

# Sastav aromatskih spojeva, aminokiselina i organskih kiselina u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina

---

**Puhelek, Ivana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:153297>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Ivana Puhelek

**SASTAV AROMATSKIH SPOJEVA,  
AMINOKISELINA I ORGANSKIH KISELINA  
U VINIMA KLONSKIH KANDIDATA  
KULTIVARA KRALJEVINA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Ivana Puhelek

**COMPOSITION OF AROMATIC  
COMPOUNDS, AMINOACIDS AND  
ORGANIC ACID IN KRALJEVINA WINES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.



Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Ivana Puhelek

**SASTAV AROMATSKIH SPOJEVA,  
AMINOKISELINA I ORGANSKIH KISELINA  
U VINIMA KLONSKIH KANDIDATA  
KULTIVARA KRALJEVINA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Ana Jeromel

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Ivana Puhelek

**COMPOSITION OF AROMATIC  
COMPOUNDS, AMINOACIDS AND  
ORGANIC ACID IN KRALJEVINA WINES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. Ana Jeromel, Ph.D.

Zagreb, 2016.

## BIBLIOGRAFSKA STRANICA

### Bibliografski podaci:

- Znanstveno područje: Biotehničko područje
- Znanstveno polje: Poljoprivreda
- Znanstvena grana: Vinogradarstvo i vinarstvo
- Institucija: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo
- Voditelj doktorskog rada: prof.dr.sc. Ana Jeromel
- Broj stranica: 159
- Broj slika: 2
- Broj tablica: 27
- Broj grafikona: 24
- Broj priloga: 1
- Broj literaturnih referenci: 403
- Datum obrane doktorskog rada: 16. 12. 2016.
- Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:
  1. Prof.dr.sc. Edi Maletić
  2. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić
  3. Doc.dr.sc. Marin Mihaljević Žulj

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p. 550,  
10 000 Zagreb,

Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 09. rujna 2014. te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 18. studenoga 2014.

## Ocjena doktorskog rada

Ovu disertaciju je ocijenilo povjerenstvo u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Edi Maletić,  
*redoviti profesor u trajnom zvanju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*
2. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić,  
*redovita profesorica Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*
3. Doc.dr.sc. Marin Mihaljević Žulj,  
*docent Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

Disertacija je obranjena na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, 16. prosinca 2016. godine pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Edi Maletić,  

---

*redoviti profesor u trajnom zvanju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagreb*
2. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić,  

---

*redovita profesorica Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*
3. Doc.dr.sc. Marin Mihaljević Žulj,  

---

*docent Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

## Informacije o mentoru:

### Mentor: Prof. dr. sc. Ana Jeromel

Ana (Majdak) Jeromel rođena je 17.02.1972. u Zagrebu, Republika Hrvatska. Nakon završetka „Obrazovnog centra za jezike” u Zagrebu, upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 1996. godine na istom Fakultetu pod mentorstvom doc.dr.sc. Jasmine Marić, na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo, gdje od 1998. godine počinje i raditi u svojstvu mlađeg asistenta. Odmah upisuje i poslijediplomski studij na istom Fakultetu, smjer Bilinogojstvo. Magistarski rad naslova “Utjecaj nekih autohtonih sojeva *Saccharomyces cerevisiae* na kakvoću vina Traminac” obranila je 26.01.2001., pod mentorstvom prof.dr.sc. Stanke Herjavec. Doktorsku disertaciju pod naslovom “Utjecaj različitih metoda otkiseljavanja na kakvoću vina Kraljevina crvena” obranila je 05.07.2005. na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Stanke Herjavec. U zvanje docenta izabrana je 25.04.2007. godine, a zvanje izvanrednog profesora 16.03.2011. godine. U znanstveno zvanje znanstvenog savjetnika izabrana je 26.10.2012. godine dok je u zvanje redovite profesorice izabrana 15. 11. 2016. godine. Od trenutka svog zapošljavanja aktivno sudjeluje u izvođenju nastave, a od 2011. godine nositelj je modula „Vinarstvo” i „Predikatna, pjenušava i specijalna vina” na prediplomskom studiju, smjer Hortikultura te modula „Kemija mošta i vina”, „Tehnologija vina” i „Senzorno ocjenjivanje vina” na diplomskom studiju, a u sklopu poslijediplomskog doktorskog studija, „Odabrana poglavlja iz enokemije”. Od trenutka zapošljavanja aktivno sudjeluje u znanstveno-istraživačkom radu te popularizaciji struke pri čemu je bila suradnik na VIP projektima te voditelj znanstvenog projekta. Član je sljedećih međunarodnih i nacionalnih društava: Hrvatskog enološkog društva, International Society for Horticultural Science te Hrvatske akreditacijske agencije. Od 2006. godine član je Povjerenstva za organoleptičko ocjenjivanje vina i drugih proizvoda od grožđa i vina te je bila član radne podskupine za pripreme pregovora o članstvu u EU za poglavlje 11. (poljoprivreda i ruralni razvitak). U 2010. godini imenovana je članom Povjerenstva za izradu Pravilnika o kategorijama proizvoda od grožđa i vina, enološkim postupcima i ograničenjima te je član Stručne skupine za mikrobiologiju vina pri Organization International du Vigne et Vin (OIV). Dobitnica je Nagrade za posebno vrijedan doprinos u istraživačkoj i nastavnoj djelatnosti Agronomskog fakulteta – godišnje nagrade za asistente – 2004. Aktivno se služi talijanskim i engleskim, a pasivno njemačkim i francuskim jezikom.



*Hvala kolegama te mojoj obitelji koji su mi omogućili da postanem mali dio priče o mojoj i  
Vašoj kraljevini, kraljevini Zelina...*

## SAŽETAK

Kraljevina, autohtoni kultivar Prigorja na područje Svetog Ivana Zeline. ima dugu tradiciju uzgoja, međutim uočena je velika varijabilnost biotipova unutar populacije. Upravo zbog sve većeg interesa za uzgojem Kraljevine kao i nepostojanje matičnih (selekcioniranih) nasada upućivali su na potrebu klonske selekcije. U postupku selekcije klonova uz osnovne pokazatelje rodnosti i kvalitete grožđa potrebno je istražiti i razinu varijabilnosti klonskih kandidata u sintezi pojedinih grupa kemijskih spojeva (hlapivi aromatski spojevi, polifenolni spojevi, aminokiseline, pojedinačne organske kiseline) koji sudjeluju u formiranju senzornih svojstava vina te definiraju njegovu kvalitetu. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi osnovni kemijski sastav te udio pojedinačnih organskih kiselina, aminokiselina i aromatskih spojeva u moštu i vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevine kao i utjecaj soja kvasca na osnovni kemijski sastav, te udio pojedinačnih organskih kiselina, aminokiselina i aromatskih spojeva, te sastav polifenolnih spojeva u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevine. Uz to cilj je bio i definirati senzorna svojstva vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina. Dvogodišnje istraživanje 9 klonskih kandidata (VV-438, VV-406, VV-479, VV-486, VV-483, VV-423, VV-360, VV-434, VV-482) provedeno je u moštu i vinu dobivenom od grožđa iz pokusnih vinograda smještenih u Svetom Ivanu Zelini. Tretmani u istraživanju bili su tretman A: vinifikacija korištenjem komercijalnog soja kvasca Anchor VIN13, i tretman B: vinifikacija korištenjem komercijalnog soja kvasca Uvaferm Affinity. Kemijska analiza mošta i vina obuhvatila je određivanje koncentracije šećera refraktometrijski, ukupnu kiselost titracijskom metodom prema O.I.V.-u, pH vrijednost te određivanje pojedinačnih organskih kiselina te aminokiselina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). U uzorcima vina provedena je osnovna fizikalno-kemijska analiza vina prema metodama O.I.V., pojedinačni polifenoli analizirani su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) dok se određivanje kvalitativnog i kvantitativnog udjela tvari arome provelo primjenom instrumentalne metode plinske kromatografije (GC). Vina su senzorno ocijenjena metodom 100 bodova. Dobiveni rezultati istraživanja ukazali su na značajnu različitost ispitivanih klonskih kandidata pri čemu je klonski kandidat VV-360 u obje godine istraživanja imao najveću koncentraciju nakupljenog šećera kao i koncentraciju pojedinačnih aminokiselina dok se kao klonski kandidat sa najmanjim potencijalom nakupljanja šećera ali i najvećom ukupnom kiselošću nametnuo klonski kandidat VV-479. Po aminokiselinskom profilu 9 istraživanih klonskih kandidata možemo svrstati u tri grupe i to VV-360 u kojem je dominantna aminokiselina arginin, VV-434 u kojoj dominira glutaminska kiselina te preostalih sedam u kojima se aminokiselinski profil nije značajno razlikovao. Prema koncentracijama pojedinačnih organskih kiselina u grupi klonskih kandidata sa višim sadržajem vinske kiseline možemo izdvojiti VV-483, VV-482 i VV-423 dok se višim sadržajem jabučne kiseline nametnuo klonski kandidat VV-434 koji je zajedno sa klonskim kandidatima VV-479 i VV-486 u obje godine imao i niži pH. Rezultati polifenolnog profila ispitivanih klonskih kandidata također su se značajno razlikovali pri čemu je klonski kandidat VV-479 imao najviše hidroksicimetnih kiselina, VV-438 hidroksibenzojevih kiselina, a klonski kandidat VV-360 izdvojio se većim koncentracijama ukupnih flavanola. Aromatski profil dobivenih vina razlikovao se kako između ispitivanih klonskih kandidata tako i korištenog soja kvasca. Kao najzastupljeniji monoterpen izdvojio se linalol kojega je najviše utvrđeno kod klonskog kandidata VV-438. Po vrijednostima C13-norizoprenoida izdvojio se klonski kandidat VV-479 dok je najviše viših alkohola imalo vino od klonskog kandidata VV-486. Pri tome je kod svih klonskih kandidata utvrđen i značajan utjecaj ispitivanih sojeva kvasaca pri čemu je soj Anchor VIN13 utjecao na veću koncentraciju norizoprenoida i monoterpena dok je Uvaferm Affinity stvorio više estera i viših alkohola. Dobiveni rezultati utjecali su i na senzornu ocjenu analiziranih vina pri čemu su se izdvojila vina od klonskih kandidata VV-482 i VV-438 oba dobivena primjenom soja kvasca Anchor VIN13.

**Ključne riječi: Kraljevina, klonski kandidat, aromatski profil, polifenolni profil, aminokiseline, soj kvasca**

## EXTENDED SUMMARY

### COMPOSITION OF AROMATIC COMPOUNDS, AMINOACIDS AND ORGANIC ACID IN KRALJEVINA WINES (*Vitis vinifera* L.)

Kraljevina is an autochthonous grapevine cultivar whose name is closely linked to the area of St. Ivana Zelina. In this area cultivar Kraljevina has a long tradition, however, was observed large variability biotypes within the population. Because of the increasing interest in the cultivation of Kraljevina as well as the lack of selected plantation pointed to the need for the implementation of clonal selection. In the process of selection of clones with basic indicators of fertility and quality of grapes is necessary to investigate the level of variability of clonal candidates in the synthesis of certain groups of chemical compounds (volatile aromatic compounds, polyphenolic compounds, amino acids, individual organic acids) which participate in the formation of the sensory properties of wine and define its quality. The aim of this study was to determine the chemical composition and content of individual organic acids, amino acids and aromatic compounds in must and wine of clonal candidates cv Kraljevina and the impact of yeast strain on the chemical composition and content of individual organic acids, amino acids and aromatic compounds in wines of Kraljevina clonal candidates. In addition, the aim was to define the sensory characteristics of wines made from clonal candidates cv Kraljevina. In the chapter *Overview of previous research* data about cultivar Kraljevina and its general characteristic are noted as well as previous research connected with ampelographic description and basic chemical analysis of Kraljevina must and wine. Also the importance of clonal selection and recent achievements connected with this scientific topic are listed as well as the results dealing with positive clonal selection. Published data about aromatic compounds in must and wine as well as their concentrations, pointed out the influence of wine technology, yeast selection and cultivar as well as selected clone. Strong difference in the amount of individual chemical compounds from the group of monoterpenes and C13 norisoprenoids is defined between Chardonnay selected clones as well as in clones of Kerner, Traminer, Rhine Riesling. Subchapter about polyphenols is dealing with a large and diverse group of chemical compounds that can strongly influence wine quality. So, determination of possible variability between cultivars and also clonal candidate in the accumulation of this group of compounds is important, the statement that is confirmed with large amount of published scientific research dealing with this topic. Research wines of different clonal candidates have shown that it can significantly vary in intensity and color tonality as well as in concentration of individual polyphenols. Phenolic composition, antioxidant activity and color diversity was investigated in Concord grape clones from Brazil while in the wines obtained from seven clones Monastrell significant differences in the mineral composition, organic acids and color intensity was noticed. In the chapter *Material and methods* the course of research and data processing is presented. The two-year study of clonal candidates cv Kraljevina (*Vitis vinifera* L.) was carried out in the must and wine made from grapes grown in experimental vineyards located in Sveti Ivan Zelina, specifically at the position Pušćak and position Krčina. Individual bunches of selected mass positive selection within the "Clonal selection of grapevine, cv. The Kraljevina", are propagated and planted in both locations. This study was conducted on 9 clonal candidates cv Kraljevina (VV-438, VV-406, VV-479, VV-486, VV-483, VV-423, VV-360, VV-434, VV-482) which are separated due to a sufficient number of vines from which a minimal amount of grapes needed for good mikrovinifikacijskog process of alcoholic fermentation was secured. Grape harvest of each clonal candidate was done by hand, at the time of full maturity. The grapes were harvested in plastic boxes with capacity of 20 kg. After crushing the grapes must was settled for 24 h after which the precipitate was separated and clear must was poured in the four vessels, volume of 10 L per each clone candidate (a total of 36 pots). The alcoholic fermentation was carried out using two

different commercial yeast strains, Anchor VIN13 and Uvaferm Affinity. During the alcoholic fermentation degradation of sugar and temperature was regularly monitored. After completion of the alcoholic fermentation samples were taken for analysis of wine and the wine was kept in basement conditions until the time of sensory evaluation that was carried out 6 months after the completion of alcoholic fermentation. Chemical analysis of must involves determining the concentration of sugar, total acidity, the pH value and the determination of individual organic acids and amino acids. In all must samples also the value of free amino acids (FAN) and the concentration of total polyphenols was determined. In wine samples basic chemical analysis was carried on (%vol alcohol, reducing sugar, total extract, total acidity, pH, volatile acidity, ash), as well as organic acid the amino-acids and individual polyphenols and aroma compounds concentrations were done using high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). The concentration of total phenolics and free amino acids in the wine was determined by spectrophotometry. All wines were evaluated by organoleptic method of 100 points. In the chapter *Results*, the main results obtained in the experiment are listed. Research results indicated a significant difference of tested clonal candidates where the clone candidate VV-360 in both years had the highest concentration of accumulated sugar and concentration of individual amino acids. On the contrary the clone candidate VV -479 had the lowest potential for accumulation of sugar but the highest total acidity. According to amino acid profile 9 investigated clonal candidates can be divided into three groups; VV-360 in which the dominant amino acid was arginine, VV-434 dominated by glutamate and the remaining seven in which the amino acid profile was not significantly different. Results of polyphenol profile singled out clone candidate VV-479 who had the most hydroxycinnamic acid, while clone candidat VV-438 was rich in hydroxybenzoic acid and clone candidate VV-360 had the higher concentrations of total flavanols. According to organic acid profile in the group of clonal candidates with a higher content of tartaric acid we can pointed out VV - 483, VV - 482 and VV - 423 while a higher content of malic acid imposed clone candidate VV - 434 which together with the cloning candidate VV - 479 and VV – 486, in both year, had a lower pH. Aromatic profile of wines differed as between examined clonal candidates as between used yeast strains. As the most abundant monoterpene was isolated linalool with the highest concentrations noted in clonal candidate VV-438. Higher values of C13-norizoprenoid pointed out clone candidate VV-479 while the highest amount of higher alcohols had wine from clonal candidate VV-486. In all clonal candidates significant effect of tested yeast strains was established, in which the strain Anchor VIN13 affect the higher concentration of norizoprenoids and monoterpenes while Uvaferm Affinity created more esters and higher alcohols. Sensory evaluation of the analyzed wines singled out clonal candidates VV-482 and VV-438 both obtained using a yeast strain Anchor VIN13. As previous research comprised mainly of biological characteristics of Kraljevina variety this results strongly contribute to expanding knowledge about the composition of individual organic acids, amino acid, aroma and polyphenol compounds and the potential of isolated clonal candidates cv Kraljevina. For the first time the impact of yeast strains used was defined as well as their influence in the formation of the organoleptic properties of the investigated clonal candidates. The research results achived will also in the future have strong impac in the further evaluation of isolated clonal candidates with the ultimate goal of selection - gaining the first clones of this cultivar. So at the end we can conclude that 9 clonal candidates used in this research distinguished between them primarily according to the possibility of accumulating sugar and individual organic acids but also in the aromatic and polyphenol compounds synthesis. In the future this data together with the confirmation of strong yeast strain impact can assure to the wine producer an easier decision what clone as well as yeast strain to use.

