

Utjecaj sumporenja na kvalitetu vina

Shahini, Fiona

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:828074>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

Fiona Shahini
7872/BT

UTJECAJ SUMPORENJA NA KVALITETU VINA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnološki aspekti proizvodnje vina

Mentor: prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj sumporenja na kvalitetu vina

Fiona Shahini, 0114030705

Sažetak:

Sumpor je u modernom vinarstvu nezaobilazan, no potrebno je znati kako, kada, zašto i u kolikoj ga mjeri treba koristiti. U proizvodnji vina sumporni dioksid ima višestruku ulogu: sprječava oksidaciju (posmeđivanje) mošta i vina, djeluje antiseptički (uklanja neželjenu mikrofloru iz vina), ubrzava bistrenje mošta i vina taloženjem različitih nečistoća koje utječu na kvalitetu. Kvasci tijekom fermentacije prirodno proizvode male količine sumpornog dioksida, pa ga tako da u manjim koncentracijama sadrže sva vina. Praksa dodavanja sumpornog dioksida tijekom procesa proizvodnje za stabilizaciju ili čuvanje vina seže daleko u prošlost. Manji dio dodanog sumpornog dioksida ostaje slobodan u vinu tj. aktivan, a veći dio se veže na određene sastojke mošta, tj. vina. Koncentracije sumpornog dioksida su obično veće u bijelim i roze vinima, a puno su veće u slatkim nego u crnim ili narančastim vinima koja prirodnu antioksidacijsku zaštitu dobivaju od tanina. Proizvodnja vina bez dodanog sumpornog dioksida prepuna je izazova, a ona su podložnija greškama, varijacijama u boci i prijevremenom starenju. Korištenje sumpornog dioksida zakonski je propisano u svakoj zemlji, što olakšava proizvodnju vina i omogućuje da na tržište dođe vino bez mana i bolesti.

Ključne riječi: sumporenje, sumporni dioksid, sumporni spojevi, vino

Rad sadrži: 36 stranica, 2 slike, 4 tablice, 88 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan

Datum obrane: 18. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing
Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Influence of sulphurization on the wine quality

Fiona Shahini, 0114030705

Abstract:

Sulphur is indispensable in modern winemaking, but it is necessary to know how, when, why and to what extent it should be used. In wine production, sulphur dioxide has multiple roles: it prevents oxidation (browning) of must and wine, acts as an antiseptic (removes unwanted microflora from wine), accelerates clarification of must and wine by precipitation of various impurities that affect quality. Yeasts naturally produce small amounts of sulphur dioxide during fermentation, so each wine contains it in smaller concentrations. The practice of adding sulphur dioxide during the production process to stabilize or preserve wine goes back into the past. A smaller part of the added sulphur dioxide remains free in the wine, i.e. active, and a larger part is bound to certain components of the must and wine. Sulphur concentrations are usually higher in white and rosé wines, and much higher in sweet than in black or orange wines, which receive natural antioxidant protection from tannins. The production of wines without added sulphur is full of challenges, and they are more susceptible to errors, variations in the bottle and premature aging. The use of sulfur dioxide is legally prescribed in every country, which facilitates the production of wine and allows the wine to reach the market without defects and diseases.

Keywords: sulfurization, sulphur dioxide, sulphur compounds, wine

Thesis contains: 36 pages, 2 figures, 4 tables, 88 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Vesna Zechner-Krpan, Full Professor

Thesis defended: July 18th 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. SUMPORNI DIOKSID U VINARSTVU - PRIMJENA I ULOGA	2
2.1. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE	2
2.2. ANTIMIKROBNO I ANTISEPTIČKO DJELOVANJE	3
3. PROIZVODNJA SUMPORNOG DIOKSIDA TIJEKOM ALKOHOLNE FERMENTACIJE	4
4. NAČIN I VRIJEME DODAVANJA SUMPORNOG DIOKSIDA	5
5. OBLICI SUMPORNOG DIOKSIDA U VINU I NJIHOVE FUNKCIJE	8
6. ULOGA SUMPORNIH SPOJEVA U VINU	9
6.1. NEPOŽELJNI SUMPORNI SPOJEVI	10
6.2. UTJECAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA NA KONCENTRACIJU NEPOŽELJNIH SUMPORNIH SPOJEVA	11
6.3. POŽELJNI SUMPORNI SPOJEVI.....	13
6.4. UTJECAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA NA KONCENTRACIJU POŽELJNIH SUMPORNIH SPOJEVA	15
7. METODE ZA ANALIZU SUMPORNIH SPOJEVA	17
7.1. TEHNIKE UZORKOVANJA I KONCENTRIRANJA.....	17
7.2. PLINSKA KROMATOGRAFIJA.....	19
7.3. MASENI SPEKTROMETAR	19
8. SMANJENJE KONCENTRACIJE SO ₂ I ALTERNATIVE SUMPORENJU.....	20
8.1. TERMIČKI PROCESI	20
8.2. NETERMIČKI PROCESI.....	21
8.3. KEMIJSKE TVARI.....	22

8.4. BAKTERIOCINI I <i>KILLER</i> TOKSINI	23
8.5. PRIRODNI BILJNI EKSTRAKTI	23
9. ZAKLJUČCI.....	25
10. LITERATURA.....	26

1. Uvod

Sumpor su u vinarstvu koristili i stari Rimljani o čemu svjedoče brojne analize u kojima su nađeni tragovi sumpora u amforama. U srednjem vijeku upotreba sumpornog dioksida bila je zabranjena. Tek u 18. stoljeću počeo se primjenjivati za mlada vina, ali se smatralo da je njegova upotreba štetna za stara vina. Danas, kad je poznata njegova vrijednost i način njegovog djelovanja i vezanja u moštu i vinu, mora ga se umjereno upotrebljavati tijekom prerade grožđa, fermentacije i njege vina, kako bi se proizvelo zdravo vino. Koliko će se sumpornog dioksida koristiti ovisi o više faktora - zdravstvenom stanju i zrelosti grožđa, temperaturi grožđa i mošta, vremenskim prilikama tijekom ljeta i jeseni, ali i tijekom berbe.

Sumporni dioksid ubrzava taloženje različitih nečistoća (čestice zemlje, plijesni, ostaci sredstava za prskanje itd.) koje nepovoljno utječu na kvalitetu vina. Također se s njegovom upotrebom postiže selekcija kvasaca, pa tijekom proizvodnje vina preživljavaju otporniji sojevi kvasaca, koji dovode vrenje do kraja. Antimikrobna aktivnost sumpornog dioksida očituje se u onemogućavanju razvoj pojedinih mikroorganizama (bakterija i divljih kvasaca) koji se nalaze na bobicama grožđa, a nakon procesa muljanja i tiještenja dospijevaju u mošt gdje se lako razmnožavaju. Antioksidacijsko djelovanje sumpornog dioksida očituje se u njegovom vezanju na fenolne spojeve (boje i tanin) i sprječavanje njihove oksidacije. Vezanje sumpornog dioksida različito je i s obzirom na temperaturu mošta odnosno vina, a ovisi i o količini ukupnih kiselina, pH vrijednosti i stupnju oksidacije. Jačina sumporenja ovisi o osobinama i vrsti vina, količini alkohola, ukupnih kiselina i sklonosti vina posmeđivanju. Sumporenjem odgađamo vrenje mošta s ciljem temeljitog taloženja, nakon čega se u roku od 24 - 48 sati dodaje kvasac. Sumporni dioksid utječe i na koagulaciju (zgrušavanje) proteina pri taloženju mošta, a samim time se i vino brže i lakše bistri.

Utjecaj sumpornog dioksida na zdravlje ljudi dobro je istražen, a rezultati dokazuju da njegova upotreba u vinarstvu u Zakonom i Pravilnikom određenim propisanim koncentracijama ne treba brinuti. Za najbolju aromu i buke vina bitno je izbjeći zakašnjela sumporenja kada već započnu oksidacijski procesi, jer se tada može povećati količina acetaldehida koji veže sumporni dioksid i smanjuje mu djelovanje, a vinu daje loš, ustajali okus. Sumporni dioksid je enološko sredstvo za koje i pored svih unapređenja proizvodnje vina, još uvijek nije pronađena adekvatna zamjena, već su sva ta unapređenja imala utjecaj na smanjenje njegove koncentracije u cilju smanjenja njegovog nepoželjnog učinka na kvalitetu vina.

2. Sumporni dioksid u vinarstvu - primjena i uloga

Sumporenje je do današnjeg dana zbog brojnih funkcija nezamjenjivi postupak u vinarstvu te se sustavno koristi u proizvodnji vina od 19. stoljeća (Giacosa i sur., 2019). Kako bi se proizvelo zdravo vino, nužna je upotreba određene količine sumpornog dioksida pri preradi grožđa, fermentaciji i njezi vina. Količina SO₂ koju je potrebno koristiti ovisi o više čimbenika, kao što su zdravstveno stanje grožđa, temperatura grožđa i mošta, vremenske prilike, kiselost mošta te način miješanja nakon dodavanja (Schubert, 1996). Glavna svojstva sumpornog dioksida te razlozi njegova korištenja u moštu i vinu su sprječavanje aktivnosti oksidacijskih enzima, prvenstveno polifenoloksidaza, zatim vezanje na kemijske spojeve kao što su šećeri, antocijani, ketoglutarat, piruvat i acetaldehid, sprječavanje promjene boje vina, tj. posmeđivanja te sprječavanje rasta nepoželjnih mikroorganizama (Grba, 2010). Svi mikroorganizmi djelovanjem sumpornog dioksida smanjuju aktivnost, dok pri većim dozama i ugibaju. Njihova je otpornost na sumporni dioksid različita te su bakterije i plijesni najmanje otporne, a kvasci ugibaju tek uz vrlo visoku količinu slobodnog sumpornog dioksida (Schubert, 1996).

2.1. Antioksidacijsko djelovanje

Iako se sulfitni ion (SO₃²⁻) može vezati s kisikom, njegova je zastupljenost u pH rasponu vina iznimno niska. Sumporni dioksid stoga sprječava oksidaciju vezanjem s prekursorima koji su uključeni u oksidativne reakcije i na taj način sprječava njihovu reakciju s kisikom ili se pak veže na spojeve koji su već oksidirani kako bi obrnuo učinak kisika (Henderson, 2009). Dodatak sumpornog dioksida u mošt inhibira učinak, a ponekad i uzrokuje denaturaciju oksidacijskih enzima (polifenoloksidaza) što rezultira zaštitom mošta od predfermentacijske oksidacije (Giacosa i sur., 2019). Dodatkom 50 mg/L sumpornog dioksida enzimska aktivnost oksidaza smanjuje se za 90 %.

Sumporni dioksid također sprječava tvorbu kinona koji nastaju enzimskom oksidacijom fenolnih spojeva (boje i tanin) pomoću laktaza i tirozinaza vezanjem na iste (Grba, 2010; Stockley, 2005). Minimalna koncentracija sumpornog dioksida potrebna za inhibiciju aktivnosti tirozinaze ovisi o čimbenicima kao što su sorta grožđa, bistroća, temperatura mošta kao i koncentracija fenolnih spojeva u moštu.

