretmana. Kao mogući uzrok tome pretpostavljena je njihova adsorpcija na naknadno dodani bentonit (B), što su ranije zabilježili različiti autori (Armada i Falqué, 2007; Lambri i sur., 2012b; Burin i sur., 2016; Ma i sur., 2020). Kao i u prethodnim slučajevima, nakon dodatnog bistrenja (B) zabilježeno je sniženje koncentracije β-damaskenona u vinima većine tretmana, najvjerojatnije kao posljedica njegove interakcije sa sumpornim dioksidom (Oliveira i sur.,

2008). Više koncentracije masnih kiselina su i nakon dodatnog bistrenja (B) pronađene u vinima tretmana koji su uključivali bistrenje s bentonitom u fermentaciji, BK17 i BKDUP17. U stabilnim vinima (B) nisu utvrđene značajnije razlike između koncentracija etilnih estera osim u slučaju etil-3-metilbutanoata čija je koncentracija u većini vina porasla, vjerojatno kao posljedica spontane esterifikacije tijekom kratkotrajnog dozrijevanja s ciljem uspostavljanja ravnotežnih koncentracija s prekursorima, prvenstveno 3-metilbutanske kiseline (Díaz-Maroto i sur., 2005; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Koncentracije pojedinih acetatnih estera su i nakon dodatnog bistrenja bile više u vinu BKDUP17 tretmana, iako uz statistički značajnu razliku samo u slučaju izobutil-acetata u odnosu na vino BK17 tretmana, izoamil-acetata u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 te 2-feniletil-acetata u podnosu na vina oba preostala tretmana. Više koncentracije pojedinih hlapljivih fenola pronađene su nakon fermentacije (F) u vinima tretmana s primjenom bentonita BK17 i BKDUP17, dok je nakon dodatnog bistrenja (B) ta razlika bila izraženija i statistički značajna u korist vina tretmana BKDUP17 u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17. U ranijem istraživanju utvrđeno je da fermentacijom bistrijeg mošta nastaju više koncentracije hlapljivih fenola, konkretnije 4-vinilgvajakola, i to posebno u završnom razdoblju fermentacije (Lukić i sur., 2017b) koje je donekle odgovaralo trenutku primjene bentonita u tretmanima BK17 i BKDUP17. Moguće je da je bistriji mošt nakon primjene bentonita u spomenutim tretmanima pogodovao nastajanju viših koncentracija hlapljivih fenola u odgovarajućim vinima. Iako je u pojedinim tretmanima utvrđeno opadanje koncentracija hlapljivih fenola nakon dodatne primjene bentonita (B), što je najvjerojatnije bilo posljedica njihove adsorpcije na bentonit a u skladu s rezultatima Ma i sur. (2020), odnosi između koncentracija u stabilnim vinima (B) ostali su slični onima utvrđenim nakon fermentacije (F).

5.4.7. Utjecaj primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji

Primjena različitih tipova bentonita pokazala je različite učinke na koncentracije hlapljivih spojeva u istraživanim vinima (Tablica 44). Od važnijih monoterpenola, vrijedi istaknuti više koncentracije linalola pronađene nakon fermentacije (F) u vinima svih tretmana s bentonitom primijenjenim u fermentaciji u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17, s najvišim koncentracijama u vinima BK7 i PEN17 tretmana. S druge strane tretmani s bentonitom uglavnom su snizili koncentracije monoterpenskih ugljikovodika, β-pinena i 3-karena, u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17, što je upućivalo na mogućnost da su struktura, odnosno funkcionalne skupine u molekulama različitih monoterpena mogle biti važne u

određivanju njihovog afiniteta za adorpciju na bentonit ili stupanje u druge nepoznate interakcije. Različiti bentoniti izmijenili su sastav ostalih monoterpena na različite načine: tretman MVN17 je ponajviše snizio koncentraciju α-terpineola, vino BK17 tretmana sadržavalo je najviše koncentracije citronelola i geraniola, a tretman PEN17 je rezultirao najvišom koncentracijom nerola. Primijenjeni tretmani uglavnom nisu značajno utjecali na koncentracije viših alkohola. Vina proizvedena uz primjenu različitih bentonita u fermentaciji sadržavala su uglavnom više koncentracije slobodnih hlapljivih masnih kiselina u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17, iako su statistički značajno više vrijednosti uglavnom pronađene u vinima PUR17 i PEN17 tretmana. Kao što je već ranije pretpostavljeno, moguće je da je sniženi sadržaj čvrstih čestica u moštu tretmana nakon djelomičnog bistrenja u fermentaciji (F) u odnosu na nebistreni mošt kontrolnog tretmana K17 pogodovao sintezi hlapljivih masnih kiselina, što su ranije utvrdili drugi autori (Valero i sur., 2001; Callejón i sur., 2012; Lukić i sur., 2017b). Vina PUR17 i PEN17 tretmana zahtijevala su najniže dodatne doze bentonita za konačno bistrenje do postizanja potpune proteinske stabilnosti (Slika 12) što bi značilo da je mošt tih tretmana bio bistriji od ostalih nakon djelomičnog bistrenja u fermentaciji. Takav podatak bio je u suglasju s tezom o pozitivnoj korelaciji bistroće mošta i stupnja sinteze masnih kiselina u fermentaciji (Valero i sur., 2001; Callejón i sur., 2012; Lukić i sur., 2017b). Više koncentracije masnih kiselina u vinima djelomično bistrenim bentonitom u fermentaciji u odnosu na koncentraciju u nebistrenom vinu kontrolnog tretmana dobili su i Lira i sur. (2015). Ranije je pokazano da bentonit može adsorbirati i ukloniti dio hlapljivih masnih kiselina (Lambri i sur., 2010; Ma i sur., 2020), pa je pretpostavljena i mogućnost da su primijenjeni bentoniti zbog svoje različite strukture i svojstava adsorbirali masne kiseline u različitim omjerima te na taj način prouzročili razlike u njihovom sastavu. Različite koncentracije hlapljivih masnih kiselina u vinu dobili su i Salazar i sur. (2017) nakon usporedbe djelovanja prirodnog Na bentonita i natrijem aktiviranog bentonita. S druge strane, moguće je da je primjena bentonita u fermentaciji imala i pozitivni utjecaj na koncentracije pojedinih masnih kiselina, kao što je utvrđeno i za neke druge hlapljive spojeve (Tablice 6, 7 i 34). Za razliku od prve (2015.; tretman BK15), a djelomično i druge godine istraživanja (2016.; tretman BK16), u eksperimentima iz posljednje, treće godine istraživanja (2017.; tretman BK17) nije utvrđen pozitivan učinak bistrenja u fermentaciji s bentonitom CX Special Grain na koncentracije ključnih hlapljivih estera nakon fermentacije (F). S druge strane, primjena ostalih bentonita u ovom dijelu istraživanja, Mastervin Compact (MVN17), SIHA Puranit (PUR17) i Pentagel (PEN17), imala je značajan pozitivan utjecaj na koncentracije ključnih etilnih estera ravnolančanih masnih kiselina srednjeg lanca, kao što su

etil-butanoat, etil-heksanoat i etil-oktanoat, te svih acetatnih estera u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17. Neujednačen odziv koncentracija hlapljivih estera ovisno o tipu bentonita upotrijebljenom za bistrenje ranije su utvrdili i Salazar i sur. (2017). Pretpostavljena je mogućnost da je zbog specifične strukture i svojstava odgovarajućih tipova bentonita djelotvornost spomenutih tretmana MVN17, PUR17 i PEN17 u uklanjanju i/ili ograničavanju djelovanja enzima koji su mogli negativno utjecati na sintezu i očuvanje hlapljivih estera, kao što su stanične esteraze (Mauricio i sur., 1993) i polifenol-oksidaza (Patrianakou i Rouis, 2013), bila veća od one bentonita CX Special Grain u tretmanu BK17. S druge strane, ponovno treba istaknuti da su vina MVN17, PUR17 i PEN17 tretmana zahtijevala najniže dodatne doze bentonita za konačno bistrenje do postizanja potpune proteinske stabilnosti (Slika 12) što bi značilo da je mošt tih tretmana bio bistriji od mošta tretmana BK17, a posebno od mošta kontrolnog tretmana K17 nakon djelomičnog bistrenja u fermentaciji (F). U ranijim istraživanjima potvrđena je pozitivna korelacija bistroće mošta i stupnja sinteze odnosno očuvanja hlapljivih estera u fermentaciji (Callejón i sur., 2012; Lukić i sur., 2017b), pa je izgledno da je bistriji mošt u tretmanima MVN17, PUR17 i PEN17 izravno barem djelomično zaslužan za više koncentracije estera u odgovarajućim vinima. Više koncentracije ravnolančanih etilnih estera i acetata u vinima djelomično bistrenim bentonitom u fermentaciji u odnosu na koncentraciju u nebistrenom vinu kontrolnog tretmana dobili su i Lira i sur. (2015). Ranije je pokazano da bentonit može adsorbirati i ukloniti dio hlapljivih estera (Lambri i sur., 2010; Burin i sur., 2016; Ma i sur., 2020). Ako je u ovom dijelu istraživanja i došlo do takvih interakcija i adsorpcije estera na bentonit, očigledno je da su pozitivni učinci primjene bentonita u fermentaciji prevladali i osigurali više koncentracije ključnih hlapljivih estera u većini tretmana s primjenom bentonita. S druge strane, koncentracija dietil-sukcinata je nakon fermentacije (F) bila niža upravo u vinima tretmana MVN17, PUR17 i PEN17, što upućuje na mogućnost da su bentoniti primijenjeni u tim tretmanima imali veći afinitet prema tom esteru od CX bentonita iz tretmana BK17. U ranijem istraživanju utvrđeno je da fermentacijom bistrijeg mošta nastaju više koncentracije hlapljivih fenola, konkretnije 4-vinilgvajakola, i to posebno u završnom razdoblju fermentacije (Lukić i sur., 2017b) koje je odgovaralo trenutku primjene bentonita u tretmanima primijenjenim u ovom istraživanju. Moguće je da je sastav bistrijeg mošta nakon primjene bentonita pogodovao nastajanju viših koncentracija hlapljivih fenola u vinima pronađenih nakon fermentacije (F).

Nakon dodatnog bistrenja (B) svih tretmana primjenom bentonita CX Special Grain utvrđene su određene promjene u odnosu na vina nakon fermentacije (F) (Tablica 44). Porast

koncentracija pojedinih monoterpena nakon dodatnog bistrenja (B), kao npr. β-pinena, D-limonena i 3-karena u vinima pojedinih tretmana, mogao je biti rezultat njihovog oslobađanja iz glikozidnih prekursora nakon spontane kemijske hidrolize, dok je porast koncentracije α-terpineola u vinima svih tretmana najvjerojatnije bio rezultat konverzije ostalih monoterpenola tijekom kratkotrajnog razdoblja dozrijevanja (Zoecklein i sur., 1997a; Oliveira i sur., 2008). Koncentracije pojedinih glavnih monoterpenola, citronelola, nerola i geraniola u vinima pojedinih tretmana značajno su snižene. Kao mogući uzrok tome pretpostavljena je njihova adsorpcija na naknadno dodani bentonit (B), što su ranije zabilježili različiti autori (Armada i Falqué, 2007; Lambri i sur., 2012b; Burin i sur., 2016; Ma i sur., 2020). Kao i u prethodnim slučajevima, nakon dodatnog bistrenja (B) zabilježeno je sniženje koncentracije β-damaskenona u vinima većine tretmana, najvjerojatnije kao posljedica njegove interakcije sa sumpornim dioksidom (Oliveira i sur., 2008). Više koncentracije masnih kiselina su i nakon dodatnog bistrenja (B) pronađene u vinima tretmana PUR17 i PEN17, dok je značajan porast njihovih koncentracija zabilježen u vinu MVN17 tretmana. Moguće je da je određena količina masnih kiselina djelomično desorbirana s čvrstih čestica, uključujući i bentonit Mastervin Compact primijenjen u fermentaciji, ili naknadno oslobođena iz stanica kvasca što je opaženo u ranijem istraživanju (Alexandre i Guilloux-Benatier, 2006). Iako nije bilo očiglednog snižavanja njihovih koncentracija kao posljedice adsorpcije na naknadno dodan bentonit, kao i u određenim slučajevima u prethodnim godinama istraživanja, dodatno bistrenje (B) gotovo je poništilo razlike u sastavu etilnih estera ravnog lanca između vina različitih tretmana. S druge strane, stabilno vino PEN17 tretmana sadržavalo je niže koncentracije etilnih estera masnih kiselina kratkog razgranatog lanca, čijoj sintezi pogoduje veći udio čvrste tvari u moštu (Lukić i sur., 2017b), u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17. Što se tiče acetatnih estera, većina razlika između vina različitih tretmana utvrđena nakon fermentacije (F) zadržala se i u stabilnim vinima (B), s uglavnom višim koncentracijama pronađenim u vinima MVN17, PUR17 i PEN17 tretmana. Koncentracije estera iz skupine ostalih estera porasle su vinima većine tretmana, vjerojatno prvenstveno kao rezultat spontanih reakcija esterifikacije tijekom kratkotrajnog dozrijevanja između dva termina uzorkovanja (F i B) s težnjom postizanja ravnotežnih koncentracija u odnosu na koncentracije njihovih prekursora – alkohola i kiselina (Díaz-Maroto i sur., 2005; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđeno je statistički značajno sniženje koncentracija hlapljivih fenola u vinima tretmana BK17 i PUR17, dok je sličan trend uočen i u ostalim vinima, što je potvrdilo istovjetne rezultate Ma i sur. (2020). Rezultati dobiveni u ovom dijelu istraživanja prilično su jasno ukazali na diferencijalni afinitet različitih tipova

bentonita za adsorpciju različitih hlapljivih spojeva arome. Nadalje, sudeći prema njihovom učinku u postizanju proteinske stabilnosti (Slika 12) doze različitih bentonita primijenjene u fermentaciji (F) ipak se nisu mogle smatrati ekvivalentnima pa je vjerojatno i to utjecalo na razlike u njihovom međudjelovanju s hlapljivim spojevima arome. U svim tretmanima je u dodatnom bistrenju (B) primijenjen isti bentonit, ali u različitim dozama, što je moglo utjecati na stupanj adsorpcije spojeva, tijek kemijskih reakcija koje su se u razdoblju između dva uzorkovanja (F i B) odvijale i slično, uzrokujući nejednake promjene koncentracija hlapljivih spojeva u stabilnim vinima.

5.5. Senzorska svojstva

5.5.1. Utjecaj trenutka primjene bentonita u fermentaciji

U ovom dijelu istraživanja utvrđen je značajan učinak trenutka primjene bentonita u fermentaciji na senzorska svojstva vina malvazije istarske (Tablice 10 - 13). Nakon fermentacije (F) viši intenziteti svojstava kao što su *cvjetni*, *voćni* i *sovinjonski* miris (*tropsko voće*) u vinima tretmana BGS15 s djelomičnim bistrenjem prije i tretmana BP15, BS15 i BK15 s djelomičnim bisrenjem tijekom fermentacije u odnosu na vino kontrolnog tretmana K15 iz prve godine istraživanja (2015.; Tablica 10) podudarali su se s višim koncentracijama važnih estera fermentacijske arome, za koje je poznato da doprinose takvim mirisnim svojstvima (Tablica 6). Pretpostavljen je dominantan utjecaj etil-oktanoata zbog najnižeg praga osjetljivosti mirisa od 0,005 mg/L (Ferreira i sur., 2000b) u odnosu na relativno visoke koncentracije u kojima je pronađen (Tablica 6). Njegov miris obično se opisuje kao *voćni*, a često podsjeća na jabuku, breskvu, krušku, ananas i bananu (Sánchez Palomo i sur., 2007). Sadržaj etil-heksanoata, nositelja nijansi mirisa koji podsjećaju na miris zelene jabuke, najvjerojatnije je također značajno utjecao na utvrđene razlike u intenzitetima *voćnih* mirisa između vina različitih tretmana jer su pronađene koncentracije tog estera višestruko premašivale odgovarajući prag osjetljivosti od 0,014 mg/L (Ferreira i sur., 2000b). Etil-dekanoat, još jedan ester mirisa koji podsjeća na voće, pronađen je u koncentracijama koje su prelazile odgovarajući prag osjetljivosti od 0,200 mg/L (Ferreira i sur., 2000b) pa je pretpostavljen i njegov doprinos. Od acetatnih estera, zbog relativno najnižeg praga osjetljivosti (0,03 mg/L; Guth, 1997) u odnosu na pronađene koncentracije, najveći utjecaj na razlike u utvrđenim intenzitetima *voćnih* mirisa najvjerojatnije je imao izoamil-acetat, pronađen u značajno višim koncentracijama u vinima tretmana BGS15, BP15, BS15 i BK15 u

odnosu na vino kontrolnog tretmana K15 (Tablica 6). Miris izoamil-acetata redovito se uspoređuje s mirisom banane (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Pronađena koncentracija 2-feniletil-acetata kretala se u rasponu čije su granice bile bliske odgovarajućem pragu osjetljivosti od 0,25 mg/L (Guth, 1997), što upućuje da je taj ester mogao doprinijeti aromi proizvedenih vina i izravno, ali vjerojatnije kroz sinergijsko djelovanje s esterima i ostalim hlapljivim spojevima sličnog, *cvjetnog* mirisa. Koncentracije hlapljivih masnih kiselina neodvojivo su povezane s koncentracijama odgovarajućih etilnih estera jer nastaju iz istih prekursora u fermentaciji (Ribéreau-Gayon, 2006b; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Bez obzira što mirisi za aromu najvažnijih masnih kiselina, heksanske, oktanske i dekanske kiseline, nisu ugodnog karaktera kao mirisi estera, ranije je utvrđeno da koncentracije ove dvije skupine spojeva obično međusobno koreliraju te se podudaraju s višom senzorskom kvalitetom vina (Lukić i sur., 2006). U ovom istraživanju također je utvrđena koincidencija viših koncentracija ove dvije skupine spojeva u vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji, BP15, BS15 i BK15 (Tablica 6), što je podrazumijevalo i pozitivnu korelaciju koncentracija masnih kiselina s intenzitetima *voćnih* mirisa. Mirisi hlapljivih masnih kiselina različite su autore uglavnom podsjećali na mirise sira, masnog i užeglog (Peinado i sur. 2004; Francis i Newton, 2005), iako se u nekim istraživanjima spominje i njihova *voćna* nota (Lorenzo i sur., 2015; Liu i sur., 2019). Pretpostavljena je mogućnost da su, osim kompleksnosti arome, masne kiseline doprinijele i izraženosti *voćnih* mirisa istraživanih vina. Navedeno se posebno odnosi na heksansku i oktansku kiselinu čije su koncentracije u istraživanim vinima višestruko premašivale odgovarajuće pragove osjetljivosti mirisa od 0,42 mg/L, odnosno 0,50 mg/L (Ferreira i sur., 2000b). Izraženijim nijansama *voćnih* i *cvjetnih* mirisa u vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji u odnosu na vino kontrolnog tretmana mogla je doprinijeti i viša koncentracija β-damaskenona pronađena u tim vinima (Tablica 6). Spomenuti C_{13}-norizoprenoid, čiji se miris obično uspoređuje s mirisima *voća*, posebno pirjane jabuke i šljive, te meda (Clarke i Bakker, 2004; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b, Li i sur., 2007), pronađen je u svim vinima u koncentracijama dva reda veličina višim od odgovarajućeg izuzetno niskog praga osjetljivosti od 0,05 μg/L (Guth, 1997). Razlikama u intenzitetu *cvjetnih* mirisa mogao je doprinijeti i 2-feniletanol, viši alkohol mirisa koji nedvojbeno podsjeća na miris ruže (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a), praga osjetljivosti od 10 mg/L (Moreno i sur., 2005), također pronađen u višim koncentracijama u vinima tretmana s bentonitom u fermentaciji, iako ne uz statistički značajnu razliku u svim slučajevima (Tablica 6). Iako se mirisi glavnih monoterpenola, prvenstveno linalola, nerola i geraniola, uglavnom uspoređuju s mirisima *cvijeća* (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b), nije utvrđena povezanost

između njihovih koncentracija i intenziteta *cvjetnih* nijansi mirisa utvrđenih u istraživanim vinima. Linalol je u svim uzorcima pronađen u koncentracijama višim od odgovarajućeg praga osjetljivosti od 15 μg/L (Guth, 1997), pa je vjerojatno izravno sudjelovao u aromi istraživanih vina, dok je moguće da se doprinos ostalih glavnih monoterpenola sastojao u njihovom zajedničkom sinergijskom djelovanju. U drugoj godini istraživanja (2016.) vino tretmana BK16 s primjenom bentonita u posljednjoj trećini trajanja fermentacije također je ocijenjeno višim intenzitetima *voćnog* i tzv. *sovinjonskog* mirisa u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 (Tablica 11), što se podudaralo s višim koncentracijama etil-heksanoata i svih analiziranih acetatnih estera u tom vinu, kao i masnih kiselina (Tablica 7). Poznato je da su glavni nositelji *sovinjonskog* mirisa, inače karakterističnog za vina kultivara *sauvignon blanc*, hlapljivi tioli (Coetzee i du Toit, 2012), koji nisu analizirani u ovom istraživanju. Bez obzira na to, moguće je da su višem intenzitetu osjeta *sovinjonske* nijanse mirisa u vinu tretmana BS16 (Tablica 11) doprinijele i redom više koncentracije ostalih mirisnih hlapljivih spojeva u odnosu na koncentracije pronađene u vinu kontrolnog tretmana K16, uključujući i već spomenute estere (Tablica 7). Pretpostavljena je mogućnost da je važan doprinos u stvaranju najvišeg intenziteta *sovinjonske* note *tropskog voća* u vinu BS16 mogla imati upravo najviša koncentracija izoamil-acetata (miris banane) pronađena u tom u odnosu na vina ostalih tretmana (Tablica 7). U trećoj godini istraživanja (2017.), vino tretmana s primjenom bentonita u posljednjoj trećini fermentacije BK17 ocijenjeno je višim intenzitetima *cvjetnih, voćnih* i *sovinjonskih* mirisa u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 35). U tom slučaju spomenute razlike nisu se mogle dovesti u izravnu vezu s koncentracijama etilnih i acetatnih estera; iako su njihove koncentracije uglavnom bile više u vinu BK17 tretmana, razlike nisu bile statistički značajne (Tablica 34). Međutim, ponovno je utvrđena koincidencija viših intenziteta *cvjetnih, voćnih* i *sovinjonskih* mirisa i koncentracija hlapljivih masnih kiselina. Izravna povezanost viših intenziteta *cvjetnih, voćnih* i *sovinjonskih* mirisa i viših koncentracija etilnih i acetatnih estera utvrđena je za vina tretmana s primjenom ostalih tipova bentonita u posljednjoj trećini fermentacije, MVN17, PUR17 i PEN17, u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablice 44 i 45), što je detaljnije raspravljeno u poglavlju 5.5.7. Višem intenzitetu *cvjetnog* mirisa utvrđenom u vinu tretmana BK17 (Tablica 36) mogle su doprinijeti i više koncentracije glavnih monoterpenola pronađene u tom u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 34).

Među vinima različitih tretmana iz prve godine istraživanja (2015.) nakon fermentacije (F) nije bilo značajnih razlika u koncentraciji 1-heksanola, glavnog nositelja mirisa koji podsjeća

na svježe pokošenu zelenu travu, lišće i *bilje* (Moyano i sur., 2002; Clarke i Bakker, 2004; Moreno-Arribas i Polo, 2009), osim u slučaju vina tretmana s bistrenjem mošta prije fermentacije BGS15 (Tablica 6). S druge strane, najviši intenzitet *biljnog* mirisa utvrđen je u vinu kontrolnog tretmana K15, što je značilo da nije potvrđena izravna povezanost intenziteta spomenutog mirisa s koncentracijom 1-heksanola. Pretpostavljeno je da je u vinu kontrolnog tretmana K15 *biljni* miris bio izraženiji zbog manje intenzivnih *cvjetnih, voćnih, sovinjonskih* i mednih nota (Tablica 10). U drugoj (2016.) i trećoj godini istraživanja (2017.) nije bilo značajnih razlika ni u koncentraciji 1-heksanola (Tablice 7 i 34) ni u intenzitetu mirisa *bilja* (Tablice 11 i 35) između istraživanih vina.

Povišen intenzitet tzv. *muškatnog* mirisa utvrđen u pojedinim vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji u prvoj godini istraživanja (2015.) nakon fermentacije (F) (Tablica 10) nije bio u skladu s koncentracijama monoterpena (Tablica 6) za koje je poznato da su glavni nositelji tipičnog mirisa vina muškatnih kultivara (Mateo i Jiménez, 2000). Međutim, ta je veza utvrđena u trećoj godini istraživanja (2017.) gdje je vino BK17 tretmana koje je opisano višim intenzitetom *muškatnog* mirisa (Tablica 35) sadržavalo više koncentracije većine glavnih monoterpenola u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 34).

U prvoj godini istraživanja (2015.) viši intenziteti mirisa koji podsjećaju na miris meda utvrđeni su u vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji, BP15, BS15 i BK15, u odnosu na vina ostalih tretmana nakon fermentacije (F) (Tablica 10). Osim hlapljivih estera koji su mogli imati određen utjecaj, utvrđene razlike mogle su se dovesti u vezu s β-damaskenonom koji je u višim koncentracijama pronađen upravo u vinima spomenutih tretmana (Tablica 6). Miris β-damaskenona često se, osim s mirisom (pirjanog i ukuhanog) voća, uspoređuje i s mirisom meda (Clarke i Bakker, 2004; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Li i sur., 2007).

Razlike u intenzitetima *začinskih* mirisa i mirisa *aromatičnog bilja*, odnosno nijansi mirisa koje podsjećaju na vosak, utvrđene između vina različitih tretmana nakon fermentacije (F) u različitim godinama istraživanja, nisu mogle biti dovedene u izravnu vezu s razlikama u koncentracijama pojedinih hlapljivih spojeva arome. Pretpostavljena je mogućnost da spomenuta svojstva mirisa nisu bila rezultat izravnog utjecaja pojedinih hlapljivih spojeva, već da su proizašla iz međudjelovanja većeg broja spojeva različitih mirisa koje je rezultiralo spomenutim senzorskim doživljajima ocjenjivača, kao što su ranije pokazali Guth (1997), Noguerol-Pato i sur. (2012) i Ríos-Reina i sur. (2019).

Utjecaj tretmana s primjenom bentonita prije i tijekom fermentacije na svojstva okusa proizvedenih vina nakon fermentacije (F) bio je najizraženiji u prvoj godini istraživanja (2015.; Tablica 10). Djelomično bistrenje prije i tijekom fermentacije imalo je pozitivan učinak na intenzitete svojstava *tijela / punoće, slatkoće* i *viskoziteta,* a negativan utjecaj na *kiselost, gorčinu* i *astringentnost* vina u odnosu na vino kontrolnog tretmana K15. U trećoj godini istraživanja (2017.) uočen je sličan učinak tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji BK17 na intenzitet svojstava *tijela / punoće* i *slatkoće* u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17, dok su slične tendencije, iako bez statističke značajnosti, uočene i za svojstva *viskoziteta* i *gorčine* (Tablica 35). Spomenute razlike u intenzitetima svojstava *tijela / punoće, slatkoće* i *viskoziteta* nisu odgovarale utvrđenim razlikama u volumnom udjelu etanola i koncentracijama ukupnog suhog ekstrakta i reducirajućih šećera za koje je pretpostavljeno da bi mogli biti njihov uzrok, osim u trećoj godini istraživanja u kojoj je vino BK17 tretmana sadržavalo nešto višu koncentraciju neprevrelih šećera u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 32). Utvrđena je uglavnom pozitivna korelacija između intenziteta senzorskih svojstava *tijela / punoće* i *viskoznosti* (Tablice 10, 11 i 35) i koncentracija hidroksicimetnih kiselina (osobito estera s vinskom kiselinom - hidroksicinamoiltartarata) (Tablice 4, 5 i 33). Gawel i sur. (2014) zabilježili su povezanost koncentracija fenolnih spojeva iz te skupine i *viskoznosti* bijelog vina, ali dosad nije utvrđena izravna uzročno-posljedična veza između koncentracije hidroksicimetnih kiselina i svojstva *tijela / punoće*. Olejar i sur. (2016) pokazali su da povišenje koncentracije fenolnih spojeva može biti povezano s pojačanim intenzitetom pozitivnih svojstava okusa. Međutim, u prvoj godini istraživanja (2015.) u kojoj su razlike između intenziteta svojstava *tijela / punoće* te *viskoznosti* između vina različitih tretmana bile najizraženije (Tablica 10), nisu utvrđene razlike u koncentraciji ukupnih fenola (Tablica 4). U drugoj (2016.) i trećoj (2017.) godini istraživanja razlike u intenzitetima spomenutih svojstava okusa bile su manje izražene ili nisu utvrđene (Tablice 11 i 35), dok je koncentracija ukupnih fenola bila najviša u vinima kontrolnih tretmana K16 i K17 (Tablice 5 i 33). Analogna kontradiktornost utvrđena je i u odnosu intenziteta *gorkog* i *astringentnog* i koncentracija ukupnih fenola koji u različitim godinama istraživanjima nisu bili u korelaciji, unatoč poznatoj činjenici da su fenolni spojevi odgovorni upravo za ta senzorska svojstva vina (Sáenz-Navajas i sur., 2015). Ipak, u prvoj godini istraživanja utvrđena koincidencija viših intenziteta *gorkog* i *astringentnog* (Tablica 10) i koncentracija pojedinačnih hidroksibenzojevih i slobodnih hidroksicimetnih fenolnih kiselina (Tablica 4) u vinu kontrolnog tretmana K15. Pretpostavljena je mogućnost da su spomenuti fenolni spojevi, za koje je poznato da pridonose gorčini i astringenciji vina

(Sáenz-Navajas i sur., 2015), utjecali na utvrđene razlike. Očekivana pozitivna korelacija utvrđena je između osjeta senzorskog svojstva *kiselosti* i koncentracije ukupne kiselosti u prvoj godini istraživanja (Tablice 2 i 10). S obzirom na utvrđena određena neslaganja u odnosima između intenziteta pojedinih senzorskih svojstava i koncentracija odgovarajućih fizikalno-kemijskih parametara, pretpostavljeno je da su senzorska svojstva proizvedenih vina bila rezultat kompleksnih međusobnih interakcija između različitih analiziranih fizikalno-kemijskih parametara i spojeva, ali i interakcija s drugim sastojcima vina koji nisu bili predmet istraživanja.

Nakon fermentacije (F), vina tretmana koji su uključivali djelomično bistrenje tijekom fermentacije ocijenjena su višim prosječnim ocjenama za opću kvalitetu u odnosu na vina odgovarajućih kontrolnih tretmana u sve tri godine istraživanja (Tablice 12, 13 i 36). Slične rezultate dobili su i Lira i sur. (2015). U prvoj i u drugoj godini istraživanja nešto nižim ocjenama ocijenjena su vina proizvedena s primjenom bentonita prije fermentacije u tretmanu BGS15 (Tablica 12), odnosno u sredini trajanja fermentacije u tretmanu BS16 (Tablica 13), pa su ta vina bila i slabije preferirana od strane ocjenjivača u odnosu na vina s primjenom bentonita tijekom (Tablica 12), odnosno u zadnjoj trećini fermentacije (Tablica 13). Prosječne ocjene uglavnom su bile u slaganju, odnosno u pozitivnoj korelaciji s intenzitetima pozitivnih svojstava mirisa i okusa i u negativnoj korelaciji s intenzitetima *biljnog* mirisa, *kiselosti*, *gorčine* i *astringentnosti*, tako da se i ocjena za opću kvalitetu vina mogla dovesti u vezu s vrijednostima pojedinih fizikalno-kemijskih parametara i koncentracijama kemijskih spojeva. Navedeno je bilo najizraženije u slučaju hlapljivih masnih kiselina i posebno estera za čije je koncentracije utvrđena vrlo jasna povezanost s intenzitetima *voćnih* i *cvjetnih* mirisa, odnosno višim ocjenama za opću kvalitetu.