**Key words: clonal candidate, Kraljevina, aminoacids, organic acids, aroma and polyphenol profile, yeast strains**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja.....	4
<b>2. PREGLED LITERATURE.....</b>	<b>5</b>
2.1. O Kraljevini.....	5
2.1.1. Klonska selekcija i istraživanje unutar-sortne varijabilnosti.....	7
2.2. Aromatski spojevi.....	10
2.2.1. Terpen.....	13
2.2.2. Norizoprenoidi.....	16
2.2.3. Fermentacijske (sekundarne) arome vina.....	18
2.2.3.1. Viši alkoholi.....	18
2.2.3.2. Esteri.....	21
2.2.3.3. Važnost aromatskih spojeva u postupku klonske selekcije.....	23
2.3. Dušični spojevi.....	26
2.4. Organske kiseline.....	35
2.5. Polifenolni spojevi.....	39
2.5.1. Flavonoidi.....	41
2.5.1.1. Flavanoli (flavan-3-oli).....	42
2.5.1.2. Flavonoli.....	43
2.5.1.3. Kondenzirani tanini.....	44
2.5.2. Neflavonoidni.....	45
2.5.2.1. Hidroksicimetne kiseline.....	45
2.5.2.2. Hidroksibenzojeve kiseline.....	46
2.5.2.3. Stilbeni.....	47
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>49</b>
3.1. Kultivar Kraljevina ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	49
3.2. Klimatske značajke vinogorja Zelina.....	51
3.3. Provođenje pokusa.....	53
3.3.1. Primarna prerada grožđa i vinifikacija.....	53
3.3.2. Kemijska analiza sastava mošta i vina.....	55
3.3.2.1. Osnovna fizikalno – kemijska analiza mošta i vina.....	55
3.3.2.2. Postupak ekstrakcije i određivanje aromatskih spojeva iz vina.....	56
3.3.2.3. Određivanje organskih kiselina.....	56
3.3.2.4. Određivanje slobodnih aminokiselina.....	57
3.3.2.5. Određivanje udjela pojedinačnih fenolnih spojeva u vinu.....	57
3.3.2.6. Određivanje slobodnog $\alpha$ -amino dušika (FAN).....	57
3.3.3. Senzorna analiza vina.....	58

3.3.4. Statistička analiza podataka.....	58
<b>4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>60</b>
4.1. Mošt.....	60
4.1.1. Koncentracija šećera.....	60
4.1.2. Ukupna kiselost.....	62
4.1.3. pH vrijednost.....	64
4.1.4. Pojedinačne organske kiseline.....	65
4.1.5. Slobodni $\alpha$ -amino dušik (FAN).....	66
4.1.6. Aminokiseline u moštu.....	67
4.1.7. Ukupni fenoli.....	71
4.2. Vino.....	74
4.2.1. Osnovni kemijski sastav vina.....	74
4.2.2. Pojedinačne organske kiseline.....	76
4.2.3. Aminokiseline u vinu.....	77
4.2.4. Sastav pojedinačnih polifenolnih spojeva u vinu.....	81
4.2.5. Aromatski spojevi u vinu.....	84
4.2.5.1. Terpeni.....	84
4.2.5.2. Norizoprenoidi.....	90
4.2.5.3. Viši alkoholi.....	94
4.2.5.4. Esteri.....	98
4.3. Senzorna analiza vina.....	101
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>105</b>
5.1. Osnovni kemijski sastav vina.....	105
5.2. Aminokiseline u vinu.....	107
5.3. Polifenolni sastav vina.....	109
5.4. Aromatski spojevi u vinu.....	111
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>115</b>
<b>7. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>118</b>
<b>8. PRILOG.....</b>	<b>146</b>

## POPIS TABLICA

Tablica 1. Masene koncentracije slobodnih terpena ( $\mu\text{g/L}$ ) u aromatičnim i nearomatičnim bijelim vinima proizvedenim u različitim zemljama

Tablica 2. Monoterpeni u vinu, njihove koncentracije, pragovi detekcije, te mirisni opisi u vinu

Tablica 3. Norizoprenoidi u vinu, njihove koncentracije, pragovi detekcije, te mirisni opisi u vinu

Tablica 4. Masene koncentracije viših alkohola ( $\text{mg/L}$ ) u bijelim vinima iz različitih zemalja

Tablica 5. Masene koncentracije estera ( $\text{mg/L}$ ) u bijelim vinima proizvedenim u različitim zemljama

Tablica 6. Najzastupljenije aminokiseline u grožđu i moštu

Tablica 7. Koncentracija šećera ( $^{\circ}\text{Oe}$ ) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Tablica 8. Koncentracije ukupne kiselosti ( $\text{g/L}$ ) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Tablica 9. pH vrijednost moštova klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Tablica 10. Koncentracija organskih kiselina ( $\text{g/L}$ ) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, berba 2011. i 2012. godina

Tablica 11. Slobodni  $\alpha$  – amino dušik (FAN) ( $\text{mg N/L}$ ) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Tablica 12. Koncentracije pojedinačnih aminokiselina u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. godina

Tablica 13. Koncentracije pojedinačnih aminokiselina u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2012. godina

Tablica 14. Koncentracije ukupnih fenola ( $\text{mg/L}$ ) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. i 2012. godine

Tablica 15. Osnovni kemijski sastav vina klonskih kandidata berbe 2011. i 2012. godine

Tablica 16. Koncentracije organskih kiselina ( $\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, berba 2011. i 2012. godina

Tablica 17. Koncentracije pojedinačnih aminokiselina u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. godina

Tablica 18. Koncentracije pojedinačnih aminokiselina u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2012. godina

Tablica 19. Koncentracija pojedinačnih polifenola u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. godina

Tablica 20. Koncentracija pojedinačnih polifenola u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2012. godina

Tablica 21. Vrijednosti ukupnih flavanola, hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. i 2012. godina

Tablica 22. Koncentracije monoterpena u ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. godina

Tablica 23. Koncentracije monoterpena ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2012. godina

Tablica 24. Koncentracija norizoprenoida ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

Tablica 25. Koncentracija pojedinačnih viših alkohola u ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

Tablica 26. Koncentracija pojedinačnih estera u ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

Tablica 27. Senzorna ocjena vina berbe 2011. i 2012. metodom 100 pozitivnih bodova (O.I.V.)

## **POPIS GRAFIKONA**

Grafikon 1. Srednje mjesečne temperature zraka u vegetaciji, Zagreb – Maksimir, 2011 i 2012. god.

Grafikon 2. Količina oborina u vegetaciji, 2011. i 2012. godina

Grafikon 3. Koncentracija šećera ( $^{\circ}\text{Oe}$ ) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Grafikon 4. Koncentracije ukupne kiselosti ( $\text{g/L}$ ) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Grafikon 5. pH vrijednost moštova klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Grafikon 6. Slobodni  $\alpha$  – amino dušik (FAN) ( $\text{mg N/L}$ ) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Grafikon 7. Koncentracije ukupnih fenola ( $\text{mg/L}$ ) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina u 2011. i 2012. godini

Grafikon 8. Analiza glavnih sastavnica (PCA) za pojedine grupe spojeva mošta u 2011. godini

Grafikon 9. Analiza glavnih sastavnica (PCA) za pojedine grupe spojeva mošta u 2012. godini



Grafikon 10. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih aminokiselina za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine

Grafikon 11. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih aminokiselina za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine

Grafikon 12. Koncentracija sume monoterpena ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

Grafikon 13. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih monoterpena za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine

Grafikon 14. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih monoterpena za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine

Grafikon 15. Koncentracija sume analiziranih norizoprenoida ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

Grafikon 16. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih norisoprenoida za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine

Grafikon 17. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih norizoprenoida za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine

Grafikon 18. Koncentracija sume analiziranih viših alkohola ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

Grafikon 19. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih viših alkohola za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine

Grafikon 20. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih viših alkohola za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine

Grafikon 21. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih analiziranih estera za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine

Grafikon 22. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih analiziranih estera za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine

Grafikon 23: Prikaz aromatskih serija vina klonskih kandidata Kraljevine berbe 2011.

Grafikon 24: Prikaz aromatskih serija vina klonskih kandidata Kraljevine berbe 2012.

## **POPIS SLIKA**

Slika 1. Analiza glavnih sastavnica za komponente mošta u 2011.

Slika 2. Analiza glavnih sastavnica za komponente mošta u 2012.

## POPIS KRATICA

N	Broj uzoraka
n.d.	Nije detektirano
TDN	1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen
TPB	1-(2,3,6-trimetilfenil) buta-1,3-dien
°Oe	Oechel
FAN	Free amino nitrogen
YAN	Yeast assimilable nitrogen
DAP	Diamonij fosfat
TCA	Krebsov ciklus
PTFE	Phenex™ Teflon®
OPA	o-ftaldialdehidom
FLD	Fluorescentnim detektorom
HPLC	High pressure liquid chromatography
PCA	Analiza glavnih sastavnica
Glu	Glutamat
Asp	Aspartat
Cys	Cistein
Ser	Serin
His	Histidin
Gly	Glicin
Thr	Treonin
Arg	Arginin
Ala	Alanin
Tyr	Tirozin
Val	Valin
Met	Metionin
Phe	Fenilalanin
Ile	Izoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lizin
ANOVA	Analiza varijance

# 1. UVOD

Hrvatski sortiment danas čini oko 200 različitih kultivara, od kojih se gotovo 120 može smatrati autohtonim, bilo da im je dokazano podrijetlo ili da se uzgajaju isključivo u hrvatskim vinogorjima (Maletić i sur., 2008). Autohtoni sortiment kontinentalne Hrvatske sveden je na svega nekoliko važnijih kultivara, a posljedica je to kontinuiranog smanjivanja njihovog broja u nedavnoj prošlosti uslijed popularizacije internacionalnog sortimenta.

Kraljevina je autohtoni kultivar Prigorja i iako je proširena na relativnom velikom području sjeverozapadne Hrvatske njeno ime se usko veže uz područje Svetog Ivana Zeline gdje uživa poseban status jer kod gotovo svih tamošnjih vinara predstavlja „bazno“ vino. Na tom području kultivar Kraljevina ima dugu tradiciju, međutim uočena je velika varijabilnost biotipova unutar populacije (Mirošević, 2003).

Kultivar Kraljevina uzgajala se i u najužem središtu grada Zagreba, gdje je ustupila mjesto uspinjači. Također, česta je bila i na drugim zagrebačkim „bregima“, ali su širenjem grada vinogradi postupno nestajali.

Godinama zapostavljeni kultivar počeo je oživljavati zahvaljujući prije svega projektu „Stvaranje županijske marke vina „ koji je inicirala Zagrebačka županija i mnogi stručnjaci koji su uočili da posebnosti ovog kultivara, koji karakterizira Prigorje, vrijedi i treba očuvati, pa je 2002. godine dobila status „Županijske robne marke“, što je dodatno pridonijelo njezinoj popularnosti i tržišnom opstanku. Vina ovog kultivara pod imenom „Kraljevina Zelina“ čine robnu marku vina Zagrebačke županije.

Na Izložbi vina kontinentalne Hrvatske koja se već gotovo pola stoljeća održava u Svetom Ivanu Zelini vina Kraljevine se posebno ocjenjuju, a najbolje od njih dobiva i tradicionalnu nagradu. Osim toga u Prigorju ćete čuti i priču kako su u zelinskoj Kraljevini uživali mnogi uglednici kroz povijest, između ostalih i Ludwig van Beethoven. Zasluge za to pripadaju grofici Ana Mariji Erdödy (1779–1837), koja je imala posjed u Sv. Ivanu Zelini. Navodno je bečki skladatelj upravo njoj slao čuvena pisma naslovljena „svojoj besmrtnoj ljubavi“, a ona njemu vina Kraljevine!

Danas u Hrvatskoj postoji veliki broj autohtonih kultivara koje su kao i Kraljevina bezrazložno zapostavljeni, te jedino pravom procjenom njihovih svojstava moguća je i njihova revitalizacija sa svrhom njihovog podizanja na gospodarski značajnu razinu. A

preduvjet postizanja optimalnog omjera kvalitete i kvantitete sirovine kojom će se proizvesti vina visoke kakvoće je proizvodnja kvalitetnog sadnog materijala.

Upravo zbog sve većeg interesa za uzgojem Kraljevine, koja je nekad bila najzastupljeniji kultivar sjeverozapadne Hrvatske, kao i nepostojanje matičnih (selekcioniranih) nasada upućivali su na potrebu za provedbom klonske selekcije. Klonska selekcija je najvažnija metoda oplemenjivanja i ima veliki potencijal u poboljšanju genetičke osnove sadnog materijala, a cilj joj je izdvojiti genotipove sa pozitivnim nasljednim karakteristikama, razmnožiti ih i nakon dugotrajne evaluacije potvrditi klonove koji daju sigurnije urode, višu kvalitetu grožđa, veću sposobnost nakupljanja šećera što sve vodi ka poboljšanju krajnjeg proizvoda, vina. Stoga je Kraljevina jedna od autohtonih kultivara vinove loze u Hrvatskoj na kojoj je 2003. godine započeo proces revitalizacije kroz klonsku selekciju. Tako je na području Svetog Ivana Zeline izdvojeno oko 100 elitnih trsova koji su razmnoženi u tzv. klonske linije, cijepljeni na dvije bezvirusne podloge, i posađene na dvije različite lokacije.

Klonsko potomstvo pokazuje sva tipična svojstva kultivara i odsustvo tipičnih simptoma bolesti, ali se u pravilu kao posljedica mutacije pozitivno izdvajaju u nekome svojstvu od osnovne populacije. S obzirom na veliku važnost autohtonih kultivara vinove loze u vinogradarskoj proizvodnji nužno je provođenje postupaka klonske selekcije jer se jedino na taj način može osigurati zdrav i kvalitetan sadni materijal, spriječiti daljnje širenje gospodarski štetnih virusa te izdvojiti klonove kod najznačajnijih kultivara kako bi se omogućilo vinogradarima da odabirom odgovarajućeg klona unaprijede svoju proizvodnju. Stoga je potrebno tijekom selekcije istražiti razlike između klonskih kandidata. Klonska selekcija je skup i dugotrajan proces, ali nesumnjivo opravdan i dugoročno isplativ.

S obzirom na činjenicu da je individualna klonska selekcija dugotrajan proces koji obično traje od 18-25 godina (Maletić i sur., 2008), a zbog istovremeno potrebe za poboljšanjem kvalitete sadnog materijala kultivara Kraljevina pokrenuto je istraživanje u sklopu projekla „Klonska selekcija cv. Kraljevina (*Vitis vinifera* L.)”.