Dodani sumporni dioksid osim enzimske sprječava i kemijsku oksidaciju tijekom obrade vina i dozrijevanja u bocama (Margalit, 1996). Kemijska oksidacija se pokreće reakcijom fenolnih

spojeva s otopljenim kisikom. Na primjer, kisik otopljen u vinu može se pretvoriti u vodikov peroksid koji zatim može pretvoriti etanol u acetaldehid, alkohole u njihove odgovarajuće aldehide te katalizirati oksidativnu polimerizaciju fenolnih spojeva. Molekularni sumporni dioksid brzo reagira s vodikovim peroksidom, nusproduktom oksidacije fenola, čime se mošt štiti od sekundarnih reakcija s peroksidima (Stockley, 2005). Sumporni dioksid važan je i pri antioksidacijskom djelovanju askorbinske kiseline, pri čemu sudjeluje u redukciji vodikovog peroksida, međuprodukta koji nastaje oksidacijom askorbinske kiseline (Grba, 2010).

Zbog sposobnosti da se veže s prekursorima i produktima oksidacije sumporni dioksid se može koristiti preventivno te kao tretman. Na primjer, bijelo vino koje je oksidiralo te ima smeđe nijanse i orašasti miris može se poboljšati dodatkom sumporovog dioksida koji smanjuje intenzitet boje vina i orašasti miris zbog vezanja s acetaldehidom (Kojić, 2019). Sumporni dioksid također reagira s ostalim sastavnicama mošta i vina, uključujući oksidirane fenolne spojeve i aldehide, kako bi se stvorili spojevi koji mogu narušavati senzorske karakteristike vina (Stockley, 2005).

2.2. Antimikrobno i antiseptičko djelovanje

Dvije glavne antiseptičke aktivnosti sumpornog dioksida su selektivno djelovanje na mikrofloru mošta i antimikrobno djelovanje u čuvanju vina tijekom njegovog odležavanja i skladištenja (Giacosa i sur., 2019).

Pri niskim koncentracijama sumporni dioksid inhibira respiraciju i reprodukciju mikroflora, dok pri visokim koncentracijama može biti letalan za prisutne mikroorganizme. Mehanizam antimikrobnog djelovanja sumpornog dioksida se očituje na način da on ulazi u mikrobne stanice te utječe na aktivnost njihovih enzima i proteina (Kojić, 2019).

Sprječavanje rasta i razmnožavanja mikroorganizama direktno je povezano sa slobodnim oblikom sumpornog dioksida (molekularni oblik SO₂ nekoliko je stotina puta učinkovitiji od bisulfitnog oblika), dok je utjecaj vezanog oblika zanemariv.

Općenito, sumporni dioksid ima veći učinak na bakterije nego na kvasce i to najčešće na one bakterije i kvasce koji su nepoželjni u moštu i vinu, a na njegovo djelovanje najosjetljiviji su kvasci rodova *Kloeckera* i *Hanseniaspora* (divlji kvasci), bakterije octene kiseline rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* te bakterije mliječne kiseline roda *Lactobacillus* (Grba, 2010). Kvasci sojeva *Saccharomyces* koji se koriste u vinarstvu za provođenje alkoholne fermentacije mnogo su otporniji na sumporni dioksid nego prethodno spomenuti divlji kvasci koji započinju

spontanu fermentaciju mošta i koji su česti izvor neugodnih aroma. Stoga, većina vinara bira kontrolirati koncentraciju divljih kvasaca dodatkom određene doze sumpornog dioksida, a nakon toga slijedi nacjepljivanje mošta komercijalnim vinskim sojevima *Saccharomyces*. Inhibitorski učinak sumpornog dioksida na malolaktičku fermentaciju mnogo je veći od onog na alkoholnu fermentaciju. Malolaktičku fermentaciju provode bakterije koje jabučnu kiselinu pregrađuju u mliječnu koja je manje kisela. Postoji nekoliko vrsta bakterija koje su sposobne provoditi malolaktičku fermentaciju, a najčešće ju provodi bakterija *Oenococcus oeni* koja je iznimno osjetljiva na sumporni dioksid. Osjetljivost malolaktičkih bakterija na sumporni dioksid vinari koriste kako bi utjecali na okus vina. Na primjer, ukoliko je cilj proizvesti kiselije vino kao što su sorte Riesling ili Sauvignon Blanc malolaktička fermentacija nije poželjna te se može spriječiti ranijim dodatkom sumpornog dioksida (Henderson, 2009).

Odgodeni početak alkoholne fermentacije ili duži period prilagodbe kvasca kod jače sumporenih moštova prvenstveno je povezan uz vezanje sumpornog dioksida na acetaldehid, stoga tek kada u moštu dođe do smanjenja koncentracije slobodnog sumpornog dioksida, kvasci započinju s normalnim rastom i metabolizmom (Grba, 2010).

Jedna od glavnih uloga sumporenja u proizvodnji vina je dobivanje mošta koji je znatno manje osjetljiv na razvoj bakterija tijekom uobičajene alkoholne fermentacije. Ova zaštita je najvažnija kod mošta bogatog šećerom, niske kiselosti, visokog pH i visoke temperature budući da je rizik od bakterijskih kvarenja i zastoja fermentacije najveći u tim slučajevima. Tijekom skladištenja vina sumporni dioksid otežava razvoj svih mikroorganizama u procesima kao što su refermentacija slatkih vina, nastanak zamućenja uzrokovan kvascima, nenamjerna malolaktička fermentacija te razna bakterijska kvarenja.

Sumporni dioksid je pri visokim pH vrijednostima i niskim koncentracijama mikostatik, dok se pri niskim pH vrijednostima i visokim koncentracijama ponaša kao fungicid. Pri uobičajenim pH vrijednostima (3,2 - 3,5), HSO_3^- je glavni oblik prisutan u moštu i vinima te isključivo djeluje kao mikostatik (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

3. Proizvodnja sumpornog dioksida tijekom alkoholne fermentacije

Tijekom alkoholnog vrenja pojedini kvasci proizvode sumporni dioksid kao metabolički intermedijer puta redukcije sulfata. Takav, endogeni sumporni dioksid kvasci tijekom fermentacije proizvode enzimskim transformacijama tvari koje sadrže sumpor kao što su aminokiseline cistein, cistin, metionin, zatim glutation, razni tio-spojevi, sulfati i elementarni

sumpor (Kuban i sur., 2018). Endogeni sumporni dioksid uglavnom je prisutan u vezanom obliku, no moguće su i manje koncentracije slobodnog (aktivnog) oblika (Wells i Osborne, 2011). Prisutnost oba oblika mora biti poznata prije dodavanja egzogenog sumpornog dioksida u bilo kojem koraku tehnološkog procesa (Kuban i sur., 2018).

Sojevi kvasaca mogu biti kategorizirani u niske proizvođače SO₂ kao što je *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* i visoke proizvođače SO₂ kao *Saccharomyces bayanus* Sacardo. Većina današnjih komercijalnih sojeva kvasaca smatra se niskim proizvođačima SO₂ te proizvode do 20 mg/L ukupnog SO₂.

Osim soja kvasca, na koncentraciju ukupnog SO₂ kojeg proizvode kvasci tijekom fermentacije utječe i sastav mošta, stoga je moguće da i soj kvasca koji se smatra niskim proizvođačem SO₂ u pojedinim moštovima pojedinih godina proizvede više koncentracije SO₂.

Na proizvodnju endogenog sumpornog dioksida i drugih sumpornih spojeva još može utjecati i temperatura. Dokazano je da je proizvodnja veća pri nižoj temperaturi (16 °C) nego pri temperaturi od 28 °C (Werner i sur., 2009).

4. Način i vrijeme dodavanja sumpornog dioksida

Osnovni cilj dodavanja sumpornog dioksida je zaštititi mošt, provesti alkoholnu fermentaciju i omogućiti starenje vina, odnosno proizvesti vino odgovarajuće kakvoće uz minimalnu koncentraciju sumpornog dioksida (Grba, 2010).

Vrste sumporenja koje se primjenjuju u proizvodnji vina su:

1. Elementarni sumpor koji se nanosi na vrpce ili kao prah koji se pali. Paljenjem sumpornih vrpca ili praha stvara se sumporni dioksid koji se jednim dijelom izgubi u atmosferi i tim se postupkom konzerviraju prazne bačve te se zaštićuju podrumi od mikroorganizama (Schubert, 1996). Sumporne trake se u današnje vrijeme rijetko koriste zbog nemogućnosti točnog doziranja u tank, mogućnosti pojave nepoželjnog okusa te jednostavnije upotrebe drugih sredstava (Grba, 2010).
2. Plinoviti sumporni dioksid koji se nalazi pod tlakom u 100%-tnoj koncentraciji u čeličnim bocama ili u obliku raspršivača u bocama koje su pogodne za manje vinarije. Najveća prednost plinovitog sumpornog dioksida je točnost doziranja te mogućnost izravnog dodavanja u vino (Schubert, 1996).

3. 5%-tna otopina sumporaste kiseline, koja se priprema uvođenjem sumpornog dioksida iz čelične boce preko mjernog aparata u vodu.

Upotrebljava se kod sumporenja masulja, mošta i vina, za sterilizaciju boca i plutenih čepova te kod sterilizacije crpki, cjevovoda i cijevi (Schubert, 1996). Sumporenje dodatkom 5%-tne otopine sumporaste kiseline ispravno je ukoliko se dodaje iz prethodno neotvorene boce s obzirom da se njezina koncentracija mijenja u kontaktu sa zrakom (Grba, 2010).

4. Kalijev metabisulfit, poznatiji kao vinobran, kemijske formule $K_2S_2O_5$ koji sadrži oko 50% sumpornog dioksida, odnosno koji daje približno polovicu djelotvornog sumpornog dioksida po težini (Schubert, 1996).

Prije upotrebe, vinobran se otopi u vinu ili zakiseljenoj vodi kako bi se kalij vezao na kiselinu, a sumporni dioksid oslobodio (Slika 1, Anonimus, 2022).



Slika 1. Vinobran (Anonimus, 2022)

Izbor oblika sumporenja je pod utjecajem faze proizvodnog procesa u kojem se sumporenje odvija i mogućnostima doziranja koje su dostupne u podrumima ili proizvodnim pogonima. U vinarstvu koje je usmjereno na redukciju sulfita u vinu, postoji težnja da se sumporni dioksid ne dodaje u mošt prije alkoholne fermentacije ukoliko zdravlje grožđa nije ugroženo. U suprotnom, doza koja se upotrebljava mora biti razmjerna stupnju infekcije grožđa. U slučaju crnih vina, važno je dodavanje sumpornog dioksida nakon malolaktičke fermentacije, kako bi se spriječile promjene i kvarenje vina, osobito ako se odležavanje odvija u hrastovim bačvama.