Nakon dodatnog bistrenja (B) zapaženo je sniženje intenziteta određenih pozitivnih senzorskih svojstava u vinima određenih tretmana u pojedinim godinama istraživanja (Tablice 10, 11 i 35), što je potvrdilo općeprihvaćeno mišljenje da primjena bentonita nakon fermentacije može umanjiti senzorsku kvalitetu vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Salazar i sur., 2006; Sanborn i sur., 2010; Plavša i Palman, 2011; Pocock i sur., 2011; Ma i sur., 2020). Tako je, na primjer, u vinima pojedinih tretmana iz prve godine istraživanja, BGS15, BS15 i BK15, nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđeno sniženje intenziteta *cvjetnih*, *voćnih* i *sovinjonskih* mirisa te *tijela / punoće*, *slatkoće* i *viskoziteta*, iako ne u svim slučajevima uz statističku značajnost (Tablica 10). Slično je utvrđeno za intenzitet *svježine* u vinu BK16 tretmana u drugoj godini istraživanja (Tablica 11), odnosno za intenzitete *cvjetnih* mirisa,

mirisa koji podsjećaju na med i vosak te svojstava okusa *tijelo / punoća* i *viskozitet* u trećoj godini istraživanja uglavnom u vinu BK17 tretmana (Tablica 35). U većini slučajeva, sniženje intenziteta pozitivnih svojstava mirisa podudaralo se sa sniženjem koncentracija etilnih i acetatnih estera te u pojedinim slučajevima β-damaskenona (Tablice 6, 7 i 34), što je bilo najviše izraženo nakon dodatnog bistrenja (B) u tretmanima iz prve godine istraživanja (Tablica 6). Ranije spomenuta vjerojatnost uklanjanja hlapljivih spojeva putem njihove izravne adsorpcije na bentonit ili posredno putem adsorpcije proteina za koje su hlapljivi spojevi vezani (Voilley, 1990; Lubbers i sur., 1993; Lubbers i sur., 1996; Lambri i sur., 2010), oksidacijskih reakcija (Patrianakou i Roussis, 2013), spontane hidrolize tijekom kratkog razdoblja dozrijevanja, kao i mogućeg isparenja tijekom i nakon pretoka, mogli su biti od značaja za gubitak određenog udjela hlapljivih spojeva ključnih za osjet spomenutih mirisa. Promjena utvrđena nakon dodatnog bistrenja (B) u odnosu na vina nakon fermentacije (F) koja je mogla imati pozitivan učinak na senzorska svojstva vina bila je povišena koncentracija slobodnog linalola u vinima većine tretmana iz prve i druge godine istraživanja (Tablice 6 i 7). Međutim, rezultati senzorske analize to nisu potvrdili, vjerojatno zbog dominantnijeg utjecaja sniženja koncentracija hlapljivih estera i posljedičnog sniženja intenziteta *cvjetnih* i *voćnih* mirisa u istim vinima. Ipak, sniženje koncentracije važnih monoterpena (linalola, citronelola, nerola, geraniola) i β-damaskenona moglo je biti važno za slabije izražen *cvjetni* miris u vinima tretmana K17 i BK17 nakon dodatnog bistrenja (B) u odnosu na vina nakon fermentacije (F) u trećoj godini istraživanja (Tablica 34). Povišenje koncentracija drugih spojeva, kao što su različiti norizoprenoidi, ostali esteri i ostali spojevi, nakon dodatnog bistrenja (B) vjerojatno nije imalo značajniji utjecaj na senzorska svojstva mirisa istraživanih vina zbog njihovog relativno slabog utjecaja na aromu. Što se tiče senzorskih svojstava okusa, utvrđeno sniženje intenziteta *svježine, tijela / punoće, slatkoće* i *viskoziteta* nakon dodatnog bistrenja (B), iako ne u svim slučajevima uz statističku značajnost (Tablice 10, 11 i 35), moglo je biti povezano sa sniženjem volumnog udjela alkohola, koncentracije ukupnog suhog ekstrakta bez reducirajućih šećera (Tablice 2, 3 i 32), ali i koncentracija određenih fenolnih spojeva, kao što su hidroksicinamoiltartarati (Tablice 4, 5 i 33).

Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđeno je sniženje opće razine kvalitete pojedinih vina, kao na primjer vina tretmana BGS15, BS15 i BK15 u prvoj (Tablica 12), odnosno vina BK17 u trećoj godini istraživanja (Tablica 36). Sniženje prosječnih ocjena dobivenih metodom OIV-a u odnosu na ocjene dodijeljene istim vinima nakon fermentacije (F) uglavnom se moglo objasniti na osnovi sniženja intenziteta važnih senzorskih svojstava, na primjer *cvjetnih*,

voćnih i *sovinjonskih* mirisa te osjeta *tijela / punoće*, *slatkoće* i *viskoziteta*, što bi značilo da se sniženje ocjena za opću kvalitetu vina i u ovom slučaju moglo dovesti u vezu s promjenama koncentracija hlapljivih estera, odnosno vrijednosti pojedinih fizikalno-kemijskih parametara kao što su volumni udio alkohola i koncentracija ukupnog ekstrakta bez reducirajućih šećera. Važno je napomenuti da su, bez obzira na utvrđeno sniženje kvalitete nakon postupka dodatnog završnog bistrenja, dorađena stabilna vina (B) proizvedena tretmanima koji su uključivali primjenu bentonita u fermentaciji bila ocijenjena višim ocjenama za opću kvalitetu nego vina kontrolnih tretmana u svim slučajevima u sve tri godine istraživanja (Tablice 12, 13 i 36).

5.5.2. Utjecaj načina primjene bentonita u fermentaciji

Vino tretmana s postupnim dodavanjem bentonita u tri doze tijekom druge polovine trajanja fermentacije BKS16 nakon fermentacije (F) je okarakterizirano gotovo jednakim intenzitetima senzorskih svojstava mirisa i okusa kao i vino tretmana BK16 s primjenom bentonita u jednoj cjelovitoj dozi u posljednjoj trećini fermentacije (Tablica 18). Jedina razlika utvrđena je za intenzitet *voćnog* mirisa koji je bio izraženiji u vinu tretmana BKS16. U odnosu na vino kontrolnog tretmana K16, vino BKS16 tretmana imalo je više intenzitete *voćnog*, *biljnog* i *sovinjonskog* mirisa te mirisa koji podsjeća na med, dok je od svojstava okusa u vinu BKS16 tretmana utvrđen viši intenzitet osjeta *viskoziteta*. Povišeni intenziteti pozitivnih svojstava mirisa u vinu BKS16 tretmana najvjerojatnije su potjecali od viših koncentracija etil-heksanoata i svih acetatnih estera pronađenih u tom vinu (Tablica 16), koji su među najznačajnijim nositeljima mirisa takvih karakteristika (Guth, 1997; Ferreira i sur., 2000b; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Sánchez Palomo i sur., 2007) što je opisano u poglavlju 5.5.1. Pretpostavljeno je da je viši intenzitet *viskoziteta* utvrđen u vinu BKS16 tretmana mogao potjecati od viših koncentracija glavnih hidroksicinamoiltartarata u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 (Tablica 15), analogno onome što su ranije pretpostavili Gawel i sur. (2014). Kao i u slučaju vina BK16 tretmana, vino BKS16 tretmana je nakon fermentacije (F) ocijenjeno višom ocjenom za opću kvalitetu nego vino kontrolnog tretmana K16 te je bilo više preferirano od vina BK16 tretmana (Tablica 19).

Nakon dodatnog bistrenja (B), vino BKS16 tretmana ocijenjeno je nižim intenzitetima većine ključnih senzorskih svojstava u odnosu na isto vino nakon fermentacije (F), iako u rijetkim slučajevima uz statistički značajnu razliku (Tablica 18). Navedeno je imalo za posljedicu da se stabilno vino (B) BKS16 tretmana nije razlikovalo od vina BK16 tretmana i vina

kontrolnog tretmana K16 na osnovi intenziteta svojstava mirisa i okusa. Takva promjena koincidirala je s promjenama u kemijskom sastavu gdje se stabilna vina (B) spomenutih tretmana, za razliku od istih vina nakon fermentacije (F), nisu međusobno razlikovala na osnovi koncentracija velike većine hlapljivih spojeva, što je posebno došlo do izražaja u slučaju acetatnih estera (Tablica 16). Posljedica toga bila je da je nakon dodatnog bistrenja (B) zabilježeno sniženje opće kvalitete vina BKS16 tretmana te se ono ni na osnovi tog kriterija nije razlikovalo od vina drugih uspoređivanih tretmana (Tablica 19). Takav rezultat na neki je način potvrdio rezultate istraživanja Muhlacka i sur. (2006) i Nordestgaarda i sur. (2007) koji nisu uočili značajne promjene u senzorskim svojstvima vina nakon primjene postrojenja za *in-line* doziranje bentonita u odnosu na šaržni postupak bistrenja. Kako je stabilno vino (B) tretmana BK16 s primjenom bentonita u jednoj cjelovitoj dozi u posljednjoj trećini fermentacije, za razliku od vina tretmana BKS16, ipak ocijenjeno višom ocjenom nego vino kontrolnog tretmana K16 te je bilo najviše preferirano od strane ocjenjivača, zaključeno je da postupak s postupnim dodavanjem bentonita u tri doze tijekom druge polovine trajanja fermentacije u okviru tretmana BKS16 nije poboljšao ovaj aspekt bistrenja bentonitom tijekom fermentacije.

5.5.3. Utjecaj načina pripreme bentonita za bistrenje u fermentaciji

Bistrenje bentonitom pripremljenim u deioniziranoj vodi tijekom fermentacije u okviru tretmana BKDEI16 pokazalo je sličan učinak kao i bistrenje bentonitom pripremljenim u vodovodnoj vodi u okviru tretmana BK16 na odgovarajuća vina nakon fermentacije (F) (Tablica 24). Jedina razlika utvrđena je za intenzitet *voćnog* mirisa koji je bio izraženiji u vinu tretmana BKDEI16. U odnosu na vino kontrolnog tretmana K16, vino BKDEI16 tretmana imalo je više intenzitete *cvjetnog*, *voćnog* i *biljnog* mirisa te mirisa koji podsjeća na *začine / aromatično bilje*. Povišeni intenziteti *cvjetne* i *voćne* sastavnice mirisa vina BKS16 tretmana vjerojatno su barem djelomično potjecali od viših koncentracija izoamil- i 2-feniletil-acetata (Tablica 22), estera koji su među najznačajnijim nositeljima mirisa takvih osobina (Guth, 1997; Ferreira i sur., 2000b; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b) što je opisano u poglavlju 5.5.1. Značajno viši intenzitet *začinskog* mirisa, odnosno mirisa *aromatičnog bilja* utvrđen u vinu BKDEI16 tretmana u odnosu na kontrolno vino K16 mogao je djelomično potjecati od više koncentracije hlapljivog fenola 4-vinilgvajakola koja je bila za dva reda veličine viša od odgovarajućeg praga osjetljivosti mirisa od 3 μg/L (Noguerol-Pato i sur., 2013) (Tablica 22). Miris 4-vinilgvajakola uglavnom se opisuje upravo kao začinski (Noguerol-Pato i sur., 2013).

Kao i u slučaju vina BK16 i BKS16 tretmana, vino BKDEI16 tretmana je nakon fermentacije (F) ocijenjeno višom ocjenom za opću kvalitetu nego vino kontrolnog tretmana K16 (Tablica 19). Plavša i Palman (2011) su bistrenjem vina nakon fermentacije primijetili da potrebna doza bentonita značajno ovisi o tipu vode upotrijebljene za pripremu suspenzije bentonita i pritom su utvrdili i značajan utjecaj na senzorska svojstva. U njihovom istraživanju bila je potrebna 33 % niža doza natrijevog bentonita pripremljenog u deioniziranoj vodi nego istog bentonita pripremljenog u vodovodnoj vodi. U odnosu na kontrolno vino (koje nije bistreno) oba su tretmana bistrenja narušila aromatski profil vina, što se očitovalo i u nižim ukupnim ocjenama bistrenih vina. Vina tretirana bentonitom pripremljenim u deioniziranoj vodi bila su manje narušenog aromatskog profila te su bila značajno bolje ocijenjena metodom 100 bodova nego vina tretirana bentonitom pripremljenim u vodovodnoj vodi. Moguće je da takav ishod i nije bio izravna posljedica kvalitete vode upotrijebljene za pripravu, već je prvenstveno bio posljedica ukupno 33 % niže doze, što bi bilo u skladu sa saznanjima Lambri i sur. (2010) koji su pokazali da utjecaj bentonita na mirisne komponente vina može proporcionalno ovisiti i o dozi bentonita. Imajući u vidu da je u ovom dijelu istraživanja doza primijenjena tijekom fermentacije u okviru svih tretmana osim kontrolnog bila jednaka, pretpostavljeno je da je navedena činjenica zaslužna za podjednak ishod učinka djelomičnog bistrenja tijekom fermentacije u okviru tretmana BK16 i BKDEI16 na senzorsku kvalitetu istraživanih vina. Vrijedi istaknuti da je u ovom istraživanju utvrđen pozitivan utjecaj bistrenja tijekom fermentacije za razliku od standardnog bistrenja nakon fermentacije u istraživanjima Lambri i sur. (2010) i Plavše i Palman (2011).

Nakon dodatnog bistrenja (B) vino BKDEI16 tretmana ocijenjeno je nižim intenzitetima pojedinih ključnih senzorskih svojstava u odnosu na isto vino nakon fermentacije (F), iako u rijetkim slučajevima uz statistički značajnu razliku (Tablica 24). Navedeno je imalo za posljedicu da se stabilno vino (B) BKDEI16 tretmana nije razlikovalo od vina BK16 tretmana i vina kontrolnog tretmana K16 na osnovi intenziteta svojstava mirisa. Takva promjena koincidirala je s promjenama u kemijskom sastavu gdje se stabilna vina (B) spomenutih tretmana, za razliku od istih vina nakon fermentacije (F), nisu međusobno razlikovala na osnovi koncentracija velike većine hlapljivih spojeva, što je posebno došlo do izražaja u slučaju izoamil- i 2-feniletil-acetata (Tablica 22). Nakon dodatnog bistrenja (B) vino tretmana BKDEI16 opisano je višim intenzitetima *tijela / punoće, viskoznosti* i *astringentnosti* u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 koji, međutim, nisu bili značajno različiti od intenziteta utvrđenih za vino BK16 tretmana. Plavša i Palman (2011) utvrdili su negativan

utjecaj bistrenja na osjet *punoće* koji je bio proporcionalan dozi bentonita. Kako je za dodatno bistrenje (B) vina BKDEI16 tretmana upotrijebljena za par postotaka niža doza od one potrebne za dodatno bistrenje vina BK16 tretmana i otprilike trostruko niža doza od one upotrijebljene za dodatno bistrenje vina kontrolnog tretmana K16 (Slika 8), pretpostavljeno je da je upravo uporaba niže doze utjecala na bolje očuvanje *tijela / punoće* i *viskoznosti*. Više koncentracije glavnih hidroksicinamoiltartarata očuvane u vinu BKDEI16 u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 nakon dodatnog bistrenja (B) (Tablica 21) također su mogle imati pozitivan utjecaj na izraženost *viskoznosti*, kako su ranije utvrdili Gawel i sur. (2014). Nakon dodatnog bistrenja (B) nije zabilježeno statistički značajno sniženje opće kvalitete vina BKDEI16 tretmana (Tablica 25). Isto tako, dodatno bistrenje (B) nije promijenilo odnos ocjena i poretka vina prema općoj kvaliteti i preferencijama ocjenjivača, pa je tako stabilno vino BKDEI16 tretmana bilo ocijenjeno višom ocjenom u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16. Nije utvrđena statistički značajna razlika između vina BK16 i BKDEI16 tretmana, ali je potonji bio više preferiran i nakon fermentacije (F) i nakon dodatnog bistrenja (F), pa je zaključeno da uporaba deionizirane vode za pripremu suspenzije bentonita može, iako blago, poboljšati ovaj aspekt bistrenja tijekom fermentacije.

5.5.4. Utjecaj primjene tanina u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji

Tretmani koji su obuhvaćali primjenu tanina u fermentaciji značajno su utjecali na senzorska svojstva vina nakon fermentacije (F) (Tablica 30). Vino tretmana T16 značajno se razlikovalo od vina kontrolnog tretmana K16 na osnovi viših intenziteta većine pozitivnih svojstava mirisa; izuzetak su bili samo *muškatni* miris i miris koji podsjeća na vosak. Navedeno se moglo dovesti u vezu s višim koncentracijama pojedinih estera nositelja *voćnih* i *cvjetnih* mirisa, kao što su etil-heksanoat i heksil-acetat, pronađenih u vinu T16 u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 (Tablica 28). Vina različitih tretmana nisu se razlikovala na osnovi koncentracija spojeva koji su na osnovi omjera njihovih koncentracija i odgovarajućih pragova osjetljivosti mogli imati najveći utjecaj na intenzitet *voćno-cvjetne* arome, kao što su β-damaskenon i etil-oktanoat. Vino tretmana T16 značajno se razlikovalo i od vina BK16 tretmana i to na osnovi viših intenziteta *voćnih*, *biljnih* i *začinskih* mirisa te mirisa koji podsjećaju na med, ali i na osnovi intenziteta svojstava okusa kao što su *tijelo / punoća*, *gorčina* i *astringentnost* (Tablica 30). Moguće je da je pozitivni utjecaj tretmana s primjenom tanina T16 na aromu bio rezultat viših koncentracija etil-heksanoata, etil-dekanoata i heksil-acetata pronađenih u tom vinu (Tablica 28). Na izražajniji osjet *tijela / punoće*, *gorčine* i

astringentnosti u vinu T16 (Tablica 30) najvjerojatnije su utjecale više koncentracije različitih fenolnih spojeva, uključujući i spojeve manjih molekulskih masa kao što su pojedini hidroksicinamoiltartarati i procijanidin B1 te posebno ukupnih fenola (flavonoida) koji su uključivali i dodane tanine (Tablica 27). Viši intenziteti *biljnog* mirisa, *gorčine* i *astringencije* nisu se negativno odrazili na ukupan dojam T16 vina pa je ono nakon fermentacije (F) ocijenjeno značajno većim brojem bodova u odnosu na ostala vina (Tablica 31). Vino BKT16 tretmana se na osnovi intenziteta senzorskih svojstava uglavnom nije razlikovalo ni od vina BK16 niti od vina T16 tretmana, dok je, slično kao i oba spomenuta vina, bilo opisano višim intenzitetima većine pozitivnih svojstava mirisa u odnosu na vino kontrolnog tretmana K16 (Tablica 30). Vino BKT16 tretmana nakon fermentacije (F) je ocijenjeno višom ocjenom za opću kvalitetu nego vina BK16 i kontrolnog tretmana K16 (Tablica 31). Razlike u kvaliteti u ovom se slučaju nisu mogle objasniti na osnovi koncentracija hlapljivih spojeva arome za koje nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđeni su značajno niži intenziteti ključnih svojstava mirisa, kao što su *cvjetni* miris i miris koji podsjeća na med, u vinima T16 i BKT16 tretmana koji su uključivali primjenu tanina u odnosu na ista vina nakon fermentacije (F) (Tablica 30). Slično je utvrđeno i za intenzitete *voćnog* i *sovinjonskog* mirisa, iako bez statističke značajnosti. Kako razlike u koncentracijama ključnih etilnih i acetatnih estera između vina nakon fermentacije (F) i nakon dodatnog bistrenja (B) nisu utvrđene, pretpostavljen je ključan učinak značajnog sniženja koncentracije β-damaskenona (Tablica 28). Spomenuti C_{13}-norizoprenoid, čiji se miris obično uspoređuje s mirisima voća, posebno pirjane jabuke i šljive te meda (Clarke i Bakker, 2004; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b, Li i sur., 2007), pronađen je u svim vinima u koncentracijama dva reda veličina višim od odgovarajućeg izuzetno niskog praga osjetljivosti od 0,05 μg/L (Guth, 1997), pa je sniženje njegove koncentracije dodatnim bistrenjem (B) vrlo vjerojatno imalo snažan učinak na osjet i intenzitete odgovarajućih mirisa tijekom senzorske analize. Ipak, sniženje koncentracije β-damaskenona utvrđeno je u vinima svih tretmana, dok su sniženi intenziteti *voćnog* i *cvjetnog* mirisa nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđeni samo u vinima tretmana s primjenom tanina u fermentaciji, T16 i BKT16. Moguće je da su za *voćne* i posebno *sovinjonske* nijanse mirisa djelomično bili zaslužni i hlapljivi tioli, spojevi koji su u ranijem istraživanju pronađeni u relativno visokim koncentracijama u vinu malvazije istarske (Bubola i sur., 2019), a u ovom radu nisu istraživani. Pretpostavljena je mogućnost da je u vinima T16 i BKT16 tretmana u trenutku uzorkovanja nakon fermentacije (F) antioksidativni učinak

dodanih tanina (Hagerman i sur., 1998b) bio izražen, dok se dodatnim bistrenjem (B) i ostalim postupcima u završnoj doradi vina umanjio u relativno velikoj mjeri u odnosu na vina tretmana u kojima nisu primijenjeni tanini te, na primjer, nije uspio zaštititi tiole od oksidacije. Sniženje intenziteta pozitivnih svojstava mirisa bilo je izraženije u vinu T16 u odnosu na vino BKT16 tretmana, što upućuje na mogućnost da je primjena bentonita osigurala određen stupanj zaštite od oksidacije tijekom završne dorade vina, o čemu je već raspravljano u poglavlju 5.3.1. Neidentificirani fenolni spojevi u vinima T16 i BKT16 tretmana za koje je pretpostavljeno da su porijeklom iz dodanog pripravka s taninima, kao i više koncentracije ukupnih flavonoida i fenola, bili su prisutni i u stabilnom vinu (B) (Tablica 27), ali nisu bitno utjecali na svojstva okusa, jer se na vina T16 i BKT16 tretmana nisu značajno razlikovala od vina BK16 tretmana. Za razliku od istraživanja Radeke i sur. (2006) u kojem su stabilna vina tretmana nakon predfermentativne primjene enoloških tanina bila značajno višeg intenziteta *svježine* u odnosu na vino kontrolnog tretmana, primjena tanina u fermentaciji u ovom se istraživanju nije na jednak način odrazila na to svojstvo okusa stabilnih vina (B). U skladu s promjenama u intenzitetima pojedinih pozitivnih senzorskih svojstava, ocjene za opću kvalitetu T16 i BKT16 vina nakon dodatnog bistrenja (B) bile su značajno niže od onih nakon fermentacije (F) (Tablica 31). Spomenute promjene dovele su do toga da je u testu nizanja po preferenciji vino T16 tretmana nakon fermentacije (F) bilo ocijenjeno kao najviše a nakon dodatnog bistrenja (B) kao najmanje preferirano. Prema senzorskoj ocjeni za opću kvalitetu vino T16 tretmana ocijenjeno je slično kao i vino kontrolnog tretmana K16. Stabilna vina (B) BK16 i BKT16 tretmana ocijenjena su najvišim ocjenama za opću kvalitetu te su bila najviše preferirana od strane ocjenjivača, što je još jednom, neovisno o primjeni tanina, potvrdilo pozitivne učinke primjene bentonita u fermentaciji.

5.5.5. Utjecaj temperature mošta tijekom bistrenja u fermentaciji

Učinci tretmana BKTMP17 s bistrenjem u fermentaciji pri 18 °C na svojstva mirisa i okusa vina nakon fermentacije (F) bili su većinom pozitivni i vrlo slični učincima BK17 tretmana s bistrenjem pri 16 °C: spomenuta vina opisana su višim intenzitetima većine pozitivnih svojstava mirisa te pojedinih pozitivnih svojstava okusa u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 35). Uzrok navedenome mogle su biti više koncentracije određenih spojeva nositelja pozitivnih svojstava mirisa u spomenutim vinima u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17, kao na primjer glavnih monoterpenola u vinu BK17, masnih

kiselina u vinima BK17 i BKTMP17, odnosno etil-heksanoata, etil-oktanoata i svih identificiranih acetatnih estera u vinu BKTMP17 tretmana (Tablica 34). Moguće je da su više koncentracije pojedinih hlapljivih fenola pozitivno utjecale na izraženiju *začinsku* notu mirisa u vinima tretmana s primjenom bentonita. Povišeni intenziteti svojstava okusa kao što su *tijelo / punoća*, *slatkoća* i *viskozitet* u vinu BK17, odnosno BKTMP17 tretmana mogli su barem djelomično biti posljedica viših koncentracija pojedinih glavnih hidroksicinamoiltartarata (Tablica 33), ali i neprevrelih reducirajućih šećera, čije su koncentracije u spomenutim vinima bile više za otprilike 0,5 g/L u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 32). Izraženijem osjetu *gorčine* u vinu kontrolnog tretmana K17 mogla je doprinijeti i viša koncentracija ukupnih fenola pronađena u tom u odnosu na ostala vina (Tablica 33). Viša temperatura tijekom bistrenja pozitivno je utjecala na pojedina svojstva mirisa, kao što su *muškatna* nota i miris po vosku, koji su bili izraženiji u vinu BKTMP17 u odnosu na vino BK17 tretmana nakon fermentacije (F) (Tablica 35). Izraženiji *muškatni* miris u vinu BKTMP17 u odnosu na vino BK17 tretmana nakon fermentacije (F) bio je u određenom neslaganju s koncentracijama glavnih monoterpenola koje su bile više u potonjem vinu. S druge strane, podjednaki intenziteti *cvjetnog* i *voćnog* mirisa u dva spomenuta vina također nisu odražavali očekivani utjecaj nositelja takvih mirisa, etilnih i acetatnih estera, koji su pronađeni u značajno višim koncentracijama u vinu BKTMP17 nego u vinu BK17 tretmana (Tablica 34). Vino BKTMP17 tretmana ocijenjeno je višom ocjenom za opću kvalitetu te kao najviše preferirano od strane ocjenjivača, dok je vino kontrolnog tretmana K17 ocijenjeno najnižom ocjenom nakon fermentacije (F) (Tablica 36). Takav odnos opće kvalitete vina različitih tretmana bio je u skladu s rezultatima fizikalno-kemijske i opisne senzorske analize.

Kao i u pojedinim prethodnim slučajevima, nakon dodatnog bistrenja (B) vina BK17 i BKTMP17 tretmana ocijenjena su nižim intenzitetima većine ključnih senzorskih svojstava u odnosu na ista vina nakon fermentacije (F), iako u rijetkim slučajevima uz statistički značajnu razliku (Tablica 35). Navedeno je imalo za posljedicu umanjenje razlika između senzorskih profila istraživanih vina, ali su vina BK17 i BKTMP17 tretmana nakon dodatnog bistrenja (B) ponovno opisana višim intenzitetima *cvjetnog* mirisa i mirisa koji podsjeća na med u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17. Navedeno se moglo dovesti u vezu s višim koncentracijama estera u stabilnim vinima (B) BK17 i BKTMP17 tretmana, iako su statistički značajne razlike utvrđene uglavnom samo u slučaju vina BKTMP17 tretmana (Tablica 34). Izraženiji osjet *kiselosti* vina BK17 u odnosu na vino BKTMP17 tretmana mogao je biti povezan s višom

koncentracijom ukupne kiselosti pronađenom u tom vinu nakon dodatnog bistrenja (B) (Tablica 32). Stabilno vino (B) BK17 bilo je u prosjeku više preferirano od strane ocjenjivača nego vino BKTMP17 tretmana (Tablica 36). Za navedeno uglavnom nije pronađeno uporište u rezultatima fizikalno-kemijske i opisne senzorske analize, osim u slučaju osjeta *svježine* koji je bio izraženiji u stabilnom vinu (B) BK17 tretmana.

5.5.6. Utjecaj primjene dvostruke doze bentonita u fermentaciji (prebistrenje)

Nakon fermentacije (F), učinci tretmana BKDUP17 koji je uključivao primjenu dvostruke doze bentonita u fermentaciji na svojstva mirisa i okusa vina bili su većinom pozitivni i uglavnom ne značajno različiti u odnosu na tretman BK17 s jednostrukom dozom u fermentaciji u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 40). Spomenuta vina opisana su višim intenzitetima velike većine pozitivnih svojstava mirisa, dok su se od svojstava okusa izdvojili viši intenziteti osjeta *kiselosti* i *viskoziteta* kojima je opisano vino BK17, odnosno viši intenzitet osjeta *tijela / punoće* kojim je opisano vino BKDUP17 tretmana u odnosu na kontrolno vino tretmana K17. Uzrok navedenome mogle su biti više koncentracije određenih spojeva nositelja pozitivnih svojstava mirisa u spomenutim vinima u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17, kao na primjer glavnih monoterpenola u vinu BK17, masnih kiselina u vinima BK17 i BKDUP17, odnosno acetatnih estera u vinu BKDUP17 tretmana, iako su i u vinu BK17 tretmana pronađene više koncentracije pojedinih estera, ali bez statističke značajnosti (Tablica 34). Unatoč značajno višim koncentracijama ključnih acetatnih estera u vinu BKDUP17 u odnosu na vino BK17 tretmana, dva spomenuta vina nisu se razlikovala na osnovi intenziteta pozitivnih svojstava mirisa, uključujući i *cvjetni*, *voćni* pa i *sovinjonski* miris te miris koji podsjeća na med, koji su mogli u velikoj mjeri potjecati od tih estera. Vrijedi istaknuti razlike između koncentracija β-damaskenona koje nakon usporedbe sva tri tretmana nisu bile značajne, ali je *t*-testom utvrđeno da je nakon fermentacije (F) vino BK17 tretmana sadržavalo višu koncentraciju od vina BKDUP17 tretmana (podatak nije prikazan u tablici). Pretpostavljena je mogućnost da je miris koji je potjecao od više koncentracije β-damaskenona u vinu BK17 nadoknadio manjak mirisa podrijetlom od hlapljivih estera u tom u odnosu na vino BKDUP17 tretmana, što je za posljedicu imalo podjednake intenzitete glavnih pozitivnih komponenti mirisa tih vina. Povišeni intenziteti svojstava okusa kao što su *tijelo / punoća* i *viskozitet*, ali i *slatkoća*, iako bez statistički značajne razlike, u vinu BK17, odnosno BKDUP17 tretmana mogli su barem djelomično biti posljedica viših koncentracija pojedinih fenola (Tablica 38), ali i reducirajućih šećera čije su

koncentracije u spomenutim vinima bile više za otprilike 0,5 g/L u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 37). Izraženiji osjet *kiselosti* vina BK17 u odnosu na vino BKDUP17 tretmana mogao je biti povezan s višom koncentracijom ukupne kiselosti pronađenom u tom vinu (Tablica 37), dok je izraženiji osjet *tijela / punoće* u vinu BKDUP17 mogao djelomično biti odraz povišenih koncentracija galne kiseline, *trans*-kaftarne kiseline i procijanidina B2 (Tablica 38). Spomenuti spojevi bili su u pozitivnoj korelaciji s osjetom svojstva *tijela* u bijelom vinu u istraživanju Lukića i sur. (2019). Vino BKDUP17 nije se razlikovalo od vina BK17 tretmana na osnovi ocjene za opću kvalitetu, ali je bilo najviše preferirano od strane ocjenjivača, dok je vino kontrolnog tretmana K17 ocijenjeno najnižom ocjenom nakon fermentacije (F) (Tablica 41). Takav odnos opće kvalitete između vina različitih tretmana bio je u donekle skladu s rezultatima fizikalno-kemijske i opisne senzorske analize.

Dodatno bistrenje (B) negativno je utjecalo na intenzitete gotovo svih pozitivnih svojstava mirisa vina proizvedenih s primjenom bentonita u fermentaciji, što je posebno bilo izraženo u slučaju vina BKDUP17 tretmana (Tablica 40). Navedeno se nije moglo objasniti na osnovi promjena u koncentracijama mirisnih hlapljivih estera jer po tom pitanju nisu utvrđene izraženije razlike između vina nakon fermentacije (F) i dodatnog bistrenja (B), pa je kao glavni uzrok pretpostavljeno značajno sniženje koncentracije β-damaskenona nakon dodatnog bistrenja (B) (Tablica 39). Vezano uz svojstva okusa, nakon dodatnog bistrenja (B) vina BK17 i BKDUP17 opisana su višim intenzitetima osjeta *svježine* u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17, što se nije moglo dovesti u vezu sa sastavom fenola jer uglavnom nisu utvrđene odgovarajuće razlike u njihovim koncentracijama (Tablica 38). Unatoč i dalje višim intenzitetima većine pozitivnih svojstava mirisa podrijetlom od viših koncentracija većeg broja važnih estera te preferiranja od strane senzorskih ocjenjivača u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17, ocjena za opću kvalitetu vina BKDUP17 nakon dodatnog bistrenja (B) nije se razlikovala od one dodijeljene vinu kontrolnog tretmana K17, dok je isto vino bilo slabije preferirano od vina BK17 tretmana (Tablica 41). U odnosu na stabilna vina (B), zaključeno je da tretman s primjenom dvostruke doze bentonita u fermentaciji BKDUP17 nije postigao značajno poboljšanje senzorske kvalitete u usporedbi s tretmanom s jednostrukom dozom BK17 u odnosu na kontrolni tretman K17.