Pored osnovnih vinogradarskih svojstava kojima se uobičajeno opisuju klonski kandidati (rodnost, veličina grozda i bobice, zbijenost i sl.) vrlo je važno obratiti pozornost na kvalitetu grožđa tj. provesti odgovarajuće fizikalno kemijske analize koje će dati odgovor na konkretna pitanja vinara vezana za tehnologiju i/ili kvalitetu njihovog vina. Sukladno opće prihvaćenim metodama klonske selekcije kao pokazatelj kakvoće grožđa analizira se koncentracija nakupljenog šećera (refraktometrijski), ukupna kiselost i pH vrijednost, na razini prosječnog uzorka klonskog kandidata. Kako se radi o vinskoj sorti, i kako su

očekivane i vrlo male razlike uslijed mutacija pojedinačnih gena, informacije dobivene analizom samo tih parametra ne omogućavaju detaljan uvid u kompleksne razlike kakvoće grožđa i vina između pojedinih klonskih kandidata.

Danas je identifikacija spojeva koji utječu na aromu i okus vina jedan od najznačajnijih izazova znanstvenih istraživanja u području vina i vinske industrije (Botelho, 2008). Stoga je i u postupku selekcije klonova uz osnovne pokazatelje rodosti i kvalitete grožđa potrebno istražiti i razinu varijabilnosti klonskih kandidata u sintezi pojedinih grupa kemijskih spojeva (hlapivi aromatski spojevi, polifenolni spojevi, aminokiseline, pojedinačne organske kiseline) koji sudjeluju u formiranju senzornih svojstava vina te definiraju njegovu kvalitetu.

Istraživanjem arome grožđa i vina klonova Chardonnaya, te definiranjem njihove različitosti s obzirom na aromatski profil bavili su se istraživači poput Versini i sur. (1988); Villa i sur. (1993); Scienza i sur. (1994); Battistutta i sur., 1996; Bettiga (2003). Rusjan i sur. (2009) utvrdili su da je aromatski profil grožđa i vina jedan od najdiskriminantnijih čimbenika kompleksnosti i prepoznatljivosti kultivara te njihovo određivanje treba biti jedan od kriterija definiranja različitosti vina klonskih kandidata. Rezultati istraživanja vina različitih klonskih kandidata pokazala su da se ona mogu značajno razlikovati u intenzitetu i tonalitetu boje, aromatskom profilu i koncentraciji pojedinačnih polifenola (Santesteban i Royo, 2006).

Istraživanja utjecaja soja kvasaca na organoleptična svojstva vina obuhvaćaju veliki broj različitih grupa kemijskih spojeva pa su tako Valero i sur. (2003) definirali različitosti u aminokiselinskom profilu vina zavisno od korištenog soja kvasca, a Swiegers i sur. (2009) ukazali su na značajan utjecaj kvasaca pri formiranju aromatskih karakteristika pojedinog vina.

Svi spomenuti rezultati istraživanja ukazuju na komplektnost istraživnog područja te opravdanost njihovog provođenja sa svrhom izdvajanja klonova koji zadržavaju sortnu prepoznatljivost, uz poboljšanje jednog ili više specifičnih svojstava dotičnog kultivara.

Dosadašnja znanstvena istraživanja obuhvatila su uglavnom biološke karakteristike kultivara Kraljevine, međutim detaljna istraživanja kemijskog sastava i kakvoće vina gotovo i nema. Stoga će predloženo znanstveno istraživanje doprinijeti spoznajama o sastavu pojedinačnih organskih kiselina, te aromatskom i aminokiselinskom potencijalu izdvojenih klonskih kandidata kultivara Kraljevine. Po prvi puta definirat će se utjecaj

korištenih sojeva kvasaca na formiranje senzornih svojstava istraživanih klonskih kandidata. Rezultati istraživanja pomoći će u daljnjem vrednovanju izdvojenih klonskih kandidata s konačnim ciljem selekcije – dobivanjem prvih klonova ovoga kultivara.

## 1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Pretpostavka je da će izdvojeni klonski kandidati kultivara Kraljevina

- značajno utjecati na sintezu i sastav aminokiselina, pojedinačnih organskih kiselina i aromatskih spojeva u moštu i vinu Kraljevine.

Pretpostavka je da će korišteni sojevi kvasaca

- značajno utjecati na kemijski sastav vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina
- značajno utjecati na mirisna i okusna svojstva vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina

Cilj istraživanja je utvrditi:

- osnovni kemijski sastav te udio pojedinačnih organskih kiselina, aminokiselina i aromatskih spojeva u moštu i vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevine
- utjecaj soja kvasca na osnovni kemijski sastav, te udio pojedinačnih organskih kiselina, aminokiselina i aromatskih spojeva u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevine
- senzorna svojstva vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. O Kraljevini

Kraljevina je autohtoni kultivar Prigorja. Iako je proširena na relativnom velikom području, njeno ime se usko veže uz područje Svetog Ivana Zeline gdje se i najviše uzgaja. Na ovom području kultivar Kraljevina ima dugu tradiciju, međutim uočena je velika varijabilnost biotipova unutar populacije (Mirošević, 2003).

Veliki broj pisanih navoda ističe prisutnost Kraljevine u vinogradarskom sortimentu kontinentalne Hrvatske od davnina, te iznose tezu o njezinoj autohtonosti (Trummer, 1841; Turković, 1955). Već 1883. godine njezinu prisutnost u hrvatskim krajevima navode Babo i Mach koji smatraju Kraljevinu originalnim hrvatskim kultivarom, s čime se slaže i austrougarski ampelograf Franz Xaver Trummer koji 1841. godine u svom poznatom djelu *Systematische Classification und Beschreibung der im Herzogthume Steiermark vorkommenden Rebensorten* piše: „To je stara autohtona sorta vinove loze, vjerovatno podrijetlom iz vinogorja sjeverozapadne Hrvatske, gdje je vodeća sorta u sortimentu Zagrebačkog i Zelinskog vinogorja”. Autor opisuje prema tadašnjoj metodologiji osnovna svojstva ovog kultivara navodeći da postoje razlike unutar populacije.

Istog je mišljenja i Praunsperger (Šatović, 2000) koji u članku iz 1857. godine "Mijenje o nazivoslovlju trsova Hrvatske" u Gospodarskom listu govori o dva tipa Kraljevine. Mišljenje je da je "Imbrina" rodnija, a tip s crvenijom kožicom pripada nazivu "Kraljevina" kako je zovu oko Zagreba.

Vukotinović u Gospodarskom listu 1857. godine (Šatović, 2000) donosi pregled sinonima sorte Kraljevina (Crljena imbrina, Kraljevina, Žarjavina, Mavrona, Brina, Kraljevina, Librina, Muravšnina) navodeći da je kultivar rasprostranjen po cijeloj Hrvatskoj, ali da je njezina prava domovina gora Susedska, Vrabče, Šestine, Sv. Šimun, Moravče, Psarjevo i Sv. Ivan.

Babo i Mach (1883) Kraljevinu svrstavaju među originalne hrvatske kultivare i navode sinonim "Konigstraube", Rotter Portugizer, Brina i Moravana. Prema istim autorima na dobrim položajima i u dobrim godinama postiže oko 20% šećera i 6 g/L ukupnih kiselina.

I domaći autori u svojim radovima spominju Kraljevinu, pa tako još 1923. Radić piše: "Kraljevina crvena najviše je raširena u Hrvatskoj, zagrebačkoj okolini, sorte ponajbolje, a u narodu je poznata kao Kraljevina i Imbrina. Kraljevina je oblikom grozda rijetkih crvenih bobica i ugodnog mirisa, dok je grozd Imbrine gust, a bobica zelenkasto-crvenkasta. Postiže oko 20% šećera i 6-7 g/L ukupnih kiselina". Turković (1955) u svom razmatranju o razvoju sortimenta vinove loze ističe da moramo voditi računa o autohtonim kultivarima, ponajprije u smislu rada na njihovoj selekciji. Istog su mišljenja i drugi autori: Licul, Mirošević, Premužić, Mežnarić, Vičić (1979), koji ističu potrebu detaljnog rada na tipskoj i individualnoj klonskoj selekciji Kraljevine, kako bi se rasvijetlile agrobiološke razlike, a time utvrdile gospodarske vrijednosti svakog pojedinog tipa unutar populacije.

U izvješću o sastavu mošta kultivara sjeverne Hrvatske Sučević (1950) spominje moštve Imbrine ili Kraljevine s dosta malom količinom sladora (od 16,0% do 18,0%), iako je bilo boljih uzoraka (24% do 26% šećera) koji su vjerojatno potjecali s boljih položaja ili od odabranih trsova. U svom stručnom osvrtu o Kraljevini Felja (1973) navodi tri tipa Kraljevine: crvenu, mirisavu i zelenu, koje se međusobno razlikuju po veličini grozda, obojenosti kože bobica i po kakvoći.

Prema jednom od novijih ampelografskih opisa Kraljevine (Mirošević i sur, 1986) postoje tri tipa ovoga kultivara: Kraljevina crvena, Kraljevina zelena i Kraljevina pikasta, a ova posljednja zove se još i Kraljevina dišeča. Kao i većina kultivara i ovaj pokazuje značajne razlike ovisno o položaju i tehnologiji, te se često ističu klonske razlike. To je bio i razlog pokretanja projekta klonske selekcije Kraljevine, gdje je visoka unutarSORTNA raznolikost i dokazana, ali je također utvrđeno da su ove karakteristike i u direktnoj vezi s tehnologijom uzgoja.

Iz svih naprijed navedenih bibliografskih podataka vidi se da je unutar Kraljevine izražena varijabilnost, koja upućuje na potrebu selekcije.

Sučević (1950) iznosi podatke o ukupnoj kiselosti od 6,6 do 10,57 g/L, uz pH 3,10 do 3,40.

Uz primjenu odgovarajućih agrotehničkih i ampelotehničkih mjera u moštu nakuplja do 18% sladora, a ovisno o godini ukupna kiselost varira od 6,0 – 9,0 g/L (Mirošević, 2003). Istraživanje sastava pojedinačnih organskih kiselina kultivara Kraljevina ukazala je na varijabilnost ovisno o istraživanom vinogradarskom položaju (Jeromel, 2005).



Na kraju citat zelinskog župnika Dragutina Stražmira iz 1870. godine, koji u svojoj knjizi „Vinogradar“ piše: „Imbrina (Kraljevina) daje vrlo sladko, voljko vino, jako se je mnogo sadi u našoj okolici čak preko Zagreba; radi svoga ugodnoga teka računa se groždje i medju zobatice. Vino od same Imbrine, kažu, da se rado ne drži, nu g. Al Štriga u Zagrebu, vrli vinogradar, tako plemenito mirisno vino iz nje izvadja, da je ljetos 300 flašah od pol oke svaku po 3 fr. gospodi prodao. Evo što pamet i znanje valja. Groždje od toga trsa u nizi i hladovini ostaje bliedo i rado gnijije, u visu liepih, zdravim plodom rodi.“

### 2.1.1. Klonska selekcija i istraživanje unutarsoortne varijabilnosti

Klonska selekcija danas je najvažniji način oplemenjivanja vinove loze. Naime, zbog teškog uvođenja novih sorata na neko područje, u velikoj mjeri uvjetovanog favoriziranjem tradicionalnih (tzv. starih) kultivara od strane potrošača, oplemenjivanjem se nastoje poboljšati postojeći (Preiner i sur., 2012). Oplemenjivanje vinove loze podrazumjeva skup metoda i postupaka kojima se stvara osnova za proizvodnju sadnog materijala poboljšanih nasljednih agronomskih svojstava koja se prenose i zadržavaju vegetativnim razmnožavanjem (Maletić i sur., 2008). U svijetu se oplemenjivanjem vinove loze bave mnogi znanstvenici s ciljem da njihovi rezultati budu od pomoći proizvođačima vina u postizanju visoke kvalitete proizvoda.

Zbog velike potražnje sadnog materijala autohtonih kultivara, plemke za njihovu proizvodnju često su uzimane iz proizvodnih nasada, bez prethodno provedenog postupka selekcije. S obzirom na veliku važnost autohtonih kultivara vinove loze u vinogradarskoj proizvodnji nužno je provođenje postupka klonske selekcije čime se jedino može osigurati zdrav i kvalitetan sadni materijal, spriječiti daljnje širenje gospodarski štetnih virusa, te izdvojiti klonove kod najznačajnijih kultivara kako bi se omogućilo vinogradarima da odabirom klona pojedinog kultivara unaprijede svoju proizvodnju (Preiner, 2012).

Klonska selekcija se temelji na unutarsoortnoj varijabilnosti, kao posljedici akumuliranja mutacija tijekom dugotrajnog vegetativnog razmnožavanja. Dugotrajnom propagacijom bez sustavne selekcije kultivar gubi proizvodni potencijal odnosno gubi neke značajke koje ga karakteriziraju zbog pojave i akumulacije mutacija koje mogu biti pozitivne i negativne. Klonska selekcija je postupak kojim se iz populacije kultivara izdvajaju trsovi (potencijalni klonovi) kod kojih uočavamo pozitivne promjene nekog od gospodarski važnih svojstava (Preiner, 2012).

Kako se proces klonske selekcije započinje odabirom elitnih trsova iz populacije i to najčešće isključivo temeljem njihovog fenotipa, važno je provesti klonsku selekciju na način da se okolinski utjecaji svedu na grešku koja se nalazi u domeni prihvatljivosti.

Početak moderne klonske selekcije doseže u daleku 1876. godinu, kad je u Njemačkoj započeto dvadesetogodišnje istraživanje potomaka jednog trsa što je u konačnici rezultiralo registracijom prvog klona (Schön i sur., 2009). Od tada pa do danas je svrha klonske selekcije da proizvođačima grožđa i vina omogući izbor klonova i njihovih bezvirusnih loznih cjepova koji zadržavaju sortnu prepoznatljivost, ali s poboljšanim jednog ili više aromatskih svojstava dotičnog kultivara (Loureiro i sur., 2011).

Provedba klonske selekcije započela je krajem 19. stoljeća u Njemačkoj, a u ostalim Europskim zemljama tek polovicom 20. stoljeća (Nicholas, 2006). Prvi znanstveno utemeljeni dokazi o postojanju klonskih razlika i opravdanosti klonske selekcije vinove loze pojavljuju se u prvoj polovici 20. stoljeća (Sartorius, 1926).

Klonska selekcija je za našu zemlju objektivno najvažnija metoda oplemenjivanja i ima veliki potencijal u poboljšanju genetičke osnove sadnog materijala (Maletić i sur., 2008). Isto tako Republika Hrvatska danas ima preko 100 sačuvanih autohtonih kultivara vinove loze, a masovna pozitivna klonska selekcija i zdravstvena provjera pokrenuta je na 15 ekonomski važnih kultivara (Karoglan Kontić i sur., 2009), dok se na području klonske selekcije najdalje stiglo kod Škrleta bijelog, Žlahtine i Plavca malog, te Graševine. Više je autora istraživalo genetsku varijabilnost populacije Škrleta kao posljedicu spontanijh mutacija, a koja se prenosi i akumulira vegetativnim razmnožavanjem (Vokurka, 2003; Šimon i sur., 2008.; Šimon, 2012.; Petric, 2013), što je dovelo do različite gospodarske vrijednosti genotipova od kojih su neki vrijedni daljnjeg razmnožavanja. Fenotipsku varijabilnost unutar kultivara Plavac mali crni, najvažnijeg hrvatskog kultivara istraživali su Zdunić i sur. (2007) , Zdunić (2009), Preiner (2012) i Šimon (2012).

Klonska selekcija Kraljevine započela je 2003. godine na inicijativu proizvođača grožđa i vina kultivara Kraljevina, Zagrebačke županije, grada Svetog Ivana Zelina i stručnjaka s Agronomskog fakulteta, te je pod vodstvom prof.dr.sc Edija Maletića i prof.dr.sc. Ivana Pejića pokrenut projekt „Klonska selekcija cv. Kraljevina (*Vitis Vinifera L.*)”, sa ciljem definiranja razlika i rješanjem dileme o u literaturi spominjanim tipovima Kraljevine (crvena, pikasta, zelena). Ovaj projekt započeo je masovnom pozitivnom selekcijom u proizvodnim nasadima, a konačni cilj je dobivanje klonova kod kojih su jasno izražene pozitivne promjene proizvodnih svojstava te koji su slobodani od gospodarski štetnih

viroza. Na ovaj način se uspješno povećao prinos i kvaliteta Rizlinga rajnskog u Njemačkoj i Pinota crnog u Francuskoj (Jackson, 1993) kao i brojni drugih kultivara.