Dodatak sumpornog dioksida je osobito nezamjenjiv prilikom punjenja vina u boce budući da je u fazi skladištenja najteže zaštititi vino od kvarenja (Giacosa i sur., 2019).

Pri sumporenju vina važno je znati da 1 g plinovitog sumpornog dioksida oslobađa 1000 mg SO₂ u litri vina, 1 mL 5%-tne sumporaste kiseline oslobađa 50 mg SO₂ u litri vina, a 1 g kalijevog metabisulfita oslobađa 500 mg SO₂ u litri vina (Grba, 2010).

U Tablici 1. su prikazane vrijednosti dopuštenih koncentracija sumpornog dioksida u vinima u različitim državama (Stockley i sur., 2021).

Tablica 1. Dopuštene koncentracije SO₂ u vinima u (Stockley i sur., 2021)

Država	Vrsta vina	Limit (mg/L)
Argentina	crno	130
	bijelo	180
	slatko crno	180
	slatko bijelo / ružičasto	210
Australija	<35 g/L šećera	250
	> 35 g/L šećera	300
Brazil	sva	300
Kanada	sva	350
EU	bijelo / ružičasto	200
	crno < 5 g/L šećera	150
	bijelo / ružičasto > 5 g/L šećera	250
	crno > 5 g/L šećera	200
	specijalna slatka vina	300-400
Indija	sva	450
Japan	sva	350
Novi Zeland	< 35 g/L šećera	250
	> 35 g/L šećera	300
Južnoafrička Republika	crno < 5 g/L	150
	bijelo < 5 g/L	160
	sva > 5 g/L	200
	specijalna slatka vina	300
SAD	sva	350

5. Oblici sumpornog dioksida u vinu i njihove funkcije

Sumporni dioksid u moštu ili vinu disocira te se nalazi u tri oblika: u molekularnom obliku (SO_2), u sulfitnom obliku (SO_3^{2-}) i u bisulfitnom obliku (HSO_3^-).

U vinu se nalazi kao slobodni sumporni dioksid u koji ulazi prvenstveno molekularni oblik, nevezani bisulfitni oblik te nedisocirani sulfitni oblik (H_2SO_3). Koncentracija slobodnog sumpornog dioksida smanjuje se vezanjem bisulfitnog oblika sa šećerima, piruvatom, ketoglutaratom, acetaldehidom, što u konačnici predstavlja vezani sumporni dioksid. Vrijednosti slobodnog i ukupnog sumpornog dioksida zajedno predstavljaju ukupnu koncentraciju sumpornog dioksida u vinu što se izražava u mg/L (Grba, 2010). Poznavanje količine slobodnog i vezanog sumpornog dioksida iznimno je važno jer jedino slobodni oblik pruža zadovoljavajuće antimikrobno i antiseptičko djelovanje (Henderson, 2009).

Među najznačajnijim faktorima koji utječu na odnose među pojedinim oblicima sumpornog dioksida je pH vrijednost vina (Grba, 2010). U području pH vrijednosti vina slobodni sumporni dioksid uglavnom je prisutan u bisulfitnom obliku. Bisulfit djeluje na enzime iz skupine polifenoloksidaza inaktivirajući ih te dovodi do smanjenja koncentracije smeđih kinona. Također pomaže izdvajanje antocijanina iz pokožice crnog grožđa te sudjeluje u njihovom izbjeljivanju i usporava njihovu polimerizaciju s drugim fenolnim spojevima. Reagira i s karbonilnim spojevima kao što je acetaldehid tvoreći spojeve poput hidroksisulfonske kiseline (Danilewicz, 2007). Iako bisulfitni oblik pokazuje određeno antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje, najaktivniji oblik je molekularni (SO_2) čiji je postotak zastupljenosti u vinu manji od 5 % (Waterhouse i sur., 2016.; Zironi i sur., 2009). Molekularni SO_2 javlja se u obliku pojedinačnih molekula u moštu i vinu ili u plinovitom stanju. Hlapiv je te se može izdvajati iz vina ukoliko je ono izloženo zraku, najčešće prilikom miješanja ili pretakanja vina. Budući da je ukupna koncentracija SO_2 u vinu regulirana u većini zemalja, definiranje minimalne koncentracije molekularnog SO_2 od velikog je značaja. Molekularni SO_2 ovisi o koncentraciji slobodnog SO_2 i pH vrijednosti (Waterhouse i sur., 2016). Postotak slobodnog sumpornog dioksida u molekularnom obliku viši je ukoliko je pH vrijednost niža, stoga su njegovi učinci intenzivniji pri nižem pH kao što je prikazano u Tablici 2. (Kojić, 2019).

Pri uobičajenim pH vrijednostima vina koncentracija sulfitnog oblika je zanemariva, a njegove reakcije s kisikom su spore iako je to jedini oblik SO_2 koji se direktno veže s njim. Sulfitni

oblik ne utječe na miris i okus mošta i vina u koncentracijama u kojima se nalazi (Stockley, 2005).

Postotak alkohola i temperatura također utječu na ravnotežu između bisulfitnih iona i molekularnog SO₂ te je molekularni oblik zastupljeniji pri višoj temperaturi i većim koncentracijama alkohola (Zironi i sur., 2009).

Na odnose među pojedinim oblicima sumpornog dioksida zastupljenih u vinu utječe i koncentracija pojedinih tvari koje reagiraju, odnosno koje se direktno vežu na dodani sumporni dioksid (Grba, 2010).

Tablica 2. Postotak slobodnog SO₂ (kao molekularnog) pri različitim pH vrijednostima (Kojić, 2019)

pH vina	% molekularnog SO ₂
3,0	6,06
3,1	4,88
3,2	3,91
3,3	3,13
3,4	2,51
3,5	2,00
3,6	1,60
3,7	1,27
3,8	1,02
3,9	0,81
4,0	0,64

6. Uloga sumpornih spojeva u vinu

Sumporni spojevi imaju veliku ulogu u senzornim karakteristikama vina. Njihova prisutnost u vinu rezultat je raznih enzimskih i neenzimskih mehanizama. U slučaju enzimskih reakcija sumporni spojevi predstavljaju produkte metabolizma i fermentacijskih puteva čiji su supstrati aminokiseline i pojedini pesticidi koji sadrže sumpor. Kada kvasci i bakterije metaboliziraju navedene tjele, oslobađaju se sumporni spojevi koji se općenito svrstavaju među neugodne

arome. Neenzimske reakcije uključuju fotokemijske, toplinske i druge kemijske reakcije sumpornih spojeva tijekom proizvodnje i skladištenja vina (Fracassetti i Vigentini, 2018).

6.1. Nepoželjni sumporni spojevi

Sumporni spojevi koji se najčešće povezuju s nepoželjnim aromama u vinu su sumporovodik, metantiol, etantiol, dimetilmerkaptani (dimetil sulfid, dimetil distulfid i dimetil trisulfid) te ostali spojevi koji sadrže sumpor prikazani u Tablici 3. (Fracassetti i Vigentini, 2018). Ove spojeve karakteriziraju reducirajuće arome kao što su pokvarena jaja, luk, češnjak, cvjetača, šparoge, trulež (Swiegers i Pretorius, 2007) koje štetno utječu na kvalitetu vina (Landaud i sur., 2008). Međutim, njihova prisutnost u malim koncentracijama ima ulogu u formiranju određenih senzorskih karakteristika (Franco-Luesma i Ferreira, 2014).

Tablica 3. Uobičajeni spojevi sumpora nastali fermentacijom i pripadajuće neugodne arome u vinu (Fracassetti i Vigentini, 2018)

Spoj	Opis arome	Prag osjetljivosti ($\mu\text{g/L}$)	Koncentracija u vinu ($\mu\text{g/L}$)
sumporovodik	pokvarena jaja, reducirana aroma	0,001-150	0-370
metantiol	kuhani kupus, reducirana aroma	0,3	0-16
etantiol	luk, guma, trulež	1,1	0-50
dimetil sulfid	kupus, šparoge, kukuruz, melasa	10-160	0-910
ugljičkov disulfid	kupus, guma	>38	0-18
dimetil trisulfid	kupus, luk, kuhano povrće	0,1	0-111
dietil sulfid	češnjak	0,93-18	0-10
dimetil disulfid	kuhani kupus	20-45	0-160

Sumporovodik predstavlja veliki problem prilikom proizvodnje vina budući da je iznimno reaktivan i može pokrenuti reakcije u kojima kao produkti nastaju merkaptani i dimetil sulfid (Swiegers i sur., 2005). Nastaje tijekom alkoholne fermentacije, tokom asimilacijske redukcije sulfata djelovanjem kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kao nepoželjan produkt (Müller i Rauhut, 2018). Koncentracija sumporovodika ovisi o dostupnosti spojeva sa sumporom, soju kvasca korištenog za fermentaciju te o dostupnim nutrijentima koji su potrebni za rast kvasca (Swiegers i sur., 2005). Senzorski prag osjetljivosti sumporovodika veoma je nizak (0,001 - 150 µg/L) te se u vinima nalazi u malim koncentracijama (0 - 370 µg/L). Nositelj je arome vina na pokvarena jaja.

Najzastupljeniji merkaptani u vinu su metantiol kojeg karakteriziraju male koncentracije (0 - 16 µg/L) i niski senzorski prag osjetljivosti (0,3 µg/L) te etantiol čija je koncentracija u rasponu 0 - 50 µg/L, a senzorski prag osjetljivosti 1,1 µg/L. Navedeni merkaptani nositelji su nepoželjnih aroma vina na kupus i luk (Fracassetti i Vigentini, 2018). Nastaju iz metionina i cisteina djelovanjem kvasaca, a nastajanje im je povezano i sa samom sintezom aminokiselina (Franco-Luesma i sur., 2016). Pri niskoj pH vrijednosti mogu se hidrolizirati u tiole na taj način stvarajući nove hlapive sumporne spojeve.

Dimetil sulfid u vinu nastaje tijekom alkoholne fermentacije iz aminokiselina metionina i cisteina ili iz prekursora *S*-metil metionin i dimetil sulfoksid (Smith i sur., 2015). Iako je utvrđeno da dimetil sulfid ima poželjan utjecaj na Syrah vina tako što pojačava njihova senzorska svojstva te povećava voćnu aromu crnih vina kao rezultat interakcija s esterima i norizoprenoidima koji su prisutni u vinu, u bijelim vinima nije povezan s poželjnim aromama (Robinson i sur., 2014). Vrlo je hlapiv spoj koji se gubi tijekom alkoholne fermentacije, ali mu se koncentracija povećava prilikom odležavanja vina u boci zbog hidrolize *S*-metil metionina (Franco-Luesma i sur., 2016). U vinu ga pronalazimo u koncentracijama do 910 µg/L, a njegov senzorski prag osjetljivosti iznosi 10 - 160 µg/L. Nositelj je arome na kupus, šparoge i kukuruz (Fracassetti i Vigentini, 2018).