5.5.7. Utjecaj primjene različitih tipova bentonita u fermentaciji

Rezultati ovog dijela istraživanja pokazali su da su se vina tretirana različitim tipovima bentonita tijekom fermentacije razlikovala međusobno, ali i od vina kontrolnog tretmana K17,

na osnovi senzorskog profila i opće kvalitete. Nakon fermentacije (F), vino MVN17 tretmana opisano je najvišim intenzitetima većine pozitivnih senzorskih svojstava mirisa u odnosu na vina ostalih tretmana, iako u pojedinim slučajevima, odnosno u odnosu na vina pojedinih tretmana, bez statističke značajnosti (Tablica 45). Visoki intenziteti *cvjetnih* i *voćnih* mirisa pronađeni u vinu MVN17, ali i vinima ostalih tretmana u kojima je u fermentaciji primijenjen bentonit, podudarali su se s višim koncentracijama važnih estera fermentacijske arome pronađenim u tim vinima, za koje je poznato da doprinose takvim mirisnim svojstvima. Pretpostavljen je dominantan utjecaj etil-oktanoata zbog najnižeg praga osjetljivosti mirisa od 0,005 mg/L (Ferreira i sur., 2000b) u odnosu na relativno visoke koncentracije u kojima je pronađen (Tablica 44). Njegov miris redovito se opisuje kao *voćni* (Sánchez Palomo i sur., 2007). Sadržaj etil-heksanoata najvjerojatnije je također značajno utjecao na utvrđene razlike u intenzitetima *voćnih* mirisa između vina različitih tretmana, jer su pronađene koncentracije tog estera višestruko premašivale odgovarajući prag osjetljivosti od 0,014 mg/L (Ferreira i sur., 2000b). Od acetatnih estera, zbog relativno najnižeg praga osjetljivosti (0,03 mg/L; Guth, 1997) u odnosu na pronađene koncentracije, najveći utjecaj na razlike u utvrđenim intenzitetima *voćnih* mirisa najvjerojatnije je imao izoamil-acetat, pronađen u značajno višim koncentracijama u vinima tretmana MVN17, PUR17 i PEN17 tretmana u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 44). Miris izoamil-acetata redovito se uspoređuje s mirisom banane (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Pronađena koncentracija 2-feniletil-acetata kretala se u rasponu čije su granice bile bliske odgovarajućem pragu osjetljivosti od 0,25 mg/L (Guth, 1997), što upućuje da je taj ester mogao doprinijeti aromi proizvedenih vina izravno, ali i kroz sinergijsko djelovanje s esterima i ostalim hlapljivim spojevima sličnog, *cvjetnog* mirisa. Vrijedi istaknuti nešto niže koncentracije važnih hlapljivih estera pronađene u vinu BK17 u odnosu na vina MVN17, PUR17 i PEN17 tretmana (Tablica 44), što se nije odrazilo u vidu nižih intenziteta *cvjetnih* i *voćnih* mirisa tog vina u odnosu na vina PUR17 i PEN17 tretmana nakon fermentacije (F) (Tablica 45). Slično tome, vina MVN17, PUR17 i PEN17 tretmana nakon fermentacije (F) su sadržavala podjednake koncentracije većine ključnih hlapljivih estera te na osnovi njih nije bilo moguće razjasniti više intenzitete *cvjetnih* i *voćnih* mirisa vina MVN17 u odnosu na vina preostala dva spomenuta tretmana. Moguće je da su niže koncentracije pojedinih spojeva koji se mogu dovesti u vezu s nižom kvalitetom vina, kao na primjer α-terpineol koji nastaje i kao rezultat oksidacije ostalih monoterpenola (Zoecklein i sur., 1997a), ili 1-heksanola koji je nositelj uglavnom nepoželjnih travnih i *biljnih* mirisa (Oliveira i sur., 2008; Moreno-Arribas i Polo, 2009), omogućile jasniju izraženost *cvjetnih* i *voćnih* mirisa podrijetlom od hlapljivih estera u tom vinu. Koncentracije

hlapljivih masnih kiselina neodvojivo su povezane s koncentracijama odgovarajućih etilnih estera jer nastaju iz istih prekursora u fermentaciji (Ribéreau-Gayon, 2006b; Moreno-Arribas i Polo, 2009). U ovom dijelu istraživanja također je potvrđena koincidencija viših koncentracija ove dvije skupine spojeva u vinima tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17. Međutim, kao zanimljivost su se isticale nešto niže koncentracije hlapljivih masnih kiselina u vinu MVN17 tretmana u odnosu na vina drugih tretmana s različitim tipovima bentonita u fermentaciji (Tablica 44), za što je pretpostavljeno da je mogao biti djelomičan izvor spomenutih razlika. Mirisi hlapljivih masnih kiselina različite su autore uglavnom podsjećali na mirise sira, masnog i užeglog (Peinado i sur., 2004; Francis i Newton, 2005), iako se u nekim istraživanjima spominje i njihova *voćna* nota (Lorenzo i sur., 2015; Liu i sur., 2019). Nije isključena mogućnost da su u ovom slučaju niže koncentracije masnih kiselina u vinu MVN17 tretmana omogućile bolju izraženost *cvjetnih* i *voćnih* mirisa podrijetlom od hlapljivih estera. Vino MVN17 tretmana također je opisano višim intenzitetom tzv. *sovinjonskog* mirisa u odnosu na ostala vina (Tablica 45). Poznato je da su glavni nositelji *sovinjonskog* mirisa, inače karakterističnog za vina kultivara *sauvignon blanc*, hlapljivi tioli (Coetzee i du Toit, 2012). Hlapljivi tioli nisu analizirani u ovom istraživanju, ali je pretpostavljena mogućnost da su razlike u njihovim koncentracijama bile bitne za nastanak spomenutih razlika u intenzitetu *sovinjonskog* mirisa. Bez obzira na to, moguće je da su višem intenzitetu osjeta *sovinjonske* nijanse mirisa u vinu tretmana MVN17 doprinijele i visoke koncentracije ostalih mirisnih hlapljivih spojeva u odnosu na koncentracije pronađene u ostalim vinima a posebno u odnosu na vino kontrolnog tretmana K17, uključujući i već spomenute estere. Pretpostavljena je mogućnost da je važan doprinos u nastanku najvišeg intenziteta *sovinjonske* note *tropskog voća* u vinu MVN17 tretmana imala upravo visoka koncentracija izoamil-acetata (miris banane), koja je moguće bila izraženija zbog manjeg doprinosa spojeva koji su mogli suprimirati njegov miris. Iako se mirisi glavnih monoterpenola, prvenstveno linalola, nerola i geraniola, uglavnom uspoređuju s mirisima cvijeća (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b), nije utvrđena u potpunosti jasna povezanost između njihovih koncentracija i intenziteta *cvjetnih* nijansi mirisa utvrđenih u istraživanim vinima. Linalol je u svim uzorcima pronađen u koncentracijama višim od odgovarajućeg praga osjetljivosti od 15 μg/L (Guth, 1997) pa je vjerojatno izravno sudjelovao u aromi istraživanih vina, dok je moguće da se doprinos ostalih glavnih monoterpenola sastojao u njihovom zajedničkom sinergijskom djelovanju. U vinu MVN17 tretmana pronađena je niža koncentracija linalola u odnosu na vina BK17 i PEN17 tretmana (Tablica 44) što nije koincidiralo s višim intenzitetom *muškatne* arome opaženom u tom vinu (Tablica 45).

Značajno viši intenzitet *začinskih* mirisa, odnosno mirisa *aromatičnog bilja* utvrđen u vinima MVN17, PUR17 i PEN17 tretmana u odnosu na vino BK17, a posebno na vino kontrolnog tretmana K17 (Tablica 45), mogao je djelomično potjecati od više koncentracije hlapljivog fenola 4-vinilgvajakola koja je bila za dva reda veličine viša od odgovarajućeg praga osjetljivosti mirisa od 3 µg/L (Noguerol-Pato i sur., 2013) (Tablica 44). Miris 4-vinilgvajakola uglavnom se opisuje kao *začinski* (Noguerol-Pato i sur., 2013). Viši intenzitet mirisa koji podsjeća na miris meda utvrđen u vinu MVN17 u odnosu na vina ostalih tretmana (Tablica 45) nije se mogao dovesti u izravnu vezu s razlikama u koncentraciji β-damaskenona koje nisu bile statistički značajne (Tablica 44). Pretpostavljena je mogućnost da su hlapljivi esteri i u ovom slučaju imali važnu ulogu. Vino kontrolnog tretmana K17 nakon fermentacije (F) opisano je uglavnom najnižim intenzitetima pozitivnih svojstava mirisa (Tablica 45). Niži intenziteti *cvjetnog*, *voćnog* i *sovinjonskog* mirisa, kao i mirisa koji podsjeća na miris meda mogli su se povezati s najnižim koncentracijama hlapljivih estera pronađenim u tom vinu. Niži intenzitet *muškatne* note koincidirao je s najnižom koncentracijom linalola, a pretpostavljena je i mogućnost da je najniži intenzitet *začinskog*, odnosno mirisa *aromatičnog bilja* utvrđen u vinu kontrolnog tretmana djelomično bio posljedica najniže koncentracije 4-vinilgvajakola (Tablice 44 i 45). Vino MVN17 tretmana nakon fermentacije (F) je opisano najvišim intenzitetima važnih pozitivnih svojstava okusa, kao što su *svježina*, *tijelo / punoća*, *slatkoća* i *viskozitet*, u odnosu na vina ostalih tretmana, iako u većini slučajeva bez statističke značajnosti u odnosu na vino PEN17 tretmana (Tablica 45). S druge strane, vino kontrolnog tretmana K17 opisano je najnižim intenzitetima istih svojstava, iako i u ovom slučaju uz iznimke za koje nisu utvrđene statistički značajne razlike. Razlike u intenzitetima spomenutih svojstava uvjetno su se mogle dovesti u vezu s nešto višim volumnim udjelom etanola (Tablica 42) te koncentracijama pojedinih hidroksicinamoiltartarata (Tablica 43) u vinima MVN17, PUR17 i PEN17 tretmana, iako su razlike u vrijednostima spomenutih fizikalno-kemijskih parametara bile relativno male da bi se na osnovi njih u potpunosti mogle objasniti razlike utvrđene u senzorskim profilima. Pretpostavljeno je da je viši intenzitet *gorčine* u vinu kontrolnog tretmana K17 mogao potjecati od više koncentracije ukupnih fenola, ali i pojedinih fenolnih kiselina pronađenih u tom vinu (Tablica 43). Nakon fermentacije (F) vino MVN17 tretmana ocijenjeno je najvišom ocjenom za opću kvalitetu te kao najviše preferirano od strane ocjenjivača, dok je vino kontrolnog tretmana K17 ocijenjeno najnižom ocjenom (Tablica 46). Vino PEN17 tretmana ocijenjeno je kao sljedeće najviše preferirano. Takav odnos opće kvalitete vina različitih tretmana bio je u skladu s rezultatima opisne senzorske analize, ali i fizikalno-kemijske

analize, posebno s koncentracijama acetatnih estera koje su bile najviše upravo u vinima MVN7 i PEN17 tretmana (Tablica 44). Nešto slabija preferencija vina PUR17 u odnosu na vina ostalih tretmana koji su uključivali primjenu bentonita u fermentaciji nije se mogla razjasniti na osnovi rezultata fizikalno-kemijske analize.

Nakon dodatnog bistrenja (B) utvrđeno je sniženje intenziteta pojedinih senzorskih svojstava u vinima pojedinih tretmana, najviše izraženo u vinu PUR17, u brojnim slučajevima i uz statističku značajnost (Tablica 45). Pretpostavljena je mogućnost da je navedeno bilo rezultat sniženja vrijednosti različitih fizikalno-kemijskih parametara (alkoholna jakost, ekstrakt, Tablica 42), ali i koncentracija različitih važnih hlapljivih spojeva arome. Iako su neke od spomenutih promjena uočene i u vinima drugih tretmana, sniženje koncentracija hlapljivih spojeva kao rezultat dodatnog bistrenja (B), iako u pojedinim slučajevima bez statističke značajnosti, posebno se isticalo upravo u vinu PUR17 tretmana i to u slučaju linalola, citronelola i nerola, 2-feniletanola, oktanske i dekanske kiseline te etil-heksanoata i etil-oktanoata (Tablica 44). Iako je koncentracija β-damaskenona dodatnim bistrenjem snižena u vinima svih tretmana, najizraženije relativno sniženje utvrđeno je upravo u vinu PUR17 tretmana. Posljedica svega navedenog bila je niža ocjena za opću kvalitetu dodijeljena vinu PUR17 tretmana nakon dodatnog bistrenja (B) u odnosu na ocjenu nakon fermentacije (F), iako je isto utvrđeno i za vino BK17 tretmana. Nakon dodatnog bistrenja (B) vina su prema testu preferencije nanizana jednakim redoslijedom kao nakon fermentacije (F) (Tablica 46).

6. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj različitih uvjeta bistrenja bentonitom tijekom alkoholne fermentacije na potrebnu dozu bentonita za postizanje proteinske stabilnosti vina, osnovne fizikalno-kemijske parametre kvalitete, hlapljive spojeve arome, fenole te senzorsku kvalitetu vina malvazije istarske. Rezultati ovog istraživanja potvrdili su postavljenu hipotezu da određeni tretmani bistrenja bentonitom tijekom alkoholne fermentacije mogu poboljšati proteinsku stabilnost te fizikalno-kemijsku i senzorsku kvalitetu vina malvazije istarske. Temeljem dobivenih rezultata, za učinkovitost pojedinih čimbenika utvrđeno je sljedeće:

- U usporedbi sa standardnim bistrenjem nakon završene fermentacije, **djelomično bistrenje bentonitom tijekom alkoholne fermentacije** snizilo je ukupnu dozu potrebnu za proteinsku stabilizaciju vina malvazije istarske. Sniženje je ovisilo o terminu primjene i bilo je najizraženije u kasnijim fazama fermentacije (do 21 % niža doza).
- Utvrđen je jasan utjecaj primjene bentonita u fermentaciji na koncentracije različitih fenolnih spojeva, prvenstveno u odnosu na kontrolni tretman, pri čemu je bitno spomenuti očuvanje viših koncentracija hidroksicinamoiltartarata. Razlike između pojedinih tretmana s različitim terminima primjene bentonita u fermentaciji bile su manje izražene.
- Bistrenje provedeno tijekom fermentacije pokazalo je zanemariv ili umjeren utjecaj na hlapljive spojeve sortne arome. Zabilježen je značajniji pozitivan učinak na sintezu i očuvanje ključnih hlapljivih spojeva fermentacijske arome, posebno većine prevladavajućih i najznačajnijih hlapljivih masnih kiselina te etilnih i acetatnih estera u odnosu na kontrolni tretman**.**
- Spomenute promjene u fizikalno-kemijskom sastavu bile su manje ili više izražene u različitim godinama istraživanja, ali u svim slučajevima su se značajno pozitivno odrazile na senzorska svojstva vina. Vina djelomično bistrena tijekom fermentacije, posebno u kasnijim fazama fermentacije, ocijenjena su višim ocjenama te opisana višim intenzitetima ključnih senzorskih svojstava u odnosu na vino kontrolnog tretmana.
- Dodatno bistrenje nakon fermentacije imalo je nepovoljan učinak na koncentracije važnih fenolnih spojeva i hlapljivih spojeva arome, iako ne jednako značajno izražen u različitim godinama istraživanja. Potpuno stabilna vina uglavnom su ocijenjena nižim ocjenama za senzorsku kvalitetu u odnosu na vina istih tretmana nakon fermentacije, ali su u velikoj većini slučajeva ocijenjena višim ocjenama od stabilnog vina kontrolnog tretmana.

- **Postupno dodavanje bentonita tijekom druge polovine trajanja fermentacije** nije se pokazalo učinkovitijim u sniženju ukupne potrebne doze u odnosu na primjenu cjelovite doze pri kraju fermentacije niti je sveukupan učinak bio značajno drugačiji od tog tretmana. Oba tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji pokazala su se perspektivnim za očuvanje viših koncentracija hlapljivih, mirisnih estera u odnosu na vino kontrolnog tretmana. Poboljšanja u fizikalno-kemijskom sastavu utvrđena neposredno nakon fermentacije u odnosu na vino kontrolnog tretmana nisu u potpunosti očuvana tijekom daljnje dorade vina. Stabilna vina oba tretmana s primjenom bentonita u fermentaciji senzorskom su analizom ocijenjena kao kvalitetnija u odnosu na vino kontrolnog tretmana.
- Tretman **bistrenja bentonitom pripremljenim u deioniziranoj vodi** pokazao je vrlo malu prednost u učinkovitosti smanjenja ukupne potrebne doze u odnosu na tretman s bentonitom pripremljenim u vodovodnoj vodi. Bio je vrlo sličnog učinka na koncentracije fenolnih spojeva i hlapljivih spojeva arome te senzorsku kvalitetu vina kao i spomenuti tretman. Poboljšanje u vidu očuvanih viših koncentracija pojedinih acetatnih estera u odnosu na kontrolni tretman utvrđeno u vinima nakon fermentacije nije očuvano u daljnjoj doradi vina. Vino nakon fermentacije, kao i stabilno vino istog tretmana, ocijenjeno je višim ocjenama u odnosu na vino kontrolnog tretmana u odgovarajućoj fazi.
- **Primjenom tanina u fermentaciji** ostvareno je sniženje ukupne potrebne doze bentonita usporedivo sa sniženjem doze ostvarenim tretmanom bistrenja bentonitom u posljednjoj trećini fermentacije, no kombinirana primjena tanina i bentonita u fermentaciji nije pokazala sinergijski učinak u poboljšanju proteinske stabilnosti.
- Za razliku od vina većine ostalih tretmana u kojima je utvrđen blagi negativan utjecaj bistrenja bentonitom u fermentaciji na koncentraciju ukupnog suhog ekstrakta bez reducirajućih šećera i ukupne kiselosti, tretmanima s primjenom tanina, samostalno ili u kombinaciji s bentonitom, očuvane su jednake ili više koncentracije navedenih parametara u odnosu na vino kontrolnog tretmana, za što se ispostavilo da je jedna od prednosti ovakvog pristupa.
- Tretmani s primjenom tanina obogatili su fenolni sastav vina taninima, ali i višim koncentracijama pojedinih fenola manjih molekulskih masa. Tretman s primjenom tanina očuvao je više koncentracije hidroksicinamoiltartarata i slobodnih hidroksicimetnih kiselina. Dodani tanini su u kombinaciji s bentonitom u fermentaciji pokazali sinergijski učinak na očuvanje koncentracija hidroksicinamoiltartarata. Na osnovi razlika u koncentracijama niza

neidentificiranih fenolnih spojeva u vinima proizvedenim uz primjenu tanina, tijekom i nakon fermentacije, zaključeno je da je došlo do značajnih interakcija između bentonita i tanina.

- Tretmani s primjenom tanina pokazali su vrlo sličan učinak na koncentracije hlapljivih spojeva arome kao i tretman s bistrenjem bentonitom u posljednjoj trećini trajanja fermentacije.
- Tretmani s primjenom tanina i s kombiniranom primjenom tanina i bentonita pokazali su veliki potencijal za poboljšanje senzorske kvalitete vina, što je utvrđeno neposredno nakon fermentacije. Navedeno se nije moglo dovesti u izravnu vezu i razjasniti na osnovi razlika u koncentracijama analiziranih hlapljivih spojeva arome. Nakon dodatnog bistrenja stabilno vino dobiveno primjenom tanina bez bentonita, ocijenjeno najvišim ocjenama nakon fermentacije, pretrpjelo je najznačajnije sniženje razine senzorske kvalitete.
- **Povišenjem temperature od 2 °C u trenutku primjene bentonita u posljednjoj trećini trajanja fermentacije** nije postignuto poboljšanje u postizanju proteinske stabilnosti vina. Posebno je važno to što je viša temperatura fermentacije pri bistrenju rezultirala višim koncentracijama važnih hlapljivih estera. Ovaj tretman bio je podjednako uspješan u odnosu na kontrolni tretman u poboljšanju opće senzorske kvalitete i većine ključnih senzorskih svojstava vina kao i osnovni tretman s bistrenjem u fermentaciji pri nižoj temperaturi. Dodatno bistrenje umanjilo je senzorsku kvalitetu tih vina, koja je, međutim, i nakon završne dorade ocijenjena višom u odnosu na kvalitetu stabilnog vina kontrolnog tretmana.
- **Tretmanom bistrenja dvostrukom dozom bentonita u fermentaciji** nije postignuto proporcionalno poboljšanje u postizanju proteinske stabilnosti vina u odnosu na tretman bistrenja jednostrukom dozom. Očuvane su više koncentracije hidroksicinamoiltartarata u odnosu na vino bistreno jednostrukom dozom i vino kontrolnog tretmana te više koncentracije hlapljivih acetatnih estera u vinu. Tretman s djelomičnim bistrenjem dvostrukom dozom bentonita tijekom fermentacije bio je podjednako uspješan u odnosu na kontrolni tretman u poboljšanju opće senzorske kvalitete i većine ključnih senzorskih svojstava kao i osnovni tretman s bistrenjem jednostrukom osnovnom dozom, međutim, dodatno bistrenje značajnije je umanjilo njegovu senzorsku kvalitetu u odnosu na potonji.
- Utvrđen je značajan utjecaj **primjene različitih tipova bentonita** na ukupnu dozu bentonita potrebnu za konačnu proteinsku stabilizaciju vina malvazije istarske. Različiti tipovi bentonita zahtijevali su različite doze za postizanje ekvivalentne razine proteinske stabilnosti. Potvrđeno je da bentonit s višim udjelom Ca^{2+} kationa pokazuje slabiju moć adsorpcije proteina, ali i proizvodi puno kompaktniji talog manjeg volumena u odnosu na bentonite s

Na^+ kao prevladavajućim kationom. Pokazano je da udio silicija u strukturi Na tipa bentonita također doprinosi kompaktnosti i manjem volumenu taloga.

- Različiti tipovi bentonita primijenjeni u fermentaciji pokazali su različit utjecaj na koncentracije fenolnih spojeva i hlapljivih spojeva arome, ali uglavnom s istim predznakom u odnosu na kontrolni tretman. Većina tretmana s primjenom različitih bentonita pozitivno je utjecala na očuvanje koncentracija pojedinih glavnih hidroksicinamoiltartarata i snizila koncentracije slobodnih hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina. Većina primijenjenih tipova bentonita pokazala je povoljan učinak na očuvanje hlapljivih masnih kiselina i estera ključnih za senzorsku kvalitetu vina. Vina tih tretmana ocijenjena su višim ocjenama za senzorsku kvalitetu i opisana višim intenzitetima mnogih pozitivnih senzorskih svojstava okusa i mirisa u odnosu na vino kontrolnog tretmana. Dodatno bistrenje u kojem je u svim tretmanima primijenjen jednak bentonit, ali u različitim dozama, uzrokovalo je nejednake promjene koncentracija kemijskih spojeva u stabilnim vinima. Stabilna vina pojedinih tretmana ocijenjena su nižim ocjenama nego ista vina nakon fermentacije, iako u većini slučajeva višim nego stabilno vino kontrolnog tretmana.

Pokazano je da istraženi alternativni pristup bistrenju (djelomično bistrenje tijekom fermentacije) ima potencijala za primjenu u suvremenoj vinarskoj industriji s ciljem smanjenja potrebne ukupne doze bentonita, odnosno dobivanja većih količina vina bolje fizikalno-kemijske i senzorske kvalitete. Učinci pojedinih tretmana primijenjenih u ovom istraživanju nisu bili jednakog intenziteta ili čak predznaka u različitim godinama istraživanjima. Različiti negativni i, što je još važnije, pozitivni učinci bili su izraženiji u djelomično bistrenim vinima nakon fermentacije, dok ih je dodatno bistrenje nakon fermentacije u više slučajeva umanjilo ili poništilo te se tako pokazalo kao ključni korak koji onemogućuje ostvarenje punog potencijala pristupa s djelomičnim bistrenjem tijekom fermentacije. Navedeno upućuje da bi se daljnja istraživanja u okviru ove teme trebala usredotočiti na razjašnjavanje utjecaja različitih fizikalno-kemijskih parametara u grožđu kao osnovnoj polazišnoj sirovini, prvenstveno koncentracije i sastava proteina koji uzrokuju nestabilnost, a zatim i ostalih čimbenika koji mogu imati utjecaj. Dobiveni rezultati jasno su ukazali na potrebu pronalaženja rješenja za ograničenje ili umanjenje nepovoljnih učinaka završnog bistrenja bentonitom nakon fermentacije. Jedna od mogućnosti koja se nameće je i razvoj protokola za potpunu proteinsku stabilizaciju minimalnom dozom bentonita već tijekom alkoholne fermentacije, čime bi se izbjegao dodatni korak bistrenja.

7. LITERATURA

Achaerandio, I., Pachova, V., Güell, C., López, F. (2001) Protein adsorption by bentonite in a white wine model solution: effect of protein molecular weight and ethanol concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 122-126.

Aleixandre-Tudo, J. L., Weightman, C., Panzeri, V., Nieuwoudt, H. H., du Toit, W. J. (2015) Effect of skin contact before and during alcoholic fermentation on the chemical and sensory profile of South African Chenin Blanc White Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **36**, 366–377. doi: 10.21548/36-3-969

Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M. (2006) Yeast autolysis in sparkling wine – a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **12**, 119–127. doi: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x

Anelli, G. (1977) The Proteins of Must. *Am. J. Enol. Vitic.* **28**, 200-203.

Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R. (2001) Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chem.* **72**, 19–28. doi: 10.1016/S0308-8146(00)00194-1

APPRRR (2016) Vinogradarski registar. APPRRR - Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju, Zagreb, <http://www.apprrr.hr/vinogradarski-registar-1128.aspx>. Pristupljeno 10. listopada 2017.

Armada, L., Falqué, E. (2007) Repercussion of the clarification treatment agents before the alcoholic fermentation on volatile composition of white wines. *Eur. Food Res. Technol.* **225**, 553–558. doi: 10.1007/s00217-006-0453-3

AWRI (2015) eNews – January 2015. AWRI-The Australian Wine Research Institute, Adelaide, <https://www.awri.com.au/information_services/enews/2015/01/19/enews-january-2015/>. Pristupljeno 17. travnja 2020.

Baffi, M. A., Tobal, T., Lago, J. H., Boscolo, M., Gomes, E., Da-Silva, R. (2013) Wine aroma improvement using a β-glucosidase preparation from Aureobasidium pullulans. *Appl. Biochem. Biotech.* **169**, 493-501. doi: 10.1007/s12010-012-9991-2

Balík, J., Kyseláková, M., Tříska, J., Vrchotová, N., Veverka, J., Híc, P., Totušel, J., Lefnerová, D. (2008) The changes of selected phenolic substances in wine technology. *Czech J. Food Sci.* **26**, S3–S12. doi: 10.17221/239/2008-CJFS

Bayly, F. C., Berg, H. W. (1967) Grape and wine proteins of white wine varietals. *Am. J. Enol. Vitic.* **24**, 18–32.

Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., Ferreira, R. B. (2009) The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chem.* **112**, 169−177. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.05.070

Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., Ferreira, R. B. (2010) Protein haze formation in wines revisited. The stabilising effect of organic acids. *Food Chem.* **122**, 1067−1075. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.03.076

Bellachioma, A., Riponi, C., Sonni, F., Chinnici, F. (2008) Applicazione di un protocollo sperimentale per la produzione di vini bianchi in assenza di SO2. *L'Enologo* **5**, 77–81.

Berg, H. W., Akiyoshi, M. (1971) The utility of potassium bitartrate concentration product values in wine processing. *Am. J. Enol. Vitic*. **22**, 127-134.

Bergaya, F., Jaber, M., Lambert, J. F. (2012) Clays and clay minerals as layered nanofillers for (bio)polymers. U: *Environmental Silicates Nano-Biocomposites* (Averous, L., Pollet, E., ured.), Springer, London, str. 41–75.

Blade, W. H., Boulton, R. (1988) Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**, 193–199.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (1996) *Principles and Practices of Winemaking*, Chapman & Hall, New York.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* **56**, 317-333. doi: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x

Bubola, M., Lukić, I., Radeka, S., Sivilotti, P., Grozić, K., Vanzo, A., Bavčar, D., Lisjak, K. (2019) Enhancement of Istrian Malvasia wine aroma and hydroxycinnamate composition by hand and mechanical leaf removal. *J. Sci. Food Agric.* **99**, 904-914. doi: 10.1002/jsfa.9262

Burin, V. M., Caliari, V., Bordignon-Luiz, M. T. (2016) Nitrogen compounds in must and volatile profile of white wine: Influence of clarification process before alcoholic fermentation. *Food Chem.* **202**, 417–425. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.096

Callejón, R. M., Margulies, B., Hirson, G. D., Ebeler, S. E. (2012) Dynamic changes in volatile compounds during fermentation of Cabernet Sauvignon grapes with and without skins. *Am. J. Enol. Vitic.* **63**, 301–312. doi: 10.5344/ajev.2012.12009

Canuti, V., Puccioni, S., Giovani, G., Salmi, M., Rosi, I., Bertuccioli, M. (2012) Effect of Oenotannin Addition on the Composition of Sangiovese Wines from Grapes with Different Characteristics. *Am. J. Enol. Vitic.* **63**, 220-231. doi: 10.5344/ajev.2012.11091

Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. (2010) Flavonol profiles of Vitis vinifera white grape cultivars. *J. Food Compos. Anal.* **23**, 699–705. doi: 10.1016/j.jfca.2010.03.017

Catarino, S., Madeira, M., Monteiro, F., Rocha, F., Curvelo-Garcia, A. S., Bruno de Sousa, R. (2008) Effect of bentonite characteristics on the elemental composition of wine. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 158-165. doi: 10.1021/jf0720180

Chagas, R., Monteiro, S., Ferreira, R. B. (2012) Assessment of potential effects of common fining agents used for white wine protein stabilization. *Am. J. Enol. Vitic.* **63**, 574-578. doi: 10.5344/ajev.2012.12016

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., Lavigne, V. (1993) Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.* **62**, 191–202. doi: 10.1002/jsfa.2740620213

Chen, K., Escott, C., Loira, I., Del Fresno, J. M., Morata, A., Tesfaye, W., Calderon, F., Benito, S., Suárez-Lepe, J. A. (2016) The Effects of Pre-Fermentative Addition of Oenological Tannins on Wine Components and Sensorial Qualities of Red Wine. *Molecules* **21**, 1445, 17. doi: 10.3390/molecules21111445

Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J., Duprat, F., Moutounet, M. (1990) Must browning in relation to the behavior of phenolic compounds during oxidation. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**, 346–349.

Cheynier, V., Souquet, J.-M., Samson, A., Moutounet, M. (1991) Hyperoxidation: influence of various oxygen supply levels on oxidation kinetics of phenolic compounds and wine quality. *Vitis* **30**, 107-115. doi: 10.5073/vitis.1991.30.107-115

Clarke, R. J., Bakker, J. (2004) *Wine Flavour Chemistry*, Wiley-Blackwell, Chichester.

Clodoveo, M. L., Hachicha Hbaieb, R., Kotti, F., Scarascia Mugnozza, G., Gargouri, M. (2014) Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **13**, 135–154. doi: 10.1111/1541-4337.12054

Coetzee, C., du Toit, W. J. (2012) A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Res. Int.* **45**, 287–298. doi:10.1016/j.foodres.2011.09.017

Colangelo, D., Torchio, F., De Faveri, D. M., Milena, L. (2018) The use of chitosan as alternative to bentonite for wine fining: Effects on heat-stability, proteins, organic acids, colour, and volatile compounds in an aromatic white wine. *Food Chem.* **264**, 301–309. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.05.005

Cosme, F., Fernandes, C., Ribeiro, T., Filipe-Ribeiro, L., Nunes, F. M (2020) White Wine Protein Instability: Mechanism, Quality Control and Technological Alternatives for Wine Stabilisation – An Overview. *Beverages* **6**, 19, 28. doi: 10.3390/beverages6010019

Croteau, R. (1984) Biosynthesis and catabolism of monoterpenes. U: *Isopentenoids in Plants* (Nes, W. D., Fuller, G., Tsai, L., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 31–80.

Dambrouck, T., Marchal, R., Cilindre, C., Parmentier, M., Jeandet, P. (2005) Determination of the grape invertase content (using PTAELISA) following various fining treatments versus changes in the total protein content of wine. Relationships with wine foamability. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8782−8789. doi: 10.1021/jf051276z

Datta, S. K., Muthukrishnan, S. (1999) *Pathogenesis-related proteins in plants*, CRC Press LLC, Boca Raton.

Díaz-Maroto, M. C., Schneider, R., Baumes, R. (2005) Formation Pathways of Ethyl Esters of Branched Short-Chain Fatty Acids during Wine Aging. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3503-3509. doi: 10.1021/jf048157o

Di Gaspero, M., Ruzza, P., Hussain, R., Honisch, C., Biondi, B., Siligardi, G., Marangon, M., Curioni, A., Vincenzi, S. (2020) The Secondary Structure of a Major Wine Protein is Modified upon Interaction with Polyphenols. *Molecules* **25**, 1646, 16. doi: 10.3390/molecules25071646

Di Gaspero, M., Ruzza, P., Hussain, R., Vincenzi, S., Biondi, B., Gazzola, D., Siligardi, G., Curioni, A. (2017) Spectroscopy reveals that ethyl esters interact with proteins in wine. *Food. Chem.* **217**, 373-378. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.08.133

Di Stefano, R., Cravero, M. C., Gentilini, N. (1989) Methods for the study of wine polyphenols. *L'Enotecnico* **5**, 83-89.

Di Stefano, R., Maggiorotto, G., Gianotti, S. (1992) Transformazioni di nerolo e geraniolo indotte dai lieviti. *Riv. Vitic. Enol.* **1**, 43–49.

Dordoni, R., Colangelo, D., Giribaldi, M., Giuffrida, M. G., De Faveri, D. M., Lambri, M. (2015a) Effect of bentonite characteristics on wine proteins, polyphenols, and metals under conditions of different pH. *Am. J. Enol. Vitic.* **66**, 518-530. doi: 10.5344/ajev.2015.15009

Dordoni, R., Galasi, R., Colangelo, D., De Faveri, D. M., Lambri, M. (2015b) Effects of fining with different bentonite labels and doses on colloidal stability and colour of a Valpolicella red wine. *Int. J. Food Sci. Technol.* **50**, 2246–2254. doi: 10.1111/ijfs.12875

Dufrechou, M., Poncet-Legrand, C., Sauvage, F.-X., Vernhet, A. (2012) Stability of white wine proteins: combined effect of pH, ionic strength, and temperature on their aggregation. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 1308−1319. doi: 10.1021/jf204048j

Dufrechou, M., Vernhet, A., Roblin, P., Sauvage, F.-X., Poncet-Legrand, C. (2013) White wine proteins: how does the pH affect their conformation at room temperature? *Langmuir* **29**, 10475−10482. doi: 10.1021/la401524w

Dumitriu, G.-D., López de Lerma, N., Luchian, C. E., Cotea, V. V., Peinado, R. A. (2018) Study of the potential use of mesoporous nanomaterials as fining agent to prevent protein haze in white wines and its impact in major volatile aroma compounds and polyols. *Food Chem.* **240**, 751-758. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.163

Dupin, I. V. S., McKinnon, B. M., Ryan, C., Boulay, M., Markides, A. J., Jones, G. P., Williams, P. J., Waters, E. J. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3098-3105. doi: 10.1021/jf0002443

Esteruelas, M., Poinsaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M. F., Canals, J. M., Zamora, F. (2009) Characterization of natural haze protein in Sauvignon white wine. *Food Chem.* **113**, 28−35. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.07.031

Ewart, A. J. W., Phipps, G. J., Iland, P. G. (1980) Bentonite additions to wine: before, during or after fermentation? *Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker* **196**, 46–47.