Rezultati masovne pozitivne klonske selekcije kultivara Kraljevina pokazali su značajnu varijabilnost kvalitativnih i kvantitativnih svojstava promatranih matičnih trsova, kao što su prinos po trsu, sadržaj šećera, kiselina i pH vrijednosti mošta, te masa grozda i bobice tijekom trogodišnjih ispitivanja. To ukazuje na veliku unutar-sortnu varijabilnost populacije Kraljevina, a klonski kandidati koji su pokazali najbolje rezultate i najmanju oscilaciju između pojedinih godina istraživanja izdvojeni su kao najperspektivniji za konačni cilj selekcije – prve klonove ovoga kultivara (Preiner i sur., 2009).

Preiner i sur., (2009) utvrdili su kako postoji statistički značajne razlike između matičnih trsova klonskih kandidata u visini prinosa, dok kod sadržaja šećera i kiselina u moštu, te pH vrijednosti mošta nema statistički značajnih razlika.

Unutar-sortnu varijabilnost moguće je sa sigurnošću potvrditi tek nakon nekoliko godina istraživanja vegetativnog potomstva odabranih matičnih trsova slobodnih od gospodarski štetnih virusa u pokusnim nasadima u kojima su maksimalno ujednačeni okolinski uvjeti, a to su ujedno i uvjeti za ispitivanje klonskih kandidata u postupku klonske selekcije. Postojanje unutar-sortne varijabilnosti potvrđeno je na ovaj način za prinos i njegovu kvalitetu kod najvažnijih kultivara kao što su Chardonnay, Pinot crni, Cabernet sauvignon (Wolpert, 1994), Rajnski rizling (Schmid i sur., 1995), ali i za brojnih drugih.

Dobar primjer postojanja genetske unutar-sortne varijabilnosti je kultivar Pinot bijeli i Pinot crni, pa je tako u istraživanju koje je provedeno na 44 klona kultivara Pinot crni u Geisenheimu (Njemačka), kroz šest godina utvrđena velika međuklonska varijabilnost u prinosu, ukupnoj kiselosti i otpornosti na *Botrytis cinerea*, dok je sadržaj suhe tvari (°Brix) pokazivao malu varijabilnost između klonova (Schön i sur., 2009). Necula i sur. (2009) utvrdili su da kemijski sastav mošta (sadržaj reducirajućeg šećera, ukupna kiselost i pH) može pokazivati međusobne klonske različitosti.

McCartny (1992) je uspio utvrditi razlike u sadržaju terpenkih spojeva (aromatski spojevi) između klonova muškate sorte *Muscat a petit grais blanc*. Gómez-Plaza i sur., (1999) ispitali su razlike u sadržaju aromatskih sastojaka u vinu sedam klonova kultivara Monastrell. Temeljem signifikantnih razlika kod nekoliko aromatskih komponenti klonovi su grupirani primjenom diskriminantne analize.

Istraživači diljem svijeta pokušavaju procijeniti i opisati klonove u Burgundiji, Champagni, Australiji, Kanadi, New Yorku, Oregonu, Kaliforniji (Anderson i sur., 2008). Pojedina istraživanja na temelju ampelografskih opažanja su vrlo bitna jer promatrane klonske karakteristike mogu varirati od regije do regije (Cirami i Ewart, 1995), najvjerojatnije zbog utjecaja tla te mikroklimne pojedinog područja.

U Francuskoj je provedena klonska selekcija Pinota crnog za proizvodnju pjenušavih vina (Collas i sur., 1995) gdje se traže klonovi sa višom ukupnom kiselošću, višim prinosima, manjim sadržajem antocijana i tanina u odnosu na klonove za proizvodnju vina redovne berbe.

U kalifornijskim vinogradima izabrano je 12 klonova Pinota crnog za proizvodnju pjenušca koji se koriste u regiji Champagne, te su uspoređeni sa 8 kalifornijskih klonova (Anderson i sur., 2008). Rasponi titracijske kiselosti i pH vrijednosti klonova su bile statistički značajne, dok rezultati fenola nisu zabilježeni u istraživanju.

Relativne karakteristike pojedinih klonova također se razlikuju u istraživanjima provedenim u drugim regijama, naznačavajući da klonovi drugačije reagiraju pod drugim uvjetima. U istraživanju kojeg je proveo Mercado – Martin i sur., 2006 zabilježili su veće razlike između klonova Pinot crnog nego između klonova Chardonnay-a.

## 2.2. Aromatski spojevi

Aroma vina je vrlo kompleksno svojstvo koje je rezultat međudjelovanja kemijskih spojeva u vinu te osjeta mirisa i okusa. Aromu čine aromatski spojevi iz grožđa, kao i spojevi koji se formiraju tijekom i/ili nakon alkoholne fermentacije. Do sada je identificirano nekoliko stotina aromatskih komponenti sa širokim rasponom malih koncentracija koje se izražavaju u mg/L, µg/L ili ng/L (Rapp, 1988). Podrijetlo arome u vinu je predmet velikog broja istraživanja u posljednje vrijeme zahvaljujući napretku analitičkih metoda koje nam pomažu u detekciji tih spojeva (Güth, 1997; López i sur., 1999; Ferreira i sur., 2000; Francis i Newton, 2005; Polášková i sur., 2008; Ebeler i Thorngate, 2009).

Hlapivi aromatski spojevi obuhvaćaju alkohole, aldehide, estere, ketone, terpene, ugljikovodike, norisoprenoide i dr. (Iland i sur., 2011; Jackson, 2014; Ribéreau-Gayon i sur., 2006a,b), a potječu iz nekoliko izvora, i to: iz grožđa, procesa vinifikacije, metabolizma kvasaca i bakterija, hrastovine i starenja vina (Jackson, 2014; Ribéreau-Gayon i sur., 2006a,b; Ferreira, 2010). Rapp (1988) navodi da je aromatski profil vina pod

utjecajem brojnih čimbenika: okoline (tlo, klima), kultivara, dozrelosti, uvjeta fermentacije (pH, temperatura, vrsta kvasca), bioloških čimbenika (soj kvasca), proizvodnog procesa vina i starenja.

Aromatski spojevi koji potječu iz grožđa značajno utječu na senzorni profil budućeg vina. Kultivari se međusobno razlikuju s obzirom na sadržaj aromatskih spojeva, što u konačnici daje vinu tipični sortni karakter. Ovo je posljedica jedinstvenog genetskog profila svakog kultivara. Isto tako, vina proizvedena od istog kultivara u različitim uzgojnim područjima daju vina različitih senzornih karakteristika. Kombiniranjem analitičkih i organoleptičkih metoda nastojimo utvrditi interakciju između hlapivih i nehlapivih komponenti vina (Pineau i sur., 2007; Robison i sur., 2009; Sáenz-Navajas i sur., 2010), kao i međusobni odnos hlapivih spojeva (Atanasova i sur., 2005; Escudero i sur., 2007; Pineau i sur., 2009).

S obzirom na podrijetlo, aromatski spojevi se mogu podijeliti u nekoliko grupa:

*Primarna (sortna) aroma* – čine ju spojevi koji potječu izravno iz grožđa poput monoterpena, norizenoprenoida, fenilpropanoida, metokspirazina, te hlapivih sumpornih spojeva (Ebeler i Thorngate, 2009; González-Barreiro i sur., 2013). Navedeni spojevi mogu se koristiti za identifikaciju kultivara (Marais, 1983; Rapp i Mandery, 1986), a karakteristična aroma vina određenog kultivara se prepisuje primarnim aromatskim spojevima jer ti spojevi prelaze iz grožđa u vino nepromjenjeni, oslobođeni utjecaja procesa fermentacije. Najvažniju skupinu spojeva grožđa koji najviše doprinosi aromatskoj prepoznatljivosti kultivara jesu monoterpeni (Ribéreau – Gayon, 2006; Câmara i sur., 2007) te C13 norizoprenoidi (Mateo i Jimenez, 2000).

*Sekundarna (fermentacijska) aroma* – čine ju spojevi koji se oslobađaju tijekom prerade grožđa djelovanjem određenih enzima kao i spojevi koji nastaju tijekom alkoholne i malolaktične fermentacije. Sekundarni metaboliti nastali mikrobiološkom aktivnošću iz šećera, masnih kiselina, dušičnih spojeva (pirimidina, proteina, nukleinskih kiselina, aminokiselina), i fenolnih kiselina koje nalazimo u grožđu (Chatonnet i sur., 1992; Herraiz i Ough, 1993; Guitart i sur., 1999; Hernández-Orte i sur., 2002; Swiegers i sur., 2005; Bartowsky i Pretorius, 2009). Ova skupina obuhvaća grupu spojeva kao što su esteri viših alkohola i masnih kiselina, više alkohole i hlapive fenole.

*Tercijarna aroma* – čine ju spojevi arome nastali tijekom dozrijevanja i starenja vina kao posljedica biokemijskih reakcija hidrolize, esterifikacije i oksidacije.

Pojedini autori su definirali kultivar temeljem najzastupljenijih aromatskih spojeva (Rosillo i sur., 1999) ili preko dominantnih grupa aromatskih spojeva (Günata i sur., 1985.; Sefton i sur., 1993) što je značajno doprinjelo identifikaciji mirisa tih aktivnih spojeva kao

predstavnik pojedinih kultivara. No, miris kao sortna prepoznatljivost ne ovisi o jednom ili dva spoja, već o mirisnoj kombinaciji svih zastupljenih aromatskih spojeva u grožđu odnosno vinu (Robinson, 2011).

Istraživanjem arome grožđa i vina klonova Chardonnaya, te definiranjem njihove različitosti s obzirom na aromatski profil bavili su se istraživači poput Versini i sur. (1988); Villa i sur. (1993); Scienza i sur. (1994); Battistutta i sur., (1996); Bettiga (2003).

Schoeffling i Faas (1990) istraživali su razlike među klonovima Kerner, Traminca, Rajnskog rizlinga i Rizvanca te temeljem dobivenih rezultata zaključili da je kromatografska analiza klonova jedan od najvažnijih kriterija u njihovoj karakterizaciji.

Različitosti među klonovima Touriga Nacional istraživalo je Falco (2004) dok je Rodrigues i sur. (1996) proveo analizu aroma šest klonova kultivara Fernão Pires. Prema Rusjan i sur. (2009) aromatski profil grožđa i vina jedan je od najdiskriminantnijih čimbenika kompleksnosti i prepoznatljivosti kultivara te njihovo određivanje treba biti jedan od kriterija definiranja različitosti vina klonskih kandidata.

Istraživanja vina različitih klonskih kandidata pokazala su da se ona mogu značajno razlikovati u aromatskom profilu i koncentraciji pojedinačnih polifenola (Santesteban i Royo, 2006).

Swiegers i sur. (2009) ukazali su na značajan utjecaj kvasaca pri formiranju aromatskih karakteristika pojedinog vina, dok su rezultati istraživanja utjecaja autohtonih kvasaca na kakvoću vina Traminac ukazala na njihovu različitu sposobnost sinteze aromatskih spojeva.

U nekim istraživanjima, znanstvenici su uspjeli razdvojiti pojedine kultivare na osnovu nekih pojedinačnih dominantnih aromatskih spojeva, ili grupe aromatskih spojeva (Noble i sur., 1980; Günata i sur., 1985; Rosillo i sur., 1999; Sefton i sur., 1993). Na osnovu ovih istraživanja, možemo zaključiti kako sortni karakter nije ovisan o jednom aromatskom spoju već o cijelom nizu aromatskih spojeva koji čine aromatski profil pojedinog kultivara.

U bobici grožđa postoje stotine sastojaka koji potencijalno mogu utjecati na okus i aromu vina. Neki spojevi iz grožđa postaju mirisni spojevi vina jer se ne mijenjaju ili se vrlo malo mijenjaju tijekom fermentacije kao npr. monoterpeni. Međutim spojeve arome vina mogu proizvesti i kvasci uz pomoć prekursora iz grožđa. Nadalje razvoj arome tijekom fermentacije može biti pod utjecajem spojeva iz grožđa.

### 2.2.1. Terpeni

Terpeni (terpenoidi, izopreni) su metaboliti biljaka karakterističnog mirisa i okusa te vrlo značajni predstavnici primarne ili sortne arome grožđa i vina. Terpeni u vinu se proučavaju već dugi niz godina s obzirom da su odgovorni za tipični aromatski profil muškatnih kultivara (Ribéreau-Gayon i sur., 1975; Marais, 1983). Zbog svojeg niskog praga senzorne detekcije, značajni su i u nearomatičnim kultivarima (Vilanova i Sieiro, 2006). Iako je njihova koncentracija u nearomatičnim kultivarima mnogo manja nego u muškatnim, često su predmet istraživanja, najčešće pod utjecajem procesa maceracije ili dodataka egzogenih enzima (Reynolds i sur., 1993; Cabaroglu i sur., 1997; Selli i sur., 2006b; Peinado i sur., 2004; Rocha i sur., 2005; Cabrita i sur., 2006; Vilanova i Sieiro, 2006; Sanchez Palomo i sur., 2006; Rodriguez Bencomo i sur., 2008).

Terpeni mogu postojati kao ugljikovodici, aldehidi, alkoholi, polioli i glikozidi. Zajednička karakteristika im je struktura - ugljikovi kosturi koji se mogu podijeliti u izo-C<sub>5</sub> jedinice (izoprenske jedinice). Postoji nekoliko podgrupa terpena, a klasificirani su na temelju izoprenskog pravila prema broju izoprenskih jedinica u molekuli (npr. monoterpeni (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>2</sub>, seskviterpeni (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>3</sub>, diterpeni (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>4</sub>). U grožđu, (*Vitis vinifera* L.) otkrivena je podgrupa terpenoida, monoterpeni, odgovorna za cvjetne arome muškatnih kultivara, kao i mirise aromatičnih kultivara (Traminac, Rajnski rizling, Silvanac zeleni, Rizvanac itd.), (Rapp i Mandery, 1986).

Najveći doprinos primarnoj aromi vina daju monoterpeni koji se u vinu najvećim dijelom nalaze u slobodnom (hlapivom) obliku vinu, a u grožđu se nalaze i u slobodnom i u vezanom glikozidnom obliku (potencijalno hlapivi terpeni, vezani terpeni). Vezani terpeni predstavljaju „aromatsku rezervu“ jer se njihovom hidrolizom glikozidne veze oslobađaju slobodni oblici monoterpena koji kao takvi direktno utječu na aromu vina (Karoglan, 2008).

Monoterpeni imaju izrazito važan doprinos u aromi bijelih vina muškatnih sorti, ali i ostalih aromatskih sorti (Ribéreau-Gayon i sur., 1975.; Rapp 1988.; Mateo i Jimeñez, 2000), dok se u manje aromatskim i nearomatskim sortama slobodni monoterpeni pojavljuju u značajno manjim koncentracijama (Dimitriadis i Williams, 1984.; Günata i sur., 1985.; Razungles i sur., 1993).

Prema koncentraciji monoterpena kultivari grožđa mogu se klasificirati u tri skupine (Margalit, 1997) i to muškatni kultivari sa visokom koncentracijom monoterpena u grožđu (1-3 mg/L), kultivari slični muškatnim (Rajnski rizling, Silvanac, Traminac mirisavi,

Rizvanac i druge sorte) sa niskim sadržajem monoterpena (0.1 -0.3 mg/L) i nemuškatni kultivari koje imaju vrlo nisku ili nemjerljivu koncentraciju monoterpena.

Monoterpeni se javljaju u obliku jednostavnih ugljikovodika (limonen, mircen), aldehida (linalal, geranial), alkohola (linalol, geraniol, citronelol,  $\alpha$ -terpineol), kiselina ili estera (Mateo i Jimeñez., 2000). Do danas u grožđu i vinu identificirano je oko 70 monoterpena, koji su nosioci cvjetnih aroma, s naglaskom na miris ruže, a najvažniji predstavnici su linalol, nerol, geraniol, citronelol i  $\alpha$ -terpineol (Câmara i sur., 2007; Jackson, 2014).