6.2. Utjecaj tehnoloških postupaka na koncentraciju nepoželjnih sumpornih spojeva

Na koncentraciju nepoželjnih sumpornih spojeva u vinu utječe starenje vina te prisutnost, odnosno odsutnost kisika prilikom tog procesa. Tijekom starenja se događaju značajne promjene arome vina, a velike probleme stvara proces oksidacije jer oksidacijom dolazi do promjene boje vina, stvaraju se razni spojevi koji su nositelji nepoželjnih aroma te dolazi do

gubitka svježih i voćnih aroma. Na aromu tijekom starenja također utječe i temperatura skladištenja (Makhotkina i sur., 2012). Na starenje vina u bocama veliki učinak imaju svojstva zatvarača (čepova) i njihova sposobnost sprječavanja ulaza kisika u bocu. Ulazak kisika je najmanje prisutan kod boca zatvorenih navojnim i aglomeriranim plutenim čepovima, srednje propusni su prirodni pluteni čepovi, dok najveću propusnost za kisik pokazuju sintetski čepovi zbog poroznog materijala od kojeg su izrađeni (Lopes i sur., 2006). Istraživanje koje su proveli Brajkovich i sur. (2005) također potvrđuje da navojni čepovi propuštaju najmanje kisika u bocu i rezultiraju najmanjim gubitkom sumpornog dioksida iz vina. Međutim, nakon 18 mjeseci skladištenja otkriveno je kako vina s navojnim čepovima sadrže i najviše nepoželjnih, reduktivnih aroma kao posljedicu porasta merkaptana koji su nositelji neželjene arome na truli kupus i koji se zbog male prisutnosti kisika ne mogu oksidirati do disulfida (Brajkovich i sur., 2005; He i sur., 2013). Bekker i sur. (2015) u svojem istraživanju također potvrđuju kako prisutnost kisika u vinu smanjuje koncentraciju merkaptana i sumporovodika tijekom starenja. To je povezano s porastom stvaranja kinona pri višim koncentracijama kisika koji zatim lako reagiraju s tiolima. Fedrizzi i sur. (2011) su u svojem istraživanju utvrdili da koncentracija dimetil sulfida ne ovisi o prisutnosti kisika, ali se tijekom starenja vina ipak povećava. Dimetil sulfid tijekom starenja nastaje iz nehlapivih prekursora cisteina, dimetil sulfoksida, metionin sulfoksida te *S*-metilmetionina (He i sur., 2013).

Dodatak bakra i drugih metala također može utjecati na koncentraciju nepoželjnih sumpornih spojeva u vinu. Mnogi su autori istraživali katalitičke učinke dodatka metalnih iona kao što su Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Sn^{4+} , Sn^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} na formiranje hlapivih sumpornih spojeva u vinu pri čemu je njihov dodatak povezan s povećanim nastajanjem hlapivih sumpornih spojeva iz njihovih prekursora (Bekker i sur., 2016). Iako dodatak bakra općenito ima poželjan učinak pri uklanjanju spojeva odgovornih za nepoželjne, reducirajuće arome koje daju sumporovodik i merkaptani, dodatak bakra u kombinaciji s malim udjelom kisika ili bez prisutnosti kisika uzrokuje povećanje koncentracije sumporovodika i merkaptana (Ugliano i sur., 2011; Viviers i sur., 2013). Razni metali, uključujući bakar, mogu pospješiti uklanjanje sumpora iz različitih supstrata, kao što je cistein, koje za posljedicu ima oslobađanje sumporovodika uz prisutnost katalizatora (Ugliano i sur., 2011). U istraživanju koje su proveli Bekker i sur. (2016) proučavali su utjecaj dodatka bakra i promjene pH vrijednosti na koncentraciju sumporovodika, dimetil sulfida i merkaptana. Otkriveno je da pH ima veliki utjecaj na interakciju Cu^{2+} iona s prekursorima prilikom formiranja hlapivih sumpornih spojeva. U istraživanju je utvrđeno da dodatkom bakra koncentracija sumporovodika raste, međutim

snižanjem pH vrijednosti, u vinu kojemu je dodan bakar, dolazi do smanjenja njegove koncentracije. Nadalje, interakcijama bakra s komponentama u vinu, koje se razlikuju u bijelim i crnim vinima, dolazi do različitih rezultata u količini formiranih merkaptana. Dodatak bakra u bijela vina uzrokuje smanjenje koncentracije merkaptana, dok dodatak bakra u crna vina uzrokuje povećanje njihove koncentracije. Ipak, nije dokazano da dodatak bakra utječe na koncentraciju dimetil sulfida, međutim sniženje pH vrijednosti vina značajno smanjuje njegovu količinu.

Na koncentraciju nepoželjnih sumpornih spojeva, osim prethodno navedenih čimbenika, utjecaj ima i svjetlo tijekom skladištenja vina. Nepoželjni sumporni spojevi, čijem nastanku pogoduje izloženost svjetlosti, uzročnici su nastanka nepoželjne reduktivne arome u vinima skladištenim u prozirnim bocama. Utjecaj svjetla na vina se očituje u smanjenju udjela antocijana u crnim vinima te može biti i uzrok posmeđivanja bijelih vina. Reduktivna aroma nastaje zbog prisutnosti metionina i riboflavina. Metionin se pod utjecajem svjetla razgrađuje na metional, veoma nestabilan spoj koji se raspada na metantioi i akrolein. Riboflavin je molekula koja pri izloženosti svjetlu podliježe reakcijama razgradnje od kojih je intermolekularna fotoredukcija najznačajnija za nastajanje reducirajućih aroma. Metantioi i dimetil sulfid koji nastaju ovim reakcijama doprinose aromi vina na kuhani kupus. Korištenjem kvasaca koji proizvode male količine riboflavina ili uklanjanjem riboflavina upotrebom bentonita može se spriječiti nastanak nepoželjnih aroma (Fracassetti i Vigentini, 2018).

6.3. Poželjni sumporni spojevi

Nositelji poželjnih aromatskih karakteristika u vinu nazivaju se sortni tioli. Glavni predstavnici ove skupine spojeva su 4-sulfanil-4-metilpentan-2-on (4MSP), 4-metil-sulfanilpentan-2-ol (4MSPOH), 3-sulfanilheksan-1-ol (3SH) i 3-sulfanilheksil acetat (3SHA) koji poželjno pridonose voćnim notama mladih vina i koje karakteriziraju niske koncentracije te niski pragovi osjetljivosti čije su vrijednosti prikazane u Tablici 4. (Roland i sur., 2011). Najzastupljeniji od navedenih spojeva, uvijek prisutan u vinu bez obzira na sortu grožđa u koncentracijama većim od svog senzorskog praga osjetljivosti je 3SH, dok je koncentracija 4MSPOH u vinu većinom niža od njegovog praga osjetljivosti te se smatra najmanje utjecajnim sortnim tiolom za aromu vina. S druge strane, koncentracije 3SHA i 4MSP znatno ovise o samoj sorti grožđa te variraju u različitim uzorcima istih sorti ovisno o tehnološkim postupcima koji su primijenjeni prilikom vinifikacije (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

4MSP je sortni tiol koji je odgovoran za aromu vina na šimšir i crni ribiz. Sortni tiol 3SH je nositelj arome na grejp i marakuju, dok je 3SHA odgovoran za aromu vina na šimšir i marakuju.

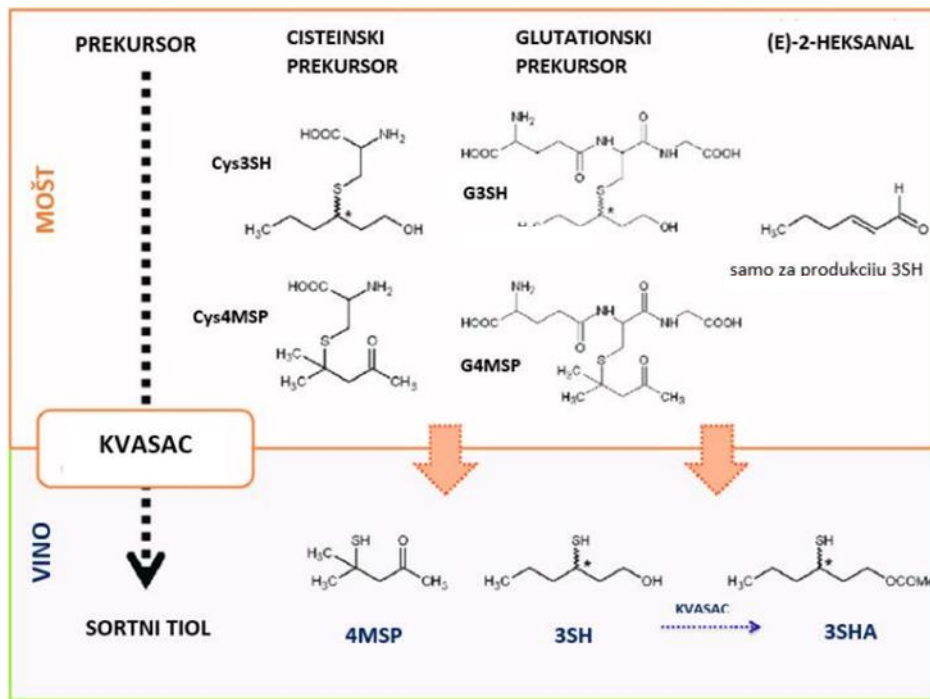
Navedeni sortni tioli identificirani su u velikom rasponu, kako među vinima bijelih sorti (Sauvignon Blanc, Petite Arvine, Petit i Gros Manseng, Melon B. i Bacchus, Semillon, Verdejo, i Kosu), tako i u vinima crnih sorti (Grenache, Merlot i Cabernet Sauvignon; kao i Rosé vina iz Provanse) (Roland i sur., 2011).

Tablica 4. Sortni tioli identificirani u vinima (Roland i sur., 2011)

Sortni tiol	Opis arome	Prag osjetljivosti (ng/L)	Koncentracija u vinu (ng/L)
4-sulfanil-4-metilpentan-2-on	šimšir, crni ribiz	0,8	0-400
4-metil-sulfanilpentan-2-ol	citrusne note	55	0-90
3-sulfanilheksan-1-ol	grejp, marakuja	60	0-19000
3-sulfanilheksil acetat	šimšir, marakuja	4,2	0-2500

Sortni tioli nisu prisutni u grožđu, već nastaju iz brojnih cisteinskih i glutationskih prekursora djelovanjem kvasaca tijekom alkoholne fermentacije. Pomoću enzima β -liaze tijekom alkoholne fermentacije dolazi do cijepanja veze ugljik – sumpor te se hlapivi tiolni spojevi otpuštaju iz *S*-cisteinskih konjugata (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Uz prethodno opisani metabolički put postoje još 3 biogenetska puta koja objašnjavaju oslobađanje 4MSP i 3SH iz odgovarajućih prekursora u vinu prikazana na Slici 2. Također, utvrđeno je kako 3SHA nastaje esterifikacijom iz 3SH tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem enzima alkohol aciltransferaze (Roland i sur., 2011).