Falconer, R. J., Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Neilson, K. A., Chan, C., Waters, E. J. (2010) Thermal stability of thaumatin-like protein, chitinase, and invertase isolated from Sauvignon blanc and Semillon juice and their role in haze formation in wine. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 975−980. doi: 10.1021/jf902843b

Fang, F., Li, J.-M., Zhang, P., Tang, K., Wang, W., Pan, Q.-H., Huang, W.-D. (2008) Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. *Food Res. Int.* **41**, 53–60. doi: 10.1016/j.foodres.2007.09.004

Ferreira, R. B., Monteiro, S., Piçarra-Pereira, M. A., Tanganho, M. C., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R. (2000a) Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods. *Am. J. Enol. Vitic.* **51**, 2–28.

Ferreira, R. B., Piçarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R. (2001) The wine proteins. *Trends Food Sci. Tech.* **12**, 230-239. doi: 10.1016/S0924-2244(01)00080-2

Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero, A., Cacho, J. (1995) Investigation of the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.* **67**, 381–392. doi: 10.1002/jsfa.2740670316

Ferreira, V., López, R., Cacho, J. F. (2000b) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varietes. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1659–1667. doi: 10.1002/1097-0010(20000901)80:11<1659::AID-JSFA693>3.0.CO;2-6

Feuillat, M., Brillant, G., Rochard, J. (1980) Mise en evidence d'une production de proteases exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Connaiss. Vigne Vin* **14**, 37–52.

Flores, J. H., Heatherbell, D. A., McDaniel, M. R. (1990) Ultrafiltration of wine: Effect of ultrafiltration on white Riesling and Gewürztraminer wine composition and stability. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**, 207–214.

Francis, I. L., Newton, J. L. (2005) Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* **11**, 114–126. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00283.x

Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Teissedre, P. L. (1995) Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 890-894. doi: 10.1021/jf00052a008

Garrido, J., Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols – a chemical perspective. *Food Res. Int.* **54**, 1844-1858. doi: 10.1016/j.foodres.2013.08.002

Gawel, R., Day, M., Van Sluyter, S. C., Holt, H., Waters, E. J., Smith, P. A. (2014) White Wine Taste and Mouthfeel As Affected by Juice Extraction and Processing. J. Agric. Food Chem. 62, 10008-10014. doi: 10.1021/jf503082v

Gazzola, D., Van Sluyter, S. C., Curioni, A., Waters, E. J., Marangon, M. (2012) Roles of proteins, polysaccharides, and phenolics in haze formation in white wine via reconstitution experiments. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10666−10673. doi: 10.1021/jf302916n

Ghanem, C., Taillandier, P., Rizk, M., Rizk, Z., Nehme, N., Souchard, J.P., El Rayess, Y. (2017) Analysis of the impact of fining agents types, oenological tannins and mannoproteins and their concentrations on the phenolic composition of red wine. *LWT - Food Sci. Technol.* **83**, 101-109. doi: 10.1016/j.lwt.2017.05.009

Gonçalves, F. J., Jordão, A. M. (2009) Influence of different commercial fining agents on proanthocyanidin fraction and antioxidant activity of a red wine from Baga grapes. *J. Int. Sci.. Vigne Vin* **43**, 111-120. doi: 10.20870/oeno-one.2009.43.2.802

Gris, E. F., Mattivi, F., Ferreira, E. A., Vrhovsek, U., Filho, D. W., Pedrosa, R. C., Bordignon-Luiz, M. T. (2013) Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on *in vivo* antioxidant activity. *J. Food Compos. Anal.* **31**, 31-40. doi: 10.1016/j.jfca.2013.03.002

Grosch, W. (2001) Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chem. Senses* **26**, 533–545. doi: 10.1093/chemse/26.5.533

Guth H. (1997) Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3027-3032. doi: 10.1021/jf970280a

Guyot, S., Vercauteren., J., Cheynier, V. (1996) Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* **42**, 1279–1288. doi: 10.1016/0031-9422(96)00127-6

Hagerman, A. E. (1989) Chemistry of tannin-protein complexation. U: *Chemistry and significance of condensed tannins* (Hemingway, R. W., Karchesy, J. J., ured.), Plenum Press, New York, str. 323–331.

Hagerman, A. E., Rice, M. E., Richard, N. T. (1998a) Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloylglucose and epicatechin16(4–8) catechin (procyanidin). *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2590–2595.

Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hatzfeld, P. W., Riechel, T. L. (1998b) High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1887-1892. doi: 10.1021/jf970975b

Harbertson, J. F., Parpinello, G. P., Heymann, H., Downey, M. O. (2012) Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chem.* **131**, 999–1008. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.09.101

Haslam, E. (1980) In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* **19**, 2577-2582. doi: 10.1016/S0031-9422(00)83922-9

Haslam, E., Lilley, T. H., Warminski, E., Liao, H., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S. H., Goulding, P. N., Luck, G. (1992) Polyphenol complexation. A study in molecular recognition. U: *Phenolic compounds in food and their effects on health I*: *Analysis, Ocurrence, & Chemistry* (Ho, C.-T., Lee, C. Y., Huang, M.-T., ured.), American Chemical Society, Washington, DC, str. 8–50.

HRN EN ISO 8589:2010, Senzorske analize - Opće uputstvo za projektiranje prostorija za ispitivanje.

Hsu, J. C., Heatherbell, D. A., Flores, J. H., Watson, B. T. (1987) Heat-unstable proteins in grape juice and wine. II. Characterization and removal by ultrafiltration. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**, 17−22.

ISO 3591:1977, Sensory analysis - Apparatus - Wine-tasting glass.

IVB (2017) Izvješće o poslovanju za 2016. godinu. IVB-Istarski vodovod, Buzet, <https://www.ivb.hr/media/1171/ivb_izvjesce_o_poslovanju_2016.pdf>. Pristupljeno 17. travnja 2020.

IVB (2018) Izvješće o poslovanju za 2017. godinu. IVB-Istarski vodovod, Buzet, <https://www.ivb.hr/media/1412/ivb_godisnje_izvjesce_2017.pdf>. Pristupljeno 17. travnja 2020.

IVB (2019) Rezultati kondicionirane vode na postrojenjima u 2018. g., interne kontrole. IVB-Istarski vodovod, Buzet, <https://www.ivb.hr/media/1606/ivb-kvalit-kondic-vode-postrojenja-2018.pdf>. Pristupljeno 17. travnja 2020.

Jackson, R. S. (2008) *Wine Science – Principles and Applications*, 3. izd., Elsevier, Amsterdam/Boston/Heidelberg/London/New York/Oxford/Paris/San Diego/San Francisco/ Singapore/Sydney/Tokyo.

Jaeckels, N., Tenzer, S., Rosch, A., Scholten, G., Decker, H., Fronk, P. (2015) β-Glucosidase removal due to bentonite fining during winemaking. *Eur. Food Res. Technol.* **241**, 253–262. doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.062

Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P. (1994) Occurrence of a resveratrol β-D-glucoside in wine: Preliminary studies. *Vitis* **33**, 183–184. doi: 10.5073/vitis.1994.33.183-184

Jeremic, J., Vongluanngam, I., Ricci, A., Parpinello, G. P., Versari, A. (2020) The Oxygen Consumption Kinetics of Commercial Oenological Tannins in Model Wine Solution and Chianti Red Wine. *Molecules* **25**, 1215, 13.

Jiang, J. Q., Cooper, C., Ouki, S. (2002) Comparison of modified montmorillonite adsorbents. Part I: Preparation, characterization and phenol removal. *Chemosphere* **47**, 711-716. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00011-5

Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., Waters, E. J. (2008) The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Qual. Pref.* **19**, 596−607. doi: 10.1016/j.foodqual.2008.03.005

Jourdes, M., Pouységu, L., Deffieux, D., Teisseder, P.-L., Quideau, S. (2013) Hydrolyzable Tannins: Gallotannins and Ellagitannins. U: *Natural Products* (Ramawat, K. G., Mérillon, J. M., ured.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 1975-2010.

Kawatra, S. K., Ripke, S. J. (2003) Laboratory studies for improving green ball strength in bentonite-bonded magnetite concentrate pellets. *Int. J. Miner. Process.* **72**, 429-441. doi: 10.1016/S0301-7516(03)00117-0

Kennedy, J. A. (2008) Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Cien. Inv. Agr.* **35**, 107-120. doi: 10.4067/S0718-16202008000200001

Kennedy, J. A., Saucier, C., Glories, Y. (2006) Grape and wine phenolics: History and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 239–248.

Killian, E., Ough, C. S. (1979) Fermentation Esters - Formation and Retention as Affected by Fermentation Temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* **30**, 301-305.

Kunkee, R. E. (1984) Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiol.* **1**, 315–332. doi: 10.1016/0740-0020(84)90065-0

Lagace, L. S., Bisson, L. F. (1990) Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**, 147–155.

Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97–129. doi: 10.21548/21-1-3560

Lambri, M., Dordoni, R., Giribaldi, M., Violeta, M. R., Giuffrida, M. G. (2012a) Heat-unstable protein removal by different bentonite labels in white wines. *LWT – Food Sci. Technol.* **46**, 460–467. doi: 10.1016/j.lwt.2011.11.022

Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., De Faveri, D. M. (2010) Effect of bentonite fining on odor-active compounds in two different white wine styles. *Am. J. Enol. Vitic.* **61**, 225–233.

Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., De Faveri, D. M. (2012b) Comparing the impact of bentonite addition for both must clarification and wine fining on the chemical profile of wine from Chambave Muscat grapes. *Int. J. Food Sci. Tech.* **47**, 1–12. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02800.x

Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., De Faveri, D. M. (2013) Odor-active compound adsorption onto bentonite in a model white wine solution. *Chem. Eng. Trans.* **32**, 1741-1746. doi: 10.3303/ACOS1311021

Lambri, M., Colangelo, D., Dordoni, R., Torchio, F., De Faveri, D. M. (2016) Innovations in the Use of Bentonite in Oenology: Interactions with Grape and Wine Proteins, Colloids,

Polyphenols and Aroma Compounds. U: *Grape and Wine Biotechnology* (Morata, A., ured.), IntechOpen, London, str. 381-400.

Larcher, R., Tonidandel, L., Villegas, T. R., Nardin, T., Fedrizzi, B., Nicolini, G. (2015) Pre-Fermentation Addition Of Grape Tannin Increases The Varietal Thiols Content In Wine. *Food Chem.* **166**, 56-61. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.149

Li, H., Tao, Y.-S., Wang, H., Zhang, L. (2007) Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China). *Eur. Food Res. Technol.* **227**, 287–292. doi: 10.1007/s00217-007-0722-9

Lira, E., Rodríguez-Bencomo, J. J., Salazar, F. N., Orriols, I., Fornos, D., López, F. (2015) Impact of Bentonite Additions during Vinification on Protein Stability and Volatile Compounds of Albariño Wines. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3004−3011. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00993

Lira, E., Salazar, F. N., Rodríguez-Bencomo, J. J., Vincenzi, S., Curioni, A., López, F. (2014) Effect of using bentonite during fermentation on protein stabilisation and sensory properties of white wine. *Int. J. Food Sci. Tech.* **49**, 1070–1078. doi: 10.1111/ijfs.12402

Liu, M., Yang, K., Qi, Y., Zhang, J., Fan, M., Wei, X. (2018) Fermentation temperature and the phenolic and aroma profile of persimmon wine. *J. I. Brewing* **124**, 269-275. doi: 10.1002/jib.497

Liu, P.-T., Duan, C.-Q., Yan, G.-L. (2019) Comparing the Effects of Different Unsaturated Fatty Acids on Fermentation Performance of Saccharomyces cerevisiae and Aroma Compounds during Red Wine Fermentation. *Molecules* **24**, 538. doi: 10.3390/molecules24030538

Lorenzo, C., Garde-Cerdán, T., Lara, J. F., Martínez-Gil, A. M., Pardo, F., Salinas, M. R. (2015) Volatile Composition of Wines Elaborated from Organic and Non-Organic Grapes. *Fermentol Techno* **4**, 117. doi: 10.4172/2167-7972.1000117

López-Malo, M., Querol, A., Guillamon, J. M. (2013) Metabolomic Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the Cryotolerant Species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during Wine Fermentation at Low Temperature. *PLoS ONE* **8**, e60135, 14. doi: 10.1371/journal.pone.0060135

Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M. (1996) Study of the binding of aroma compounds by bentonite in must, wine and model systems. *Vitis* **35**, 59-62. doi: 10.5073/vitis.1996.35.59-62

Lubbers, S., Voilley, A., Charpentier, C., Feuillat, M. (1993) Mise en Evidences of interactions between wine macromolecules and aroma. *French Review of Enology* **144**, 12–18.

Lucchetta, M., Pocock, K. F., Waters, E. J., Marangon, M. (2013) Use of Zirconium Dioxide during Fermentation as an Alternative to Protein Fining with Bentonite for White Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **64**, 400−404. doi: 10.5344/ajev.2013.12143

Lukić, I., Budić-Leto, I., Bubola, M., Damijanić, K., Staver, M. (2017a) Pre-fermentative cold maceration, *saignée*, and various thermal treatments for more options in modulating volatile aroma and phenol profiles of red wine. *Food Chem.* **224**, 251-261. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.12.077

Lukić, I., Horvat, I. (2017) Differentiation of commercial PDO wines produced in Istria (Croatia) according to variety and harvest year based on HS-SPME-GC/MS volatile aroma compounds profiling. *Food Technol. Biotech.* **55**, 95-108. doi: 10.17113/ftb.55.01.17.4861

Lukić, I., Horvat, I., Radeka, S., Damijanić, K., Staver, M. (2019) Effect of different levels of skin disruption and contact with oxygen during grape processing on phenols, volatile aromas, and sensory characteristics of white wine. *J. Food Process. Pres.* **43**, e13968, 12. doi: 10.1111/jfpp.13969

Lukić, I., Lotti, C., Vrhovsek, U. (2017b) Evolution of free and bound volatile aroma compounds and phenols during fermentation of Muscat blanc grape juice with and without skins. *Food Chem.* **232**, 25-35. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.166

Lukić, I., Plavša, T., Sladonja, B., Peršurić, Đ. (2008) Aroma compounds as markes of wine quality in the case of Malvazija istarska young wine. *J. Food Qual.* **31**, 717-735. doi: 10.1111/j.1745-4557.2008.00230.x

Lukić, I., Radeka, S., Grozaj, N., Staver, M., Peršurić, Đ. (2016) Changes in physico-chemical and volatile aroma compound composition of Gewürztraminer wine as a result of late and ice harvest. *Food Chem.* **196**, 1048-1057. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.061

Ma, T.-Z., Gong, P.-F., Lu, R.-R., Zhang, B., Morata, A., Han, S.-Y. (2020) Effect of Different Clarification Treatments on the Volatile Composition and Aromatic Attributes of 'Italian Riesling' Icewine. *Molecules* **25**, 2657, 16. doi: 10.3390/molecules25112657

Main, G. L., Morris, J. R. (1991) Color of Riesling and Vidal Wines as Affected by Bentonite, Cufex®, and Sulfur Dioxide Juice Treatments. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 354−357.

Main, G. L., Morris, J. R. (1994) Color of Seyval blanc juice and wine as affected by juice fining and bentonite fining during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **45**, 417-422.

Majewski, P., Barbalet, A., Waters, E. (2011) $1 billion hidden cost of bentonite fining. *Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker* **569**, 58−62.

Marangon, M., Lucchetta, M., Waters, E. J. (2011a) Protein stabilisation of white wines using zirconium dioxide enclosed in a metallic cage. *Aust. J. Grape Wine Res.* **17**, 28–35. doi: 10.1111/j.1755-0238.2010.00112.x

Marangon, M., Sauvage, F.-X., Waters, E. J., Vernhet, A. (2011b) Effects of ionic strength and sulfate upon thermal aggregation of grape chitinases and thaumatin-like proteins in a model system. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 2652−2662. doi: 10.1021/jf104334v

Marangon, M., Stockdale, V. J., Munro, P., Trethewey, T., Schulkin, A., Holt, H. E., Smith, P. A. (2013) Addition of Carrageenan at Different Stages of Winemaking for White Wine Protein Stabilization. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6516−6524. doi: 10.1021/jf401712d

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Neilson, K. A., Chan, C., Haynes, P. A., Waters, E. J., Falconer, R. J. (2011c) Roles of grape thaumatin like protein and chitinase in white wine haze formation. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 733−740. doi: 10.1021/jf1038234

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Robinson, E. M. C., Muhlack, R. A., Holt, H. E., Haynes, P. A., Waters, E. J. (2012) Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization. *Food Chem.* **135**, 1157–1165. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.042

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Waters, E. J., Menz, R. I. (2014) Structure of haze forming proteins in white wines: Vitis vinifera thaumatin-like proteins. *PLoS One* **9**, e113757. doi: 10.1371/journal.pone.0113757

Marangon, M., Vincenzi, S., Lucchetta, M., Curioni, A. (2010) Heating and reduction affect the reaction with tannins of wine protein fractions differing in hydrophobicity. *Anal. Chim. Acta* **660**, 110−118. doi: 10.1016/j.aca.2009.10.038

Martin, V., Boido, E., Giorello, F., Mas, A., Dellacassa, E., Carrau, F. (2016) Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by *Hanseniaspora vineae* strains. *Yeast* **33**, 323-328. doi: 10.1002/yea.3159

Mateo, J. J., Jiménez, M. (2000) Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr. A* **881**, 557–567. doi: 10.1016/s0021-9673(99)01342-4

Mauricio, J. C., Moreno, J., Valero, E. M., Zea, L., Medina, M., Ortega, J. M. (1993) Ester formation and specific activities of in vitro alcohol acetyltransferase and esterase by *Saccharomyces cerevisiae* during grape must fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 2086–2091. doi: 10.1021/jf00035a050

McMahon, H. M., Zoecklein, B. W., Jasinski, Y. W. (1999) The effects of prefermentation maceration temperature and percent alcohol (v/v) at press on the concentration of Cabernet Sauvignon grape glycosides and glycoside fractions. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**, 385–390.

McRae, J. M., Barricklow, V., Pocock, K. F., Smith, P. A. (2018) Predicting protein haze formation in white wines. *Aust. J. Grape Wine R.* **24**, 504-511. doi: 10.1111/ajgw.12354

Mesquita, P. R., Piçarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., Ferreira, R. B. (2001) Effect of wine composition on protein stability. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 324-330.

Mierczynska-Vasilev, A., Wahono, S. K., Smith, P.-A., Bindon, K., Vasilev, K. (2019) Using Zeolites To Protein Stabilize White Wines. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, 12240–12247. doi: 10.1021/acssuschemeng.9b01583

Miller, G. C., Amon, J. M., Gibson, R. L., Simpson, R. F. (1985) Loss of wine aroma attributable to protein stabilization with bentonite or ultrafiltration. *Australian Grapegrower & Winemaker* **256**, 49–50.

Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., Agostin, E. (2007) Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biot.* **77**, 675–687. doi: 10.1007/s00253-007-1194-3

Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (2005) Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. *Eur. Food Res. Technol.* **220**, 331–340. doi: 10.1007/s00217-004-1109-9

Monteiro, S., Piçarra-Pereira, M. A., Mesquita, P. R., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., Ferreira, R. B. (2001) The wide diversity of structurally similar wine proteins. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3999–4010. doi: 10.1021/jf0013914

Moreno, J. A., Zea, L., Moyano, L., Medina, M. (2005) Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control* **16**, 333-338. doi: 10.1016/j.foodcont.2004.03.013

Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. (2009) *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer, New York.

Motta, S., Guaita, M., Petrozziello, M., Panero, L., Bosso, A. (2014) Effect of reductive pressing on the concentration of reduced glutathione and phenols in the musts of four Italian cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* **65**, 471–478. doi: 10.5344/ajev.2014.13087

Moyano, L., Zea, L., Moreno, J., Medina, M. (2002) Analytical Study of Aromatic Series in Sherry Wines Subjected to Biological Aging. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7356–7361. doi:10.1021/jf020645d

Muhlack, R. A., Colby, C. B. (2018) Reduced product loss associated with inline bentonite treatment of white wine by simultaneous centrifugation with yeast lees. *Food Bioprod. Process.* **108**, 51-57. doi: 10.1016/j.fbp.2017.12.005

Muhlack, R. A., O'Neill, B. K., Waters, E. J., Colby, C. B. (2016) Optimal Conditions for Controlling Haze-Forming Wine Protein with Bentonite Treatment: Investigation of Matrix Effects and Interactions Using a Factorial Design. *Food Bioprocess Tech.*. **9**, 936–943. doi: 10.1007/s11947-016-1682-5

Muhlack, R., Nordestgaard, S., Waters, E. J., O'Neill, B. K., Lim, A., Colby, C. B. (2006). In-line dosing for bentonite fining of wine or juice: Contact time, clarification, product recovery and sensory effects. *Aust. J. Grape Wine Res.* **12**, 221–234. doi: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00062.x

Murphey, J. M., Spayd, S. E., Powers, J. R. (1989) Effect of grape maturation on soluble protein characteristics of Gewürztraminer and White Riesling juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **40**, 199–207.

Neves, A. C., Spranger, M. I., Zhao, Y., Leandro, M. C., Sun, B. (2010) Effect of Addition of Commercial Grape Seed Tannins on Phenolic Composition, Chromatic Characteristics, and Antioxidant Activity of Red Wine. *J. Agric. Food Chem*. **58**, 11775–11782. doi: 10.1021/jf1038037

Noguerol-Pato, R., González-Álvarez, M., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2013) Evolution of the aromatic profile in Garnacha Tintorera grapes during raisining and comparison with that of the naturally sweet wine obtained. *Food Chem.* **139**, 1052-1061. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.12.048

Noguerol-Pato, R., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Martínez, M. C., Santiago, J. L., Simal-Gándara, J. (2012) Floral, spicy and herbaceous active odorants in Gran Negro grapes from shoulders and tips into the cluster, and comparison with Brancellao and Mouratón varieties. *Food Chem.* **135**, 2771–2782. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.104

Nordestgaard, S., Chuan, Y. P., O'Neill, B., Waters, E., Deans, L., Policki, P., Colby, C. (2007) In-line Dosing of White Wine for Bentonite Fining with Centrifugal Clarification. *Am. J. Enol. Vitic* **58**, 283-285.

Obreque-Slíer, E., Peña-Neira, A., López-Solís, R., Ramírez-Escudero, C., Zamora-Marín, F. (2009) Phenolic characterization of commercial enological tannins. *Eur. Food Res. Technol.* **229**, 859–866. doi: 10.1007/s00217-009-1121-1

Odom, I. (1984) Smectite clay minerals: properties and uses. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* **311**, 391-409.

OIV (2009) Resolution 332a/2009. OIV standard for international wine and spirituous beverages of vitivinicultural origin competitions. OIV - International Organisation of Vine and Wine, Paris, <http://www.oiv.int/public/medias/4661/oiv-concours-332a-2009-en.pdf>. Pristupljeno 28. lipnja 2020.

OIV (2011) COEI–1–BENTON, Bentonites, International oenological codex (Oeno 11/2003 modified Oeno 441-2011). OIV - International Organisation of Vine and Wine, Paris, <http://www.oiv.int/public/medias/4055/e-coei-1-benton.pdf>. Pristupljeno 4. veljače 2020.

OIV (2015) COEI-1-TANINS, Oenological Tannins, International oenological codex (Oeno 12/2002 modified by Oeno 5/2008, 6/2008 and OIV-Oeno 352-2009). OIV-OENO 554-2015. OIV - International Organisation of Vine and Wine, Paris, <http://www.oiv.int/public/medias/4093/e-coei-1-tanins.pdf>. Pristupljeno 28. lipnja 2020.

OIV (2019) Compendium of international methods of wine and must analysis, Volume 1. OIV - International Organisation of Vine and Wine, Paris, <http://www.oiv.int/public/medias/6619/compendium-2019-en-vol1.pdf>. Pristupljeno 4. veljače 2020.

Olejar, K. J., Fedrizzi, B., Kilmartin, P. A. (2016) Enhancement of Chardonnay antioxidant activity and sensory perception through maceration technique. *LWT – Food Sci. Technol.* **65**, 152–157. doi: 10.1016/j.lwt.2015.08.001

Oliveira, J. M., Oliveira, P., Baumes, R. L., Maia, O. (2008) Changes in aromatic characteristics of Loureiro and Alvarinho wines during maturation. *J. Food Compos. Anal.* **21**, 695-797. doi: 10.1016/j.jfca.2008.08.002

Ough, C. S., Berg, H., Amerine, M. A. (1969) Substances extracted during skin contact with white musts. II. Effect of bentonite additions during and after fermentation on wine composition and sensory quality. *Am. J. Enol. Vitic.* **20**, 101-107.

Sánchez Palomo, E., Díaz-Maroto, M. C., Viñas, M. A. G., Soriano-Pérez, A., Pérez-Coello, M. S. (2007) Aroma profile of wines from Albillo and Muscat grape varieties at different stages of ripening. *Food Control* **18**, 398–403. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.11.006

Pashova, V., Güell, C., López, F. (2004) White wine continuous protein stabilisation by packed column. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1558−1563. doi: 10.1021/jf034966g

Pati, S., Crupi, P., Benucci, I., Antonacci, D., Di Luccia, A., Esti, M. (2014) HPLC-DAD–MS/MS characterization of phenolic compounds in white wine stored without added sulfite. *Food Res. Int.* **66**, 207–215. doi: 10.1016/j.foodres.2014.09.017

Patrianakou, M., Roussis, I. G. (2013) Decrease of wine volatile aroma esters by oxidation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **34**, 241–245. doi: 10.21548/34-2-1100

Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., Mauricio, J. C. (2004) Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chem.* **84**, 585-590. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00282-6

Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F. F., Marques, J. C., Câmara, J. S. (2006) Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Anal. Chim. Acta* **563**, 154-164. doi: 10.1016/j.aca.2005.10.023

Plavša, T., Palman, I. (2011) Suspenzija bentonit – voda: utjecaj na proteinsku stabilnost vina malvazija istarska. *Poljoprivreda* **17**, 8-12.

Pocock, K. F., Hayasaka, Y., McCarthy, M. G., Waters, E. J. (2000) Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1637−1643. doi: 10.1021/jf9905626

Pocock, K. F., Høj, P. B., Adams, K. S., Kwiatkowski, M. J., Waters, E. J. (2003) Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect. *Aust. J. Grape Wine R.* **9**, 56–63. doi: 10.1111/j.1755-0238.2003.tb00232.x

Pocock, K. F., Alexander, G. M., Hayasaka, Y., Jones, P. R., Waters, E. J. (2007) Sulfate − a candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1799−1807. doi: 10.1021/jf062658n

Pocock, K. F., Salazar, F. N., Waters, E. J. (2011) The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. *Aust. J. Grape Wine R.* **17**, 280–284. doi: 10.1111/j.1755-0238.2011.00123.x

Pocock, K. F., Waters, E. J. (2006) Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Aust. J. Grape Wine R.* **12**, 212-220. doi: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00061.x

Polášková, P., Herszage, J., Ebeler, S. E. (2008) Wine flavor: chemistry in a glass. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 2478-2489. doi: 10.1039/b714455p

Pozo-Bayón, M. Á., Reineccius, G. (2009) Interactions Between Wine Matrix Macro-Components and Aroma Compounds. U: *Wine Chemistry and Biochemistry* (Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., ured.), Springer, New York, str. 417-435.

Puig-Deu, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., Torre-Boronat, M. C. (1996) Influence of must racking and fining procedures on the composition of white wine. *Vitis* **35**, 141−145. doi: 10.5073/vitis.1996.35.141-145

Radeka, S., Peršurić, Đ., Lukić, I., Bocca, E., Plavša, T. (2009) Influence of the addition of tannins of different origin on protein stability and aromatic profile of Malvazija istarska wine. *Proceedings of the 32nd World Congress of Vine and Wine and 7th General Assembly of the OIV*. 32nd World Congress of Vine and Wine and 7th General Assembly of the OIV, Zagreb.

Rankine, B. C., Emerson, W. W. (1963) Wine clarification and protein removal by bentonite. *J. Sci. Food Agric.* **14**, 685–689. doi: 10.1002/jsfa.2740141001

Ribeiro, T., Fernandes, C., Nunes, F. M., Filipe-Ribeiro, L., Cosme, F. (2014) Influence of the structural features of commercial mannoproteins in white wine protein stabilization and chemical and sensory properties. *Food Chem.* **159**, 47–54. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.149

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006a) *Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*, 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006b) *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*, 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester.

Ríos-Reina, R., Pilar Segura-Borrego, M., Lourdes Morales, M., Callejón, R. M. (2019) Characterization of the aroma profile and key odorants of the Spanish PDO wine vinegars. *Food Chem.* **311**, 126012. doi:10.1016/j.foodchem.2019.126012

Romero-Pérez, A. I., Ibern-Gómez, M., Lamuela-Raventós, R. M., de la Torre-Boronat, M. C. (1999) Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1533–1536. doi: 10.1021/jf981024g

Ruiz, J., Kiene, F., Belda, I., Fracassetti, D., Marquina, D., Navascués, E., Calderón, F., Benito, A., Rauhut, D., Santos, A., Benito, S. (2019) Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Appl. Microbiol. Biot.* **103**, 7425-7450. doi: 10.1007/s00253-019-10008-9

Sáenz-Navajas, M.-P., Avizcuri, J.-M., Ballester, J., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Peyron, D., Valentin, D. (2015) Sensory-active compounds influencing wine experts' and consumers' perception of red wine intrinsic quality. *LWT - Food Sci. Technol.* **60**, 400-411. doi: 10.1016/j.lwt.2014.09.026

Salas, J. J., Sánchez, J. (1999) The decrease of virgin olive oil flavor produced by high malaxation temperature is due to inactivation of hydroperoxide lyase. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 809–812. doi: 10.1021/jf981261j

Salazar, F. N., Achaerandio, I., Labbé, M. A., Güell, C., López, F. (2006) Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: Physicochemical and wine sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9955-9958. doi: 10.1021/jf062632w

Salazar, F. N., Marangon, M., Labbé, M., Lira, E., Rodríguez-Bencomo, J. J., López, F. (2017) Comparative study of sodium bentonite and sodium-activated bentonite fining during white wine fermentation: its effect on protein content, protein stability, lees volume, and volatile compounds. *Eur. Food Res. Technol.* **243**, 2043–2054. doi: 10.1007/s00217-017-2917-z

Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Guillamón, J. M., Salazar, G., Querol, A., Barrio, E. (2011) Temperature adaptation markedly determines the growth and evolution within the genus *Saccharomyces*. *Appl. Environ. Microb.* **77**, 2292–2302. doi: 10.1128/AEM.01861-10

Samoticha, J., Wojdyło, A., Chmielewska, J., Nofer, J. (2019) Effect of Different Yeast Strains and Temperature of Fermentation on Basic Enological Parameters, Polyphenols and Volatile Compounds of Aurore White Wine. *Foods* **8**, 599, 18. doi: 10.3390/foods8120599

Sanborn, M., Edwards, C. G., Ross, C. F. (2010) Impact of fining on chemical and sensory properties of Washington state chardonnay and gewürztraminer wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **61**, 31-41.

Sarmento, M. R., Oliveira, J. C., Slatner, M., Boulton, R. B. (2000) Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests. *Food Control* **11,** 423-432. doi: 10.1016/S0956-7135(00)00004-9

Saucier, C. (2010) How do wine polyphenols evolve during wine ageing? *Cerevisia* **35**, 11–15. doi: 10.1016/j.cervis.2010.05.002

Sauvage, F.-X., Bach, B., Moutounet, M., Vernhet, A. (2010) Proteins in white wines: thermo-sensitivity and differential adsorbtion by bentonite. *Food Chem.* **118**, 26−34. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.080

Sáenz-Navajas, M.-P., Avizcuri, J.-M., Ferreira, V., Fernández-Zurbano, P. (2012) Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chem.* **134**, 1484–1493. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.060

Schmidt, S. A., Tan, E. L., Brown, S., Nasution, U. J., Pettolino, F., Macintyre, O. J., Lopes, M. D. B., Waters, E. J., Anderson, P. A. (2009) Hpf2 glycan structure is critical for protection against protein haze formation in white wine. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3308−3315. doi: 10.1021/jf803254s

Schoonheydt, R. A., Johnston, C. T. (2013) Surface and Interface Chemistry of Clay Minerals. U: *Handbook of Clay Science*, 2. izd. (Bergaya, F., Lagaly, G., ured.), Elsevier, Oxford, str. 139-172.