Mirisni pragovi monoterpena su prilično niski i kreću se na razini od najviše nekoliko stotina mg/L. Zasebno gledano, najmirisniji su citronelol i linalol, iako je sveukupno aromatično djelovanje monoterpena sinergističko (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

Terpeni imaju važnu ulogu u tvorbi arome muškatnih kultivara, kao npr. Muškatu aleksandrijskom bijelom, Muškatu fontiganu, Muškatu ottonelu te Muškatu d'Alsaceu, što možemo i zaključiti obzirom da su koncentracije monoterpena u tim vinima daleko iznad olfaktornog praga detekcije (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a). Osim kod muškatnih kultivara, također su vrlo bitna aromatska komponenta u kultivarima sličnima muškatu, kao što su Traminac, Pinot sivi, Rajnski rizling, Rizvanac i drugi, te također daju muškatnu notu mirisu vina poput Albarina, Viogniera te Muscadellea (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

Senzorni pragovi detekcije za nerol (400  $\mu$ g/L) i  $\alpha$ -terpineol (400  $\mu$ g/L) su mnogo veći nego za geraniol (30  $\mu$ g/L, 130  $\mu$ g/L), linalol (25  $\mu$ g/L, 50  $\mu$ g/L) citronelol (18  $\mu$ g/L). Oksidi linalola imaju prag detekcije pri 3000-5000  $\mu$ g/L.

Aroma važnijih terpena se uglavnom opisuje kao cvjetna - ruža (geraniol, nerol), korijander i citrusi (linalol), kamfor (oksid linalola), zeleno (oksid nerola) i biljna (Simpson, 1979; Güth, 1997). Iako se kao najaromatičniji terpeni navode linalol i citronelol (miris cvijeće), poznat je sinergistički učinak terpena na senzorna svojstva vina (Tamborra, 1992; Sanchez Palomo i sur., 2006; Selli i sur., 2006b, Güth, 1997). Istraživanjima je dokazana korelacija visokog sadržaja linalola i  $\alpha$ -terpineola s cvjetnim opisom mirisa vina (González Álvarez i sur., 2011; Sánchez Palomo i sur., 2012).

Koncentracija monoterpena u grožđu ovisi o kultivaru, zdravstvenom stanju grožđa, stupnju zrelosti, tlu, klimatskim uvjetima i ampelotehničkim zahvatima (Wilson i sur., 1984; Koblet i sur., 1994; Di Stefano i sur., 1995). Potvrđen je i utjecaj tehnoloških postupaka poput maceracije, upotrebe bentonita, ne-*Saccharomyces* kvasaca i pektolitičkih enzima



(Tamborra, 1992; Selli i sur, 2006b; Radeka i sur. 2005; Sanchez Palomo i sur., 2006; Selli i sur., 2006a).

Jednom kada proces proizvodnje vina započne, monoterpeni spojevi prolaze različite vrste reakcija. U grožđu su reakcije monoterpena i njihove transformacije enzimatski potaknute. Mateo i Jimenez (2000) su utvrdili da putevi transformacije monoterpena u moštu i vinu uključuju kiselinsku i enzimatski kataliziranu hidrolizu, izomeraciju i ciklizaciju. Kiselinska, odnosno kemijska hidroliza vezanih glikozida ovisi o pH medija. Dokazano je da pri pH 3 nastaje najviše linalola, nerola i geraniola (Williams i sur., 1981). Enzimatska, odnosno biokemijska hidroliza, protječe u dvije faze. U prvoj fazi enzimi glikozidaze odvajaju šećerni dio, dok u drugoj fazi  $\beta$ -glukozidaza odcjepljuje aromatski slobodni, hlapivi monoterpeni (Mateo i Jimenez, 2000).

Navedene reakcije uz djelovanje kvasaca se odvijaju tijekom maceracije i alkoholne fermentacije (Tamborra, 1992; Delcroix i sur., 1994), a enzimi glikozidaze koje sudjeluju dolaze iz grožđa, kvasaca ili komercijalnih preparata (egzogene  $\beta$ -glukozidaze).

Tablica 1: Masene koncentracije slobodnih terpena ( $\mu\text{g/L}$ ) u aromatičnim i nearomatičnim bijelim vinima proizvedenim u različitim zemljama

<b>TERPENI</b>	Hrvatska (n=21)	Turska (n=9)	Španjolska (n=6)	Španjolska (n=6)	Španjolska (n=6)
Linalol	21.85-48.67	179-171	11.8-13.8	81-236	15.4-54.7
Citronelol	1.73-6.98	49-58	n.d.	n.d.-12	7.3-13.2
Geraniol	14.97-30.75	161-256	12.4-13.2	7-62	28.6-110
Nerol	1.74-5.29		n.d.	n.d.-17	115-210
	Radeka i sur., 2008.	Selli i sur., 2006a.	Palomo i sur., 2007.	Masa i Vilanova, 2008	Palomo i sur., 2006.

n = broj uzoraka; n.d. = nije detektirano

Tablica 2: Monoterpeni u vinu, njihove koncentracije, pragovi detekcije, te mirisni opisi (prema Francis i Newton (2005), Ribéreau-Gayon i sur. (2006b))

<b>TERPENI</b>	Koncentracija u vinu ( $\mu\text{g/L}$ )	Prag detekcije ( $\mu\text{g/L}$ )	Opis mirisa
Cis – ružin oksid	3 - 21	0.2	Travnat, liči, ruža
Citronelol	tragovi – 12	18	Citrusi
Geraniol	0.91 – 506	30, 130	Ruža
ho - Trienol	tragovi - 127	110	Lipa
Linalol	1.7 – 473	25.2, 50	Ruža
Nerol	4 – 135	400	Ruža
$\alpha$ - Terpineol	3 – 87	400	Ljilljan

### 2.2.2. Norizoprenoidi

Osim monoterpena veliki utjecaj na aromu grožđa i vina imaju i norizoprenoidi (Strauss i sur., 1987., Winterhalter i sur., 1990a, Marais i sur., 1992.; Schneider i sur., 2001). Razlog tome je njihov jako niski prag detekcije.

Norizenoprenoidi nastaju iz karotenoida i značajno doprinose aromi vina (Baumes i sur., 2002; Winterhalter i Rouseff, 2002; Winterhalter i Ebeler, 2013). Građeni su od ugljikova prstena, a međusobno se razlikuju po mjestu na koje se veže funkcionalna kisikova skupina. Postoje strukture bez kisikove skupine, kao i one u kojima se kisik veže na 7C mjestu (damaskenon) ili 9C mjestu (ionon) (Winterhalter i Rouseff, 2002). Norizoprenoidi su prisutni u grožđu mnogih kultivara, ali ih najviše ipak ima u grožđu aromatičnih kultivara (Strauss i sur., 1987; Winterhalter i sur., 1990a; Marais i sur., 1992; Schneider i sur., 2001). Najviše istraživanja je usmjereno u istraživanje C13-norizenoprenoida, koji su najprisutniji u grožđu (Williams i sur., 1992). Ovi spojevi igraju značajnu ulogu u aromi kultivara poput Sèmillona, Sauvignona bijelog, Chardonnaya, Merlota, Syraha, Cabernet sauvignona (Razungles i sur., 1993; Sefton i sur., 1993., 1994., 1996; Sefton 1998).

Budući da norizenoprenoidi nastaju iz karotenoida, prisutnost karotenoida u grožđu je odlučujući čimbenik u njihovu nastanku. U grožđu, karotenoidi i ksantofili nastaju u kloroplastima (Baumes i sur., 2002). Tijekom dozrijevanja grožđa, a promjenom boje lišća, kloroplasti se razgrađuju (Hardie i sur., 1996), a s njima opada razina klorofila i

karotenoida (Razungles i sur., 1988; 1993). Karotenoidi se nakupljaju u kožici bobice neposredno pred šaru (Razungles i sur., 1988; Guedes de Pinho i sur., 2001). Put nastanka norizenoprenoida iz karotenoida otkriven je tek prije desetak godina (Mathieu i sur., 2005).

Samo je nekoliko slobodnih norizoprenoida pronađeno u grožđu dok se većina nalazi glikozidno vezan, pa time i nehlapiva (bez mirisa) sve dok nisu oslobođeni enzimatski ili hidrolizom. Ketonski oblici norizenoprenoida su izdvojena grupa aromatskih spojeva mednih i cvjetnih mirisa, ovisno o koncentraciji (Skouroumounis i Sefton, 2002; Sefton i sur., 2011). Najznačajniji spojevi su  $\beta$ -ionon (mirisni prag detekcije u vinu je 0,09  $\mu$ /l; Kotseridis i sur., 1999) i  $\beta$ -damaskenon (mirisni prag detekcije u 10% etanolu je 0,05  $\mu$ /l; Güth, 1997).

$\beta$  – damaskenon je ključni mirisni sastojak u mnogim voćnim vrstama, uključujući i grožđe, a osim u vinu važna je komponenta mirisa i kod pive i kave. Njegov miris opisuje se kao voćno – cvjetni, medni i miris pirjane jabuke.

$\beta$  – ionon je također važan sastojak arome u mnogim voćnim vrstama, a njegov miris se opisuje kao sladak ili kao miris ljubičice.

U grupu značajnih norizoprenoida u vinu pripada i 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN) koji je povezan sa kerozinskim mirisom dozrelih vina od kultivara Rajnski rizling (Simpson 1979; Winterhalter i sur., 1990b), te E-1-(2,3,6-trimetilfenil) buta-1,3-dien (TPB) koji se pak povezuje sa cvjetnim, geranium i duhanskim mirisnim karakterom dozrelih vina (Janusz i sur., 2003; Cox i sur., 2005).

$\beta$  – damaskenon i  $\beta$  – ionon pronađeni su u grožđu u koncentracijama iznad praga detekcije i zato se smatraju važnim sastavnicama cvjetnih aroma kod mnogih kultivara vinove loze (Gómez – Miguez i sur., 2007). Za  $\beta$  – damaskenon se smatra da iako se u nekom vinu nalazi ispod praga detekcije još uvijek doprinosi voćnoj aromi mijenjajući prag detekcije drugih komponeneta arome (Pineau i sur., 2007).

Linsenmeier i Löhnertz (2007) navode da je  $\beta$  – damaskenon, kao poželjan aromatski spoj u vinu, pokazao tendenciju opadanja s nedostatkom dušika. Autori navedenog rada upućuju na činjenicu se se treba pretpostaviti kako dušična gnojidba ima utjecaj na profil aroma kod pojedinog kultivara.

Tablica 3: Norizoprenoidi u vinu, njihove koncentracije, pragovi detekcije, te mirisni opisi u vinu prema Francis i Newton (2005), Ribéreau – Gayon i sur. (2006b)

<b>C13 -NORIZOPRENOIDI</b>	Koncentracija u vinu ( $\mu\text{g/L}$ )	Prag detekcije ( $\mu\text{g/L}$ )	Opis mirisa
$\beta$ - damaskenon	tragovi – 11.9	0.05	Jabuka, ruža, med
$\beta$ - ionon	0.032 – 1.95	0.09	Ljubičica, kupina
Vitispiran	20 – 320	800	Krizantema, voće
TDN	1 - 59	20	Petrolej, kerozin

TDN- 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen

### 2.2.3. Fermentacijske (sekundarne) arome vina

#### 2.2.3.1. Viši alkoholi

Alkohole s više od dva atoma ugljika nazivamo viši alkoholi koji nastaju tijekom alkoholne fermentacije i uz estere su glavni nosioci sekundarne arome vina. Na koncentraciju viših alkohola u velikoj mjeri utječe rod, vrsta i soj kvasaca. Fizikalna svojstva i metabolizam viših alkohola obradili su još 1963. godine Webb i Ingraham ukazavši na činjenicu da je biosinteza viših alkohola normalna karakteristika svih kvasaca. Uloga kvasaca u njihovoj biosintezi to je značajnija obzirom da svaki viši alkohol zasebno, kvalitativno i kvantitativno doprinosi specifičnosti arome pojedinog vina.

Viši alkoholi su gotovo uvijek prisutni u vinu i mogu pozitivno utjecati na miris nearomatičnih kultivara. Najčešće se izdvajaju 1-heksanol sa senzornim pragom detekcije pri 1300  $\mu\text{g/L}$  i *cis*-3-heksen-1-ol sa senzornim pragom detekcije pri 400  $\mu\text{g/L}$  (Güth, 1997; Moyano i sur., 2009). Ostali potencijalno značajni viši alkoholi iz grožđa koji ostaju i nakon fermentacije su 2-etil-1-heksanol, benzilni alkohol, 2-feniletanol (Cabaroglu i sur., 1997; Jackson, 2014), dok 3-oktanol i 1-okten-3-ol potječu iz grožđa koje je zaraženo plemenitom plijesni (*Botrytis cinerea.*) (Rapp i Güntert, 1986). Kvantitativno su najznačajniji alifatski viši alkoholi 1-propanol (miris zrelog voća), izobutilni alkohol, amilni alkohol i izoamilni alkohol (miris otapala) te aromatski alkohol 2-fenil etanol (miris cvijeća, ruža) (Jackson, 2014). Ostali viši alkoholi mogu nastati od aldehida iz grožđa, enzimatskom redukcijom aminokiselina ili putem sinteze iz ugljikohidrata.

Na sintezu viših alkohola tijekom fermentacije značajno utječu tehnološki postupci poput temperature fermentacije, izbor soja kvasaca, količina kisika, pH, bistroća mošta i dostupnost dušičnih spojeva za kvasce (Rankine, 1967; Sponholz, 1988). Kompozicija aminokiselina u moštu je od velikog značaja jer te tvari predstavljaju važan izvor slobodnog dušika, te sudjeluju kao prekursori tijekom sinteze produkata fermentacije.

Metabolizam dušičnih spojeva utječe na formiranje pojedinih spojeva koji značajno utječu na senzorna svojstva vina. Veliki je broj radova koji se bavio utjecajem dušika na aktivnost kvasaca te formiranje viših alkohola, te svi oni potvrđuju vezu i ovisnost ukupnog sadržaja viših alkohola o koncentraciji i tipu aminokiselina u vinu.

Viši se alkoholi mogu formirati metabolizmom kvasaca preko dva različita mehanizma: Katabolički put nastajanja iz aminokiselina prisutnih u mediju odvija se Ehrlichovim mehanizmom (Ehrlich, 1907).

Anabolički put nastajanja viših alkohola iz ugljikohidrata polazi od piruvata i acetil-CoA kao prekursora (MacDonald, 1984).

Kod oba mehanizma krajni korak je dekarboksilacija ketokiselina, te njihova redukcija. Bidan (1975) je utvrdio da 25% viših alkohola u vinu nastaje razgradnjom šećera (anabolički), a ostatak nastaje degradacijom aminokiselina prisutnih u mediju (katabolički). Ough i Bell (1980) i Castino (1988) se slažu da u moštu nema dovoljno aminokiselina koje bi bile dovoljne za formiranje viših alkohola tijekom fermentacije. Mehanizam sinteze masnih kiselina je mnogo aktivniji u medijima koji su bogatiji sa aminokiselinama gdje kvasci ne moraju započinjati sintezu tih spojeva. Vina proizvedena iz takvih moštova imaju radi toga niži udio viših alkohola (Rapp i Versini, 1996).

Različiti autori utvrdili su da su kvasci u stanju sami sintetizirati sve potrebne aminokiseline polazeći od amonijačnog dušika. U slučaju kada je on glavni izvor dušika srednje vrijednosti formiranih viših alkohola vrlo su niske (60 mg/L). Međutim kada kvaščevoj stanici na raspolaganju stoji samo dušik iz aminokiselina dolazi do značajnog povećanja količina nastalih viših alkohola (od 300 do 600 mg/L). Razlog tome je što nedostatkom amonijaka kvasci nadomještaju taj manjak slobodnog dušika putem deaminacije i transaminacije pri čemu ostavljaju neiskorištene ugljikove kosture koje prevode u više alkohole (Montedoro i sur., 1987).

Još 1967. godine Rankine je ispitivao nekoliko sojeva *Saccharomyces cerevisiae* i epifitnu mikrofloru kvasaca u odnosu na njihove mogućnosti u formiranju viših alkohola. U slučaju čistih kultura uočena je signifikantna razlika u proizvedenim količinama pojedinih viših alkohola.