Slika 2. Biogenetski putevi za 4MSP, 3SH i 3SHA tijekom alkoholne fermentacije (Roland i sur., 2011)

6.4. Utjecaj tehnoloških postupaka na koncentraciju poželjnih sumpornih spojeva

Jedan od čimbenika koji utječe na koncentraciju poželjnih sumpornih spojeva u vinu je zrelost grožđa, odnosno termin njegove berbe. U istraživanju koje su proveli Roland i sur. (2010) među vinima Sauvignon Blanc i Melon B. istraživao se utjecaj zrelosti grožđa na cisteinske i glutationske prekursore. Utvrđeno je kako se koncentracija Cys3SH, G3SH i G4MSP u Sauvignon Blanc vinu značajno povećava povećanjem stupnja zrelosti grožđa od kojeg je to vino proizvedeno, dok je koncentracija Cys4MSP bila veća u manje zrelim bobicama. U bobicama sorte Melon B. nije utvrđena veza između stupnja dozrijevanja i koncentracije prekursora.

Na koncentraciju poželjnih sumpornih spojeva u vinu utječe i temperatura fermentacije. Masneuf-Pomarède i sur. (2006) istraživali su utjecaj različitih temperatura alkoholne fermentacije na koncentraciju sortnih tiola u Sauvignon Blanc vinima. Njihovi su rezultati pokazali da viša temperatura alkoholne fermentacije (20 °C) rezultira višim koncentracijama 4MSP i 3SH u vinu za razliku od niže temperature (13 °C). Slično istraživanje proveli su i Howell i sur. (2004) u kojem su utvrdili da su koncentracije 4MSP u vinima više ukoliko je

alkoholna fermentacija provedena pri temperaturi od 28 °C nego u vinima dobivenim fermentacijom pri 18 °C.

Maceracija također utječe na koncentraciju sortnih tiola u vinu. U istraživanju provedenom od strane Peyrot des Gachons i sur. (2002) utvrđeno je kako je prekursor Cys4MSP u trenutku berbe jednako zastupljen u pokožici i pulpi grožđa Sauvignon Blanc, dok je Cys3SH najviše zastupljen u pokožici bobice. Roland i sur. (2011) su otkrili da se cisteinski i glutationski prekursori 3SH osim u pokožici, nalaze i u lišću vinove loze i pulpi bobice grožđa. Istraživanje o utjecaju različite duljine maceracije (0 h, 4 h, 16 h i 32 h) i tlakova primijenjenih tijekom prešanja (samotok, 0,4 atm i 2 atm) na koncentraciju prekursora 3SH i 3SHA u vinu Sauvignon blanc proveli su Maggu i sur. (2007). Utvrdili su da su razlike u koncentraciji Cys3SH na početku kontakta čvrste i tekuće faze nakon 4 h maceracije nezamjetne te se povećanje zamjećuje tek nakon 16 h, dok se znatno povećanje koncentracije dogodilo nakon 32 h. Najveća koncentracija cisteinskog prekursora 3SH je ekstrahirana nakon maceracije koja se provodila 32 h uz primijenjeni tlak tijekom prešanja od 0,4 atm, dok je koncentracija bila manja uz primijenjeni tlak od 2 atm iz čega proizlazi da duljina kontakta mošta s pokožicom ima veći utjecaj na koncentraciju prekursora nego tlak primijenjen tijekom prešanja. Također je dokazano kako i temperatura maceracije ima utjecaj na koncentracije tiola u vinu. Niske temperature prilikom kriogene maceracije povećavaju koncentracije prekursora tiola zbog oštećenja bobica uzrokovano formiranjem kristala u samoj bobici te oni uslijed temperaturnog šoka prelaze iz bobice u mošt (Kobayashi i sur., 2011; Olejar i sur., 2015).

Brojna istraživanja ukazuju kako i starenje vina utječe na koncentraciju poželjnih sumpornih spojeva u vinu. Budući da je 3SH iznimno nestabilna komponenta, njegova se koncentracija zbog oksidacijskih procesa znatno smanjuje tijekom starenja vina, kao što se smanjuje i koncentracija 3SHA zbog reakcije hidrolize na 3SH i octenu kiselinu (Makhotkina i sur., 2012). Brajkovich i sur. (2005) proveli su istraživanje u kojem su utvrdili kako su koncentracije 3SH i 3SHA tijekom starenja u bocama koje su zatvorene plutenim čepovima niže od vrijednosti dobivenih u bocama s navojnim čepovima, a razlog tome može biti da je tijekom zatvaranja vina plutenim čepom došlo do apsorpcije 3SH i 3SHA ili oksidacija vina budući da pluteni čepovi propuštaju kisik zbog njihove poroznosti. Na smanjenje koncentracije 3SH znatno utječe i prisutnost katehina koji u prisutnosti kisika oksidiraju u kinone. *O*-kinoni su snažni oksidansi koji vrlo lako reagiraju s tiolima te na taj način uzrokuju smanjenje njihove koncentracije. Nadalje, *O*-kinoni isto tako mogu vrlo lako stvoriti perokside koji također uzrokuju smanjenje koncentracije 3SH zbog svojih oksidacijskih svojstava. Dodatak

sumpornog dioksida može umanjiti smanjenje koncentracije 3SH zbog svog antioksidacijskog učinka na katehine (Blanchard i sur., 2004).

7. Metode za analizu sumpornih spojeva

Plinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (*Gas chromatography/Mass spectrometry*, GC/MS) najčešća je kromatografska tehnika koja se koristi za analizu hlapivih sumpornih spojeva u vinu zbog svoje osjetljivosti, specifičnosti i pouzdanosti te brzine provođenja same analize. Spojevi se najprije odjeljuju plinskom kromatografijom, a zatim se identificiraju pomoću masenog spektrometra (Mesters i sur., 2000).

7.1. Tehnike uzorkovanja i koncentriranja

Probleme prilikom analize sumpornih spojeva u vinu predstavljaju niske koncentracije te visoka reaktivnost navedenih spojeva, kao i kompleksnost matrice uzorka. Iz tih razloga prethodna priprema uzorka uvelike utječe na uspješnost primjene GC/MS sustava. Prije kromatografske analize potrebno je provesti ekstrakciju i koncentriranje, a tehnike koje se najčešće koriste kako bi se osigurala adekvatna ekstrakcija su ekstrakcija tekuće-tekuće, statička i dinamička *headspace* metoda te mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (Mestres i sur., 2000).

Ekstrakcija tekuće-tekuće predstavlja referentnu tehniku za ekstrakciju spojeva iz vina. Prilikom ekstrakcije koriste se organska otapala, a efikasnost ekstrakcije moguće je poboljšati korištenjem azeotropne smjese s više otapala (Mestres i sur., 2000). Kao pogodno otapalo za ekstrakciju većine nepoželjnih sumpornih spojeva koristi se diklormetan, dok su se kao najbolja otapala kod ekstrakcije sortnih tiola pokazali etil acetat i kombinacija pentan-diklormetan, a često se koristi i *p*-hidroksimerkuribenzoat zbog specifičnih interakcija s tiolnim grupama. Prilikom izdvajanja tiola iz kompleksa s *p*-hidroksimerkuribenzoatom za eluciju se koristi glutation (Mesters i sur., 2000; Moreira, 2004). Ova metoda ipak ima određene nedostatke kao što su predugo vrijeme trajanja ekstrakcije i uparavanje otapala što može biti uzrok gubitka pojedinih komponenti te korištenje velikih količina otapala koja mogu biti štetna (Moreira, 2004). Također, nedostatak metode je loša specifičnost za 4MSP, a moguća je i degradacija 3SHA u 3SH (Roland i sur., 2011).

Headspace je separacijska tehnika, koja postoji statičkoj i dinamičkoj izvedbi, kojom se lako hlapive komponente izdvajaju iz složene matrice nakon čega se injektiraju u plinski

kromatograf i detektiraju (Mestres i sur., 2000).

Statički *headspace* provodi se na način da se uzorak stavlja u staklenu bočicu i zatim termostatira te se prilikom toga analit raspoređuje između tekućeg ili čvrstog uzorka i plinovite faze iznad uzorka. U trenutku kada se koncentracije analita u plinovitoj fazi iznad uzorka i analita u uzorku izjednače postignuto je stanje ravnoteže. Tada se dio plinovite faze prenosi na plinski kromatograf pomoću plinopropusne štrcaljke (Snow, 2002). Statički *headspace* se zbog nepostojanja koraka koncentriranja, odnosno zbog ograničene osjetljivosti metode koristi za analizu spojeva koji imaju niske temperature vrelišta (Mestres i sur., 2000). Najveću primjenu ima u kombinaciji s mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi prilikom ekstrakcije nepoželjnih sumpornih spojeva (Nguyen i sur., 2012).

Kod dinamičkog *headspacea* tekući ili čvrsti uzorak dolazi u kontakt s plinovitom fazom u komori koja se pročišćava pomoću plina koji nosi hlapive komponente iz uzorka do adsorbensa, na koji se komponente zatim adsorbiraju i koncentriraju. Koncentrirani analit na adsorbensu potrebno je desorbirati povišenjem temperature kako bi se mogao prenijeti na plinski kromatograf (Mestres i sur., 2000; Snow, 2002). Dinamički *headspace* pogodan je za pripremu uzorka prilikom određivanja sortnih tiola u vinu zbog smanjenja upotrebe organskih otapala prilikom ekstrakcije tekuće-tekuće, kao i za određivanje hlapivih sumpornih spojeva prisutnih u niskim koncentracijama u vinu zbog same tehnike koncentriranja analita na adsorbensu. Ova je metoda kompleksnija te posljedično i puno skuplja od statičkog *headspacea* (Fedrizzi i sur., 2008; Fracassetti i Vigentini, 2018).

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi predstavlja alternativu ekstrakciji tekuće-tekuće. To je vrlo jeftina i jednostavna metoda visoke osjetljivosti koja ne zahtjeva upotrebu otapala, već koristi vlakno prekriveno polimerom na koji se analit adsorbira i koncentrira (Fedrizzi i sur., 2007; Nguyen i sur., 2012). Najveće probleme tijekom provođenja mikroekstrakcije na čvrstoj fazi predstavlja složenost matrice uzorka zbog čega može doći do prezasićenja vlakna ili pak do kompeticije između analita, standarda i drugih komponenti vina za adsorpciju na vlakno što stvara probleme u linearnosti odgovora (Lopez i sur., 2002). Unatoč nedostacima, mikroekstrakcija na čvrstoj fazi u kombinaciji s drugim metodama (*headspace*) najčešće se koristi za ekstrakciju i koncentriranje prilikom pripreme uzorka za analizu nepoželjnih sumpornih spojeva u vinu (Slaghenaufi i sur., 2017).