Shamsuddin, R. M., Verbeek, C. J. R., Lay, M. C. (2014) Producing protein intercalated bentonite – Equilibrium, kinetics and physical properties of gelatin-bentonite system. *Appl. Clay. Sci.* **87**, 52-60. doi: 10.1016/j.clay.2013.11.023

Siebert, K. J. (2009) Chapter 2: Haze in beverages. U: *Advances in food and nutrition research* (Taylor, S. L., ured.), Elsevier, Burlington/San Diego/London/Amsterdan/Oxford, str. 53-86.

Siebert, K. J., Carrasco, A., Lynn, P. Y. (1996a) Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1997-2005. doi: 10.1021/jf950716r

Siebert, K. J., Lynn, P. Y. (2003) Effects of Alcohol and pH on Protein–Polyphenol Haze Intensity and Particle Size. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **61**, 88-98. doi: 10.1094/ASBCJ-61-0088

Siebert, K. J., Troukhanova, N. V., Lynn, P. Y. (1996b) Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 80-85. doi: 10.1021/jf9502459

Simpson, R. F. (1982) Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis* **21**, 233-239. doi: 10.5073/vitis.1982.21.233-239

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.

Singleton, V. L., Zaya, J., Trousdale, E., Salgues, M. (1984) Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. *Vitis* **23**, 113-120. doi: 10.5073/vitis.1984.23.113-120

Soares, S., Brandão, E., Mateus, N., de Freitas, V. (2017) Sensorial properties of red wine polyphenols: astringency and bitterness. *Crit. Rev. Food Sci.* **57**, 937–948. doi: 10.1080/10408398.2014.946468

Somers, T. C., Ziemelis, G. (1985) Flavonol haze in white wines. *Vitis* **24**, 43–50. doi: 10.5073/vitis.1985.24.43-50

Sonni, F., Cejudo Bastante, M. J., Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. (2009) Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *J. Sci. Food Agric.* **89**, 688-696. doi: 10.1002/jsfa.3503

Sonni, F., Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. (2011) Pre-fermentative replacement of sulphur dioxide by lysozyme and oenological tannins: Effect on the formation and evolution of volatile compounds during the bottle storage of white wines. *Food Chem.* **129**, 1193-1200. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.104

Spagna, G., Pifferi, P. G., Rangoni, C., Mattivi, F., Nicolini, G., Palmonari, R. (1996) The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Res. Int.* **29**, 241-248. doi: 10.1016/0963-9969(96)00025-7

Styger, G., Prior, G., Bauer, F. F. (2011) Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **38**, 1145-1159. doi: 10.1007/s10295-011-1018-4

Sun, X., Li, C., Wu, Z., Xu, X., Ren, L., Zhao, H. (2007) Adsorption of protein from model wine solution by different bentonites. *Chinese J. Chem. Eng.* **15**, 632-638. doi: 10.1016/S1004-9541(07)60137-2

Terrier, N., Poncet-Legrand, C., Cheynier, V. (2009) Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. U: *Wine Chemistry and Biochemistry* (Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., ured.), Springer, New York, str. 463-507.

Threlfall, R. T., Morris, J. R., Mauromoustakos, A. (1999) Effects of fining agents on *trans*-resveratrol concentration in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **5**, 22-26. doi: 10.1111/j.1755-0238.1999.tb00147.x

Toledo, L., Aquino, A., Salazar, F. (2017) A Theoretical Approach for Understanding the Haze Phenomenon in Bottled White Wines at Molecular Level. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **38**, 64–71. doi: 10.21548/38-1-837

Valero, E., Millán, C., Ortega, J. M. (2001) Influence of pre-fermentative treatment on the fatty acid content of *Saccharomyces cerevisiae* (M330–9) during alcoholic fermentation of grape must. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 117–122. doi: 10.1016/S1389-1723(01)80052-9

van Loon, L.C. (1985) Pathogenesis related proteins. *Plant Mol. Biol.* **4**, 111-116. doi: 10.1007/BF02418757

Van Sluyter, S. C., McRae, J. M., Falconer, R. J., Smith, P. A., Bacic, A., Waters, E. J., Marangon, M. (2015) Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 4020–4030. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00047

Vela, E., Hernández-Orte, P., Castro, E., Ferreira, V., Lopez, R. (2017) Effect of Bentonite Fining on Polyfunctional Mercaptans and Other Volatile Compounds in Sauvignon blanc Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **68**, 30−38. doi: 10.5344/ajev.2016.16052

Versari, A., du Toit, W., Paripinello, G. P. (2013) Oenological tannins: a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **19**, 1-10. doi: 10.1111/ajgw.12002

Vignault, A., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Fermaud, M., Roudet, J., Canals, J. M., Teissedre, P.-L., Zamora, F. (2019) Impact of enological tannins on laccase activity. *OENO One* **53**, 27-38. doi: 10.20870/oeno-one.2019.53.1.2361

Vincenzi, S., Crapisi, A., Curioni, A. (2014) Foamability of Prosecco wine: Cooperative effects of high molecular weight glycocompounds and wine PR-proteins. *Food Hydrocolloid.* **34**, 202−207. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.09.016

Vincenzi, S., Marangon, M., Tolin, S., Curioni, A. (2011) Protein evolution during the early stages of white winemaking and its relations with wine stability. *Aust. J. Grape Wine Res.* **17**, 20−27. doi: 10.1111/j.1755-0238.2010.00113.x

Vincenzi, S., Panighel, A., Gazzola, D., Flamini, R., Curioni, A. (2015) Study of Combined Effect of Proteins and Bentonite Fining on the Wine Aroma Loss. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 2314−2320. doi: 10.1021/jf505657h

Vincenzi, S., Polesani, M., Curioni, A. (2005) Removal of specific protein components by chitin enhaces protein stability in a white wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **56**, 246–254.

Voilley, A., Lamer, C., Dubois, P., Feuillat, M. (1990) Influence of macromolecules and tratments on the behavior of aroma compounds in a model wine. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 248–251. doi: 10.1021/jf00091a054

Vrhovsek, U. (1998) Extraction of hydroxycinnamoyltartaric acids from berries of different grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4203-4208. doi: 10.1021/jf980461s

Wang, J., Huo, S., Zhang, Y., Liu, Y., Fan, W. (2016) Impact of various maceration techniques on the phenolic and volatile composition of Chenin Blanc wines. *Int. J. Food Sci. Technol.* **51**, 2360–2366. doi: 10.1111/ijfs.13215

Waters, E. J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K. F., Colby, C., O'Neill, B. K., Høj, P.B., Jones, P. (2005) Preventing protein haze in bottled white wine. *Aust. J. Grape Wine R.* **11**, 215–225. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00289.x

Waters, E. J., Pellerin, P., Brillouet, J.-M. (1994a) A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohyd. Polym.* **23**, 185−191. doi: 10.1016/0144-8617(94)90101-5

Waters, E. J., Pellerin, P., Brillouet, J.-M. (1994b) A wine arabinogalactan-protein that reduces heat-induced wine protein haze. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 43−48. doi: 10.1271/bbb.58.43

Waters, E. J., Shirley, N. J., Williams, P. J. (1996) Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3−5. doi: 10.1021/jf9505584

Waters, E. J., Wallace, W., Williams, P. J. (1991) Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.* **101**, 365-369.

Waters, E. J., Wallace, W., Williams, P. J. (1992) Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1514–1519. doi: 10.1021/jf00021a008

Winterhalter, P., Sefton, M. A., Williams, P. J. (1990) Two-dimensional GC-DCCC analysis of the glycoconjugates of monoterpenes, norisoprenoids, and shikimate-derived metabolites from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1041–1048. doi: 10.1021/jf00094a028

Wu, Z. S., Sun, X. F., Li, C. (2011) Effects of Bentonite Clarificants on Organic Acids Contents in Red Wine during Clarification. *Adv. Mat. Res.* **194-196**, 802-805. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.194-196.802

Yıldırım, H. K. (2011) Effects of Fining Agents on Antioxidant Capacity of Red Wines. *J. Inst. Brew.* **117**, 55-60. doi: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00443.x

Zalacain, A., Marín, J., Alonso, G. L., Salinas, M. R. (2007) Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta* **71**, 1610-1615. doi: 10.1016/j.talanta.2006.07.051

Zoecklein, B. (1988) Bentonite Fining of Juice and Wine. VT – Virginia Tech (Virginia Polytechnic Institute and State University), <https://www.apps.fst.vt.edu/extension/enology/downloads/bentonite01.pdf>. Pristupljeno 15. siječnja 2017.

Zoecklein, B. W, Fugelsang, K. C., Gump, B. H., Nury F. S. (1990) *Production Wine Analysis*, Van Nostrand Reinhold, New York.

Zoecklein, B. W, Fugelsang, K. C., Gump, B. H., Nury F. S. (1995) *Wine Analysis and Production*, Chapman & Hall, New York, str. 45–46.

Zoecklein, B. W., Marcy, J. E, Jasinski, Y. (1997a) Effect of fermentation, storage sur lie or post-fermentation thermal processing on White Riesling (*Vitis vinifera* L.) glycoconjugates. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 397–402.

Zoecklein, B. W., Marcy, J. E., Williams, J. M., Jasinski, Y. (1997b) Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* on glycosyl glucose, potential volatile terpenes, and selected aglycones of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *J. Food Comp. Anal.* **10**, 55-65. doi: 10.1006/jfca.1996.0518

8. PRILOZI

PRILOG 1. Popis kemijskih standarda (s pripadajućim CAS brojem, čistoćom i proizvođačem) korištenih za kvantitativno određivanje hlapljivih spojeva aroma i fenolnih spojeva u uzorcima vina

Kemijski standardi	CAS broj	Čistoća	Proizvođač
Hlapljivi spojevi aroma			
Monoterpeni			
linalol	78-70-6	> 97 %	Merck
α-terpineol	98-55-5	> 98 %	Merck
citronelol	106-22-9	> 98 %	Merck
geraniol	106-24-1	~ 96 %	Fluka
nerol	106-25-2	~ 95 %	Fluka
C_{13}-norizoprenoid			
β-damaskenon	23696-85-7	prirodni	SAFC, Aldrich
Alkoholi			
1-heksanol	111-27-3	≥ 98 %	Fluka
trans-3-heksenol	928-97-2	98 %	Aldrich
cis-3-heksenol	928-96-1	≥ 98 %	Fluka
2-feniletanol	60-12-8	≥ 99 %	Fluka
Masne kiseline			
butanska kiselina	107-92-6	≥ 99,5 %	Fluka
heksanska kiselina	142-62-1	≥ 98 %	Fluka
oktanska kiselina	124-07-2	≥ 98 %	Fluka
dekanska kiselina	334-48-5	~ 99 %	Fluka
Etil-esteri			
etil-izobutanoat	97-62-1	≥ 98 %	Fluka
etil-butanoat	105-54-4	≥ 98 %	Fluka
etil-2-metilbutanoat	7452-79-1	99 %	Aldrich
etil-3-metilbutanoat	108-64-5	≥ 97 %	Fluka
etil-heksanoat	123-66-0	> 98 %	Merck
etil-oktanoat	106-32-1	> 98 %	Merck
etil-dekanoat	110-38-3	> 99 %	Merck
Acetatni esteri			
izoamil-acetat	123-92-2	≥ 99 %	Merck
izobutil-acetat	110-19-0	~ 99 %	Fluka
heksil-acetat	142-92-7	99 %	Fluka
2-feniletil-acetat	103-45-7	≥ 99 %	Fluka
Ostali esteri			
etil-laktat	97-64-3	≥ 98%	Merck
dietil-sukcinat	123-25-1	≥ 99%	Fluka
Fenoli			
Hidroksibenzojeve kiseline			
galna kiselina	149-91-7	≥ 98 %	Fluka
protokatehinska kiselina	99-50-3	≥ 97 %	Fluka

p-hidroksibenzojeva kiselina	99-96-7	99 + %	Acros Organics
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	490-79-9	99 %	Acros Organics
siringinska kiselina	530-57-4	≥ 95 %	Sigma
Hidroksicimetne kiseline			
trans-kaftarna kiselina	67879-58-7	≥ 97 %	Sigma
kafeinska kiselina	331-39-5	≥ 98 %	Sigma
p-kumarna kiselina	501-98-4	≥ 98 %	Fluka
ferulinska kiselina	1135-24-6	≥ 99 %	Fluka
Flavan-3-oli			
katehin	225937-10-0	≥ 96 %	Fluka
epikatehin	490-46-0	≥ 90 %	Fluka
procijanidin B1	20315-25-7	≥ 80 %	Extrasynthese
procijanidin B2	29106-49-8	≥ 90 %	Extrasynthese
Ostali fenoli			
tirosol	501-94-0	98 %	Aldrich
taksifolin	480-18-2	≥ 85 %	Fluka
trans-piceid	65914-17-2	≥ 95 %	Sigma

PRILOG 2. Senzorska svojstva bijelog vina ocjenjivana kvantitativnom deskriptivnom analizom

			Intenzitet svojstva										
Svojstvo mirisa	cvjetni		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	voćni		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	biljni		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	začinski / aromatično bilje		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	sovinjonski		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	muškatni		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ostalo	med	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		vosak	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Boja	zeleno-žuta		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	žuto-zelena		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	žuta		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	slamnato-žuta		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Svojstvo okusa	svježina		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	kiselost		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	tijelo / punoća		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	slatkoća		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	viskozitet		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	gorčina		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	astringentnost		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Ukupan dojam vina		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Napomena: intenzitet arome, boje, okusa i ukupan dojam vina označiti s X (0 – ne osjeti se; 1 - najmanji intenzitet; 10 - najveći intenzitet).

PRILOG 3. Parametri senzorskog ocjenjivanja vina metodom 100 bodova

MIRNA VINA		Odlično	Vrlo dobro	Dobro	Prolazno	Loše	Primjedbe
IZGLED	Bistroća	5	4	3	2	1	
	Boja	10	8	6	4	2	
MIRIS	Čistoća	6	5	4	3	2	
	Intenzitet	8	7	6	4	2	
	Kvaliteta	16	14	12	10	8	
OKUS	Čistoća	6	5	4	3	2	
	Intenzitet	8	7	6	4	2	
	Trajnost	8	7	6	5	4	
	Kvaliteta	22	19	16	13	10	
Harmoničnost / Opći dojam		11	10	9	8	7	
Ukupno bodova							

PRILOG 4. Smanjenje ukupne doze bentonita za postizanje proteinske stabilnosti uzoraka vina proizvedenih različitim tretmanima u tri godine berbe u odnosu na kontrolne tretmane

Tretmani 2015.		BGS15	BP15	BS15	BK15
Smanjenje ukupne doze u usporedbi s kontrolnim tretmanom K15 (%)[#]	Test A	2 c	7 b	14 a	16 a
	Test B	10 c	13 b	19 a	21 a

Tretmani 2016.		BS16	BK16	BKS16	BKDEI16	T16	BKT16
Smanjenje ukupne doze u usporedbi s kontrolnim tretmanom K16 (%)[#]	Test A	6 b	15 a	1 b	16 a	14 a	15 a
	Test B	6 bc	11 ab	1 c	16 a	10 ab	14 ab

Tretmani 2017.		BK17	BKTMP17	BKDUP17	MVN17	PUR17	PEN17
Smanjenje ukupne doze u usporedbi s kontrolnim tretmanom K17 (%)[#]	Test A	2 b	ne	ne	ne	ne	15 a

Tretmani 2017.		BKTMP17	BKDUP17	MVN17	PUR17	PEN17
Smanjenje dodatne doze u usporedbi s tretmanom BK17 (%)[#]	Test A	ne	ne	24 b	64 a	24 b

[#] Prikazani podaci su prosječne vrijednosti tri repeticije svakog tretmana. Različita mala slova u eksponentu predstavljaju statistički značajne razlike između tretmana pri razini značajnosti $p < 0,05$ (univarijantna ANOVA i LSD test), zasebno utvrđene za rezultate proizašle iz određivanja proteinske stabilnosti metodom zagrijavanja (test A) i metodom zagrijavanja s taninom (test B).

PRILOG 5. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9913 ± 0,0001	0,9911 ± 0,0002	0,9910 ± 0,0002	0,9911 ± 0,0003	0,9912 ± 0,0001
	B	0,9914 ± 0,0000	0,9913 ± 0,0002	0,9912 ± 0,0002	0,9913 ± 0,0002	0,9913 ± 0,0001
Alkohol (vol. %)	F	13,36 ± 0,04	13,44 ± 0,04	13,29 ± 0,04	13,40 ± 0,08	13,20 ± 0,01
	B	13,10 ± 0,04	13,16 ± 0,04	13,12 ± 0,01	13,14 ± 0,05	13,14 ± 0,03
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	22,4 ± 0,3	22,4 ± 0,3	21,5 ± 0,3	22,2 ± 0,5	21,7 ± 0,0
	B	22,1 ± 0,3	22,0 ± 0,4	21,7 ± 0,3	22,1 ± 0,3	21,8 ± 0,3
Reducirajući šećeri (g/L)	F	2,5 ± 0,1	3,2 ± 0,2	2,3 ± 0,4	2,9 ± 0,6	2,5 ± 0,1
	B	2,6 ± 0,0	2,9 ± 0,3	2,5 ± 0,3	2,7 ± 0,4	2,6 ± 0,1
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	19,9 ± 0,1	19,2 ± 0,3	19,2 ± 0,2	19,3 ± 0,3	19,2 ± 0,1
	B	19,5 ± 0,3	19,1 ± 0,1	19,2 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,2 ± 0,3
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,8 ± 0,0	5,5 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,0
	B	5,6 ± 0,0	5,4 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,4 ± 0,1
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,47 ± 0,13	0,40 ± 0,02	0,44 ± 0,08	0,40 ± 0,03	0,32 ± 0,01
	B	0,42 ± 0,06	0,34 ± 0,04	0,34 ± 0,05	0,35 ± 0,03	0,31 ± 0,04
pH	F	3,26 ± 0,00	3,28 ± 0,01	3,27 ± 0,01	3,27 ± 0,01	3,25 ± 0,01
	B	3,26 ± 0,01	3,27 ± 0,01	3,26 ± 0,01	3,26 ± 0,00	3,25 ± 0,01

PRILOG 6. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman						
		K16	BS16	BK16	BKS16	BKDEI16	T16	BKT16
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9895 ± 0,0002	0,9888 ± 0,0001	0,9893 ± 0,0002	0,9892 ± 0,0002	0,9890 ± 0,0003	0,9898 ± 0,0003	0,9895 ± 0,0001
	B	0,9894 ± 0,0002	0,9889 ± 0,0001	0,9895 ± 0,0002	0,9893 ± 0,0002	0,9892 ± 0,0004	0,9898 ± 0,0002	0,9896 ± 0,0002
Alkohol (vol. %)	F	15,04 ± 0,08	15,06 ± 0,02	15,09 ± 0,07	14,94 ± 0,04	15,07 ± 0,09	14,98 ± 0,13	14,94 ± 0,04
	B	14,69 ± 0,09	14,70 ± 0,02	14,66 ± 0,06	14,66 ± 0,03	14,64 ± 0,03	14,61 ± 0,03	14,67 ± 0,04
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	22,6 ± 0,4	21,0 ± 0,4	22,4 ± 0,5	21,8 ± 0,5	21,5 ± 0,8	23,4 ± 0,4	22,5 ± 0,3
	B	21,5 ± 0,4	20,2 ± 0,1	21,7 ± 0,4	21,2 ± 0,6	20,9 ± 0,9	22,3 ± 0,8	22,0 ± 0,4
Reducirajući šećeri (g/L)	F	3,4 ± 0,2	2,5 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,3	4,2 ± 0,4	3,5 ± 0,2
	B	3,4 ± 0,3	2,5 ± 0,3	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,4	2,9 ± 0,4	4,0 ± 0,5	3,6 ± 0,2
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	19,2 ± 0,2	18,4 ± 0,4	18,7 ± 0,3	18,5 ± 0,2	18,3 ± 0,6	19,1 ± 0,2	19,0 ± 0,1
	B	18,2 ± 0,1	17,7 ± 0,2	18,2 ± 0,2	18,0 ± 0,2	18,0 ± 0,6	18,3 ± 0,3	18,4 ± 0,2
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,5 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,3 ± 0,0	5,3 ± 0,0	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,1
	B	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,0	5,1 ± 0,0
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,67 ± 0,03	0,70 ± 0,04	0,69 ± 0,06	0,69 ± 0,01	0,68 ± 0,02	0,65 ± 0,04	0,62 ± 0,06
	B	0,65 ± 0,04	0,70 ± 0,03	0,66 ± 0,04	0,70 ± 0,06	0,64 ± 0,02	0,63 ± 0,04	0,65 ± 0,02
pH	F	3,33 ± 0,01	3,37 ± 0,00	3,34 ± 0,01	3,37 ± 0,01	3,33 ± 0,01	3,31 ± 0,01	3,31 ± 0,01
	B	3,36 ± 0,01	3,39 ± 0,00	3,31 ± 0,03	3,39 ± 0,01	3,33 ± 0,02	3,32 ± 0,01	3,32 ± 0,01

PRILOG 7. Vrijednosti standardnih fizikalno-kemijskih parametara u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Fizikalno-kemijski parametar	Uzorkovanje	Tretman						
		K17	BK17	BKTMP17	BKDUP17	MVN17	PUR17	PEN17
Relativna gustoća 20 °C / 20 °C	F	0,9905 ± 0,0003	0,9905 ± 0,0001	0,9903 ± 0,0000	0,9902 ± 0,0002	0,9902 ± 0,0001	0,9903 ± 0,0003	0,9904 ± 0,0002
	B	0,9906 ± 0,0002	0,9906 ± 0,0002	0,9905 ± 0,0000	0,9903 ± 0,0001	0,9904 ± 0,0001	0,9904 ± 0,0003	0,9905 ± 0,0001
Alkohol (vol. %)	F	13,41 ± 0,05	13,42 ± 0,03	13,56 ± 0,10	13,53 ± 0,04	13,56 ± 0,03	13,51 ± 0,02	13,52 ± 0,07
	B	13,18 ± 0,07	13,24 ± 0,08	13,24 ± 0,08	13,32 ± 0,02	13,23 ± 0,05	13,27 ± 0,05	13,20 ± 0,03
Ukupni ekstrakt (g/L)	F	20,7 ± 0,5	20,7 ± 0,3	20,6 ± 0,3	20,2 ± 0,3	20,5 ± 0,2	20,3 ± 1,1	20,8 ± 0,3
	B	20,2 ± 0,4	20,3 ± 0,4	20,1 ± 0,3	19,9 ± 0,2	19,8 ± 0,2	19,9 ± 0,5	20,0 ± 0,2
Reducirajući šećeri (g/L)	F	3,0 ± 0,3	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,1 ± 0,5	3,6 ± 0,2
	B	2,9 ± 0,5	3,4 ± 0,2	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,3	3,1 ± 0,1	3,1 ± 0,4	3,6 ± 0,2
Ukupni ekstrakt bez reducirajućih šećera (g/L)	F	17,8 ± 0,3	17,2 ± 0,3	17,0 ± 0,2	16,8 ± 0,2	17,3 ± 0,3	17,2 ± 0,7	17,1 ± 0,3
	B	17,3 ± 0,6	16,9 ± 0,3	16,5 ± 0,3	16,5 ± 0,3	16,7 ± 0,2	16,8 ± 0,1	16,4 ± 0,1
Ukupna kiselost (g/L)	F	5,5 ± 0,0	5,4 ± 0,1	5,2 ± 0,0	5,2 ± 0,0	5,4 ± 0,1	5,3 ± 0,0	5,2 ± 0,0
	B	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,2 ± 0,0	5,2 ± 0,0	5,2 ± 0,0	5,1 ± 0,0
Hlapljiva kiselost (g/L)	F	0,43 ± 0,06	0,36 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,45 ± 0,04	0,40 ± 0,01	0,4 ± 0,05	0,42 ± 0,04
	B	0,54 ± 0,03	0,43 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,47 ± 0,04	0,39 ± 0,03	0,51 ± 0,08	0,49 ± 0,02
pH	F	3,22 ± 0,01	3,23 ± 0,00	3,24 ± 0,00	3,22 ± 0,01	3,23 ± 0,00	3,21 ± 0,01	3,23 ± 0,01
	B	3,21 ± 0,02	3,14 ± 0,01	3,22 ± 0,03	3,19 ± 0,00	3,18 ± 0,01	3,18 ± 0,01	3,23 ± 0,01

PRILOG 8. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Hidroksibenzojeve kiseline						
galna kiselina	F	1,440 ± 0,007	1,247 ± 0,037	1,144 ± 0,042	1,315 ± 0,036	1,360 ± 0,024
	B	1,005 ± 0,029	1,261 ± 0,043	1,176 ± 0,020	1,219 ± 0,021	1,201 ± 0,018
protokatehinska kiselina	F	0,894 ± 0,038	0,808 ± 0,035	0,851 ± 0,075	0,838 ± 0,020	0,765 ± 0,113
	B	1,069 ± 0,033	0,955 ± 0,071	0,931 ± 0,083	0,917 ± 0,010	0,910 ± 0,009
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,510 ± 0,002	0,504 ± 0,010	0,485 ± 0,024	0,478 ± 0,002	0,473 ± 0,014
	B	0,529 ± 0,011	0,491 ± 0,018	0,466 ± 0,017	0,429 ± 0,026	0,460 ± 0,005
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,311 ± 0,045	0,180 ± 0,028	0,219 ± 0,031	0,194 ± 0,005	0,184 ± 0,002
	B	0,315 ± 0,029	0,183 ± 0,013	0,213 ± 0,032	0,192 ± 0,006	0,183 ± 0,002
siringinska kiselina	F	0,110 ± 0,004	0,152 ± 0,007	0,116 ± 0,007	0,117 ± 0,003	0,108 ± 0,006
	B	0,074 ± 0,004	0,111 ± 0,002	0,092 ± 0,003	0,091 ± 0,008	0,088 ± 0,008
Hidroksicimetne kiseline						
trans-kaftarna kiselina	F	2,952 ± 0,431	5,304 ± 0,161	5,102 ± 0,879	5,361 ± 0,235	5,297 ± 0,059
	B	1,921 ± 0,297	4,276 ± 0,082	4,122 ± 0,905	4,195 ± 0,220	4,093 ± 0,018
cis-kutarna kiselina[S]	F	0,628 ± 0,002	0,726 ± 0,011	0,682 ± 0,009	0,660 ± 0,016	0,656 ± 0,018
	B	0,643 ± 0,002	0,734 ± 0,007	0,716 ± 0,006	0,705 ± 0,007	0,700 ± 0,008
trans-kutarna kiselina[S]	F	0,108 ± 0,057	0,648 ± 0,083	0,694 ± 0,247	0,801 ± 0,096	0,826 ± 0,024
	B	0,031 ± 0,003	0,316 ± 0,023	0,348 ± 0,177	0,365 ± 0,039	0,409 ± 0,006
kafeinska kiselina	F	2,721 ± 0,004	1,847 ± 0,046	1,876 ± 0,006	1,854 ± 0,026	1,878 ± 0,048
	B	2,627 ± 0,028	1,780 ± 0,017	1,853 ± 0,020	1,819 ± 0,009	1,809 ± 0,016
cis-fertarna kiselina[S]	F	0,595 ± 0,011	0,561 ± 0,011	0,570 ± 0,060	0,562 ± 0,005	0,585 ± 0,011
	B	0,679 ± 0,012	0,623 ± 0,009	0,647 ± 0,065	0,645 ± 0,012	0,655 ± 0,009
trans-fertarna kiselina[S]	F	1,863 ± 0,032	2,199 ± 0,035	2,138 ± 0,135	2,170 ± 0,028	2,169 ± 0,001
	B	1,785 ± 0,015	2,146 ± 0,018	2,090 ± 0,140	2,115 ± 0,035	2,095 ± 0,008

p-kumarna kiselina	F	1,223 ± 0,086	0,751 ± 0,067	0,710 ± 0,096	0,675 ± 0,013	0,628 ± 0,027
	B	1,064 ± 0,123	0,667 ± 0,025	0,631 ± 0,102	0,572 ± 0,022	0,575 ± 0,007
ferulinska kiselina	F	1,173 ± 0,065	0,884 ± 0,043	0,865 ± 0,033	0,839 ± 0,007	0,843 ± 0,010
	B	1,137 ± 0,064	0,872 ± 0,040	0,840 ± 0,054	0,814 ± 0,017	0,811 ± 0,011
Flavan-3-oli						
katehin	F	2,206 ± 0,015	2,220 ± 0,055	2,195 ± 0,080	2,252 ± 0,029	2,225 ± 0,009
	B	2,237 ± 0,051	2,096 ± 0,049	2,203 ± 0,084	2,258 ± 0,022	2,224 ± 0,022
procijanidin B1	F	2,931 ± 0,039	2,884 ± 0,102	2,789 ± 0,250	2,917 ± 0,037	2,901 ± 0,071
	B	2,900 ± 0,038	3,136 ± 0,051	2,928 ± 0,315	3,029 ± 0,052	2,955 ± 0,017
procijanidin B2	F	1,255 ± 0,015	1,105 ± 0,015	1,222 ± 0,167	1,187 ± 0,050	1,276 ± 0,021
	B	1,208 ± 0,010	1,204 ± 0,007	1,177 ± 0,117	1,207 ± 0,011	1,221 ± 0,008
Ostali						
tirosol	F	11,756 ± 2,897	12,339 ± 1,063	11,681 ± 1,030	11,845 ± 0,788	12,381 ± 0,478
	B	11,993 ± 2,811	12,479 ± 1,049	12,006 ± 1,040	12,130 ± 0,807	12,661 ± 0,441
taksifolin	F	0,174 ± 0,006	0,090 ± 0,005	0,099 ± 0,007	0,100 ± 0,006	0,100 ± 0,004
	B	0,181 ± 0,006	0,097 ± 0,001	0,103 ± 0,007	0,101 ± 0,005	0,098 ± 0,001
Ukupni fenoli[‡]	F	130,545 ± 9,025	119,879 ± 2,423	119,227 ± 3,921	116,273 ± 17,340	111,242 ± 9,422
	B	126,227 ± 7,907	118,788 ± 6,835	117,121 ± 4,818	122,667 ± 1,111	118,030 ± 4,728