U nižim koncentracijama viši alkoholi doprinose kompleksnosti arome u vinu, no odgovorni su i za nepoželjne mirise kada su prisutni u vinu u većim koncentracijama. (Romano i sur., 2003; Bell i Henschke, 2005; Swiegers i sur., 2005; Mendes-Ferreira i sur., 2009).

Koncentracija viših alkohola u bijelim vinima rijetko prelazi 300 mg/L, što se smatra granicom do koje i doprinose kompleksnosti arome (Usseglio Tomasset, 1975; Jackson, 2014). Rapp i Mandery (1986) su pomaknuli taj prag na 400 mg/L. Organoleptički utjecaj ograničen je njihovim uobičajenim sadržajem u vinu, no on ovisi i od sveukupnog aromatskog intenziteta vina. Ukupan sadržaj viših alkohola trebao bi biti što niži jer generalno gledajući imaju loš miris s izuzetkom 2-fenil etanola.

Viši alkoholi imaju i indirektnu ulogu u razvoju arome starenja vina. Tijekom alkoholne fermentacije sudjeluju u enzimatskim, a tijekom starenja vina u neenzimatskim reakcijama u kojima nastaju esteri (Rapp i Güntert, 1986). Benzilni alkohol i 2-fenil etanol djeluju pozitivno na aromu vina, posebno kod neutralnih kultivara (Selli i sur., 2006b; Tamborra i sur., 2004; Selli i sur., 2006a). 2-fenil etanol nastaje pod utjecajem kvasaca tijekom fermentacije i u većim koncentracijama daje miris po ružama, dok se koncentracija benzilnog alkohola povećava pod utjecajem egzogenih enzima pri čemu daje cvjetne arome vinu (Cabaroglu i sur., 1997; Tamborra i sur., 2004; Selli i sur., 2006a; Sanchez Palomo, 2006).

Manji udio u skupini viših alkohola predstavljaju C6 alkoholi – heksanoli i heksenoli koji tijekom fermentacije nastaju redukcijom C6 aldehida u alkohole (Lilly i sur., 2006). C6 alkoholi nastaju također u grožđu od dugolančanih masnih kiselina, a količina im se povećava tijekom dozrijevanja grožđa, prilikom mehaničke obrade grožđa i maceracije prije fermentacije (Baumes i sur., 1989). Dio C6 alkohola nalazi se u glikozidnoj vezanoj formi, no te su količine najčešće toliko male da se ne očekuje porast koncentracije slobodnog oblika djelovanjem glikozidnih enzima (Calleja i Falqu , 2005; Lilly i sur., 2006).

Tablica 4. Masene koncentracije viših alkohola (mg/L) u bijelim vinima iz različitih zemalja

<b>VIŠI ALKOHOLI</b>	Hrvatska (n=9)	Turska (n=12)	Španjolska (n=6)	Italija (n=6)	Španjolska (n=6)
1-Heksanol		1.04-1.20	0.23-0.38	0.018-0.039	
Izobutanol	30.1-57.75	9.55-13.92	12.8-23.2		
1-Butanol	n.d.-2.11	0.07-0.38			n.d-1.2
1-Propanol	37.74-48.22		16.5-18.1		17.89-69.18
Izoamilni alkohol	190.7-292.0	74.74-143.54			199.95-328.59
2-feniletanol		14.89-64.92	4.7-5.4	0.14-0.21	28.74-95.42
	Ivić i sur., 2009.	Selli i sur., 2006b.	Palomo i sur., 2007.	Esti i Tamborra, 2006.	Masa i Vilanova, 2008.

n = broj uzoraka; n.d. = nije detektirano

#### 2.2.3.2. Esteri

Esteri su vrlo važni aromatski spojevi vina koji nastaju kao produkti kondenzacije organskih kiselina i alkohola (alifatski esteri) ili fenola (fenolni esteri). Identificirano je više od 160 estera od kojih se većina javlja tek u tragovima, dok samo nekoliko češćih dolazi pri ili iznad praga senzorne detekcije. Među alifatske estere ubrajamo acetatne i etilne estere (Jackson, 2014).

Esteri su važni u formiranju arome nearomatičnih kultivara, a voćni karakter pojedinih estera je značajan za aromu mladih bijelih vina (Marais i Pool, 1980; Ferreira i sur., 1995). Alifatski esteri su važni za *V. vinifera* kultivare, dok su fenolni esteri više vezani uz nekoliko *V. labrusca* kultivara, pogotovo Concord. Najznačajniji među njima, zbog svoje koncentracije i „foxy“ mirisa je metil-antranilat (Rapp i Versini, 1996).

Među alifatskim esterima posebno su značajni etilni esteri, ugodne voćne arome, koje stvaraju etanol i nezasićene masne ili organske kiseline (Jackson, 2014). Glavni predstavnici su etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanat (Ferreira i sur., 1995; Boulton i sur., 2009). Etil butirat mirisom podsjeća na ananas, a etil heksanoat na koru jabuke (Jackson, 2014). Aroma etilnih estera se mijenja s povećanjem duljine lanca, od voćne preko sapunaste do mirisa masti koja više nije poželjna u aromi vina (Jackson, 2014).

Acetatni esteri poput etil acetata, izoamil acetata, izobutil acetata, 2-feniletil acetata i heksil acetata nastaju reakcijom između octene kiseline i viših alkohola (Ferreira i sur., 1995; Boulton i sur., 2009; Jackson, 2014). Izoamil acetat posjeduje miris banane, a benzil acetat miris jabuke (Jackson, 2014) pa ih i nazivaju voćni esteri. Zajedno s etilnim esterima iskazuju pozitivan sinergistički učinak na miris vina (Ferreira i sur., 2010). Voćni esteri se tijekom dozrijevanja vina hidroliziraju na više alkohole i octenu kiselinu, čemu pridonosi viša temperatura i niži pH vina. Esteri s duljim lancima su stabilniji i stvaraju se tijekom cijelog procesa dozrijevanja (Ramey i Ough, 1980). 2-feniletil acetat i izoamil acetat dodatno se hidroliziraju dodatkom egzogenih enzima (Tamborra i sur., 2004).

Esteri se sintetiziraju u grožđu, ali u koncentracijama koje nisu senzorno značajne za razliku od većine koju stvaraju kvasci tijekom alkoholne fermentacije i zbog čega estere i smatramo dijelom fermentacijske arome vina. Pri kraju fermentacije voćni esteri dosežu maksimalnu koncentraciju, nakon koje nastupa hidroliza, dok sinteza etilnih estera tek počinje (Jackson, 2014). Na nastanak estera tijekom fermentacije utječu brojni čimbenici, pa izborom primjerene tehnologije možemo potaknuti njihovu sintezu. Bistrenje mošta, manje koncentracije SO<sub>2</sub>, optimalne koncentracije dušičnih spojeva i odsutnost kisika tijekom fermentacije pozitivno djeluju na sintezu i nakupljanje estera (Boulton i sur., 2009; Jackson, 2014). Niske temperature fermentacije (~10 °C) potiču sintezu voćnih estera poput izoamil, izobutil i heksil acetata, dok više temperature (15-20 °C) potiču estere veće molekularne mase, poput etil oktanoata i etil dekanoata (Killian i Ough, 1979; Molina i sur., 2007). Više temperature ograničavaju nakupljanje estera zbog ubrzanja hidrolize. Kvasci se razlikuju po sposobnosti proizvodnje estera, unutar i između vrsta (Houtman i Du Plessis 1986; Antonelli i sur., 1999; Rojas i sur., 2001; Plata i sur., 2003; Miller i sur., 2007; Swiegers i sur., 2009). *Ne-Saccharomyces* vrste kvasaca proizvode veće koncentracije etil acetata i zbog toga je njihova upotreba kao ključnih kvasaca u vinarstvu ograničena, osim u kofermentaciji sa *Saccharomyces cerevisiae* sojevima (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Pojedini sojevi također variraju s obzirom na profil i koncentraciju stvorenih acetatnih i etilnih estera koji doprinose senzorno značajnim razlikama između mladih vina, koje mogu trajati i do dvije godine (Dumont i Dulau, 1997).

Etil acetat je najproučavaniji ester nastao kondenzacijom octene kiseline i etanola. Njegove koncentracije u zdravom vinu su uglavnom ispod 50-100 mg/L. Pri koncentracijama manjim od 50 mg/L on doprinosi kompleksnosti mirisa, dok iznad 150 mg/L daje negativne arome koje podsjećaju na lak za nokte, ljepilo i ocat (Ough i Amerine, 1980; Amerine i Roessler, 1983). Nepoželjne koncentracije etil acetata su obično vezane uz prisutnost octenih bakterija *Acetobacter* i *Gluconobacter* u grožđu, moštu i vinu



(Ribéreau-Gayon i sur., 2006a; Jackson, 2014). Spomenute bakterije direktno sintetiziraju etil acetat i octenu kiselinu koja u neenzimatskim reakcijama s etanolom opet formira etil acetat. Etil acetat može ozbiljno narušiti miris vina, mnogo prije nego koncentracija octene kiseline u vinu prouzroči octikavost.

Formiranje estera smanjeno je kod moštova sa malim sadržajem aminokiselina koji su glavni prekursori u formiranju estera. Veza između estera i sadržaja aminokiselina uglavnom je vezana uz sadržaj arginina, glutamata i glutamina pošto one čine najveću frakciju aminokiselina koje kvasci koriste u fermentaciji (Thurston i sur., 1981).

Tablica 5: Masene koncentracije estera (mg/L) u bijelim vinima proizvedenim u različitim zemljama

<b>ESTERI</b>	Turska (n=3)	Španjolska (n=6)	Turska (n=9)	Španjolska (n=6)
Etil acetat		14.4-27.7		54.41-61.11
Izoamil acetat	1.25-2.14	2.63-3.66	0.64-1.80	0.14-0.27
Heksil acetat	0.03-0.07	0.02-0.04		n.d.-0.27
2-Feniletal acetat	1.56-1.93	0.02-0.04		
Etil butirat				0.17-4.82
Etil heksanoat	0.83-0.97	0.35-0.66	0.25-0.63	0.28-1.13
Etil oktanoat	0.67-0.77	0.35-0.80		0.3-1.84
Etil dekanoat	0.31-0.33	0.18-0.26	0.13-0.74	0.09-2.21
Etil dodekanoat			0.003-0.093	
	Selli i sur., 2006a.	Palomo i sur., 2007.	Selli i sur., 2006b.	Masa i Vilanova, 2008

n = broj uzoraka; n.d. = nije detektirano

### 2.2.3.3. Važnost aromatskih spojeva u postupku klonske selekcije

Istraživanje aromatskog profila vina dobivenog od grožđa klonskih kandidata bitan je korak u postupku klonske selekcije kao jedno od mogućih postupaka daljnje kvalitativne diferencijacije izdvojenih klonskih kandidata.

Iako su aromatski spojevi grožđa i mošta prekursori sortnih aroma u vinu, standardne metode klonske selekcije ne uključuju njihovu preciznu determinaciju već se pri njihovom definiranju koristi uglavnom organoleptička ocjena vina proizvedenih mikroviniifikacijom (Rusjan i sur., 2009).

Karakteristična aroma vina određenog kultivara pripisuje se aromatskim spojevima u njezinom grožđu koji tijekom procesa fermentacije prelaze u vino. Važnost aromatskih spojeva mošta i vina prvi put je prepoznata prije gotovo četiri desetljeća (Cordonnier i Bayobov, 1974).

Neki autori su temeljem aromatskih spojeva prepoznavali kultivare (Rosillo i sur., 1999) što je značajno doprinijelo identifikaciji mirisa tih aktivnih spojeva. No, miris kao sortna prepoznatljivost ne ovisi o jednom ili dva spoja, već o mirisnoj kombinaciji svih zastupljenih aromatskih spojeva u grožđu odnosno vinu (Robinson, 2011).

Do sada je objavljeno vrlo malo radova vezano za analizu aromatskih spojeva klonskih kandidata uključenih u postupak klonske selekcije jer dosadašnji hodogram klonske selekcije ne obvezuje analiziranje aromatskih spojeva grožđa ili vina. Vrlo je malo objavljenih rezultata o aromatskim spojevima u grožđu ili moštu za razliku od aromatskih spojeva u vinu. Jedan od razloga je činjenica da je nefermentirani mošt vrlo nestabilan medij za kromatografsku analizu za razliku od vina koji je stabilniji medij, te je kao takav jednostavniji za provođenje analiza metodom plinske kromatografije. Monoterpeni tako imaju veliki utjecaj na karakter mirisa vina te je dokazana korelacija visokog sadržaja linalola i  $\alpha$ -terpineola s cvjetnim opisom mirisa vina (Presa – Owens i Noble, 1997.; Lee i Noble, 2003.; Campo i sur., 2006.; Lee i Noble, 2006.; Komes i sur., 2006.; Botelho, 2008.; Skinkis i sur., 2008.; González Álvarez i sur., 2011.; García – Carpintero i sur., 2011; Sánchez – Paloma i sur., 2012).

U Republici Hrvatskoj zakonske obveze klonske selekcije pri registriranju novih klonova završavaju mikroviniifikacijom njihovog grožđa kroz dvije berbe, a rezultati se prikazuju uz standardni opis klonova (Anonymous 3), te nije potrebno provoditi analize aromatskog profila klonskih kandidata. Pojedini autori govore o važnosti aromatskog profila u provedbi klonske selekcije, ali u pravilu se govori o analizama u vinu, a ne u grožđu (moštu). Tako Jackson (2014) spominje važnost aromatskog spoja 2-metoksi-3-isobutilpirazin u klonskoj selekciji kultivara Cabernet Sauvignon kao karakterističnog spoja primarne arome u vinu, dok Boidron (1995) u svom radu navodi dva klona kultivara Chardonnay (klon 77 i klon 809) čija vina imaju izraženiju mušklatnu aromu u odnosu na druge istraživane klonove te prepoznaje to kao pozitivnu i poželjnu karakteristiku klona.

Schoeffling i Faas (1990) među prvima provode istraživanje o značaju aromatskog profila u postupku klonske selekciji na klonovima četiriju kultivara: Kerner, Traminac crveni, Rizvanac i Graševina. Proučavali su utjecaj sadržaja šećera ( $^{\circ}\text{Oe}$ ) na aromatski profil vina, te su utvrdili da se sadržaj šećera ne može koristiti kao jedino svojstvo kvalitete

klonskih kandidata u postupku klonske selekcije jer sadržaj šećera nije dovoljan podatak o kvaliteti grožđa. Zaključili su da je potrebno provesti senzornu analizu vina, te ističu da bi krajnja faza klonske selekcije trebala obuhvatiti vinifikaciju klonova (dvije godine zaredom), te da se temeljem rezultata senzorne analize vina zajedno sa rezultatima istraživanja uobičajenih svojstava u klonskoj selekciji donese konačan sud o kvaliteti klona, odnosno klonskog kandidata.

Versini i sur. (1990) u svom istraživanju navode da je za usporedbu kakvoće grožđa klonskih kandidata analitičkim metodama potrebno proučavati one aromatske spojeve na čiji sadržaj u grožđu najmanje utječe okolina (u odnosu na ostale aromatske spojeve), a to su monoterpeni te utvrđuje razlike između klonova kultivara Chardonnay, ali ne i razlike između klonova Rajnskog rizlinga.

Marais i Rapp (1991) istražujući utjecaj koncentracije slobodnih i vezanih terpenskih spojeva na međuklonsku različitost 15 klonova kultivara Rajnski rizling utvrđuju da ne postoji statistički značajna razlika između klonova, ali izdvajaju dva klona koji imaju veći potencijal sinteze terpena od ostalih istraživanih klonova. Kod aromatičnog kutivara Traminac mirisavi u istom istraživanju dokazuju da je moguće opravdano razlikovati klonove na temelju koncentracije terpena te isto tako da neki klonovi kutivara Traminac crveni imaju veći potencijal u proizvodnji vina bogatih aromom.