7.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (*Gas chromatography*, GC) tehnika je koja se najčešće upotrebljava prilikom odjeljivanja i kvantitativnog određivanja hlapivih komponenti vina. Metoda se temelji na razdvajanju plinovite, tekuće ili krute komponente između stacionarne i mobilne faze. Stacionarna faza može biti u krutom ili tekućem stanju, dok se kao mobilna faza uvijek koriste kemijski inertni plinovi helij, dušik ili vodik koji transportiraju uzorak kroz kromatografsku kolonu. Prednost plinske kromatografije je to što je to metoda u kojoj nema interakcija između mobilne faze i analita (Kaur i Sharma, 2018). Komponente prisutne u uzorku razdvajaju se na osnovu njihove različite raspodjele između stacionarne i mobilne faze. Plinski kromatograf radi na principu unošenja uzorka u zagrijani injektor pomoću šprice prilikom čega komponente prelaze u plinovito stanje te se uvode u kolonu pomoću plina nosioca. Komponente se u koloni razdvajaju na osnovu relativne topljivosti u stacionarnoj fazi i relativnom tlaku para, a zatim nošene plinom nosiocem dolaze na detektor gdje se detektiraju. Detektirani signal se zatim šalje na računalo koje ga prikazuje u obliku kromatograma (McNair i Miller, 2009).

7.3. Maseni spektrometar

Maseni spektrometar (*Mass spectrometry*, MS) se koristi za identifikaciju spojeva u vinu koji su prethodno razdvojeni iz smjese plinskom kromatografijom. To je instrument kojim se mogu odrediti mase i relativne koncentracije atoma i molekula. Pomoću masenog spektrometra se također može identificirati kemijski sastav spoja ili uzorka na temelju omjera mase i naboja nabijenih čestica. Maseni spektrometar sastoji se od izvora iona koji pretvara molekule u uzorku u fragmente, zatim analizatora mase koji sortira ione prema njihovim masama primjenom elektromagnetskog polja te detektora koji mjeri vrijednost neke indikatorske veličine i na taj način daje podatke potrebne za izračunavanje zastupljenosti svakog prisutnog ionskog fragmenta (Patel i sur., 2012).

Za detekciju hlapivih sumpornih spojeva koji se u vinu nalaze u niskim koncentracijama može se koristiti i tandem maseni spektrometar (MS/MS), značajan i pouzdan analitički uređaj, čija je prednost visoka osjetljivost i selektivnost (Seger i sur., 2008).

8. Smanjenje koncentracije SO₂ i alternative sumporenju

Unatoč mnogim poželjnim učincima sumpornog dioksida u vinu, nepoželjni učinci njegovog djelovanja na ljudsko zdravlje posljednjih su godina glavni predmet istraživanja. Štetni utjecaji SO₂ povezani su s mnogim zdravstvenim rizicima kao što su proljev, bol u trbuhu, angioedem, bronhokonstrikcija te anafilaksija (Guerrero i Cantos-Villar, 2015). Uz SO₂ su osim navedenih, povezani i drugi poremećaji poput astme, alergijskih reakcija, glavobolje, umora i svraba (Vally i Thompson, 2003). Nadalje, prekomjerne količine SO₂ i njegovo nestručno dodavanje prilikom proizvodnje vina dovode do organoleptičkih promjena konačnog proizvoda. Iz svih navedenih razloga maksimalne dopuštene koncentracije SO₂ u vinima su se kroz godine postupno smanjivale te se posljednjih godina intenzivno radi na smanjenju ili čak potpunoj eliminaciji SO₂, posebno prilikom proizvodnje ekoloških vina. Osnovni zahtjevi koje alternative SO₂ trebaju ispunjavati su nepostojanje nepoželjnih utjecaja na zdravlje, laka dostupnost i niska cijena, posjedovanje antimikrobnih i antioksidacijskih svojstava te očuvanje kvalitete vina (Yıldırım, 2020).

8.1. Termički procesi

Termički procesi u procesu proizvodnje vina su vrlo važni za konačnu kvalitetu vina. Iako ne mogu zamijeniti sve funkcije, mogu nadopuniti učinak sumpornog dioksida u kombinaciji s drugim učinkovitim alternativnim tehnikama (Lambri i sur., 2015). Ove tehnologije pojedinačno ili u kombinaciji pokazuju veliki potencijal ne samo za sterilizaciju, već i za ekstrakciju antocijana i drugih polifenola iz grožđa u vino u procesu fermentacije, te sprječavaju tamnjenje zbog inhibicije oksidacijskih enzima (Clarke i Bakker, 2011; Corrales i sur., 2009).

Termička obrada se često koristi prilikom prerade grožđa kako bi se eliminirala bakterijska kontaminacija (Li i sur., 2017). U istraživanju koje su proveli Boban i sur. (2010) naznačeno je da je termička obrada crnog vina na 75 °C i 125 °C kroz 45 min učinkovita u zaštiti od bakterija *Salmonella enterica* i *Escherichia coli*, uobičajenih patogena koji se prenose hranom i pićem. Osim mikrobiološkog utjecaja, primjena topline na grožđe ili mošt može se koristiti i kao predfermentacijski tretman za smanjenje enzimske aktivnosti i obogaćivanje sastava vina. Termički tretman na 70 °C tijekom 10 ili 20 min omogućuje ekstrakciju fenolnih spojeva, uglavnom antocijana i aromatičnih spojeva, u vodenoj fazi (Ševcech i sur., 2015). Iako je termička obrada najčešće korišten proces za inhibiciju mikroorganizama u prehrambenoj

industriji, primjena prekomjerne topline kako bi se uništili specifični patogeni također može utjecati na narušavanje kvalitete i organoleptičkih svojstva krajnjeg proizvoda (Li i sur., 2014). Niske temperature također mogu biti jedan od izbora za inaktivaciju enzima i inhibiciju patogenih mikroorganizama (Li i sur., 2017). Smrzavanje također doprinosi ukupnoj ekstrakciji polifenola zbog razbijanja stanica sjemenki koje sadrže tanine (Peinado i sur., 2004).

8.2. Netermički procesi

Za razliku od termičkih procesa, provođenjem netermičkih procesa ne dolazi do velikih promjena u boji, mirisu, okusu i kvaliteti vina. U vinarstvu se najčešće koriste visoki hidrostatski tlak, pulsirajuće električno polje, ultrazvuk te ultraljubičasto zračenje (Yıldırım, 2020).

Visoki hidrostatski tlak (200 – 800 MPa) se koristi kao metoda inhibicije mikroorganizama i inaktivacije enzima. Istraživanja pokazuju da tretmani tlakom utječu na fizikalno-kemijska i senzorna svojstva vina, kao i na promjenu aromatičnih spojeva u mladim vinima (Briones-Labarca i sur., 2017). U istraživanju koje su proveli Tao i sur. (2012) primijećeno je da vrlo visoki tlakovi (> 650 MPa) primijenjeni tijekom duljeg vremenskog razdoblja (> 2 sata) mogu utjecati na boju crnog vina i smanjiti količinu fenolnih spojeva. Santos i sur. (2016) su u svojem istraživanju primijenili tlakove od 500 i 600 MPa tijekom 5 i 20 min te su njihovi rezultati pokazali smanjenje koncentracije monomernih antocijana, fenolnih kiselina i flavonola u odnosu na vino koje nije tretirano visokim hidrostatskim tlakom. S druge strane, u istraživanju Briones-Labarca i sur. (2017) tretman visokim hidrostatskim tlakom (300 MPa) nije utjecao na fizikalno-kemijske parametre bijelog vina i senzorna svojstva, kao ni na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida. U istraživanju provedenom od strane Santos i sur. (2013) primjena visokog hidrostatskog tlaka je pak ubrzala Maillardove reakcije u bijelom vinu koje dovode do nepoželjnih promjena u boji vina (posmeđivanje).

Tehnologija pulsirajućeg električnog polja se također može upotrijebiti za inhibiciju mikroorganizama. Metoda radi po principu primjene električnih impulsa kroz kratko vrijeme izraženo u mikrosekundama (μ sek) na proizvod koji je postavljen između serije elektroda. Tehnologija je testirana na moštovima i vinima bijelog i crnog grožđa te se pokazala uspješnom prilikom inaktivacije kvasaca i bakterija mliječne kiseline (Yıldırım, 2020).

Ultrazvuk velike snage je metoda koja inhibira mikroorganizme upotrebom zvučnih valova (> 14 – 16 kHz) te se može koristiti za sprječavanje kvarenja vina (Luo i sur., 2012). Rezultati

istraživanja koje su proveli Tiwari i sur. (2010) ukazuju kako upotreba ultrazvuka ne utječe na količinu antocijana u moštu crnog grožđa, a Jiranek i sur. (2008) također potvrđuju da se tretman ultrazvukom može koristiti za inaktivaciju neželjenih mikroorganizama bez utjecaja na boju i okus vina.

Ultraljubičasto zračenje također može biti jedna od metoda upotrijebljena za inaktivaciju mikroorganizama, koja može smanjiti ili u potpunosti zamijeniti upotrebu SO₂. U istraživanju koje su proveli Pala i Toklucu (2013) upotreba ultraljubičastog zračenja uspješno je inhibirala rast mikroorganizama u moštu, bez značajnih promjena u parametrima kvalitete. Falguera i sur. (2013) su u svojem istraživanju također izvijestili da bi UV zračenje moglo spriječiti kvarenje vina u istoj mjeri kao i SO₂, bez promjena drugih parametara kvalitete kao što su pH te sadržaj vinske kiseline i alkohola. Jedan od nedostataka primjene UV zračenja je različiti učinak na crna i bijela vina. Naime, crna vina apsorbiraju više zračenja od bijelih, stoga se inaktivacija mikroorganizama u crnim vinima pokazala manje učinkovitom od one u bijelim vinima (Fredericks i Krügel, 2011).

8.3. Kemijske tvari

Neke od kemijskih tvari čiji se učinci istražuju kako bi se smanjila količina SO₂ koja se dodaje prilikom proizvodnje vina su dimetil dikarbonat, lizozim te hitozan.

Dimetil dikarbonat je aditiv koji se pokazao uspješnim prilikom inhibicije pojedinih mikroorganizama. Maksimalna dopuštena doza ovog spoja u proizvodnji vina pokazala se uspješnom prilikom kontrole kontaminacije vina neželjenim kvascima, dok je učinak na bakterije mliječne i octene kiseline nedostatan (Renouf i sur., 2008). Također, učinkovitost dimetil dikarbonata se pokazala privremenom, stoga se ne preporučuje korištenje prilikom skladištenja vina (Delfini i sur., 2002).

Lizozim je enzim (aktivan pri pH vrijednostima 2,8 – 4,2) izoliran iz jaja, koji pokazuje antimikrobni učinak na mnoge namirnice (Delfini i sur., 2004). Istraživanja pokazuju da se kombinirani antibakterijski sustav s lizozimom može koristiti za stabilizaciju vina tijekom procesa starenja, kako bi se smanjila koncentracija SO₂ te učinkovito spriječila kontaminacija nepoželjnim bakterijama mliječne kiseline (Chen i sur., 2015; Sonni i sur., 2011). Iako je upotreba lizozima prilikom proizvodnje vina dopuštena, njegova prisutnost treba biti jasno naznačena na etiketi zbog rizika koji predstavlja za potrošače alergične na jaja (Yıldırım, 2020). Hitozan je biopolimer koji je našao primjenu u pročišćavanju vina te kao antimikrobno

sredstvo, a najčešće se koristi za suzbijanje bakterijskog kvarenja (Gómez-Rivas i sur., 2004). Chinnici i sur. (2014) su proveli istraživanje o zaštitnim učincima hitozana protiv oksidacijske razgradnje sortnih tiola. Zaključili su da je upotreba hitozana značajno smanjila oksidaciju tiola. Također, smatraju kako ovaj aditiv može pridonijeti očuvanju karaktera vina proizvedenog od aromatičnog grožđa, kao i smanjenoj razini sulfida.