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

PRILOG 9. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman						
		K16	BS16	BK16	BKS16	BKDEI16	T16	BKT16
Hidroksibenzojeve kiseline								
galna kiselina	F	2,380 ± 0,574	2,864 ± 0,462	2,900 ± 0,165	3,064 ± 0,222	2,993 ± 0,107	46,622 ± 0,388	43,960 ± 1,350
	B	2,973 ± 0,066	3,161 ± 0,361	2,976 ± 0,154	3,457 ± 0,049	3,409 ± 0,215	50,507 ± 0,753	47,324 ± 1,539
protokatehinska kiselina	F	1,724 ± 0,439	1,046 ± 0,016	1,054 ± 0,025	1,079 ± 0,006	0,994 ± 0,066	1,136 ± 0,015	0,961 ± 0,014
	B	1,195 ± 0,326	1,232 ± 0,027	1,189 ± 0,016	1,213 ± 0,061	1,161 ± 0,064	1,384 ± 0,060	1,154 ± 0,032
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,538 ± 0,014	0,337 ± 0,005	0,340 ± 0,015	0,347 ± 0,003	0,342 ± 0,006	0,530 ± 0,041	0,450 ± 0,008
	B	0,520 ± 0,030	0,382 ± 0,020	0,382 ± 0,011	0,370 ± 0,008	0,369 ± 0,023	0,592 ± 0,017	0,503 ± 0,007
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,116 ± 0,017	0,057 ± 0,001	0,051 ± 0,005	0,061 ± 0,004	0,043 ± 0,010	0,092 ± 0,006	0,041 ± 0,003
	B	0,125 ± 0,005	0,082 ± 0,002	0,078 ± 0,015	0,063 ± 0,009	0,058 ± 0,003	0,115 ± 0,010	0,058 ± 0,010
siringinska kiselina	F	0,105 ± 0,006	0,114 ± 0,002	0,113 ± 0,002	0,115 ± 0,003	0,109 ± 0,008	1,517 ± 0,018	1,892 ± 0,023
	B	0,137 ± 0,003	0,147 ± 0,016	0,157 ± 0,013	0,130 ± 0,013	0,118 ± 0,005	0,752 ± 0,028	0,972 ± 0,034
Hidroksicimetne kiseline								
cis-kaftarna kiselina[S]	F	1,720 ± 0,062	1,770 ± 0,011	1,807 ± 0,047	1,782 ± 0,034	1,785 ± 0,024	1,669 ± 0,038	1,789 ± 0,036
	B	1,189 ± 0,083	1,118 ± 0,071	1,098 ± 0,038	1,172 ± 0,009	1,107 ± 0,021	1,122 ± 0,081	1,109 ± 0,061
trans-kaftarna kiselina	F	12,762 ± 1,529	19,236 ± 0,225	19,132 ± 0,287	18,578 ± 0,066	19,516 ± 0,465	15,535 ± 0,290	21,113 ± 0,349
	B	12,791 ± 1,366	19,362 ± 0,478	19,227 ± 0,469	18,375 ± 0,236	19,651 ± 0,147	15,430 ± 0,047	21,345 ± 0,206
cis-kutarna kiselina[S]	F	0,815 ± 0,003	0,871 ± 0,001	0,868 ± 0,005	0,870 ± 0,005	0,882 ± 0,007	0,925 ± 0,022	0,929 ± 0,032
	B	0,746 ± 0,014	0,786 ± 0,015	0,768 ± 0,003	0,814 ± 0,005	0,806 ± 0,020	0,815 ± 0,020	0,817 ± 0,016
trans-kutarna kiselina[S]	F	0,082 ± 0,009	0,228 ± 0,015	0,230 ± 0,005	0,208 ± 0,002	0,245 ± 0,016	0,125 ± 0,021	0,394 ± 0,027
	B	0,086 ± 0,004	0,219 ± 0,024	0,227 ± 0,012	0,186 ± 0,014	0,239 ± 0,013	0,127 ± 0,011	0,392 ± 0,019
kafeinska kiselina	F	4,877 ± 0,258	3,749 ± 0,064	3,643 ± 0,059	3,740 ± 0,037	3,499 ± 0,036	4,453 ± 0,048	2,948 ± 0,026
	B	5,535 ± 0,289	4,255 ± 0,037	4,037 ± 0,082	4,194 ± 0,010	3,919 ± 0,106	5,002 ± 0,034	3,134 ± 0,056
cis-fertarna kiselina[S]	F	0,374 ± 0,011	0,376 ± 0,009	0,374 ± 0,010	0,383 ± 0,009	0,373 ± 0,013	0,344 ± 0,023	0,349 ± 0,010
	B	0,249 ± 0,020	0,249 ± 0,017	0,250 ± 0,008	0,255 ± 0,005	0,246 ± 0,005	0,234 ± 0,006	0,224 ± 0,013

trans-fertarna kiselina[S]	F	1,641 ± 0,024	1,771 ± 0,018	1,765 ± 0,011	1,765 ± 0,012	1,774 ± 0,025	1,724 ± 0,093	1,847 ± 0,011
	B	1,896 ± 0,026	1,978 ± 0,026	1,949 ± 0,020	1,939 ± 0,007	1,972 ± 0,033	1,894 ± 0,011	1,963 ± 0,008
p-kumarna kiselina	F	0,854 ± 0,008	0,556 ± 0,008	0,561 ± 0,011	0,574 ± 0,004	0,566 ± 0,014	0,875 ± 0,045	0,546 ± 0,042
	B	1,123 ± 0,166	0,647 ± 0,004	0,591 ± 0,009	0,728 ± 0,011	0,688 ± 0,033	1,012 ± 0,036	0,598 ± 0,011
ferulinska kiselina	F	1,053 ± 0,026	0,897 ± 0,009	0,881 ± 0,022	0,906 ± 0,009	0,855 ± 0,028	1,045 ± 0,030	0,849 ± 0,043
	B	1,015 ± 0,033	0,900 ± 0,016	0,858 ± 0,029	0,887 ± 0,009	0,849 ± 0,002	0,999 ± 0,033	0,831 ± 0,027
Flavan-3-oli								
katehin + tirosol (kao katehin)	F	21,476 ± 0,203	21,183 ± 0,494	20,803 ± 0,241	20,911 ± 0,147	20,662 ± 0,070	20,730 ± 0,196	20,666 ± 0,815
	B	21,281 ± 0,303	21,172 ± 0,728	20,348 ± 0,270	20,621 ± 0,082	20,611 ± 0,534	20,418 ± 0,311	20,451 ± 0,673
epikatehin	F	0,781 ± 0,216	0,801 ± 0,028	0,787 ± 0,009	0,930 ± 0,060	0,796 ± 0,061	0,645 ± 0,047	0,846 ± 0,141
	B	0,944 ± 0,126	1,135 ± 0,122	1,165 ± 0,028	0,931 ± 0,084	0,855 ± 0,083	0,783 ± 0,049	0,736 ± 0,026
procijanidin B1	F	1,605 ± 0,039	1,727 ± 0,021	1,696 ± 0,032	1,665 ± 0,016	1,651 ± 0,030	7,392 ± 0,091	7,587 ± 0,180
	B	1,600 ± 0,125	1,801 ± 0,039	1,754 ± 0,038	1,668 ± 0,023	1,715 ± 0,029	7,176 ± 0,203	7,282 ± 0,147
procijanidin B2	F	0,501 ± 0,020	0,605 ± 0,016	0,602 ± 0,026	0,651 ± 0,056	0,651 ± 0,026	0,252 ± 0,025	0,370 ± 0,006
	B	0,740 ± 0,018	1,082 ± 0,340	1,516 ± 0,072	0,848 ± 0,071	0,811 ± 0,013	0,549 ± 0,078	0,607 ± 0,014
Ostali								
taksifolin	F	0,155 ± 0,002	0,100 ± 0,004	0,108 ± 0,001	0,098 ± 0,004	0,096 ± 0,009	0,145 ± 0,004	0,113 ± 0,005
	B	0,172 ± 0,004	0,114 ± 0,007	0,114 ± 0,001	0,103 ± 0,003	0,107 ± 0,005	0,154 ± 0,002	0,111 ± 0,004
trans-piceid	F	0,129 ± 0,005	0,169 ± 0,004	0,172 ± 0,007	0,166 ± 0,001	0,170 ± 0,008	0,156 ± 0,007	0,159 ± 0,002
	B	0,111 ± 0,005	0,171 ± 0,002	0,174 ± 0,007	0,162 ± 0,002	0,175 ± 0,001	0,128 ± 0,005	0,199 ± 0,004
Neidentificirani[S]								
T1	F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	22,925 ± 0,235	22,240 ± 0,259
	B	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	24,169 ± 0,232	23,333 ± 0,189
T2	F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	15,079 ± 0,220	13,488 ± 0,504
	B	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	18,615 ± 0,130	16,488 ± 0,625
T3	F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	15,639 ± 0,357	13,554 ± 0,603
	B	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	19,839 ± 0,330	17,233 ± 0,576
T4	F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	79,283 ± 0,555	79,521 ± 2,735
	B	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	76,191 ± 1,392	77,636 ± 2,992
T5	F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	37,361 ± 0,195	38,916 ± 2,220

	B	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	35,055 ± 0,778	36,294 ± 2,169
T6	F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	5,559 ± 0,022	5,933 ± 0,259
	B	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	6,969 ± 0,123	6,841 ± 0,411
T7	F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	3,628 ± 0,048	4,636 ± 0,114
	B	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,403 ± 0,079	2,015 ± 0,105
T8	F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	3,393 ± 0,074	4,014 ± 0,290
	B	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	2,187 ± 0,103	2,415 ± 0,136
T9	F	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	33,380 ± 0,407	29,009 ± 2,777
	B	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	38,560 ± 0,674	33,588 ± 2,890
Ukupni flavonoidi	F	166,28 ± 6,80		115,85 ± 0,00			584,99 ± 37,14	558,18 ± 13,59
	B	86,11 ± 5,14		59,41 ± 6,80			540,38 ± 10,28	522,58 ± 13,59
Ukupni fenoli[‡]	F	195,64 ± 1,68	185,36 ± 1,99	181,68 ± 4,528	182,78 ± 5,28	171,58 ± 3,83	309,24 ± 21,79	314,85 ± 4,09
	B	214,97 ± 1,96	185,15 ± 7,13	200,27 ± 6,01	177,33 ± 8,15	178,94 ± 0,14	331,48 ± 8,38	330,82 ± 10,71

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1, osim u slučaju neidentificiranih spojeva T1 - T9 čije su koncentracije izražene kao ekvivalenti procijanidina B1 uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1; n. d. - nije detektiran.

[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

PRILOG 10. Koncentracije fenolnih spojeva (mg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Fenolni spojevi	Uzorkovanje	Tretman						
		K17	BK17	BKTMP17	BKDUP17	MVN17	PUR17	PEN17
Hidroksibenzojeve kiseline								
galna kiselina	F	0,522 ± 0,108	0,559 ± 0,042	0,767 ± 0,110	0,720 ± 0,052	0,617 ± 0,104	0,616 ± 0,105	0,652 ± 0,062
	B	0,577 ± 0,122	0,711 ± 0,087	0,601 ± 0,100	0,630 ± 0,188	0,653 ± 0,059	0,624 ± 0,056	0,681 ± 0,058
protokatehinska kiselina	F	3,331 ± 0,119	3,201 ± 0,064	3,284 ± 0,027	3,183 ± 0,016	3,212 ± 0,048	3,204 ± 0,094	3,189 ± 0,075
	B	3,237 ± 0,109	3,190 ± 0,039	3,139 ± 0,046	3,091 ± 0,078	3,136 ± 0,039	3,087 ± 0,024	3,146 ± 0,008
p-hidroksibenzojeva kiselina	F	0,252 ± 0,010	0,259 ± 0,004	0,245 ± 0,010	0,247 ± 0,003	0,226 ± 0,003	0,230 ± 0,006	0,230 ± 0,004
	B	0,226 ± 0,012	0,232 ± 0,007	0,230 ± 0,003	0,230 ± 0,011	0,229 ± 0,005	0,222 ± 0,003	0,232 ± 0,005
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina	F	0,051 ± 0,003	0,044 ± 0,001	0,044 ± 0,003	0,035 ± 0,004	0,045 ± 0,004	0,040 ± 0,004	0,037 ± 0,003
	B	0,043 ± 0,005	0,039 ± 0,006	0,035 ± 0,003	0,036 ± 0,004	0,034 ± 0,002	0,034 ± 0,004	0,037 ± 0,002
siringinska kiselina	F	0,187 ± 0,014	0,237 ± 0,008	0,250 ± 0,004	0,263 ± 0,006	0,239 ± 0,005	0,278 ± 0,011	0,232 ± 0,009
	B	0,219 ± 0,011	0,252 ± 0,009	0,242 ± 0,004	0,261 ± 0,014	0,242 ± 0,007	0,266 ± 0,004	0,237 ± 0,003
Hidroksicimetne kiseline								
cis-kaftarna kiselina[S]	F	0,920 ± 0,079	0,882 ± 0,041	0,959 ± 0,031	0,963 ± 0,017	0,909 ± 0,083	0,887 ± 0,054	0,892 ± 0,065
	B	0,594 ± 0,051	0,624 ± 0,026	0,587 ± 0,010	0,604 ± 0,066	0,600 ± 0,050	0,549 ± 0,017	0,591 ± 0,035
trans-kaftarna kiselina	F	9,323 ± 1,147	9,483 ± 0,559	10,959 ± 0,079	11,158 ± 0,142	10,344 ± 0,730	10,616 ± 0,822	10,381 ± 0,873
	B	9,259 ± 0,817	11,27 ± 1,088	10,442 ± 0,213	11,285 ± 1,343	11,305 ± 0,589	10,823 ± 0,575	11,289 ± 0,440
cis-kutarna kiselina[S]	F	0,857 ± 0,050	0,829 ± 0,028	0,888 ± 0,012	0,888 ± 0,009	0,858 ± 0,034	0,863 ± 0,047	0,855 ± 0,051
	B	0,784 ± 0,058	0,831 ± 0,048	0,794 ± 0,009	0,822 ± 0,062	0,821 ± 0,040	0,791 ± 0,019	0,817 ± 0,020
trans-kutarna kiselina[S]	F	0,737 ± 0,074	0,807 ± 0,036	0,887 ± 0,035	0,936 ± 0,025	0,873 ± 0,043	0,915 ± 0,054	0,884 ± 0,059
	B	0,689 ± 0,056	0,896 ± 0,096	0,823 ± 0,052	0,936 ± 0,095	0,915 ± 0,040	0,939 ± 0,045	0,927 ± 0,022
kafeinska kiselina	F	0,314 ± 0,109	0,185 ± 0,035	0,268 ± 0,036	0,218 ± 0,008	0,195 ± 0,050	0,235 ± 0,092	0,193 ± 0,061
	B	0,265 ± 0,063	0,247 ± 0,015	0,231 ± 0,041	0,222 ± 0,041	0,233 ± 0,031	0,249 ± 0,050	0,220 ± 0,043
cis-fertarna kiselina[S]	F	0,364 ± 0,018	0,358 ± 0,010	0,370 ± 0,004	0,369 ± 0,009	0,354 ± 0,018	0,351 ± 0,016	0,358 ± 0,013
	B	0,265 ± 0,009	0,267 ± 0,005	0,258 ± 0,003	0,260 ± 0,010	0,258 ± 0,011	0,238 ± 0,002	0,258 ± 0,005

trans-fertarna kiselina[S]	F	1,672 ± 0,113	1,695 ± 0,066	1,813 ± 0,010	1,813 ± 0,018	1,754 ± 0,039	1,774 ± 0,072	1,755 ± 0,106
	B	1,763 ± 0,108	1,947 ± 0,125	1,829 ± 0,042	1,931 ± 0,134	1,941 ± 0,067	1,879 ± 0,065	1,933 ± 0,022
p-kumarna kiselina	F	0,155 ± 0,016	0,079 ± 0,015	0,104 ± 0,024	0,081 ± 0,007	0,078 ± 0,010	0,077 ± 0,014	0,074 ± 0,012
	B	0,163 ± 0,036	0,115 ± 0,005	0,117 ± 0,026	0,101 ± 0,020	0,120 ± 0,009	0,100 ± 0,003	0,100 ± 0,010
ferulinska kiselina	F	0,529 ± 0,070	0,368 ± 0,053	0,393 ± 0,033	0,382 ± 0,031	0,348 ± 0,034	0,367 ± 0,051	0,337 ± 0,036
	B	0,457 ± 0,041	0,399 ± 0,011	0,339 ± 0,038	0,365 ± 0,062	0,353 ± 0,023	0,354 ± 0,013	0,333 ± 0,013
Flavan-3-oli								
katehin + tirosol (kao katehin)	F	15,085 ± 0,259	13,959 ± 0,374	14,565 ± 0,242	13,557 ± 0,192	14,011 ± 0,333	13,681 ± 0,507	14,027 ± 0,470
	B	14,688 ± 0,402	13,877 ± 0,142	13,850 ± 0,225	13,297 ± 0,325	13,891 ± 0,235	13,644 ± 0,062	13,95 ± 0,164
epikatehin	F	3,202 ± 0,136	3,292 ± 0,106	3,468 ± 0,070	3,487 ± 0,010	3,311 ± 0,139	3,430 ± 0,171	3,305 ± 0,120
	B	2,972 ± 0,052	3,100 ± 0,096	3,003 ± 0,041	3,151 ± 0,109	3,039 ± 0,075	3,034 ± 0,014	3,056 ± 0,032
procijanidin B1	F	0,436 ± 0,140	0,371 ± 0,056	0,536 ± 0,263	0,469 ± 0,084	0,393 ± 0,201	0,477 ± 0,194	0,423 ± 0,179
	B	0,361 ± 0,019	0,481 ± 0,056	0,399 ± 0,080	0,477 ± 0,058	0,423 ± 0,063	0,399 ± 0,118	0,503 ± 0,030
procijanidin B2	F	0,448 ± 0,022	0,478 ± 0,012	0,487 ± 0,061	0,499 ± 0,014	0,467 ± 0,040	0,488 ± 0,040	0,465 ± 0,025
	B	0,451 ± 0,010	0,455 ± 0,005	0,437 ± 0,010	0,463 ± 0,019	0,453 ± 0,014	0,414 ± 0,027	0,473 ± 0,008
Ostali								
taksifolin	F	0,075 ± 0,008	0,068 ± 0,009	0,086 ± 0,012	0,085 ± 0,006	0,073 ± 0,013	0,081 ± 0,014	0,079 ± 0,010
	B	0,063 ± 0,003	0,077 ± 0,007	0,071 ± 0,006	0,076 ± 0,011	0,074 ± 0,002	0,065 ± 0,006	0,074 ± 0,005
trans-piceid	F	0,046 ± 0,003	0,044 ± 0,005	0,056 ± 0,008	0,054 ± 0,003	0,049 ± 0,009	0,053 ± 0,009	0,048 ± 0,006
	B	0,041 ± 0,000	0,052 ± 0,005	0,048 ± 0,003	0,053 ± 0,007	0,053 ± 0,003	0,055 ± 0,001	0,052 ± 0,004
Ukupni fenoli[‡]	F	129,152 ± 1,129	114,818 ± 4,348	113,121 ± 1,652	119,545 ± 4,193	113,515 ± 3,348	110,485 ± 2,113	118,000 ± 2,862
	B	122,818 ± 2,786	115,152 ± 5,761	111,212 ± 5,611	103,303 ± 7,182	117,394 ± 4,106	106,909 ± 11,022	111,545 ± 9,153

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti *trans*-kaftarne kiseline uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

[‡] Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent mg/L galne kiseline.

PRILOG 11. Koncentracije slobodnih hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Slobodni spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Monoterpeni						
cis-furan oksid linalola[S]	F	0,287 ± 0,056	0,253 ± 0,040	0,295 ± 0,031	0,315 ± 0,136	0,259 ± 0,073
	B	0,768 ± 0,053	0,716 ± 0,247	0,922 ± 0,106	0,922 ± 0,095	0,915 ± 0,005
linalol	F	30,123 ± 1,489	30,923 ± 0,952	29,410 ± 1,076	30,949 ± 0,829	29,735 ± 1,009
	B	48,428 ± 0,389	50,749 ± 0,290	55,100 ± 1,586	52,073 ± 2,230	57,544 ± 1,895
hotrienol[S]	F	11,152 ± 0,904	9,750 ± 1,563	10,471 ± 0,098	9,766 ± 0,361	11,711 ± 0,583
	B	12,562 ± 0,381	13,131 ± 0,465	14,712 ± 0,394	13,808 ± 0,730	15,649 ± 0,739
α-terpineol	F	9,267 ± 0,165	9,692 ± 0,045	9,157 ± 0,155	9,589 ± 0,244	8,784 ± 0,197
	B	32,010 ± 0,169	34,224 ± 1,163	35,863 ± 0,755	33,608 ± 0,701	36,523 ± 0,889
trans-piran oksid linalola[S]	F	0,177 ± 0,018	0,156 ± 0,005	0,212 ± 0,010	0,184 ± 0,035	0,197 ± 0,144
	B	0,217 ± 0,026	0,317 ± 0,094	0,280 ± 0,096	0,360 ± 0,104	0,266 ± 0,006
citronelol	F	10,809 ± 0,158	6,813 ± 0,556	7,104 ± 1,696	7,008 ± 0,245	7,194 ± 0,318
	B	10,052 ± 0,495	8,970 ± 0,201	8,847 ± 0,538	8,261 ± 0,918	7,553 ± 0,591
geraniol	F	11,752 ± 0,794	12,176 ± 1,772	11,549 ± 0,106	11,953 ± 0,709	11,138 ± 1,154
	B	9,025 ± 0,263	9,648 ± 1,600	10,849 ± 0,695	9,239 ± 0,138	9,104 ± 1,687
C_{13}-norizoprenoidi						
vitispiran I[S]	F	0,088 ± 0,001	0,095 ± 0,003	0,090 ± 0,014	0,076 ± 0,019	0,116 ± 0,018
	B	0,321 ± 0,070	0,361 ± 0,025	0,304 ± 0,013	0,276 ± 0,021	0,324 ± 0,043
vitispiran II[S]	F	0,101 ± 0,013	0,088 ± 0,011	0,117 ± 0,026	0,089 ± 0,012	0,098 ± 0,022
	B	0,320 ± 0,089	0,343 ± 0,017	0,326 ± 0,012	0,297 ± 0,048	0,289 ± 0,076
aktinidol etil-eter[S]	F	0,045 ± 0,033	0,018 ± 0,014	0,043 ± 0,012	0,040 ± 0,023	0,063 ± 0,049
	B	0,707 ± 0,127	0,535 ± 0,084	0,653 ± 0,236	0,478 ± 0,077	0,702 ± 0,196
β-damaskenon	F	3,651 ± 0,104	3,654 ± 0,075	4,130 ± 0,031	4,383 ± 0,105	4,222 ± 0,163
	B	2,648 ± 0,106	2,306 ± 0,106	2,268 ± 0,467	2,225 ± 0,024	2,397 ± 0,158

aktinidol I[S]	F	0,868 ± 0,098	0,903 ± 0,001	0,840 ± 0,125	0,887 ± 0,013	0,899 ± 0,055
	B	6,573 ± 0,195	7,179 ± 0,295	7,269 ± 0,428	6,927 ± 0,228	7,260 ± 0,301
aktinidol II[S]	F	1,673 ± 0,117	1,722 ± 0,006	1,589 ± 0,136	1,701 ± 0,038	1,648 ± 0,095
	B	11,285 ± 0,253	12,276 ± 0,357	12,302 ± 0,827	11,746 ± 0,158	12,333 ± 0,337
Alkoholi						
1-heksanol (mg/L)	F	1,877 ± 0,055	1,483 ± 0,002	1,916 ± 0,069	1,939 ± 0,171	1,848 ± 0,040
	B	1,957 ± 0,039	1,724 ± 0,081	1,982 ± 0,077	1,845 ± 0,013	1,986 ± 0,054
trans-3-heksenol	F	126,938 ± 4,436	112,523 ± 0,458	140,425 ± 4,496	139,522 ± 9,237	141,176 ± 5,495
	B	129,837 ± 1,559	123,263 ± 5,639	148,496 ± 5,171	133,977 ± 4,634	148,368 ± 4,390
cis-3-heksenol	F	61,356 ± 1,207	60,258 ± 1,316	74,791 ± 4,876	75,293 ± 6,177	74,584 ± 3,651
	B	66,503 ± 0,957	66,528 ± 2,421	77,155 ± 2,115	72,194 ± 1,840	76,554 ± 2,186
1-okten-4-ol[S]	F	8,788 ± 1,697	9,224 ± 0,081	9,596 ± 1,787	11,305 ± 0,995	10,672 ± 1,187
	B	21,428 ± 3,691	25,310 ± 1,651	23,971 ± 1,467	23,420 ± 0,522	25,287 ± 1,127
benzil-alkohol[S]	F	5,363 ± 0,071	4,446 ± 0,135	4,325 ± 0,107	4,540 ± 0,184	4,554 ± 0,290
	B	9,902 ± 0,436	7,349 ± 0,235	7,762 ± 0,562	7,136 ± 0,395	7,354 ± 0,220
2-feniletanol (mg/L)	F	18,309 ± 4,219	19,034 ± 0,623	22,334 ± 2,602	23,864 ± 1,963	23,313 ± 2,353
	B	18,784 ± 4,526	21,475 ± 1,311	21,983 ± 2,004	20,954 ± 1,118	23,032 ± 2,415
Masne kiseline						
butanska kiselina	F	32,728 ± 0,634	30,910 ± 1,028	40,252 ± 1,998	40,771 ± 3,409	40,699 ± 3,359
	B	34,086 ± 1,125	37,053 ± 1,046	38,127 ± 3,113	37,372 ± 1,453	42,144 ± 1,586
heksanska kiselina (mg/L)	F	3,790 ± 0,442	5,077 ± 0,084	5,650 ± 0,453	5,326 ± 0,248	5,724 ± 0,204
	B	3,588 ± 0,294	4,960 ± 0,201	5,686 ± 0,431	5,447 ± 0,356	6,229 ± 0,173
oktanska kiselina (mg/L)	F	1,619 ± 0,176	2,450 ± 0,098	3,031 ± 0,136	2,722 ± 0,334	3,037 ± 0,129
	B	1,881 ± 0,156	2,493 ± 0,107	3,105 ± 0,315	2,892 ± 0,299	3,387 ± 0,063
dekanska kiselina (mg/L)	F	0,652 ± 0,056	0,966 ± 0,044	1,073 ± 0,032	1,007 ± 0,037	1,220 ± 0,088
	B	0,694 ± 0,010	0,662 ± 0,060	0,811 ± 0,077	0,794 ± 0,110	0,941 ± 0,121
Etil-esteri						
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,449 ± 0,027	0,570 ± 0,023	0,580 ± 0,032	0,589 ± 0,011	0,652 ± 0,011
	B	0,300 ± 0,010	0,307 ± 0,011	0,384 ± 0,039	0,359 ± 0,009	0,432 ± 0,027
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,777 ± 0,012	0,951 ± 0,008	0,888 ± 0,169	0,962 ± 0,092	1,076 ± 0,064

	B	0,337 ± 0,019	0,410 ± 0,020	0,445 ± 0,036	0,436 ± 0,005	0,452 ± 0,031
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,248 ± 0,005	0,298 ± 0,052	0,303 ± 0,003	0,287 ± 0,015	0,348 ± 0,006
	B	0,080 ± 0,001	0,112 ± 0,006	0,124 ± 0,013	0,116 ± 0,007	0,133 ± 0,012
Acetatni esteri						
izoamil-acetat (mg/L)	F	0,728 ± 0,001	0,999 ± 0,003	1,347 ± 0,179	1,353 ± 0,138	1,321 ± 0,031
	B	0,458 ± 0,036	0,665 ± 0,023	0,794 ± 0,139	0,721 ± 0,055	0,856 ± 0,041
heksil-acetat (mg/L)	F	0,095 ± 0,001	0,137 ± 0,001	0,134 ± 0,018	0,130 ± 0,011	0,130 ± 0,005
	B	0,019 ± 0,001	0,035 ± 0,005	0,044 ± 0,013	0,039 ± 0,004	0,047 ± 0,006
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	0,123 ± 0,020	0,184 ± 0,002	0,163 ± 0,006	0,178 ± 0,008	0,177 ± 0,008
	B	0,085 ± 0,012	0,119 ± 0,007	0,108 ± 0,008	0,120 ± 0,003	0,123 ± 0,004
Ostali esteri						
etil-laktat (mg/L)	F	6,292 ± 0,883	5,963 ± 0,225	5,403 ± 0,443	6,302 ± 0,507	5,759 ± 0,331
	B	16,485 ± 1,511	16,044 ± 1,252	17,426 ± 0,641	16,913 ± 0,591	17,063 ± 0,910
izoamil-heksanoat[S]	F	1,102 ± 0,201	1,377 ± 0,105	1,690 ± 0,494	1,817 ± 0,244	1,905 ± 0,336
	B	2,680 ± 0,133	3,406 ± 0,125	3,165 ± 0,454	3,691 ± 0,528	3,156 ± 0,299
izoamil-oktanoat[S]	F	2,070 ± 0,195	2,750 ± 0,822	2,781 ± 0,487	2,598 ± 0,175	3,182 ± 0,424
	B	2,094 ± 0,019	2,724 ± 0,267	6,817 ± 3,261	3,090 ± 0,841	9,640 ± 0,354
dietil-sukcinat (mg/L)	F	0,217 ± 0,056	0,280 ± 0,023	0,175 ± 0,001	0,259 ± 0,068	0,220 ± 0,019
	B	1,661 ± 0,298	2,237 ± 0,078	1,941 ± 0,157	1,967 ± 0,181	2,028 ± 0,105
Ostali						
furfural[S]	F	1,510 ± 0,248	1,548 ± 0,276	1,604 ± 0,231	1,748 ± 0,346	2,122 ± 0,114
	B	11,019 ± 0,009	8,659 ± 0,798	11,286 ± 0,871	10,072 ± 0,879	11,053 ± 0,378
benzaldehid	F	4,865 ± 0,493	5,299 ± 0,031	7,104 ± 1,582	6,785 ± 1,148	7,773 ± 0,723
	B	5,690 ± 0,540	5,546 ± 0,202	7,253 ± 1,126	6,293 ± 0,140	8,029 ± 0,427
dihidro-3(2H)-tiofenon[S]	F	6,652 ± 4,220	8,639 ± 0,301	6,925 ± 2,321	9,226 ± 1,846	8,978 ± 1,303
	B	4,612 ± 2,396	6,445 ± 0,616	4,876 ± 1,481	5,423 ± 1,170	6,002 ± 1,588
etil-benzenacetat[S]	F	1,114 ± 0,064	0,960 ± 0,026	0,820 ± 0,180	0,933 ± 0,116	1,025 ± 0,254
	B	2,416 ± 0,043	2,241 ± 0,103	2,125 ± 0,283	2,120 ± 0,136	2,309 ± 0,282
4-etilfenol[S]	F	0,651 ± 0,011	0,686 ± 0,024	0,673 ± 0,008	1,251 ± 0,596	0,945 ± 0,246
	B	0,774 ± 0,110	0,885 ± 0,057	0,866 ± 0,089	0,936 ± 0,086	1,006 ± 0,112

4-vinilgvajakol[S]	F	100,730 ± 12,905	113,544 ± 4,577	117,139 ± 7,387	113,718 ± 9,216	107,288 ± 2,493
	B	110,792 ± 4,268	104,512 ± 1,897	120,735 ± 17,456	100,420 ± 2,865	106,380 ± 6,516

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti spojeva slične kemijske strukture uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

PRILOG 12. Koncentracije slobodnih hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Slobodni spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman						
		K16	BS16	BK16	BKS16	BKDEI16	T16	BKT16
Monoterpeni								
linalol	F	24,405 ± 0,739	23,666 ± 0,746	22,920 ± 0,445	23,789 ± 1,657	23,070 ± 0,092	24,782 ± 1,156	24,790 ± 1,273
	B	29,675 ± 4,918	28,802 ± 1,302	29,242 ± 2,272	27,463 ± 1,255	27,292 ± 1,570	29,558 ± 2,523	28,700 ± 3,441
α-terpineol	F	9,506 ± 0,238	10,377 ± 1,707	10,179 ± 0,093	9,660 ± 0,468	9,691 ± 0,053	10,446 ± 0,940	9,970 ± 0,496
	B	12,444 ± 0,432	12,048 ± 0,226	11,921 ± 0,386	12,892 ± 0,967	12,383 ± 0,665	11,977 ± 0,339	12,226 ± 0,268
α-terpinolen^{S}	F	0,838 ± 0,732	0,866 ± 0,760	0,972 ± 0,917	1,073 ± 1,023	0,525 ± 0,909	0,862 ± 0,755	1,199 ± 1,160
	B	0,892 ± 0,774	0,994 ± 0,861	1,351 ± 0,526	0,793 ± 0,687	0,933 ± 0,810	0,856 ± 0,746	0,851 ± 0,745
citronelol	F	7,811 ± 0,775	8,317 ± 0,758	8,043 ± 0,250	8,006 ± 0,292	7,784 ± 0,820	7,851 ± 0,220	7,730 ± 0,741
	B	7,676 ± 0,314	7,778 ± 0,335	7,585 ± 0,330	7,901 ± 0,551	7,453 ± 0,183	7,390 ± 0,563	7,443 ± 0,640
terpendiol I^{S}	F	86,778 ± 1,002	88,355 ± 5,827	85,801 ± 5,458	84,588 ± 3,798	83,713 ± 2,983	83,697 ± 2,925	86,620 ± 5,449
	B	77,585 ± 1,282	75,654 ± 12,047	76,090 ± 2,408	78,130 ± 1,392	77,807 ± 1,411	75,699 ± 3,515	73,615 ± 1,027
C_{13}-norizoprenoid								
β-damaskenon	F	3,100 ± 0,486	3,575 ± 0,252	3,510 ± 0,227	3,408 ± 0,137	2,901 ± 0,550	3,199 ± 0,157	3,353 ± 0,269
	B	2,287 ± 0,223	2,482 ± 0,168	2,322 ± 0,222	2,519 ± 0,218	2,068 ± 0,329	2,297 ± 0,278	2,447 ± 0,191
Alkoholi								
propanol (mg/L)	F	28,306 ± 3,175		28,250 ± 3,552			27,143 ± 1,941	26,670 ± 1,529
	B	29,150 ± 0,476		29,370 ± 2,346			29,017 ± 0,987	25,584 ± 1,071
izobutanol (mg/L)	F	18,497 ± 0,957		18,849 ± 1,579			18,796 ± 1,370	20,589 ± 4,737
	B	19,632 ± 0,019		19,783 ± 0,389			19,323 ± 0,288	19,703 ± 3,743
izoamil-alkohol (mg/L)	F	196,986 ± 9,651		199,844 ± 16,477			204,384 ± 13,551	211,370 ± 40,767
	B	205,993 ± 0,530		205,522 ± 4,629			206,430 ± 3,626	205,939 ± 31,577
1-heksanol (mg/L)	F	2,023 ± 0,066	1,927 ± 0,059	1,973 ± 0,021	1,982 ± 0,047	1,979 ± 0,054	1,939 ± 0,061	1,991 ± 0,143
	B	1,976 ± 0,063	1,948 ± 0,021	1,912 ± 0,021	1,963 ± 0,087	1,900 ± 0,010	1,866 ± 0,035	1,960 ± 0,155
trans-3-heksenol^{S}	F	134,293 ± 1,920	130,399 ± 4,483	133,372 ± 2,626	133,652 ± 2,015	134,488 ± 5,389	133,050 ± 5,182	132,413 ± 3,489