Reynolds i sur. (2004) također ističu važnost aromatskog profila u klonskoj selekciji, te provode istraživanje na vinima klonova Chardonnay i Pinot crni u području sušne kontinentalne klime uz navodnjavanje, te preporučuju uzgoj klonova 76, 95 i 96 jer se senzorno izdvajaju od ostalih klonova kultivara Chardonnay. Istovremeno ne preporučuju uzgoj klona Prosser zbog nepoželjnih vegetativnih aroma po kojima se uz visoku ukupnu kiselost razlikuje od ostalih klonova kultivara Chardonnay.

Duchêne i sur., (2009), proučavajući varijabilnost sadržaja linalola i geraniola u grožđu i vinu između dvije grupe klonova: aromatskih (Traminac crveni i Sauvignon) i manje aromatskih (Chardonnay: 76 i 809) potvrđuju da klonska varijabilnost uzrokovana somatskim mutacijama može značajno promijeniti aromatski profil grožđa tj. karakteriziraju klonove temeljem njihovog terpenskog sadržaja u grožđu i vinu.

Belancic i sur., (1997) dokazali su da kod kultivara Muškat aleksadrijski i Muškat ruža djelomično zasjenjena zona grožđa omogućuje razvoj grožđa s karakterističnim

muškatnim profilom aroma s visokim sadržajem slobodnih terpena, te su utvrdili da je efekt insolacije potencirao razvoj sadržaja vezanih terpena.

Većina zahvata u vinogradu, kao što su navodnjavanje, gnojidba, određivanje uzgojnog oblika, te održavanje lisne mase utječu na omjer vegetativnog i reprodukcijskog rasta i to uglavnom na smanjenje prinosa, a samim time i na kakvoću što znači da direktno ili indirektno zahvati u vinogradu utječu na aromatski profil grožđa.

Mogućnost sojeva kvasca da povećaju geografsku tipizaciju vina ostaje predmet rasprave, no sigurno je da su specifični sojevi korisni za: (i) povećanje voćnog karaktera (Torija i sur., 2003a; Sablayrolles, 2009). (ii) poboljšanje nekih sortnih karakteristika u pojedinim vinima, (Delcroix i sur., 1994; Murat i sur., 2001a; Swiegers i sur., 2005, 2006, 2007; King i sur., 2008) (iii) ograničenje proizvodnje organskih kiselina ili povećanje proizvodnje glicerola (Scanes i sur., 1998), (iv) ograničenje neželjenih okusa i mirisa, uključujući i onih koji su produkt sumpora (Rauhut, 1993; Rauhut i sur., 1996, 1997) i hlapljivih fenola (Shinohara i sur., 2000). Upotreba različitih sojeva *Saccharomyces* u alkoholnoj fermentaciji rezultirala je vinima sa različitim hlapljivim spojevima, različitim koncentracija estera octene kiseline, i estera etil masnih kiselina, različite kompozicije viših alkohola (Henick-Kling i sur., 1998; Antonelli i sur., 1999; Heard, 1999; Howell i sur., 2006; Chomsri, 2008; King i sur., 2008; Swiegers i sur., 2009) kao i hlapljivih tiola (Howell i sur., 2005; King i sur., 2008; Swiegers i sur., 2009).

### 2.3. Dušični spojevi

Među glavne tvari mošta koje sadrže dušik ubrajamo amonijak, amide, aminokiseline, peptide, polipeptide, proteine, vitamine i nukleinske kiseline. Prevladavaju amonijak i aminokiseline (Bisson, 1991).

Aminokiseline kao izvor dušikovih spojeva imaju značajnu ulogu u provođenju alkoholne fermentacije. Međuprodukt su i velikog broja aromatskih spojeva vina, ali i nepoželjnih biogenih amina te etil karbamata (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Jackson, 2014).

Pored šećera, spojevi dušika su najvažnije nutritivne tvari koje se nalaze u moštu, a koje kvasci mogu koristiti (Mauricio i sur., 1995; Dharmadhikari, 2001; Torija i sur., 2003b). 10%

težine kvasca sastoji se od dušika. Spojevi koji sadrže dušik u moštu igraju važnu ulogu u fermentaciji vina, te je dušik vrlo bitan nutrient za rast i metabolizam kvasca.

Tijekom rasta i povećanja biomase u moštu, *Saccharomyces cerevisiae* koristi velike količine slobodnog dušika (Kunkee, 1991). Na samom početku alkoholne fermentacije kvasac koristi dušik iz amonijevih soli za svoj razvoj, nakon čega slijedi usvajanje dušika iz slobodnih aminokiselina (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Međutim, sekundarne aminokiseline, kao što su prolina i hidrosiprolin, nisu metabolizirane u standardnim uvjetima proizvodnje vina (Duteurtre i sur., 1971; Ingledew i sur., 1987). Peptidi male molekularne mase također se mogu koristiti za razliku od proteina iz grožđa koji se ne mogu koristiti kao izvor dušika zato što kvascu *S. cerevisiae* nedostaje izvanstanična proteolitska aktivnost.

Pokazatelj opskrbljenost mošta dušikom izražava se kao „slobodni  $\alpha$ -amino dušik“ ili FAN (free aminonitrogen) (Amerine i Ough, 1980; Spayd i Andersen-Bagge, 1996). FAN uključuje slobodne  $\alpha$ -amino kiseline koje kvasac može lako usvojiti, a to su arginin, serin, alanin, treonin,  $\alpha$ -amino maslačna kiselina, asparaginska kiselina (Fugelsang, 1997). FAN predstavlja dušik iz primarnih aminokiselina, dok sekundarne aminokiseline kao prolina i hidrosiprolin ne spadaju u tu skupinu (Cooper, 1982; Bell i Henschke, 2005) .

Prethodno opisani FAN zajedno s amonijskim dušikom ( $\text{NH}_4^+$ ) čini „yeast assimilable nitrogen“ ili YAN, a predstavlja ukupni dušik u moštu koji su kvasci sposobni asimilirati (Spayd i sur., 1995).

Vrijednost FAN-a u moštu ovisne su o vinogradarskom položaju, tlu, kultivaru vinove loze, podlozi, gnojdbi, opskrbljenosti vodom, stupnju zrelosti i mikrobiološkoj aktivnosti na grožđu u vrijeme dozrijevanja (Zoecklin i sur., 2001).

Neka su istraživanja pokazala da ukupni sastav dušika može varirati od 60 – 2400 mg/L (Henschke i Jiranek, 1993; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b), te da je kvascu potrebno minimalno 120-140 mg/L dušika (Bely i sur., 1990; Bisson, 1991; Henschke i Jiranek, 1993; Bell i Henschke, 2005). Taillander i sur. (2007) utvrdili su da je razina od 120 mg/L asimilacijskog dušika nedovoljna za dovršenje procesa fermentacije. Mošt sa asimiliranim dušikom u sastavu kvasca manjim od 140 mg N/l može biti veliki problem zbog neadekvatnog rasta kvasca te slabe aktivnosti fermentacije dok sastav iznad 400 mg N/l dovodi do povećanja biomase, rasta kvasca i učinka fermentacije (Henschke i Jiranek, 1993; Zoecklein i sur., 1999; Bell i Henschke, 2005).

Prema Kunkeeu (1991), za uspješno provođenje alkoholne fermentacije potrebno je minimalno 140 mg/L asimilacijskog dušika. Prema Jiraneku i sur. (1995b), više autora slaže se da je u moštu potrebna minimalna količina asimilacijskog dušika od 120 do 140 mg/L (Agenbach, 1977; Bely i sur., 1991).

Da je dušik neophodan kao hrana za kvasce potvrđuju istraživanja o povezanosti rasta kvasaca i udjela asimilacijskog dušika. Agenbachu (1977) tvrdi da je za maksimalan rast stanica i pravilan tijek alkoholne fermentacije potrebo 500 mg/L ukupnog dušika. Drugi istraživači (Bisson, 1991) navode da koncentracija od 540 mg/L amonijaka osigurava maksimalni rast stanica kvasaca. Vilanova i sur. (2007) potvrdili su da je krajnja biomasa kvasaca ovisila o početnom udjelu asimilacijskog dušika.

Taillandier i sur. (2007) ustanovili su da je utjecaj YAN-a na rast biomase kvasaca za vrijeme fermentacije ovisio o soju kvasca. Tako su kod nekih sojeva udio YAN-a i biomasa kvasaca bili u pozitivnoj korelaciji dok je kod drugih sojeva utjecaj YAN-a na biomasu kvasaca bio vrlo malen. Za jedan od ispitanih sojeva kvasaca utvrđeno da je za postizanje maksimalnog rasta biomase kvasaca optimalan udio YAN-a oko 190 mg/L. Kod istog soja, znatno niže ili više vrijednosti YAN-a od navedenog imale su sličan utjecaj na biomasu kvasaca.

Prema Garde-Cerdan i Ancin-Azpilicueta (2008), trajanje fermentacije nije se značajnije skratilo nakon što je dodavanjem aminokiselina u mošt prekoračena preporučena granica minimalnog udjela asimilacijskog dušika (140 mg N/l).

Barbosa i sur., (2009) utvrdili su da potrebe za ukupnim dušikom u moštu mogu varirati ovisno o koncentraciji šećera u moštu te soju kvasaca. Agenbach (1977) pak navodi da je pri udjelu šećera u moštu od 200 g/L potrebno 70-190 mg/L slobodnog aminodušika dok su Ingledew i Kunkee (1985) utvrdili da je kod viših udjela šećera potrebno i do gotovo 900 mg/L.

Kod nekih sojeva kvasaca, izvor dušika u moštu utjecao je na brzinu razgradnje šećera pa je tako prilikom dodavanja DAP-a (diamonij fosfat) u mošt razgradnja bila brža nego kod dodavanja aminokiselina (Barbosa i sur., 2009). Suprotno tome, Barbosa i sur. (2009) navode da su Albers i sur. (1996) ustanovili da je dušik iz aminokiselina povoljnije djelovao na fermentaciju i rast kvasaca nego dušik iz amonij iona.

Nedostatak dušika u moštu jedan je od glavnih faktora za sprečavanje rasta kvasaca i loše razgradnje šećera, te može rezultirati sporom fermentacijom (Hernández-Orte i sur.,

2006a). Dušični spojevi su vrlo bitni za cijeli proces vinifikacije, ne samo zato što utječu na rast i metaboličku aktivnost kvasca nego i zbog toga što utječu na formiranje viših alkohola, koji utječu na aromatski profil i kvalitetu vina (Mauricio i sur., 1995; Valero i sur., 2003). Također utječu na mikrobiološku nestabilnost vina, (Bell i Henschke, 2005) pogotovo bijelog (Dharmadhikari, 2001).

Niska razina spojeva dušika povezana je sa sporom fermentacijom i staničnom aktivnošću (Bely i sur., 1990). Drugi pak smatraju da je u ovom slučaju problem niska koncentracija biomase kvašćevih stanica (Bisson, 1991; Cramer i sur., 2002; Ribéreau-Gayon i sur., 2006a). Ograničavanje ukupnog asimiliranog dušika utječe na kvasac tako što smanjuje razmnožavanje stanica kvasca, te indirektno smanjuje i stopu glikolize (Bely i sur., 1990). Ove posljedice ovise i o izvoru dušika, budući da rast na izvorima bogatim dušikom, kao što su amonijak, glutamin i asparagin, doprinosi relativno većoj stopi rasta nego na siromašnim izvorima kao što su prolin i urea (ter Schure i sur., 2000).

Nadalje, brojna istraživanja o ulozi kvasca u razvoju vinske arome, okusa i punoće sve su bolje definirane, kao i istraživanje o utjecaju dušika na metabolizam kvasca (Henschke i Jiranek, 1993; Rapp i Versini, 1996; Albers i sur., 1996; Bell i Henschke, 2005; Hernández-Orte i sur., 2005; Swiegers i sur., 2005). Niska koncentracija dušika može utjecati na stvarnje sumporovodika (Henschke i Jiranek, 1991; Giudici i Kunkee, 1994; Jiranek i sur., 1995b; Ugliano i sur., 2009) i ostalih hlapivih sumpornih spojeva (Moreira i sur., 2002). S druge strane, razgradnja nekih spojeva dušika doprinosi stvaranju kancerogenih spojeva, biogenih amina i etil karbamata, koji su štetni za zdravlje (Monteiro i sur., 1989; Ough, 1991; Zoecklein i sur., 1999; Bell i Henschke, 2005).

U cilju sprečavanja problematičnih fermentacija koje vode ka kvarenju vina, uobičajeno je dodavanje dušika u mošt, najčešće u obliku amonijevih soli (Jiranek i sur., 1995b; Arias – Gil i sur., 2007). Dodatak amonijevih soli u mošt ima značajan utjecaj na fiziologiju kvasaca i sintezu metabolita tijekom alkoholne fermentacije. Također utječu na trajanje alkoholne fermentacije, biomasu kvasaca te stvarnje glicerola, octene kiseline i hlapivih aromatskih spojeva.

Aminokiseline su uz amonijak, glavni dušični spojevi koji mogu biti asimilirani od strane kvasaca (Agenbach, 1977; Jiranek i sur., 1995a; Kunkee, 1991), a samim time i njihova koncentracija u moštu može značajno utjecati na kvalitetu vina.

Ukupno je izdvojeno 20 najčešćih aminokiselina pronađenih u grožđu i moštu i one predstavljaju 28 – 39% ukupnog dušika ovisno radi li se o moštu bijeloga ili crnog grožđa (Rapp i Versini, 1996).

Koncentracije aminokiselina u moštu variraju između 170-4000 mg/L , dok u vinima variraju između 3-4000 mg/L (Carnevillier i sur., 2000; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Boulton i sur., 2009) što prvenstveno ovisi o sorti, podlozi, kultivaciji, gnojidbi, roku berbe, regiji uzgoja, klimatskim prilikama, te načinu prerade grožđa. Najzastupljenije aminokiseline u moštu i vinu su prolin i arginin koje predstavljaju 21% do 55% ukupnog dušika (Huang i Ough, 1989; Sponholz, 1991; Gockowiak i Henschke, 1992; Spayd i Andersen–Bagge, 1996; Hernández–Orte i sur., 1999; Stines i sur., 2000; Soufleros i sur., 2003; Herbert i sur., 2005; Boulton i sur., 2009), a slijede ih alanin, asparagin, asparaginska kiselina, glutamat, glutaminska kiselina, serin, treonin.

Nadalje, aminokiselinski profil grožđa određivan je diljem vinogradarsko-vinarskog svijeta (Huang i Ough, 1991; Kliewer, 1970; Ough i Bell, 1980; Sponholz, 1991), te je ustanovljeno da njihov sastav varira ovisno o kultivaru i vinogradarskoj regiji. Na osnovu njihovog sastava Kliewer je (1970) rangirao sorte *Vitis vinifera*, a Huang i Ough (1991) su utvrdili da koncentracija pojedinih aminokiselina varira ovisno o proizvodnoj godini. Spayd i sur. (1995) su ukazali na znakovitu povezanost dušične gnojidbe i koncentracije pojedinačnih aminokiselina.

Bouzas-Cid i sur., (2015) istraživali su aminokiselinski profil kultivara „ Godello“ i „Treixadura“ koje se tradicionalno uzgajaju u Galiciji (SZ Španjolska). Rezultati dvogodišnjeg istraživanja pokazuju da je aminokiselinski sastav u tim kultivarima 2012 godine bio veći za razliku od 2013 godine što je vjerovatno odraz klimatskih prilika, a to potvrđuju i rezultati trogodišnjeg istraživanja aminokiselinskog sastava španjolskog kultivara „ Verdejo“ (Ortega–Heras i sur., 2014) koji su ukazali na više koncentracije aminokiselina u toplijim i sušnim godinama.