8.4. Bakteriocini i *killer* toksini

Bakteriocini su izvanstanične tvari koje proizvode i Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. To su peptidi s antimikrobnom aktivnošću koji sprječavaju kvarenje hrane i pića. Nizin i pediocin, koje proizvode specifične bakterije mliječne kiseline, su dva najčešće upotrebljavana bakteriocina u prehrambenoj industriji (Yıldırım, 2020).

Rojo-Bezares i sur. (2007) su u svojem istraživanju ispitali utjecaj nizina na rast 64 različite bakterije mliječne kiseline, 23 bakterije octene kiseline i 20 kvasaca te su njihovi rezultati pokazali da je nizin vrlo učinkovito sredstvo u zaštiti vina od bakterija mliječne kiseline. *Killer* toksini, koje proizvode sami kvasci, su fungicidna sredstva koja se također razmatraju u kontroli razvoja nepoželjnih kvasaca tijekom proizvodnje vina (Yıldırım, 2020). Oro i sur. (2016) su proveli istraživanje u kojem su ispitali antimikrobnu aktivnost Kwkt i Pikt *killer* toksina koje proizvode *Kluyeromyces wickerhamii* i *Wickerhanomyces anomalus* protiv kvasaca roda *Brettanomyces* uzrokovanog kvarenja vina te su njihovi rezultati pokazali da se upotrebom navedenih *killer* toksina može smanjiti ukupna koncentracija SO₂ u vinu.

8.5. Prirodni biljni ekstrakti

U današnje vrijeme postoji sve veća potražnja za hranom i pićem koje sadrži prirodne umjesto kemijskih konzervansa. Jedna od najperspektivnijih prirodnih alternativa za smanjenje količine SO₂ u proizvodnji vina su antioksidacijski i antimikrobni biljni ekstrakti bogati fenolnim spojevima. Flavonoidi, fenolni spojevi i njihovi derivati, koji se nalaze u strukturi u biljnih ekstrakata, pokazali su se učinkovitima u sprječavanju autooksidacije, dok i ostale fitokemikalije koje se nalaze u ekstraktu, kao što su terpeni, alkaloidi i laktoni, mogu doprinijeti antioksidacijskim svojstvima (Yıldırım, 2020).

Istraživanje koje su proveli Xia i sur. (2010) također pokazuje da se rast patogenih mikroorganizama i mikroorganizama kvarenja može snažno smanjiti ili inhibirati primjenom određenih biljnih ekstrakata.

Budući da bi vina tretirana biljnim ekstraktima bila vrlo konkurentna na trenutnom globalnom tržištu, potrebna su istraživanja o njihovim učincima na kvalitetu i senzorna svojstva konačnog proizvoda (Yıldırım, 2020). Sonni i sur. (2009) su u svojem istraživanju izvijestili da je u vinima tretiranim ovim fenolnim spojevima bogatim ekstraktima spriječena oksidacija i da takva vina čak izazivaju bolju osjetilnu percepciju od vina tretiranih sumpornim dioksidom.

9. Zaključci

1. U suvremenom vinarstvu, sumporni dioksid (u obliku plina, praha ili vodene otopine) koristi se u različitim fazama proizvodnje vina: tijekom berbe, prerade bobica, fermentacije i flaširanja.
2. Sumporni dioksid se vinu dodaje zbog antiseptičkog, antimikrobnog i antioksidacijskog djelovanja te taloženja i bržeg bistrenja vina.
3. Dodavanje sumpornog dioksida zaustavlja fermentaciju, sprječava stvaranje octene kiseline, stabilizira okus i boju i povećava rok trajanja vina.
4. Sumporni dioksid je i nusproizvod fermentacije jer ga proizvode i kvasci pa vina bez minimalne koncentracije sumpornog dioksida ne postoje.
5. Sadržaj sumpornog dioksida u vinu regulira više tijela u svim zemljama svijeta kako bi se smanjio njegov štetni utjecaj na zdravlje ljudi.
6. Do danas još nije pronađena odgovarajuća i bezopasna zamjena za sumporni dioksid.

10. Literatura

Anonimus 2 (2022) Pa-vin d.o.o. <http://www.pavin.hr/proizvod/1037/>, pristupljeno 2. 5. 2022.

Bekker MZ, Mierczynska-Vasilev A, Smith PA, Wilkes EN (2016) The effects of pH and copper on the formation of volatile sulfur compounds in Chardonnay and Shiraz wines postbottling. *Food Chem* **207**, 148–156.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.060>

Blanchard L, Darriet P, Dubourdieu D (2004) Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: Impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *Am J Enol Viticult* **55**, 115- 120.

Boban N, Tonkić M, Modun, D, Budimir D, Mundić I, Šutlović D, Punda-Polić V, Boban M (2010) Thermally treated wine retains antibacterial effects to food-born pathogens. *Food Control* **21**, 1161– 1165.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.01.012>

Briones-Labarca V, Perez-Wom M, Habib G, Giovagnolivicuña C, Cañas-Sarazua R, Tabilo-Munizaga G, Salazar FN (2017) Oenological and quality characteristic on young white wines (Sauvignon Blanc): Effects of high hydrostatic pressure processing. *J Food Quality* **2017**, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/8524073>

Brajkovich M, Tibbits N, Peron G, Lund CM, Dykes SI, Kilmartin PA, Nicolau L (2005) Effect of screwcap and cork closures on SO₂ levels and aromas in a Sauvignon Blanc wine. *J Agr Food Chem* **53**, 10006–10011. <https://doi.org/10.1021/jf0512813>

Chen K, Han S, Zhang B, Li M, Sheng W (2015) Development of lysozyme-combined antibacterial system to reduce sulfur dioxide and to stabilize Italian Riesling ice wine during aging process. *Food Sci Nutr* **3**, 453-65. <https://doi.org/10.1002/fsn3.238>

Chinnici F, Natali N, Riponi C (2014) Efficacy of Chitosan in Inhibiting the Oxidation of (+)-Catechin in White Wine Model Solutions. *J Agric Food Chem* **62**, 9868-9875.

<https://doi.org/10.1021/jf5025664>

Clarke RJ, Bakker J (2011) Wine flavour chemistry, 2. izd., Blackwell Publishing Ltd., Oxford
<https://doi.org/10.1002/9781444346022>

Corrales M, García AF, Butz P, Tauscher B (2009) Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *J Food Eng* **90**, 415–421.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.003>

Danilewicz JC (2007) Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. *Am J Enol Viticult* **58**, 53-60.

Delfini C, Cersosimo M, Del Prete V, Strano M, Gaetano G, Pagliara A, Ambro S (2004) Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. *J Agric Food Chem* **52**, 1861–1866.
<https://doi.org/10.1021/jf034824m>

Delfini C, Gaia P, Schellino R, Strano M, Pagliara A, Ambro S (2002) Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *J Agric Food Chem* **50**, 5605–5611.
<https://doi.org/10.1021/jf0256337>

Falguera V, Forns M, Ibarz A (2013) UV-vis irradiation : An alternative to reduce SO₂ in white wines. *LWT-Food Sci Technol* **5**, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.006>

Fedrizzi B, Versini G, Lavagnini I, Badocca D, Nicolini G, Magno F (2008) Hyphenated gas chromatography-mass spectrometry analysis of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine: Comparison with results of other sampling procedures via a robust regression. *Anal Chim Acta* **621**, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.040>

Fedrizzi B, Versini G, Lavagnini I, Nicolini G, Magno F (2007) Gas chromatography–mass spectrometry determination of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine: A comparison of headspace solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Anal Chim Acta* **596**, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.007>

Fedrizzi B, Zapparoli G, Finato F, Tosi E, Turri A, Azzolini M, Versini G (2011) Model aging and oxidation effects on varietal, fermentative, and sulfur compounds in a dry botrytized red wine. *J Agr Food Chem* **59**, 1804–1813. <https://doi.org/10.1021/jf104160m>

Fracassetti D, Vigentini I (2018) Occurrence and analysis of sulfur compounds in wine. U: Jordão AM, Cosme F (ured.) *Grapes and Wines - Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*, IntechOpen, str. 225-238.

Franco-Luesma E, Sáenz-Navajas MP, Valentin D, Ballester J, Rodrigues H, Ferreira V (2016) Study of the effect of H₂S, MeSH and DMS on the sensory profile of wine model solutions by RateAll-That-Apply (RATA). *Food Res Int* **87**, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.004>

Franco-Luesma E, Ferreira V (2014) Quantitative analysis of free and bonded forms of volatile sulfur compounds in wine. Basic methodologies and evidences showing the existence of reversible cation-complexed forms. *J Chromatogr A* **1359**, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.011>

Fredericks IN, Krügel M (2011) Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiol* **28**, 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.018>

Giacosa S, Segade SR, Cagnasso E, Caudana A, Rolle L, Gerbi V (2019) SO₂ in wines: Rational use and possible alternatives. U: Morata A (ured.) *Red wine technology*, Elsevier Inc., London/San Diego/Cambridge/Kidlington, str. 309-321.

Gómez-Rivas L, Escudero-Abarca BI, Aguilar-Uscanga MG, Hayward-Jones PM, Mendoza P, Ramírez M (2004) Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *J Ind Microbiol Biot* **31**, 16– 22. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0112-2>

Grba S (2010) *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji*, Plejada, Zagreb.

Guerrero RF, Cantos-Villar E (2015) Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends Food Sci Tech* **42**, 27-43.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.004>

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

<https://doi.org/10.1002/ffj.3137>

Henderson P (2009) Sulfur dioxide: Science behind this anti-microbial, anti-oxidant, wine additive. *Practical Winery & Vineyard Journal* **1**, 1-7.

<https://beerbrew.com/words/wp-content/uploads/2014/05/SO2science.pdf>

Howell KS, Swiegers JH, Elsey GM, Siebert TE, Bartowsky EJ, Fleet GH, Pretorius IS, de Barros Lopes MA (2004) Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiol Lett* **240**, 125-9.

<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.022>

Jiranek V, Grbin P, Yap A, Barnes M, Bates D (2008) High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology. *Biotechnol Lett* **30**, 1–6.

Kaur G, Sharma S (2018) Gas Chromatography- A Brief Review, *Inter J Inf Comp Scie* **5**, 125-131.