	B	132,984 ± 4,241	132,021 ± 3,142	127,304 ± 0,760	131,435 ± 4,347	129,108 ± 0,822	128,123 ± 4,154	129,217 ± 3,438
cis-3-heksenol[S]	F	84,702 ± 1,559	81,678 ± 2,064	83,260 ± 0,889	82,784 ± 2,167	84,056 ± 3,012	80,919 ± 2,235	74,106 ± 8,393
	B	83,090 ± 3,007	81,984 ± 2,288	78,587 ± 1,654	81,071 ± 3,207	80,433 ± 0,899	77,737 ± 1,651	72,531 ± 8,871
1-oktanol[S]	F	14,832 ± 3,130	18,660 ± 4,359	14,461 ± 1,354	16,497 ± 3,660	13,350 ± 2,149	12,694 ± 1,256	15,919 ± 3,651
	B	18,618 ± 4,932	13,275 ± 4,085	15,009 ± 3,572	14,957 ± 2,871	14,169 ± 4,668	11,959 ± 1,339	14,023 ± 5,755
benzil-alkohol[S]	F	51,588 ± 0,494	29,022 ± 0,435	28,122 ± 0,473	28,735 ± 0,232	28,009 ± 1,609	45,842 ± 0,776	28,236 ± 1,197
	B	60,788 ± 1,018	29,369 ± 0,488	28,230 ± 0,839	29,909 ± 0,619	28,237 ± 0,717	52,825 ± 1,816	27,778 ± 1,517
2-feniletanol (mg/L)	F	29,900 ± 1,033	30,982 ± 2,353	28,770 ± 0,791	28,748 ± 1,135	28,952 ± 0,939	29,636 ± 0,814	29,975 ± 0,836
	B	27,993 ± 0,523	29,238 ± 1,410	28,140 ± 0,683	28,904 ± 1,097	27,717 ± 0,686	27,520 ± 0,099	28,618 ± 1,285
Masne kiseline								
butanska kiselina (mg/L)	F	1,784 ± 0,058	1,930 ± 0,165	1,835 ± 0,102	1,813 ± 0,051	1,811 ± 0,027	1,788 ± 0,020	1,571 ± 0,132
	B	1,751 ± 0,151	1,937 ± 0,120	1,737 ± 0,057	1,795 ± 0,027	1,774 ± 0,010	1,705 ± 0,058	1,540 ± 0,145
heksanska kiselina (mg/L)	F	3,920 ± 0,157	4,362 ± 0,223	4,107 ± 0,180	4,064 ± 0,119	4,142 ± 0,162	4,289 ± 0,148	3,882 ± 0,477
	B	3,900 ± 0,260	4,125 ± 0,098	3,939 ± 0,023	4,019 ± 0,069	3,968 ± 0,080	4,050 ± 0,238	3,667 ± 0,389
oktanska kiselina (mg/L)	F	5,357 ± 0,253	6,326 ± 0,418	5,963 ± 0,164	5,728 ± 0,148	5,812 ± 0,300	6,036 ± 0,330	5,511 ± 0,683
	B	5,615 ± 0,564	6,085 ± 0,145	5,676 ± 0,112	5,835 ± 0,063	5,572 ± 0,320	5,813 ± 0,471	5,204 ± 0,778
dekanska kiselina (mg/L)	F	1,597 ± 0,083	1,857 ± 0,140	1,759 ± 0,048	1,632 ± 0,060	1,482 ± 0,233	1,906 ± 0,056	1,672 ± 0,157
	B	1,842 ± 0,332	1,851 ± 0,041	1,766 ± 0,138	1,821 ± 0,052	1,638 ± 0,347	1,887 ± 0,109	1,678 ± 0,225
dodekanska kiselina[S]	F	52,434 ± 8,080	31,917 ± 7,433	27,413 ± 13,101	25,801 ± 6,413	20,138 ± 7,001	42,708 ± 4,898	27,255 ± 4,891
	B	36,627 ± 1,928	26,775 ± 3,675	22,642 ± 5,349	25,687 ± 4,359	27,423 ± 15,861	32,207 ± 5,982	24,047 ± 9,110
Etil esteri								
etil-butanoat (mg/L)	F	0,289 ± 0,016	0,349 ± 0,012	0,330 ± 0,040	0,323 ± 0,016	0,305 ± 0,015	0,307 ± 0,013	0,270 ± 0,074
	B	0,312 ± 0,044	0,349 ± 0,017	0,317 ± 0,026	0,319 ± 0,015	0,320 ± 0,021	0,317 ± 0,020	0,262 ± 0,057
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,492 ± 0,039	0,610 ± 0,031	0,572 ± 0,027	0,556 ± 0,010	0,493 ± 0,145	0,584 ± 0,058	0,511 ± 0,059
	B	0,598 ± 0,098	0,656 ± 0,012	0,586 ± 0,043	0,618 ± 0,030	0,576 ± 0,159	0,615 ± 0,051	0,553 ± 0,072
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,213 ± 0,021	0,259 ± 0,015	0,242 ± 0,028	0,229 ± 0,031	0,212 ± 0,031	0,254 ± 0,045	0,229 ± 0,048
	B	0,268 ± 0,020	0,273 ± 0,025	0,246 ± 0,025	0,286 ± 0,016	0,359 ± 0,204	0,267 ± 0,049	0,256 ± 0,066
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,037 ± 0,002	0,035 ± 0,003	0,031 ± 0,002	0,033 ± 0,002	0,027 ± 0,002	0,043 ± 0,008	0,033 ± 0,005
	B	0,039 ± 0,007	0,036 ± 0,001	0,037 ± 0,004	0,040 ± 0,002	0,047 ± 0,032	0,043 ± 0,005	0,037 ± 0,009
Acetatni esteri								

etil-acetat (mg/L)	F	18,004 ± 2,788		20,269 ± 0,344			20,163 ± 3,621	23,529 ± 3,799
	B	29,178 ± 3,276		21,863 ± 4,547			22,763 ± 2,809	22,170 ± 2,575
izoamil-acetat (mg/L)	F	0,911 ± 0,032	1,212 ± 0,035	1,141 ± 0,013	1,076 ± 0,052	0,987 ± 0,023	1,121 ± 0,135	0,894 ± 0,277
	B	0,986 ± 0,201	1,127 ± 0,015	0,993 ± 0,042	0,984 ± 0,030	0,971 ± 0,098	1,009 ± 0,093	0,790 ± 0,242
heksil-acetat	F	67,142 ± 4,633	93,090 ± 4,021	90,817 ± 3,859	85,551 ± 5,720	70,638 ± 16,115	95,087 ± 14,652	70,290 ± 21,203
	B	82,899 ± 24,114	89,606 ± 4,898	80,056 ± 9,951	84,650 ± 3,014	72,380 ± 25,889	89,110 ± 11,679	69,195 ± 24,478
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	0,118 ± 0,005	0,157 ± 0,017	0,149 ± 0,010	0,143 ± 0,004	0,143 ± 0,011	0,149 ± 0,011	0,127 ± 0,033
	B	0,138 ± 0,029	0,145 ± 0,009	0,141 ± 0,008	0,135 ± 0,003	0,142 ± 0,002	0,140 ± 0,013	0,115 ± 0,029
Ostali esteri								
etil-laktat (mg/L)	F	5,759 ± 0,324	5,114 ± 0,117	5,513 ± 0,562	5,404 ± 0,479	5,715 ± 0,519	5,767 ± 0,467	5,654 ± 0,970
	B	7,595 ± 0,447	7,045 ± 0,553	7,599 ± 0,624	7,554 ± 0,361	7,683 ± 0,266	7,630 ± 0,199	7,911 ± 0,946
etil-3-hidroksibutanoat^{S} (mg/L)	F	0,251 ± 0,003	0,237 ± 0,009	0,256 ± 0,003	0,237 ± 0,001	0,256 ± 0,015	0,246 ± 0,013	0,280 ± 0,040
	B	0,250 ± 0,016	0,227 ± 0,015	0,244 ± 0,005	0,237 ± 0,003	0,251 ± 0,005	0,237 ± 0,016	0,274 ± 0,036
dietil-sukcinat^{S} (mg/L)	F	0,435 ± 0,014	0,394 ± 0,012	0,406 ± 0,053	0,394 ± 0,010	0,404 ± 0,027	0,417 ± 0,012	0,464 ± 0,056
	B	0,693 ± 0,026	0,669 ± 0,010	0,670 ± 0,047	0,689 ± 0,042	0,692 ± 0,014	0,714 ± 0,023	0,777 ± 0,090
metil-4-hidroksibutanoat^{S}	F	22,823 ± 1,441	24,189 ± 0,391	25,063 ± 0,927	22,448 ± 1,215	25,299 ± 1,399	22,902 ± 0,593	19,617 ± 1,145
	B	18,078 ± 2,207	16,12 ± 7,032	19,606 ± 0,747	18,106 ± 0,289	17,924 ± 1,157	15,730 ± 0,730	14,225 ± 2,274
etil-4-hidroksibutanoat^{S} (mg/L)	F	6,706 ± 0,664	7,739 ± 0,540	7,460 ± 0,402	6,934 ± 0,384	7,416 ± 0,080	6,628 ± 0,123	5,799 ± 0,833
	B	5,439 ± 0,673	5,523 ± 0,887	5,590 ± 0,296	5,359 ± 0,099	5,402 ± 0,244	4,860 ± 0,219	4,240 ± 0,719
dietil-malat^{S} (mg/L)	F	0,311 ± 0,006	0,299 ± 0,012	0,294 ± 0,018	0,282 ± 0,003	0,302 ± 0,023	0,301 ± 0,016	0,320 ± 0,020
	B	0,586 ± 0,013	0,562 ± 0,016	0,564 ± 0,030	0,581 ± 0,015	0,583 ± 0,009	0,598 ± 0,030	0,604 ± 0,022
monometil-sukcinat^{S}	F	80,313 ± 9,810	67,541 ± 3,815	65,988 ± 2,865	64,828 ± 8,424	68,955 ± 4,334	77,135 ± 9,442	84,805 ± 15,232
	B	79,255 ± 5,567	64,129 ± 22,824	72,433 ± 6,606	77,722 ± 9,226	75,52 ± 8,122	78,802 ± 4,889	89,670 ± 11,040
monoetil-sukcinat^{S} (mg/L)	F	21,270 ± 0,949	20,430 ± 1,100	19,548 ± 0,563	19,144 ± 1,108	19,648 ± 0,659	19,010 ± 0,969	21,057 ± 1,940
	B	26,480 ± 1,042	25,299 ± 3,669	26,297 ± 0,867	26,812 ± 0,671	25,970 ± 1,376	25,848 ± 1,567	26,891 ± 1,449
etil-*p*-kumarat^{S} (mg/L)	F	0,445 ± 0,016	0,392 ± 0,033	0,400 ± 0,015	0,381 ± 0,007	0,358 ± 0,042	0,445 ± 0,055	0,315 ± 0,024
	B	0,489 ± 0,021	0,405 ± 0,021	0,415 ± 0,038	0,444 ± 0,022	0,406 ± 0,014	0,507 ± 0,037	0,334 ± 0,031
Ostali								
acetaldehid (mg/L)	F	43,040 ± 5,078		44,217 ± 6,122			42,947 ± 3,773	47,061 ± 7,424
	B	44,188 ± 1,931		48,921 ± 2,813			46,783 ± 4,191	49,489 ± 7,058

benzaldehid[S]	F	9,263 ± 5,279	6,864 ± 0,752	9,216 ± 5,236	8,750 ± 4,760	9,491 ± 6,531	9,025 ± 5,249	9,114 ± 4,462
	B	8,521 ± 4,913	9,051 ± 5,326	8,795 ± 5,423	9,050 ± 5,049	8,774 ± 5,112	8,330 ± 5,189	8,675 ± 5,157
metanol (mg/L)	F	48,308 ± 0,801		44,418 ± 6,222			44,631 ± 4,101	51,649 ± 1,570
	B	48,913 ± 2,624		52,158 ± 6,244			49,271 ± 6,320	47,119 ± 10,000
gvajakol[S]	F	0,951 ± 0,039	0,923 ± 0,144	0,974 ± 0,200	0,475 ± 0,418	1,345 ± 0,337	0,950 ± 0,130	0,701 ± 0,669
	B	0,942 ± 0,240	0,809 ± 0,173	1,239 ± 0,661	0,954 ± 0,230	0,974 ± 0,293	0,967 ± 0,118	0,960 ± 0,171
4-vinilgvajakol[S]	F	366,144 ± 19,667	398,459 ± 23,612	439,502 ± 74,611	393,622 ± 14,353	499,892 ± 24,797	433,065 ± 21,804	435,792 ± 30,534
	B	382,427 ± 26,602	332,417 ± 55,704	417,905 ± 112,885	451,898 ± 39,919	317,847 ± 53,984	324,534 ± 38,943	392,870 ± 8,173
acetoin[S]	F	29,514 ± 3,441	15,968 ± 0,519	24,282 ± 1,030	21,679 ± 1,861	22,765 ± 4,053	33,482 ± 2,317	29,856 ± 6,115
	B	28,764 ± 2,297	14,212 ± 5,933	24,624 ± 1,596	22,784 ± 1,693	22,557 ± 3,883	32,064 ± 2,017	31,460 ± 4,217
3-hidroksi-2-pentanon[S]	F	38,297 ± 2,726	32,254 ± 2,624	34,832 ± 4,183	36,701 ± 2,493	37,902 ± 4,433	43,728 ± 2,518	48,911 ± 10,479
	B	36,903 ± 2,166	30,626 ± 2,210	35,033 ± 3,437	36,880 ± 2,877	36,358 ± 3,001	42,481 ± 4,241	49,619 ± 7,680
γ-butirolakton[S]	F	191,042 ± 12,983	226,944 ± 5,856	215,531 ± 25,721	206,255 ± 9,556	217,167 ± 25,663	201,759 ± 18,195	185,990 ± 14,004
	B	232,534 ± 23,793	226,659 ± 58,372	234,584 ± 8,514	247,659 ± 23,295	255,379 ± 19,258	229,544 ± 18,430	200,729 ± 15,700
pantolakton[S]	F	45,073 ± 2,764	41,324 ± 1,814	46,794 ± 4,448	44,795 ± 3,264	44,405 ± 4,104	42,513 ± 2,259	46,818 ± 4,191
	B	46,878 ± 2,673	38,541 ± 13,813	45,903 ± 1,576	46,339 ± 1,552	45,090 ± 1,433	44,800 ± 0,704	44,780 ± 1,609
3-metiltio-propanol[S] (mg/L)	F	1,059 ± 0,051	1,025 ± 0,049	1,053 ± 0,043	1,018 ± 0,027	1,047 ± 0,019	1,106 ± 0,043	1,123 ± 0,172
	B	1,058 ± 0,062	0,969 ± 0,131	1,021 ± 0,035	1,024 ± 0,043	1,015 ± 0,028	1,057 ± 0,031	1,084 ± 0,140
triptofol[S] (mg/L)	F	0,746 ± 0,046	1,073 ± 0,169	1,068 ± 0,016	0,868 ± 0,074	0,976 ± 0,079	1,075 ± 0,074	1,152 ± 0,164
	B	0,922 ± 0,178	1,023 ± 0,160	0,837 ± 0,059	0,799 ± 0,044	0,793 ± 0,162	0,923 ± 0,142	0,981 ± 0,033

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

PRILOG 13. Koncentracije vezanih hlapljivih spojeva arome (µg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Vezani spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Monoterpeni						
β-pinen[S]	F	0,284 ± 0,021	0,274 ± 0,028	0,179 ± 0,026	0,188 ± 0,059	0,207 ± 0,056
	B	0,254 ± 0,021	0,267 ± 0,024	0,256 ± 0,024	0,248 ± 0,011	0,187 ± 0,020
trans-ocimen[S]	F	0,137 ± 0,000	0,198 ± 0,097	0,275 ± 0,152	0,288 ± 0,075	0,262 ± 0,107
	B	0,220 ± 0,023	0,231 ± 0,086	0,253 ± 0,081	0,291 ± 0,065	0,264 ± 0,017
trans-furan oksid linalola[S]	F	0,605 ± 0,030	0,661 ± 0,025	0,693 ± 0,128	0,617 ± 0,024	0,655 ± 0,074
	B	0,829 ± 0,015	0,808 ± 0,092	0,730 ± 0,049	0,848 ± 0,026	0,832 ± 0,029
cis-furan oksid linalola[S]	F	0,177 ± 0,017	0,286 ± 0,041	0,321 ± 0,041	0,226 ± 0,029	0,136 ± 0,023
	B	0,293 ± 0,023	0,217 ± 0,018	0,509 ± 0,114	0,225 ± 0,035	0,255 ± 0,152
linalol	F	28,295 ± 3,855	28,472 ± 1,798	30,706 ± 5,882	30,216 ± 3,165	27,384 ± 0,828
	B	4,456 ± 0,148	4,022 ± 0,532	4,062 ± 0,871	4,398 ± 0,568	3,763 ± 0,408
hotrienol[S]	F	0,309 ± 0,065	0,281 ± 0,063	0,339 ± 0,064	0,408 ± 0,032	0,313 ± 0,046
	B	0,361 ± 0,062	0,281 ± 0,092	0,284 ± 0,075	0,234 ± 0,055	0,344 ± 0,029
α-terpineol	F	2,413 ± 0,212	2,151 ± 0,041	2,464 ± 0,279	2,067 ± 0,729	3,366 ± 0,349
	B	2,243 ± 0,670	3,840 ± 1,396	3,939 ± 2,301	3,661 ± 2,010	2,248 ± 0,197
trans-piran oksid linalola[S]	F	1,584 ± 0,117	1,712 ± 0,305	1,813 ± 0,199	1,395 ± 0,291	1,557 ± 0,365
	B	2,373 ± 0,223	1,759 ± 0,237	1,606 ± 0,148	1,722 ± 0,111	1,662 ± 0,252
citronelol	F	6,539 ± 0,776	11,592 ± 0,197	15,467 ± 4,636	9,625 ± 1,768	14,889 ± 3,645
	B	7,018 ± 0,412	3,624 ± 0,269	7,314 ± 1,395	5,847 ± 3,678	5,944 ± 4,345
nerol	F	9,594 ± 1,811	11,653 ± 0,642	10,966 ± 0,680	11,941 ± 0,679	12,556 ± 1,05
	B	8,968 ± 0,836	8,715 ± 0,860	8,081 ± 1,064	8,920 ± 0,553	7,453 ± 0,957
geraniol	F	72,382 ± 4,078	79,283 ± 5,979	82,493 ± 14,418	83,458 ± 4,402	81,471 ± 9,345
	B	69,779 ± 4,959	59,674 ± 3,293	62,459 ± 7,024	65,809 ± 3,166	63,166 ± 3,351
C_{13}-norizoprenoid						

3-hidroksi-β-damaskon[S]	F	49,828 ± 4,200	51,439 ± 3,870	41,182 ± 5,597	43,360 ± 4,309	50,454 ± 2,972
	B	35,161 ± 1,039	29,705 ± 0,930	29,271 ± 5,503	31,591 ± 1,203	30,819 ± 3,388
Alkoholi						
1-heksanol	F	132,806 ± 46,054	133,754 ± 8,542	134,164 ± 1,494	140,294 ± 10,844	150,727 ± 20,248
	B	139,019 ± 7,005	171,573 ± 21,084	225,875 ± 14,786	115,231 ± 15,945	123,773 ± 2,653
trans-3-heksenol	F	0,642 ± 0,261	1,341 ± 0,364	1,388 ± 0,433	1,298 ± 0,398	1,438 ± 0,067
	B	1,860 ± 0,051	1,750 ± 0,247	1,626 ± 0,183	1,708 ± 0,241	1,886 ± 0,037
cis-3-heksenol	F	28,752 ± 0,620	29,049 ± 0,504	29,288 ± 2,000	28,940 ± 2,152	29,890 ± 1,936
	B	33,815 ± 1,308	31,226 ± 2,018	30,053 ± 2,856	30,988 ± 1,783	32,929 ± 1,783
1-okten-3-ol[S]	F	1,485 ± 0,006	1,617 ± 0,263	1,692 ± 0,171	1,590 ± 0,155	1,698 ± 0,036
	B	1,960 ± 0,115	3,098 ± 0,744	1,970 ± 0,619	6,486 ± 0,541	4,218 ± 0,578
benzil-alkohol[S]	F	68,698 ± 3,128	67,137 ± 5,468	70,107 ± 13,697	71,003 ± 5,339	80,233 ± 5,098
	B	92,505 ± 1,299	79,725 ± 7,127	78,609 ± 8,422	87,171 ± 7,335	81,085 ± 5,073
2-feniletanol	F	334,001 ± 27,598	371,412 ± 13,327	317,873 ± 29,623	355,377 ± 16,125	383,547 ± 19,594
	B	367,735 ± 19,913	286,615 ± 14,992	348,301 ± 40,614	334,583 ± 31,140	276,681 ± 37,221
Ostali						
benzaldehid	F	14,320 ± 0,170	13,428 ± 0,119	12,187 ± 0,168	13,846 ± 0,146	14,701 ± 1,144
	B	15,770 ± 0,514	10,562 ± 1,112	12,258 ± 1,752	13,815 ± 0,528	15,433 ± 0,968

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti spojeva slične kemijske strukture uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

PRILOG 14. Koncentracije vezanih hlapljivih spojeva arome (µg/L) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Vezani spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman						
		K16	BS16	BK16	BKS16	BKDEI16	T16	BKT16
Monoterpeni								
trans-furan oksid linalola^{S}	F	2,269 ± 0,211	2,732 ± 0,964	2,311 ± 0,192	2,373 ± 0,042	2,461 ± 0,143	2,388 ± 0,512	2,418 ± 0,096
	B	2,338 ± 0,119	2,344 ± 0,085	2,300 ± 0,128	2,429 ± 0,070	2,384 ± 0,154	2,547 ± 0,167	2,681 ± 0,152
cis-furan oksid linalola^{S}	F	0,767 ± 0,047	0,784 ± 0,040	0,797 ± 0,070	0,751 ± 0,042	0,849 ± 0,112	0,889 ± 0,066	0,874 ± 0,055
	B	0,842 ± 0,012	0,815 ± 0,053	0,760 ± 0,043	0,784 ± 0,031	0,845 ± 0,100	0,905 ± 0,022	1,040 ± 0,066
linalol	F	8,612 ± 0,692	7,571 ± 0,458	7,964 ± 1,398	8,306 ± 1,690	8,622 ± 1,109	7,928 ± 1,158	5,802 ± 2,357
	B	6,478 ± 0,294	6,269 ± 0,827	6,025 ± 0,491	6,161 ± 0,749	5,937 ± 0,184	4,781 ± 1,072	3,802 ± 1,640
hotrienol^{S}	F	1,850 ± 0,628	2,368 ± 0,103	2,245 ± 0,345	2,055 ± 0,675	2,341 ± 0,715	2,477 ± 0,420	2,432 ± 0,525
	B	1,814 ± 0,618	2,298 ± 0,422	2,352 ± 0,376	2,329 ± 0,609	2,225 ± 0,463	2,376 ± 0,077	2,274 ± 1,024
α-terpineol	F	1,351 ± 0,024	1,375 ± 0,041	1,395 ± 0,074	1,404 ± 0,062	1,490 ± 0,114	1,859 ± 0,286	2,075 ± 0,132
	B	1,330 ± 0,017	1,368 ± 0,066	1,327 ± 0,020	1,384 ± 0,040	1,356 ± 0,034	1,706 ± 0,167	2,024 ± 0,165
trans-piran oksid linalola^{S}	F	5,721 ± 0,425	5,577 ± 0,171	5,848 ± 0,389	5,874 ± 0,427	5,850 ± 0,118	6,094 ± 1,125	5,888 ± 0,159
	B	5,724 ± 0,492	5,523 ± 0,510	5,767 ± 0,123	6,040 ± 0,225	5,773 ± 0,256	5,913 ± 0,616	6,270 ± 0,662
citronelol	F	1,027 ± 0,037	0,955 ± 0,022	0,662 ± 0,580	1,066 ± 0,158	0,992 ± 0,094	1,180 ± 0,260	0,312 ± 0,541
	B	0,694 ± 0,601	0,991 ± 0,029	1,044 ± 0,178	0,318 ± 0,551	0,640 ± 0,555	0,301 ± 0,521	0,622 ± 0,539
nerol	F	7,447 ± 0,035	7,405 ± 0,153	7,688 ± 0,724	8,013 ± 0,528	7,413 ± 0,326	7,464 ± 0,448	7,742 ± 0,872
	B	7,612 ± 0,477	7,644 ± 0,531	7,524 ± 0,352	7,807 ± 0,456	7,317 ± 0,370	7,250 ± 0,306	7,868 ± 1,688
geraniol	F	43,486 ± 0,893	40,910 ± 0,854	45,476 ± 7,901	45,747 ± 5,414	45,473 ± 3,383	40,042 ± 2,335	43,351 ± 7,119
	B	41,761 ± 1,987	43,858 ± 4,122	43,132 ± 2,846	42,966 ± 0,896	43,564 ± 2,693	39,068 ± 1,773	39,937 ± 5,411
terpendiol I^{S}	F	1,684 ± 0,331	0,997 ± 0,091	1,334 ± 0,632	1,418 ± 0,680	1,580 ± 0,521	1,096 ± 0,267	0,937 ± 0,333
	B	1,436 ± 0,405	1,003 ± 0,272	1,321 ± 0,355	1,391 ± 0,628	1,192 ± 0,373	0,920 ± 0,057	1,819 ± 2,029
trans-8-hidroksi-linalol^{S}	F	29,597 ± 6,727	20,839 ± 1,090	29,551 ± 3,551	28,603 ± 6,868	26,446 ± 5,055	27,042 ± 8,397	24,57 ± 1,559
	B	21,403 ± 3,043	21,927 ± 8,474	26,669 ± 4,449	24,526 ± 1,479	20,908 ± 3,724	19,253 ± 4,664	31,374 ± 19,119
7-hidroksi-geraniol^{S}	F	21,916 ± 1,827	22,109 ± 2,028	23,226 ± 1,821	24,128 ± 1,579	23,779 ± 1,283	21,849 ± 3,742	22,965 ± 3,122

	B	19,401 ± 4,846	19,737 ± 6,681	23,475 ± 0,699	24,850 ± 1,756	22,747 ± 2,215	21,585 ± 3,126	41,953 ± 34,494
cis-8-hidroksi-linalol[S]	F	92,777 ± 10,225	91,964 ± 8,046	99,874 ± 9,730	101,670 ± 6,130	98,967 ± 5,348	91,859 ± 6,911	91,944 ± 19,181
	B	83,504 ± 17,083	81,706 ± 28,873	100,344 ± 1,326	101,932 ± 9,759	94,400 ± 8,338	82,179 ± 9,285	158,338 ± 134,585
trans-geranijska kiselina[S]	F	8,372 ± 1,529	7,877 ± 0,079	9,366 ± 1,870	9,139 ± 0,843	9,808 ± 1,309	8,691 ± 1,879	9,357 ± 1,793
	B	8,118 ± 0,654	8,579 ± 0,273	9,541 ± 0,535	9,265 ± 0,830	8,286 ± 1,323	7,979 ± 1,332	9,882 ± 3,252
C_{13}-norizoprenoidi								
β-damaskenon	F	0,144 ± 0,024	0,140 ± 0,022	0,102 ± 0,095	0,150 ± 0,041	0,156 ± 0,033	0,172 ± 0,019	0,172 ± 0,023
	B	0,119 ± 0,011	0,131 ± 0,025	0,132 ± 0,011	0,142 ± 0,011	0,107 ± 0,003	0,124 ± 0,014	0,074 ± 0,065
3-hidroksi-β-damaskon[S]	F	177,555 ± 8,056	157,921 ± 12,923	179,754 ± 39,343	178,457 ± 16,614	182,622 ± 31,488	183,228 ± 4,615	183,418 ± 45,728
	B	130,081 ± 10,274	128,769 ± 11,521	135,159 ± 14,887	145,364 ± 17,812	128,712 ± 16,502	130,389 ± 16,977	129,279 ± 29,681
3-okso-α-jonol[S]	F	59,229 ± 4,771	56,015 ± 3,827	62,705 ± 7,835	60,803 ± 3,882	63,056 ± 2,323	61,105 ± 12,388	58,098 ± 6,416
	B	59,096 ± 1,305	57,332 ± 3,798	60,956 ± 4,855	61,635 ± 6,039	59,168 ± 6,027	54,791 ± 8,243	58,876 ± 7,242
3-hidroksi-7,8-dihidro-β-jonol[S]	F	50,450 ± 3,568	49,101 ± 1,385	53,445 ± 4,926	53,466 ± 3,433	51,996 ± 2,099	51,136 ± 5,227	53,082 ± 4,948
	B	47,417 ± 5,020	45,005 ± 11,520	52,070 ± 2,550	52,523 ± 3,077	49,769 ± 3,323	48,445 ± 6,696	66,343 ± 25,015
vomifoliol[S]	F	20,284 ± 4,013	18,474 ± 2,172	25,323 ± 4,410	22,716 ± 8,836	19,969 ± 4,398	22,506 ± 2,616	18,844 ± 1,806
	B	17,073 ± 5,214	14,028 ± 7,096	20,814 ± 2,937	20,067 ± 3,554	19,275 ± 2,681	18,193 ± 1,645	47,682 ± 49,764
Alkoholi								
1-heksanol	F	88,109 ± 2,153	86,501 ± 0,512	86,977 ± 9,322	87,692 ± 3,571	89,633 ± 2,612	89,533 ± 5,729	90,305 ± 2,078
	B	86,353 ± 3,271	86,500 ± 1,855	87,485 ± 1,619	87,307 ± 2,979	86,345 ± 1,896	84,532 ± 2,084	86,448 ± 0,823
trans-3-heksenol[S]	F	1,157 ± 0,037	1,111 ± 0,102	1,098 ± 0,095	1,118 ± 0,037	1,134 ± 0,044	1,202 ± 0,091	1,134 ± 0,049
	B	1,180 ± 0,048	1,156 ± 0,088	1,164 ± 0,099	1,136 ± 0,038	1,184 ± 0,038	1,182 ± 0,053	1,099 ± 0,045
cis-3-heksenol[S]	F	13,289 ± 1,085	13,279 ± 0,256	13,463 ± 0,542	13,730 ± 0,421	14,337 ± 0,512	13,938 ± 0,83	14,816 ± 0,964
	B	12,806 ± 0,875	12,630 ± 1,037	13,168 ± 0,285	13,666 ± 0,419	13,871 ± 0,850	12,741 ± 0,237	14,306 ± 0,474
trans-2-heksenol[S]	F	15,182 ± 0,469	16,309 ± 0,151	16,374 ± 0,953	16,575 ± 0,628	16,931 ± 0,274	15,628 ± 0,625	17,464 ± 0,489
	B	15,267 ± 1,082	15,971 ± 1,041	16,880 ± 0,219	16,204 ± 0,066	16,748 ± 0,828	15,505 ± 1,47	16,805 ± 0,196
1-okten-3-ol[S]	F	2,491 ± 0,301	2,483 ± 0,260	2,597 ± 0,052	2,552 ± 0,101	2,606 ± 0,087	2,889 ± 0,277	2,619 ± 0,047
	B	2,530 ± 0,179	2,420 ± 0,257	2,510 ± 0,039	2,390 ± 0,224	2,317 ± 0,121	2,523 ± 0,223	2,751 ± 0,538
1-oktanol[S]	F	200,436 ± 309,774	19,881 ± 0,679	192,749 ± 302,518	178,832 ± 272,165	226,977 ± 355,732	191,798 ± 295,042	163,962 ± 252,751
	B	210,644 ± 323,883	188,657 ± 294,483	180,566 ± 280,862	172,444 ± 268,280	183,083 ± 284,111	199,649 ± 309,726	166,081 ± 255,691
2-feniletanol[S]	F	322,719 ± 4,602	262,358 ± 6,737	266,701 ± 12,631	284,727 ± 15,763	281,298 ± 1,077	318,079 ± 36,236	279,587 ± 13,060

	B	305,423 ± 32,625	260,852 ± 35,068	273,109 ± 8,350	289,711 ± 11,414	279,359 ± 2,481	309,064 ± 17,744	287,039 ± 22,08
Ostali								
benzaldehid[S]	F	5,087 ± 2,796	2,380 ± 1,004	2,582 ± 0,753	2,427 ± 1,238	2,805 ± 0,506	1,846 ± 0,899	2,824 ± 0,543
	B	3,124 ± 0,965	3,097 ± 0,998	2,313 ± 0,064	2,786 ± 0,455	3,292 ± 0,590	3,149 ± 0,259	4,395 ± 1,692
4-vinilgvajakol[S]	F	12,291 ± 2,942	14,024 ± 2,995	16,199 ± 6,155	17,463 ± 7,264	12,447 ± 2,988	14,828 ± 1,518	12,434 ± 2,138
	B	10,362 ± 2,642	9,555 ± 2,451	13,413 ± 2,204	11,245 ± 2,165	12,174 ± 2,587	10,130 ± 1,311	47,284 ± 59,711
triptofol[S]	F	10,091 ± 1,903	11,189 ± 0,712	13,790 ± 1,748	12,051 ± 1,906	12,329 ± 1,522	13,100 ± 2,446	14,397 ± 2,284
	B	10,624 ± 1,271	10,918 ± 4,750	12,641 ± 0,218	11,625 ± 0,751	11,494 ± 1,907	11,984 ± 2,610	15,008 ± 6,230

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti unutarnjeg standarda 1-heptanola uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