Kobayashi H, Takase H, Suzuki Y, Tanzawa F, Takata R, Fujita K, Kohno M, Mochizuki M, Suzuki S, Konno T (2011) Environmental stress enhances biosynthesis of flavor precursors, S3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine, in grapevine through glutathione S-transferase activation. *J Exp Bot* **62**, 1325–1336.

<https://doi.org/10.1093/jxb/erq376>

Kojić N (2019) Djelovanje sumporovog dioksida u vinu. *Glasnik Zaštite Bilja* **6**, 86-92.

<https://doi.org/10.31727/gzb.42.6.11>

Kuban V, Fic V, Marcinčák P, Kračmar S, Golian J (2018) Content of endogenous sulfur dioxide in wines, *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* **12**, 241-247. <https://doi.org/10.5219/854>

Lambri M, Torchio F, Colangelo D, Segade SR, Giacosa S, De Faveri DM, Gerbi V, Rolle L (2015) Influence of different berry thermal treatment conditions, grape anthocyanin profile, and skin hardness on the extraction of anthocyanin compounds in the colored grape juice production. *Food Res Int* **77**, 584-590. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.027>

Landaud S, Helinck S, Bonnarme P (2008) Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Appl Microbiol and Biot* **77**, 1191–1205. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1288-y>

Li F, Chen G, Zhang B, Fu X (2017) Current applications and new opportunities for the thermal and non-thermal processing technologies to generate berry product or extracts with high nutraceutical contents. *Food Res Int* **100**, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.035>

Li XM, Wang PH, Wu DH, Lu J (2014) Effects of sterilization temperature on the concentration of ethyl carbamate and other quality traits in Chinese rice wine. *J I Brewing* **120**, 512-515. <https://doi.org/10.1002/jib.169>

Lopes P, Saucier C, Teissedre PL, Glories Y (2006) Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles. *J Agr Food Chem* **54**, 6741- 6746. <https://doi.org/10.1021/jf0614239>

Lopez R, Aznar M, Cacho J, Ferreira V (2002) Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* **966**, 167–177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00696-9)

Luo H, Schmidt F, Grbin PR, Jiranek V (2012) Ultrasonics sonochemistry viability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonics. *Ultrason Sonochem* **19**, 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.06.009>

Maggi M, Winz R, Kilmartin PA, Trought MC, Nicolau L (2007) Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *J Agr Food Chem* **55**, 10281-10288.

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

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.034>

Makhotkina O, Pineau B, Kilmartin P (2012) Effect of storage temperature on the chemical composition and sensory profile of Sauvignon Blanc wines. *Aust J Grape Wine R* **18**, 91-99.

<https://doi.org/10.1021/jf072192o>

Margalit Y (1996) Winery technology & operations, The wine appreciation guild, San Francisco, SAD. str. 67-78.

Masneuf-Pomarède I, Mansour C, Murat ML, Tominaga T, Dubourdieu D (2006) Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *Int J Food Microbiol* **108**, 385-390. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.001>

McNair HM, Miller JM (2009) Basic Gas Chromatography. Techniques in Analytical Chemistry, 2. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, SAD.

Mestres M, Busto O, Guasch J. (2000) Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *J Chromatogr A* **881**, 569-581. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00220-X)

Moreira EN (2004) Method for analysis of heavy sulphur compounds using gas chromatography with flame photometric detection. *Anal Chim Acta* **513**, 183-189.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.12.041>

Moreno-Arribas M. V., Polo M.C. (2009) Wine Chemistry and Biochemistry, Springer New York, NY, str. 260-282.

Müller N, Rauhut D (2018) Recent developments on the origin and nature of reductive sulfurous off-odours in wine. *Fermentation* **4**, 62.

<https://doi.org/10.3390/fermentation4030062>

Nguyen DD, Nicolau L, Kilmartin P (2012) Application of an automated headspace solid phase micro-extraction for the GC-MS detection and quantification of reductive sulfur compounds in wines. U: Salih B, Çelikbıçak Ö (ured.) Gas Chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications, IntechOpen, str. 172-192.

Olejar KJ, Fedrizzi B, Kilmartin PA (2015) Influence of harvesting technique and maceration process on aroma and phenolic attributes of Sauvignon blanc wine. *Food Chem* **183**, 181-189.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.040>

Oro L, Ciani M, Bizzaro D, Comitini F (2016) Evaluation of damage induced by Kwkt and Pikt zymocins against *Brettanomyces / Dekkera* spoilage yeast as compared to sulphur dioxide. *J Appl Microbiol* **211**, 207–214. <https://doi.org/10.1111/jam.13121>

Pala ÇU, Toklucu AK (2013) Effects of UV-C light processing on some quality characteristics of grape juices. *Food Bioprocess Tech* **6**, 719- 725.

<https://doi.org/10.1007/s11947-012-0808-7>

Patel RS, Roy M, Dutta GK (2012) Mass spectrometry - A review. *Vet World* **5**, 185-192.

<https://doi.org/10.5455/vetworld.2012.185-192>

Peinado RA, Moreno J, Bueno JE, Moreno JA, Mauricio JC (2004) Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chem* **84**, 585–590. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00282-6)

Peyrot Des Gachons C, Tominaga T, Dubourdieu D (2002) Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J Agric Food Chem* **50**, 4076-4079.

<https://doi.org/10.1021/jf020002y>

Renouf V, Strehaiano P, Lonvaud-Funel A (2008) Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control* **19**, 208–216.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.03.012>

Ribéreau-Gayon P, Dubourdiou D, Donèche B, Lonvaud-Funel A (2006) The use of sulphur dioxide in must and wine treatment. U: Ribéreau-Gayon P, Dubourdiou D, Donèche B, Lonvaud-Funel A (ured.) Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, str. 193-221.

Robinson LA, Boss KP, Solomon SP, Trengove DR, Heymann H, Ebeler ES (2014) Origins of grape and wine aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *Am J Enol Viticult* **65**, 1-24. <http://dx.doi.org/10.5344/ajev.2013.12070>

Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Zarazaga M, Torres C, Ruizlarrea F (2007) Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int J Food Microbiol* **116**, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.020>

Roland A, Vialaret J, Razungles A, Rigou P, Schneider R (2010) Evolution of S-cysteinylation and S-glutathionylation thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *J Agr Food Chem* **58**, 4406-4413. <https://doi.org/10.1021/jf904164t>

Roland A, Schneider R, Razungles A, Cavalier F (2011) Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications. *Chem Rev* **111**, 7355-7376. <https://doi.org/10.1021/cr100205b>

Santos MC, Nunes C., Rocha MAM, Rodrigues A, Rocha SM, Saraiva JA, Coimbra MA (2013) Impact of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free white wine during bottle storage: Evidence for Maillard reaction acceleration. *Innov Food Sci Emerg* **20**, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.001>

Santos MC, Nunes C, Jourdes M, Teissedre P, Rodrigues A, Amado O, Coimbra MA (2016) Evaluation of the potential of high pressure technology as an enological practice for red wines. *Innov Food Sci Emerg* **33**, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.018>

Schubert G (1996) Podrumarstvo, 2. izd., Nakladni zavod globus, Zagreb

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

<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.02.017>

Slaghenaufi D, Tonidandel L, Moser S, Roman T, Larcher R (2017) Rapid analysis of 27 volatile sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction gas chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal Meth* **10**, 3706–3715.

<https://doi.org/10.1007/s12161-017-0930-2>

Smith ME, Bekker MZ, Smith PA, Wilkes EN (2015) Source of volatile sulfur compounds in wine. *Aust J Grape Wine R*, **21**, 705-712. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12193>

Snow NH, Slack GC (2002) Head-space analysis in modern gas chromatography. *TrAC-Trend Anal Chem* **21**, 608–617. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00802-6](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00802-6)

Sonni F, Clark AC, Prenzler PD, Riponi C, Scollary GR (2011) Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *J Agr Food Chem* **59**, 3940–3949. <https://doi.org/10.1021/jf104575w>

Sonni F, Jesus M, Bastante C, 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*, 688–696. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3503>

Stockley C (2005) Sulfur dioxide and the wine consumer. *Australian and New Zealand Grapegrower & Winemaker* **501**, 73-76.

<https://search.informit.org/doi/10.3316/ielapa.200511514>

Stockley C, Paschke-Kratzin A, Teissedre PL, Garcia Tejedor N, Quini C (2021) SO₂ and wine: A review, OIV publications, Pariz, Francuska.

Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine R* **11**, 139-173.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>

Swiegers JH, Pretorius IS (2007) Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl Microbiol Biot* **74**, 954-960. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0828-1>

Ševcech J, Vicenová Ľ, Furdíková K, Malík F (2015) Influence of thermal treatment on polyphenol extraction of wine cv. André. *Czech J Food Sci* **33**, 91–96.

<https://doi.org/10.17221/286/2014-CJFS>

Tao Y, Sun D, Gorecki A, Wioletta B, Lamparski G, Amarowicz R, Jeli T (2012) Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a red wine. *Innov Food Sci Emerg Technol* **16**, 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.09.005>

Tiwari BK, Patras A, Brunton N, Cullen PJ, O'Donnell CP (2010) Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrason Sonochem* **17**, 598-604.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.10.009>

Ugliano M, Kwiatkowski M, Vidal S, Capone D, Siebert T, Dieval JB, Aagaard O, Waters EJ (2011) Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure derived oxygen. *J Agr Food Chem* **59**, 2564–2572. <https://doi.org/10.1021/jf1043585>

Vally H, Thompson PJ (2003) Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Addict Biol* **8**, 3–11. <https://doi.org/10.1080/1355621031000069828>

Viviers MZ, Smith ME, Wilkes E, Smith P (2013) Effects of five metals on the evolution of hydrogen sulfide, methanethiol, and dimethyl sulfide during anaerobic storage of Chardonnay and Shiraz wines. *J Agr Food Chem* **61**, 12385–12396. <https://doi.org/10.1021/jf403422x>

Waterhouse AL, Sacks GL, Jeffery DW (2016) Understanding wine chemistry. John Wiley & Sons, UK, str. 140-148.

Wells A, Osborne JP (2011) Production of SO₂ binding compounds and SO₂ by *Saccharomyces* during alcoholic fermentation and the impact on malolactic fermentation. *S Afr J Enol Vitic* **32**, 267-278. <https://doi.org/10.21548/32-2-1387>

Werner M, Rauhut D, Cottureau P (2009) Yeasts and natural production of sulphites, *Internet journal of enology and viticulture* **12/3**.
<https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto7646-01-1.pdf>

Xia Eq, Deng Gf, Guo Yj, Li Hb (2010) Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci* **11**, 622- 646. <https://doi.org/10.3390/ijms11020622>

Yıldırım H (2020) Alternative methods of sulfur dioxide used in wine production. *J Microb Biot Food Sci* **9**, 675-687. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.675-687>

Zironi R, Comuzzo P, Tat L, Scobioala S (2009) Sulphur dioxide management in low input winemaking. *Internet journal of enology and viticulture* **12/1**.
<https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto7591-01-1.pdf>

Izjava o izvornosti

Ja Fiona Shahini izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Fiona Shahini

Vlastoručni potpis