PRILOG 15. Koncentracije hlapljivih spojeva arome (µg/L, osim drugačije naznačenog) u vinima kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenim nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Hlapljivi spojevi arome	Uzorkovanje	Tretman						
		K17	BK17	BKTMP17	BKDUP17	MVN17	PUR17	PEN17
Monoterpeni								
β-pinen[S]	F	6,387 ± 0,322	4,587 ± 0,629	5,534 ± 0,095	5,336 ± 0,366	5,059 ± 0,561	5,187 ± 0,951	4,279 ± 0,885
	B	8,755 ± 1,134	7,935 ± 0,373	8,820 ± 0,011	7,436 ± 1,267	8,820 ± 0,440	6,660 ± 0,517	5,982 ± 0,555
D-limonen[S]	F	3,676 ± 0,854	2,696 ± 0,647	1,692 ± 1,506	2,105 ± 0,136	3,533 ± 1,122	3,066 ± 0,238	3,049 ± 1,307
	B	4,071 ± 1,016	5,590 ± 0,739	5,514 ± 0,165	4,081 ± 1,372	6,098 ± 0,226	4,153 ± 1,238	3,530 ± 0,733
3-karen[S]	F	0,572 ± 0,026	0,377 ± 0,018	0,362 ± 0,117	0,296 ± 0,006	0,360 ± 0,165	0,457 ± 0,046	0,408 ± 0,071
	B	0,712 ± 0,041	0,697 ± 0,044	0,724 ± 0,026	0,621 ± 0,078	0,782 ± 0,022	0,627 ± 0,032	0,576 ± 0,057
linalol	F	22,081 ± 2,392	28,445 ± 1,127	23,292 ± 1,208	23,612 ± 0,594	24,779 ± 1,157	26,734 ± 0,688	27,905 ± 0,676
	B	21,485 ± 0,815	24,310 ± 0,396	23,973 ± 0,133	24,141 ± 2,265	23,975 ± 1,367	23,704 ± 0,680	25,028 ± 1,727
α-terpineol	F	16,156 ± 0,605	14,123 ± 1,750	8,425 ± 1,172	9,313 ± 0,044	8,071 ± 3,027	11,259 ± 3,054	16,749 ± 4,581
	B	19,495 ± 0,830	20,753 ± 2,056	22,005 ± 0,177	17,023 ± 3,346	22,227 ± 1,576	18,194 ± 3,436	18,572 ± 2,637
citronelol	F	8,322 ± 1,056	9,956 ± 0,666	7,148 ± 0,599	6,296 ± 3,460	7,872 ± 0,548	9,017 ± 0,362	8,401 ± 1,032
	B	7,341 ± 1,366	8,375 ± 0,483	7,705 ± 0,456	7,060 ± 1,261	8,356 ± 0,429	7,481 ± 0,698	7,714 ± 0,662
nerol	F	8,527 ± 2,101	13,174 ± 0,638	7,834 ± 1,756	8,523 ± 0,788	9,034 ± 1,780	11,155 ± 0,476	30,394 ± 14,409
	B	7,091 ± 0,883	7,922 ± 1,124	8,354 ± 0,365	6,377 ± 1,335	8,273 ± 0,637	7,519 ± 1,233	6,205 ± 1,675
geraniol	F	7,119 ± 1,761	17,000 ± 4,062	5,253 ± 1,011	9,715 ± 0,757	7,276 ± 1,545	9,888 ± 5,503	5,980 ± 2,389
	B	8,961 ± 1,548	7,944 ± 2,687	7,642 ± 1,509	5,110 ± 1,137	7,339 ± 0,390	3,803 ± 0,836	3,525 ± 0,507
C_{13}-norizoprenoid								
β-damaskenon	F	1,693 ± 0,202	1,865 ± 0,166	1,654 ± 0,217	1,561 ± 0,084	1,699 ± 0,053	1,931 ± 0,253	1,926 ± 0,308
	B	1,048 ± 0,139	1,222 ± 0,094	1,246 ± 0,136	1,090 ± 0,206	1,320 ± 0,098	1,025 ± 0,096	1,158 ± 0,130
Viši alkoholi								
1-heksanol (mg/L)	F	1,388 ± 0,076	1,363 ± 0,037	1,135 ± 0,062	1,208 ± 0,021	1,203 ± 0,023	1,284 ± 0,094	1,312 ± 0,019
	B	1,399 ± 0,058	1,306 ± 0,070	1,207 ± 0,040	1,295 ± 0,077	1,218 ± 0,042	1,306 ± 0,090	1,183 ± 0,053
cis-3-heksenol	F	68,013 ± 12,415	67,025 ± 2,625	74,406 ± 8,949	75,041 ± 3,992	73,123 ± 2,266	76,708 ± 6,048	76,420 ± 2,883

	B	57,234 ± 6,721	72,686 ± 2,100	66,735 ± 3,786	65,376 ± 5,994	63,010 ± 0,930	59,407 ± 3,423	67,870 ± 6,248
2-feniletanol (mg/L)	F	25,845 ± 2,583	25,619 ± 0,783	23,039 ± 1,749	23,150 ± 0,427	23,854 ± 1,454	25,081 ± 0,502	25,720 ± 2,027
	B	24,806 ± 0,594	25,278 ± 0,733	26,616 ± 0,891	23,933 ± 2,474	27,329 ± 1,252	22,710 ± 2,322	26,084 ± 3,080
Masne kiseline								
butanska kiselina	F	89,963 ± 9,178	75,951 ± 5,726	76,166 ± 9,537	79,466 ± 4,536	70,324 ± 7,375	95,326 ± 9,682	84,949 ± 15,351
	B	85,119 ± 28,771	87,818 ± 19,050	86,196 ± 5,758	90,143 ± 22,599	82,278 ± 2,237	75,121 ± 16,986	82,650 ± 7,264
heksanska kiselina (mg/L)	F	5,675 ± 0,304	5,700 ± 0,110	5,704 ± 0,353	6,557 ± 0,443	5,213 ± 0,160	5,996 ± 0,312	5,845 ± 0,448
	B	5,331 ± 0,117	5,977 ± 0,322	6,139 ± 0,132	6,172 ± 0,411	5,716 ± 0,019	5,792 ± 0,316	5,852 ± 0,374
oktanska kiselina (mg/L)	F	7,888 ± 0,371	9,256 ± 0,360	9,551 ± 0,268	9,988 ± 0,830	8,573 ± 0,496	9,379 ± 0,429	9,588 ± 0,563
	B	8,000 ± 0,414	9,143 ± 0,563	10,789 ± 0,374	9,115 ± 0,480	10,421 ± 0,549	8,461 ± 0,580	9,300 ± 0,631
dekanska kiselina (mg/L)	F	4,084 ± 0,308	4,418 ± 0,410	5,414 ± 0,267	4,838 ± 0,374	4,386 ± 0,131	5,199 ± 0,382	4,983 ± 0,345
	B	4,617 ± 0,141	5,592 ± 0,534	6,422 ± 0,295	5,694 ± 0,453	6,474 ± 0,328	4,888 ± 0,708	5,660 ± 0,365
Etil-esteri								
etil-izobutanoat	F	2,545 ± 0,277	2,279 ± 0,010	2,102 ± 0,277	2,051 ± 0,428	2,501 ± 0,215	2,066 ± 0,155	2,257 ± 0,215
	B	2,867 ± 0,140	2,888 ± 0,182	1,954 ± 0,347	2,618 ± 0,052	2,837 ± 0,236	3,082 ± 0,576	2,376 ± 0,439
etil-butanoat (mg/L)	F	0,361 ± 0,044	0,380 ± 0,008	0,408 ± 0,022	0,422 ± 0,011	0,417 ± 0,017	0,414 ± 0,034	0,439 ± 0,005
	B	0,366 ± 0,053	0,372 ± 0,008	0,404 ± 0,013	0,428 ± 0,008	0,397 ± 0,005	0,417 ± 0,028	0,386 ± 0,024
etil-2-metilbutanoat	F	4,869 ± 2,370	4,278 ± 0,077	5,694 ± 1,637	4,112 ± 0,052	6,210 ± 1,407	4,078 ± 0,259	4,635 ± 1,023
	B	7,395 ± 2,038	6,707 ± 0,251	5,202 ± 0,145	5,525 ± 0,150	6,109 ± 0,598	6,116 ± 1,138	4,840 ± 0,170
etil-3-metilbutanoat	F	17,334 ± 3,508	14,641 ± 0,581	13,906 ± 2,512	12,168 ± 0,343	14,385 ± 0,731	15,097 ± 0,501	15,846 ± 1,430
	B	22,623 ± 2,067	20,680 ± 1,109	18,463 ± 0,765	18,296 ± 1,507	19,714 ± 0,830	21,616 ± 2,835	18,324 ± 1,494
etil-heksanoat (mg/L)	F	0,774 ± 0,086	0,819 ± 0,013	0,921 ± 0,049	0,801 ± 0,057	0,857 ± 0,092	0,913 ± 0,064	0,973 ± 0,030
	B	0,748 ± 0,106	0,824 ± 0,045	0,903 ± 0,080	0,810 ± 0,074	0,863 ± 0,061	0,762 ± 0,136	0,834 ± 0,125
etil-heptanoat[S]	F	31,079 ± 2,079	31,525 ± 0,068	29,576 ± 0,962	30,845 ± 0,284	30,742 ± 0,800	29,745 ± 1,698	30,954 ± 1,493
	B	30,480 ± 1,078	34,646 ± 0,308	32,171 ± 0,129	31,841 ± 3,837	32,332 ± 0,190	31,198 ± 0,483	32,851 ± 2,422
etil-oktanoat (mg/L)	F	0,541 ± 0,038	0,564 ± 0,021	0,677 ± 0,024	0,543 ± 0,037	0,666 ± 0,019	0,616 ± 0,029	0,642 ± 0,059
	B	0,535 ± 0,028	0,593 ± 0,095	0,732 ± 0,133	0,583 ± 0,128	0,742 ± 0,104	0,484 ± 0,038	0,577 ± 0,088
etil-nonanoat[S]	F	8,068 ± 4,146	6,187 ± 0,196	12,523 ± 2,849	10,656 ± 0,366	15,413 ± 0,399	11,857 ± 4,701	7,625 ± 2,070
	B	9,473 ± 5,353	6,387 ± 0,246	6,077 ± 0,249	8,098 ± 1,948	6,599 ± 0,153	6,509 ± 1,101	8,720 ± 3,407
etil-dekanoat (mg/L)	F	0,350 ± 0,064	0,321 ± 0,020	0,352 ± 0,006	0,311 ± 0,052	0,327 ± 0,023	0,290 ± 0,041	0,355 ± 0,087

	B	0,322 ± 0,032	0,387 ± 0,066	0,417 ± 0,050	0,352 ± 0,050	0,414 ± 0,039	0,356 ± 0,021	0,351 ± 0,076
Acetatni esteri								
izobutil-acetat	F	12,230 ± 1,813	10,948 ± 0,285	14,647 ± 1,596	14,599 ± 0,846	13,632 ± 0,846	13,471 ± 1,784	15,418 ± 1,424
	B	10,942 ± 2,250	10,356 ± 0,197	12,929 ± 0,158	13,431 ± 0,875	12,228 ± 0,909	12,222 ± 0,482	12,043 ± 1,707
izoamil-acetat (mg/L)	F	2,943 ± 0,509	3,173 ± 0,256	4,361 ± 0,064	4,083 ± 0,297	4,062 ± 0,218	3,737 ± 0,218	4,218 ± 0,386
	B	2,811 ± 0,521	3,376 ± 0,258	4,566 ± 0,059	3,888 ± 0,260	3,878 ± 0,298	3,673 ± 0,384	3,914 ± 0,454
heksil-acetat (mg/L)	F	0,190 ± 0,040	0,211 ± 0,023	0,295 ± 0,014	0,257 ± 0,016	0,274 ± 0,013	0,263 ± 0,023	0,294 ± 0,028
	B	0,210 ± 0,046	0,239 ± 0,033	0,320 ± 0,014	0,277 ± 0,036	0,289 ± 0,011	0,262 ± 0,020	0,290 ± 0,050
cis-4-heksenil-acetat[S] (mg/L)	F	0,058 ± 0,028	0,071 ± 0,011	0,116 ± 0,008	0,093 ± 0,014	0,100 ± 0,005	0,091 ± 0,011	0,117 ± 0,016
	B	0,061 ± 0,030	0,072 ± 0,015	0,119 ± 0,005	0,102 ± 0,014	0,099 ± 0,003	0,089 ± 0,006	0,105 ± 0,023
2-fenetil-acetat (mg/L)	F	2,623 ± 0,396	2,875 ± 0,332	4,148 ± 0,588	3,683 ± 0,241	3,859 ± 0,359	3,640 ± 0,201	4,448 ± 0,492
	B	2,198 ± 0,508	2,705 ± 0,429	4,562 ± 0,309	3,789 ± 0,335	4,029 ± 0,314	3,329 ± 0,243	4,129 ± 0,485
Ostali esteri								
izoamil-izobutanoat[S]	F	12,672 ± 2,595	14,300 ± 0,756	14,160 ± 3,126	14,408 ± 1,719	16,133 ± 0,677	13,231 ± 1,455	17,049 ± 1,381
	B	17,682 ± 1,482	19,474 ± 0,386	46,981 ± 27,192	17,956 ± 3,309	20,488 ± 3,930	20,478 ± 5,458	25,113 ± 18,892
dietil-sukcinat (mg/L)	F	0,570 ± 0,027	0,536 ± 0,036	0,371 ± 0,044	0,417 ± 0,027	0,459 ± 0,050	0,520 ± 0,018	0,455 ± 0,053
	B	0,757 ± 0,131	0,781 ± 0,023	0,678 ± 0,038	0,642 ± 0,131	0,854 ± 0,041	0,753 ± 0,068	0,724 ± 0,066
Hlapljivi fenoli								
4-vinilgvajakol[S]	F	23,814 ± 8,809	29,853 ± 1,902	29,353 ± 3,503	34,053 ± 2,247	32,739 ± 4,009	36,299 ± 2,828	34,688 ± 8,130
	B	15,356 ± 1,068	23,599 ± 2,586	31,254 ± 2,420	29,354 ± 9,712	33,382 ± 3,136	25,738 ± 5,207	28,746 ± 6,771
4-vinilfenol[S]	F	1,111 ± 0,267	1,788 ± 0,413	1,234 ± 0,114	1,438 ± 0,118	1,323 ± 0,136	1,631 ± 0,084	1,468 ± 0,243
	B	0,745 ± 0,161	0,983 ± 0,126	1,308 ± 0,080	1,251 ± 0,300	1,404 ± 0,125	1,075 ± 0,186	1,123 ± 0,245

[S] Semikvantitativno određivanje koncentracija, koncentracije su izražene kao ekvivalenti spojeva slične kemijske strukture uz pretpostavku da relativni faktor odziva iznosi 1.

PRILOG 16. Rezultati kvantitativne deskriptivne senzorske analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Svojstva mirisa						
cvjetni	F	6,4 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,4	7,6 ± 0,3	7,6 ± 0,1
	B	5,7 ± 0,1	6,8 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,2 ± 0,1	7,0 ± 0,1
voćni	F	6,3 ± 0,1	7,1 ± 0,3	7,1 ± 0,3	7,3 ± 0,2	7,2 ± 0,2
	B	5,1 ± 0,1	6,2 ± 0,1	7,0 ± 0,2	6,6 ± 0,3	6,6 ± 0,1
biljni	F	2,6 ± 0,6	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
	B	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,4	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,4
začinski / aromatično bilje	F	2,8 ± 0,2	3,0 ± 0,5	3,2 ± 0,4	2,7 ± 0,5	3,1 ± 0,3
	B	1,8 ± 0,4	2,3 ± 0,5	2,8 ± 0,2	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,4
sovinjonski	F	2,7 ± 0,3	3,4 ± 0,2	3,5 ± 0,3	3,8 ± 0,3	3,6 ± 0,2
	B	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,6	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,4	3,2 ± 0,3
muškatni	F	2,8 ± 0,5	3,4 ± 0,3	3,6 ± 0,3	3,5 ± 0,3	3,4 ± 0,4
	B	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,6	3,4 ± 0,0	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,2
med	F	3,0 ± 0,6	3,7 ± 0,2	4,1 ± 0,4	3,9 ± 0,4	3,9 ± 0,4
	B	2,6 ± 0,4	3,1 ± 0,9	3,8 ± 0,3	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,2
vosak	F	2,5 ± 0,1	2,9 ± 0,4	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,6
	B	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,6	2,8 ± 0,4	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2
Svojstva okusa						
svježina	F	6,5 ± 0,1	6,6 ± 0,1	6,6 ± 0,1	6,6 ± 0,2	6,6 ± 0,0
	B	6,2 ± 0,3	6,5 ± 0,3	6,4 ± 0,3	6,5 ± 0,2	6,5 ± 0,1
kiselost	F	6,2 ± 0,0	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,1	5,2 ± 0,2	5,5 ± 0,1
	B	6,3 ± 0,1	5,5 ± 0,2	5,4 ± 0,0	5,5 ± 0,1	5,4 ± 0,3
tijelo / punoća	F	7,2 ± 0,2	7,9 ± 0,2	8,0 ± 0,2	8,2 ± 0,3	8,1 ± 0,2
	B	6,5 ± 0,2	7,5 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,6 ± 0,2	7,5 ± 0,3

slatkoća	F	4,1 ± 0,1	5,6 ± 0,2	5,3 ± 0,2	5,6 ± 0,4	5,5 ± 0,2
	B	3,9 ± 0,0	5,0 ± 0,1	5,4 ± 0,0	5,3 ± 0,2	5,3 ± 0,3
viskozitet	F	7,0 ± 0,0	7,8 ± 0,2	7,8 ± 0,1	8,0 ± 0,2	7,8 ± 0,3
	B	6,4 ± 0,2	7,4 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,5 ± 0,2	7,3 ± 0,3
gorčina	F	3,9 ± 0,0	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,1
	B	3,8 ± 0,3	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,4	3,3 ± 0,1
astringentnost	F	3,8 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1
	B	3,6 ± 0,3	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,4 ± 0,1

PRILOG 17. Rezultati kvantitativne deskriptivne senzorske analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman						
		K16	BS16	BK16	BKS16	BKDEI16	T16	BKT16
Svojstva mirisa								
cvjetni	F	6,9 ± 0,2	6,7 ± 0,1	7,2 ± 0,1	7,4 ± 0,4	7,4 ± 0,4	7,5 ± 0,1	7,4 ± 0,3
	B	6,6 ± 0,6	6,7 ± 0,2	7,2 ± 0,3	6,8 ± 0,2	7,0 ± 0,2	6,3 ± 0,2	6,9 ± 0,1
voćni	F	6,4 ± 0,1	6,8 ± 0,4	6,9 ± 0,1	7,5 ± 0,2	7,8 ± 0,4	7,5 ± 0,2	7,3 ± 0,4
	B	6,5 ± 0,4	6,7 ± 0,6	7,0 ± 0,5	6,7 ± 0,3	6,8 ± 0,1	6,4 ± 0,7	6,8 ± 0,2
biljni	F	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,4	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,3	2,5 ± 0,3	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,4
	B	2,2 ± 0,5	2,0 ± 0,3	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,6	1,9 ± 0,7	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,3
začinski / aromatično bilje	F	1,5 ± 0,2	2,1 ± 0,6	1,7 ± 0,5	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,4	2,7 ± 0,6	2,4 ± 0,5
	B	1,8 ± 0,5	2,7 ± 0,5	2,2 ± 0,4	2,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,5	2,7 ± 0,5
sovinjonski	F	3,2 ± 0,2	4,1 ± 0,6	3,5 ± 0,3	4,0 ± 0,4	4,8 ± 1,4	4,5 ± 1,1	3,9 ± 0,5
	B	3,1 ± 0,5	4,0 ± 0,1	3,4 ± 0,3	3,3 ± 0,4	3,4 ± 0,0	2,9 ± 0,3	3,4 ± 0,6
muškatni	F	3,5 ± 0,1	3,9 ± 0,3	3,6 ± 0,5	3,9 ± 0,3	4,0 ± 0,5	4,2 ± 0,5	3,7 ± 0,3
	B	3,5 ± 0,2	3,5 ± 0,3	3,6 ± 0,4	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,2	3,1 ± 0,1	3,5 ± 0,2
med	F	1,5 ± 0,7	2,3 ± 0,7	2,1 ± 0,7	3,0 ± 0,1	2,7 ± 0,4	3,3 ± 0,5	3,1 ± 0,2
	B	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,5	2,8 ± 0,5	2,4 ± 0,5	2,2 ± 0,2	1,8 ± 0,8	2,2 ± 0,1
vosak	F	2,3 ± 0,4	2,5 ± 0,5	2,8 ± 0,7	3,3 ± 0,8	2,9 ± 1,1	3,5 ± 0,5	2,8 ± 0,8
	B	1,8 ± 0,8	1,8 ± 1,1	2,5 ± 0,8	1,7 ± 0,5	2,3 ± 0,5	1,6 ± 0,6	1,7 ± 0,7
Svojstva okusa								
svježina	F	7,3 ± 0,2	7,4 ± 0,4	7,4 ± 0,2	7,5 ± 0,3	8,0 ± 0,7	7,7 ± 0,4	7,7 ± 0,2
	B	7,1 ± 0,3	7,4 ± 0,2	7,0 ± 0,1	6,9 ± 0,2	7,3 ± 0,0	6,8 ± 0,4	7,3 ± 0,2
kiselost	F	5,9 ± 0,3	5,8 ± 0,3	5,8 ± 0,4	5,8 ± 0,5	6,4 ± 0,3	6,0 ± 0,5	5,9 ± 0,2
	B	5,5 ± 0,3	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,3	5,5 ± 0,3	5,8 ± 0,3	5,7 ± 0,5	5,9 ± 0,2
tijelo / punoća	F	7,8 ± 0,2	7,8 ± 0,2	8,2 ± 0,4	8,4 ± 0,4	8,3 ± 0,4	8,5 ± 0,1	8,1 ± 0,2
	B	7,7 ± 0,2	7,9 ± 0,4	8,1 ± 0,2	8,1 ± 0,3	8,3 ± 0,1	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,4

slatkoća	F	6,5 ± 0,5	6,3 ± 0,4	6,5 ± 0,4	7,1 ± 0,5	7,0 ± 0,5	7,1 ± 0,5	6,7 ± 0,1
	B	6,5 ± 0,2	6,4 ± 0,2	6,8 ± 0,2	6,6 ± 0,4	6,7 ± 0,3	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1
viskozitet	F	7,3 ± 0,2	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,4	7,9 ± 0,2	7,9 ± 0,4	7,9 ± 0,4	7,7 ± 0,4
	B	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,2	7,7 ± 0,3	7,8 ± 0,2	8,1 ± 0,1	7,8 ± 0,3	7,5 ± 0,2
gorčina	F	3,2 ± 0,0	3,2 ± 0,4	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,3	3,4 ± 0,3	4,0 ± 0,3	3,5 ± 0,2
	B	3,4 ± 0,1	3,6 ± 0,4	3,4 ± 0,1	3,2 ± 0,2	3,5 ± 0,3	3,5 ± 0,4	3,4 ± 0,2
astringentnost	F	2,8 ± 0,3	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,3	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,4	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,2
	B	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,0	2,7 ± 0,3	2,5 ± 0,2	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,0	2,7 ± 0,1

PRILOG 18. Rezultati kvantitativne deskriptivne senzorske analize vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Senzorsko svojstvo	Uzorkovanje	Tretman						
		K17	BK17	BKTMP17	BKDUP17	MVN17	PUR17	PEN17
Svojstva mirisa								
cvjetni	F	5,5 ± 0,1	6,5 ± 0,1	6,7 ± 0,3	6,3 ± 0,1	7 ± 0,5	6,3 ± 0,3	6,3 ± 0,1
	B	5,1 ± 0,1	5,8 ± 0,1	6,0 ± 0,3	5,3 ± 0,2	6,8 ± 0,1	5,7 ± 0,3	6,2 ± 0,2
voćni	F	5,8 ± 0,2	6,7 ± 0,2	6,9 ± 0,2	6,8 ± 0,3	7,7 ± 0,5	6,8 ± 0,2	7,1 ± 0,1
	B	6,0 ± 0,1	6,3 ± 0,2	6,2 ± 0,4	5,8 ± 0,2	7,4 ± 0,1	5,9 ± 0,1	6,8 ± 0,1
biljni	F	1,9 ± 0,3	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,6	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,4 ± 0,2
	B	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,4	1,7 ± 0,1	2,5 ± 0,2	1,8 ± 0,4	2,5 ± 0,1
začinski / aromatično bilje	F	1,2 ± 0,3	2,1 ± 0,5	2,0 ± 0,5	2,3 ± 0,0	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,4	2,8 ± 0,3
	B	1,3 ± 0,7	2,0 ± 0,5	1,9 ± 0,3	2,0 ± 0,5	2,8 ± 0,4	2,1 ± 0,4	2,7 ± 0,1
sovinjonski	F	2,8 ± 0,1	3,4 ± 0,4	3,6 ± 0,2	3,3 ± 0,3	4,5 ± 0,8	3,4 ± 0,3	3,8 ± 0,1
	B	2,7 ± 0,2	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	3,8 ± 0,3	2,7 ± 0,4	3,4 ± 0,2
muškatni	F	3,0 ± 0,1	3,4 ± 0,3	3,9 ± 0,1	3,6 ± 0,2	4,0 ± 0,3	3,6 ± 0,1	3,7 ± 0,1
	B	3,2 ± 0,2	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,3	3,0 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,9 ± 0,1
med	F	1,7 ± 0,3	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,7	3,3 ± 0,4	4,2 ± 0,5	2,8 ± 0,5	3,3 ± 0,1
	B	1,5 ± 0,4	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3	3,0 ± 0,2	1,8 ± 0,2	3,1 ± 0,1
vosak	F	0,9 ± 0,3	2,1 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,5	1,9 ± 0,3	2,3 ± 0,3
	B	0,4 ± 0,5	0,8 ± 0,8	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,9 ± 0,2	0,5 ± 0,5	2,0 ± 0,1
Svojstva okusa								
svježina	F	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,1	7,1 ± 0,3	7,0 ± 0,1	7,5 ± 0,2	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0,1
	B	6,6 ± 0,2	7,0 ± 0,1	6,6 ± 0,1	6,9 ± 0,1	7,3 ± 0,1	6,7 ± 0,2	7,0 ± 0,1
kiselost	F	5,3 ± 0,2	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,2	5,2 ± 0,1	5,4 ± 0,3	5,4 ± 0,1	5,3 ± 0,1
	B	5,5 ± 0,4	6,0 ± 0,3	5,2 ± 0,5	5,1 ± 0,5	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,5	5,4 ± 0,1
tijelo / punoća	F	6,4 ± 0,1	6,9 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,2 ± 0,4	8,0 ± 0,3	7,0 ± 0,1	7,5 ± 0,1
	B	6,1 ± 0,2	6,3 ± 0,3	6,2 ± 0,3	6,2 ± 0,1	7,5 ± 0,3	5,9 ± 0,1	6,6 ± 0,1

slatkoća	F	5,1 ± 0,1	5,6 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,4	6,3 ± 0,4	5,5 ± 0,3	5,9 ± 0,1
	B	5,1 ± 0,2	5,0 ± 0,3	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,2	6,0 ± 0,0	5,4 ± 0,3	5,4 ± 0,1
viskozitet	F	6,2 ± 0,1	6,6 ± 0,3	6,9 ± 0,3	6,5 ± 0,2	7,3 ± 0,5	6,7 ± 0,3	7,0 ± 0,2
	B	5,9 ± 0,3	5,8 ± 0,2	6,0 ± 0,1	5,7 ± 0,1	6,8 ± 0,1	5,6 ± 0,2	6,4 ± 0,2
gorčina	F	2,4 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1
	B	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1
astringentnost	F	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1
	B	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1

PRILOG 19. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2015. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u različitim fazama fermentacije (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

	Uzorkovanje	Tretman				
		K15	BGS15	BP15	BS15	BK15
Bodovi	F	81,2 ± 0,0	84,3 ± 0,3	84,9 ± 1,1	85,7 ± 0,9	85,6 ± 0,7
	B	79,5 ± 1,8	82,3 ± 0,5	84,8 ± 0,3	83,6 ± 0,4	83,3 ± 0,1

PRILOG 20. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2016. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

	Uzorkovanje	Tretman						
		K16	BS16	BK16	BKS16	BKDEI16	T16	BKT16
Bodovi	F	83,0 ± 0,2	84,9 ± 0,4	86,1 ± 0,6	87,5 ± 1,5	88,2 ± 2,6	88,9 ± 0,7	87,3 ± 0,6
	B	83,6 ± 0,5	84,2 ± 0,7	85,6 ± 0,8	84,8 ± 0,5	86,0 ± 0,2	83,3 ± 1,6	85,0 ± 0,5

PRILOG 21. Rezultati senzorske analize (metoda 100 bodova) vina kultivara malvazija istarska iz berbe 2017. godine dobivenih nakon djelomičnog bistrenja bentonitom u fermentaciji (F) i postizanja proteinske stabilnosti dodatnim bistrenjem nakon fermentacije (B) (prosječna vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

	Uzorkovanje	Tretman						
		K17	BK17	BKTMP17	BKDUP17	MVN17	PUR17	PEN17
Bodovi	F	80,9 ± 0,5	84,9 ± 0,3	85,9 ± 0,3	85,6 ± 0,7	89,1 ± 2,0	84,8 ± 0,7	86,2 ± 0,4
	B	81,3 ± 0,4	82,9 ± 0,1	82,7 ± 0,8	81,7 ± 0,4	87,2 ± 0,4	81,8 ± 0,5	85,3 ± 0,7

ŽIVOTOPIS

Ivana Horvat rođena je 24. studenoga 1986. godine u Koprivnici gdje je završila osnovnu školu i opću gimnaziju. Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završila je preddiplomski studij biotehnologije i diplomski studij bioprocesnog inženjerstva, nakon čega je neko vrijeme radila izvan struke, kao učiteljica i nastavnica u nekoliko škola, te pohađala Pedagoško-psihološku i metodičko-didaktičku izobrazbu. Tijekom 2015. i 2016. godine stručno se osposobljavala na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču sudjelujući na aktivnostima projekta „Razjašnjavanje sortne tipičnosti vina i maslinovih ulja od hrvatskih domaćih sorti" (TYPICRO), voditelja i mentora dr. sc. Igora Lukića. Od rujna 2016. asistentica je na Zavodu za poljoprivredu i prehranu Instituta za poljoprivredu i turizam što je omogućeno putem projekta Hrvatske zaklade za znanost „Projekt razvoja karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti". U veljači 2017. upisala je sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu i u sklopu projekta TYPICRO provela istraživanje za doktorski rad. Koautorica je 7 a1 radova (4 Q1) i 2 a3 rada te 17 sažetaka objavljenih u zbornicama s kongresa. Usavršavala se u području instrumentalnih analiza (tekućinska i plinska kromatografija) na seminarima i radionicama (Phenomenex seminari, predavanja i radionica u BIOCentru, Waters Users' Meeting), 3 tjedna u Jedinici za metabolomiku pri Fondazione Edmund Mach (S. Michele all'Adige, Italija) i 3 mjeseca u Zavodu za kemiju pariške École Normale Supérieure (Pariz, Francuska). Sudjelovala je na 6 međunarodnih znanstvenih konferencija u Hrvatskoj (Simpozij agronoma 2017., 2018. i 2019., PBN kongres 2018.) i inozemstvu (XXIX International Conference on Polyphenols and 9th Tannin Conference 2018., Madison, Wisconsin, SAD; OENO/IVAS 2019., Bordeaux, Francuska).

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Radovi u časopisima

Lukić, I., **Horvat, I.** (2017) Differentiation of Commercial PDO Wines Produced in Istria (Croatia) According to Variety and Harvest Year Based on HS-SPME-GC/MS Volatile Aroma Compounds Profiling. *Food Technol. Biotech.* **55**, 95-108. doi: 10.17113/ftb.55.01.17.4861

Lukić, I., **Horvat, I.**, Godena, S., Krapac, M., Lukić, M., Vrhovsek, U., Brkić Bubola, K. (2018) Towards understanding the varietal typicity of virgin olive oil by correlating sensory and compositional analysis data: a case study. *Food Res. Int.* **112**, 78-89. doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.022

Lukić, I., Krapac, M., **Horvat, I.**, Godena, S., Kosić, U., Brkić Bubola, K. (2018) Three-factor approach for balancing the concentrations of phenols and volatiles in virgin olive oil from a late-ripening olive cultivar. *LWT – Food Sci. Technol.* **87**, 194-202. doi: 10.1016/j.lwt.2017.08.082

Horvat, I., Radeka, S., Plavša, T., Lukić, I. (2019) Bentonite fining during fermentation reduces the dosage required and exhibits significant side-effects on phenols, free and bound aromas, and sensory quality of white wine. *Food Chem.* **285**, 305-315. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.172

Lukić, I., Carlin, S., **Horvat, I.**, Vrhovsek, U. (2019) Combined targeted and untargeted profiling of volatile aroma compounds with comprehensive two-dimensional gas chromatography for differentiation of virgin olive oils according to variety and geographical origin. *Food Chem.* **270**, 403-414. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.133

Lukić, I., **Horvat, I.**, Radeka, S., Damijanić, K., Staver, M. (2019) Effect of different levels of skin disruption and contact with oxygen during grape processing on phenols, volatile aromas, and sensory caracteristics of white wine. *J. Food Process. Pres.* **43**, e13969, 12. doi: 10.1111/jfpp.13969

Bažon, I., Lukić, I., Ban, D., **Horvat, I.**, Prekalj, B., Goreta Ban, S. (2020) Impact of harvest date on the content of volatile components in garlic. *J. Cent. Eur. Agric.* **21**, 333-337. doi: 10.5513/JCEA01/21.2.2728

Radovi u zbornicima radova sa skupova

Novoselić, A., Klisović, D., Lukić, I., **Horvat, I.**, Brkić Bubola, K. (2020) The strategies for antioxidant enrichment of Buža cv. virgin olive oil. *Proceedings of the 55th Croatian and 15th International Symposium on Agriculture*, Vodice, str. 533-537.

Rossi, S., Radeka, S., Bubola, M., Plavša, T., **Horvat, I.**, Lukić, I., Jagatić Korenika, A.-M. (2020) Influence of different vinification techniques on stilbenes and total polyphenolic content in Teran wines. *Proceedings of the 55th Croatian and 15th International Symposium on Agriculture*, Vodice, str. 496-500.