Tablica 6: Najzastupljenije aminokiseline u grožđu i moštu prema Huang i Ough (1989), Sponholz (1991), Henschke i Jiranek (1993), Spayd i Andersen-Bagge (1996), Hernández-Orte i sur. (1999), Bell i Henschke (2005), Boulton i sur. (2009)

<b>AMINOKISELINE</b>	Koncentracija (mg/L)
Alanin	10 – 227
Arginin	20 – 2322
Asparagin	1 – 171
Asparaginska kiselina	10 – 138
Citrulin	0.1 – 83
Cistein	1 – 8.2
Glutamat	9 – 4499
Glutaminska kiselina	27 – 454
Glicin	1 – 20
Histidin	5 – 197
Izoleucin	1-117
Leucin	2-160
Lizin	0.7 – 45
Metionin	1 – 33
Ornitin	0.1 – 27.2
Fenilalanin	2.8-138
Prolin	9 – 2257
Serin	13 – 330
Treonin	9 – 284
Triptofan	0.2 – 11
Tirozin	2- 33
Valin	7 – 116

Arginin je kvantitativno najvažnija aminokiselina koju kvasac koristi iz grožđa (Monteiro i Bisson, 1992a; Henschke i Jiranek, 1993; Jiranek i sur., 1995a; Stines i sur., 2000; Bell i Henschke; 2005; Boulton i sur., 2009). Kvasac na početku fermentacije vrlo brzo usvaja arginin, te po završetku alkoholne fermentacije dolazi do oslobađanja navedene aminokiselina u vino uslijed autolize kvašćevih stanica (Fugelsang i Edwards, 2007).

Aminokiselina prolin je kod većine sorti pronađena u koncentracijama od je 750-2257 mg/L (Huang i Ough, 1989; Spayd i Andersen-Bagge, 1996; Boulton i sur., 2009). U tipičnim anaerobnim uvjetima koji vladaju tijekom alkoholne fermentacije, prolin se ne može koristiti kao izvor dušika upravo zbog nedostatka kisika, neophodnog za njegovu razgradnju (Duteurtre i sur., 1971; Ingledew i sur., 1987), zbog toga se i naziva neasimilirani dušik (Bell i Henschke, 2005).

U istraživanju Huang i Ough (1991), najzastupljenije aminokiseline u moštu bile su arginin i prolin, a slijedile su ih glutamin i alanin. Spayd i Andersen-Bagge (1996) navode da su nakon arginina i prolina najzastupljenije aminokiseline bile alanin i valin. Prema Garde-Cerdan i sur. (2009), to su bili alanin, treonin i serin.

U istraživanju Huang i Ough (1991), omjer prolina i arginina poslužio je kao indeks za usporedbu pojedinih kultivara vinove loze, a njime su se koristili i drugi autori (Garde-Cerdan i sur., 2009). Prema Bell i Henschke (2005), omjer prolina i arginina u moštu može se koristiti za podjelu kultivara u dvije skupine: one koje nakupljaju više prolina (omjer prolin/arginin veći od 1) i one koje nakupljaju više arginina (omjer prolin/arginin manji od 1).

Opisana klasifikacija kultivara pomaže nam pri procjeni iskoristivosti aminokiselina prisutnih u moštu. Naime, Bisson (1991) te Huang i Ough (1991) su ustanovili da kvasci nisu koristili aminokiselinu prolin. Tako kultivari koje imaju jednak udio ukupnih aminokiselina ne moraju istovremeno imati jednaki udio dušika iskoristivog od strane kvasaca tj. asimilacijskog dušika. Ukoliko se radi o kultivaru koja nakuplja više prolina, udio asimilacijskog dušika bit će niži (Bell i Henschke, 2005).

Iskorištenje aminokiselina od strane kvasaca je dakle, selektivno. U istraživanju Ough i sur. (1991), većina aminokiselina se u fermentaciji gotovo uvijek brzo iskoristila. Izuzetak su bili alanin, prolin, citrulin, ornitin i arginin.

Boss i sur. (2015) istraživali su utjecaj pojedinih masnih kiselina i aminokiselina na sintezu fermentacijskih aroma. Rezultati istraživanja ukazali su na značajan utjecaj  $\beta$ -alanina pri sintezi etil estera masnih kiselina dok utjecaj na koncentracije izoamil acetata nije bio dovoljno izražen.

Jiranek i sur. (1995a) ustanovili su da su kvasci najviše koristili arginin, serin, glutamat, treonin, aspartat i lizin, te da sojevi kvasaca pokazuju i razliku s obzirom na aminokiseline

koje koriste, ali i s obzirom na količinu potrošenog dušika uopće. Upravo iz tog razloga različiti sojevi mogu pokazati različitu efikasnost u trenutku kada izvor dušika postane ograničen.

Dostupnost aminokiselina također može utjecati na metabolizam kvasca, uključujući formiranje hlapljivih i nehlapljivih komponenti koje su važne za organoleptičku kvalitetu vina (Albers i sur., 1996; Bell & Henschke, 2005; Garde-Cerdan i Ancín–Aypilicueta, 2008).

Sastav aminokiselina u moštu nije nužno istovjetan potrebama kvasaca. U tim je slučajevima amonij ishodna tvar koja se ugrađuje u molekularnu strukturu nedostatnih aminokiselina koja nastaje u stanicama. Preporuka o potrebi korištenja prihrane dodatkom amonijevih soli, nema za posljedicu samo osiguravanje od usporavanja ili zastoja fermentacije, već je to ujedno i prevencija od nastajanja neugodnih reduktivnih mirisa.

Tri su glavne skupine dušičnih spojeva koje kvasci u fazi rasta i razmnožavanja koriste: aminokiseline i njihovi derivati, nukleotidne baze sa svojim derivatima i poliamini. U grožđanom soku koncentracija ovih spojeva varira. Općenito, kvasci će prvo iskoristiti onaj dušični spoj koji im je prvi dostupan odnosno prisutan u moštu. Ako ih ima više, kvasci prvo koriste onaj kojeg će najlakše prevesti u biosintetski pristupačan oblik kao što je amonijak ili glutamat, ili koji zahtjeva najmanju količinu energije da bi se razgradio (Bisson, 1991, Jiranek, 1991).

Za rast i metabolizam kvasaca u moštu i vinu najznačajniji su aminokiseline i amonijev ion (Bisson, 1991; Valero i sur., 2003). Kada bi se umjesto aminokiselina u mošt dodao amonijak bio bi iskorišten u potpunosti pošto ga kvasci preferiraju u odnosu na aminokiseline (Bisson, 1991, Jiranek, 1991).

O važnosti dušika za rast i metabolizam vinskih kvasaca, putem njegovog udjela u strukturi i diobi stanice, već je mnogo napisano. U tom pogledu najvažniji je glutamat, prekursor svih anaboličkih reakcija u metabolizmu dušika, te dominantna aminokiselina u citoplazmi kvasca (Watson, 1976). Mnoga istraživanja (Cooper, 1982 i Large, 1986) identificirala su široku paletu dušičnih spojeva (purini, pirimidini, urea, te aminokiseline serin, treonin, tirozin, fenilalanin, glutamin, asparagin, triptofan, aspartat, izoleucin, leucin, valin, alanin, arginin i prolin) koji degradiraju u glutamat, bilo direktno, bilo putem reakcije amonijevog iona sa  $\alpha$ -ketoglutaratom.

Metabolizam dušičnih spojeva utječe na formiranje pojedinih spojeva koji značajno utječu na senzorna svojstva vina. Deaminacijom aminokiselina preostaje ugljik koji sudjeluje u formiranju  $\alpha$ -keto kiseline ili viših alkohola (Bisson, 1991). Viši alkoholi mogu također nastati tijekom biosinteze aminokiselina iz odgovarajućih keto kiseline (Webb i Ingraham, 1963). Formiranje viših alkohola intenzivira se pri samom kraju fermentacije, kada je već završio period konzumacije aminokiselina (Webb i Ingraham, 1963). Njihova uloga još je poprilično nerazjašnjena. Smatra se da sudjeluju u detoksifikaciji aldehida nastalih tijekom katabolizma aminokiselina. Druga uloga mogla bi biti regulacija anabolizma aminokiselina. Mogu biti i indikator nedostatka ili blokade pristupačnog dušika (Bisson, 1991).

Sinteza viših alkohola povezana je sa prisutnošću aminokiselina u moštu koji su prekursori određenih hlapljivih spojeva ovisno o strukturi same aminokiseline. Biosinteza leucina je povezana sa nastajanjem 3-metil-1-butanola (Reazin i sur., 1970). Na isti način 2-metil-1-propanol nastaje iz biosinteze valina i 2-metil-1-butanol iz leucina. Razgradnja treonina je povezana sa nastajanjem 1-propanola.

Aromatski spojevi sa sumporom nastali su metabolizmom kvasaca iz aminokiselina koje sadrže sumpor, metionina i cisteina. Prema Guitart i sur. (1999), nastajanje izoamilnog alkohola i fenil-etanola povezano je s metabolizmom treonina i fenilalanina. Herraiz i Ought (1993) potvrđuju da je nestanak treonina iz mošta povezan sa sintezom 1-propanol.

Prema istraživanju Bell i sur. (1979), ukupan udio dušika u moštu kao i relativan udio pojedinih dušičnih spojeva utječu na rast kvasaca, brzinu i tijek fermentacije, formiranje spojeva fermentacije te na organoleptička svojstva vina. Razna istraživanja pokazala su da su brzina i tijek fermentacije bili poboljšani kod moštova sa višim udjelom ukupnog dušika tj. aminokiselina (Ough i Lee, 1981; Huang i Ough, 1989, Vilanova i sur., 2007).

Monteiro i Bisson (1991) ustanovili su da su udio dušika u moštu i biomasa kvasaca u pozitivnoj korelaciji te da je dodatak dušika u mošt ubrzao tijek fermentacije. Bely i sur. (2003) utvrdili su da je viši udio YAN-a skratio trajanje fermentacije.

S druge strane, nedostatak dušika u moštu može uzrokovati višestruke probleme u vinifikaciji: ograničen rast kvasaca, usporenu i prekinutu fermentaciju te nastanak nepoželjnih spojeva kao što je sumporovodik (Spayd i Andersen-Bagge, 1996).

## 2.4. Organske kiseline

Kiselost vina jedan je od važnijih faktora u formiranju njegove kvalitete. Ubraja se među najvažnija svojstva mošta i vina. Osim što utječu na svježinu okusa, kiseline modificiraju percepciju drugih okusa i "mouth-feel" doživljaja (Jackson, 2014).

Organske su kiseline bitan parametar kvalitete vina i značajno doprinose sastavu, stabilnosti i senzornim svojstvima vina, posebice bijelih (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Organske kiseline osiguravaju vinu mikrobiološku i fizikalno–kemijsku stabilnost (Jackson, 2014), te utječu na boju, potencijal starenja i ravnotežu okusa vina (Margalit, 1997; Boulton, 2009). Osim toga utječu na kemijsku i enzimatsku oksidaciju spojeva koji se nalaze u moštu i vinu, metabolizam mikroorganizama, topljivost bjelančevina, polisaharida i kalijevog bitartarata, boju vina te učinkovitost sumpornog dioksida, bistrila i pektolitičkih enzima (Boulton i sur., 2009).

Jackson (2014) navodi da kiseline vina spadaju u grupu slabih organskih kiselina. Pri ionskoj disocijaciji dolazi do njihovog razdvajanja na katione i anione. Organske kiseline otapanjem u vodi slabo disociraju, što znači da u otopini postoji značajna količina molekula kiselina koje nisu disocirane. Konstanta disocijacije pokazuje odnos ravnotežnih koncentracija nedisociranog i disociranog oblika molekula. Što je konstanta disocijacije veća to je više molekula disociralo. Prema tome konstanta disocijacije pojedine kiseline predstavlja njezinu jačinu. Što je ta konstanta disocijacije veća, to je kiselina jača. U vinu najveću konstantu disocijacije ima vinska kiselina ( $9,10 \times 10^{-4}$ ) a za njom slijede jantarna, limunska, jabučna, octena i na kraju mliječna kiselina.

Ribéreau-Gayon i sur. (2006b) navode da su najzastupljenije organske kiseline u vinu: vinska, jabučna, limunska, mliječna i jantarna kiselina. Porijeklom su iz dva izvora, kiseline koje se formiraju u grožđu, te direktno prelaze u vino (vinska, jabučna, limunska) te kiseline koje nastaju tijekom procesa fermentacije (mliječna, jantarna, octena i dr.), (Margalit, 1997). Conde i sur. (2007) navode da se jantarna i mliječna kiselina, iako u vrlo malim količinama, mogu naći u zrelom grožđu.

Prema Ribéreau-Gayon i sur. (2006b) količina ukupnih kiselina mošta može varirati od 4,5 – 15 g/L (kao vinska), a zavisi od kultivara vinove loze, klimatskih uvjeta i stupnja zrelosti. Udio pojedinih kiselina, te međusobni odnos najzastupljenije vinske i jabučne kiseline, razlikuju se od kultivara do kultivara, ali i među klonovima pojedinog kultivara.

Vinska i jabučna kiselina predstavljaju gotovo 90% ukupne sume svih kiselina grožđa (Kliwer, 1966). Njihova sinteza vrši se u lišću i bobici, no nema dokaza o njihovom transportu iz lišća u bobice (Bellman i Gallander, 1979; Ruffner, 1982).

Međusobni odnos svih kiselina važan je fizikalno-kemijski pokazatelj vina i jedan od presudnih čimbenika u formiranju okusa suhih vina (Jackson, 2014). Vina sa niskom kiselošću i visokim pH imaju tup okus, dok su vina bogata kiselinama sa niskim pH izrazito kiselog, neužitnog okusa (Munyon i Nagel, 1977). Teško je odrediti optimalnu kiselost vina, obzirom da je ona uvjetovana nizom čimbenika poput stila vina, regionalnih preferencija proizvođača i potrošača. Nadalje kiselost vina i vrijednost pH međusobno su povezani, pa je tako za većinu vina poželjan raspon od 5,5 do 8,5 g/L ukupne kiselosti te vrijednosti pH od 3,1 do 3,4 (Jackson, 2014)

Ostale organske kiseline vina kao limunska, izolimunska, fumarna i  $\epsilon$ -ketoglutarna međuprodukti su TCA ciklusa metabolizma grožđa ili kvasaca. Mogu nastati metaboličkom razgradnjom šećera, aminokiselina i masnih kiselina. Većina tih kiselina u vinu se nalazi u malim koncentracijama, te općenito nemaju utjecaja na organoleptička svojstva vina. Moguća iznimka je  $\epsilon$ -ketoglutarna kiselina koja može vezati na sebe sumporni dioksid, te smanjiti njegovu slobodnu razinu u vinu (Jackson, 2014).

Ovisno o klimatskim uvjetima, odnosno specifičnosti položaja u kojima je grožđe proizvedeno, te o kultivaru i podlozi, kiselost grožđa može biti izrazito visoka. U takvim slučajevima je vrlo često količina jabučne kiseline veća od količine vinske kiseline (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Osim toga isti autori navode da odnos vinske i jabučne kiseline znatno varira ovisno o kultivaru vinove loze. Većina njih u trenutku berbe sadrži više vinske nego jabučne kiseline, no postoje iznimke poput sorata Chenin blanc, Pinota, Carignan (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

Jackson (2014) navodi kako jabučna kiselina može činiti gotovo 50% ukupne kiselosti i tijekom dozrijevanja se njena koncentracija smanjuje, posebice tijekom toplijih vremenskih uvjeta, dok pri hladnijem vremenu koncentracija jabučne kiseline ostaje povišena što negativno utječe na senzorna svojstva vina. Vina sa povećim sadržajem jabučne kiseline su opora, gruba, neharmonična, no jabučna kiselina u vinu nije postojana. Zato je u određenim uvjetima neophodno smanjiti i/ili ukloniti višak jabučne kiseline kako bi se vinu osigurala fizikalna, biokemijska i mikrobiološka stabilnost (Delcourt i sur., 1995; Pretorius, 2000).

Gallander (1977) potvrđuje navedenu tezu naglašavajući da vina iz hladnijih regija imaju veće koncentracije jabučne kiseline, zbog puno slabijeg intenziteta transpiracije u odnosu na toplija područja. Ovisno o gore navedenim vremenskim uvjetima, koncentracije jabučne kiseline kreću se u rasponu 1–10 g/L (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

Conde i sur. (2007) navode kako se najveća količina jabučne kiseline u grožđu nakupi netom prije fenofaze šare, a nastaje u listovima i zelenim bobicama. Nakon toga količina jabučne kiseline u grožđu počinje opadati i to prvenstveno zbog oksidacije iste.

Temperatura tijekom dozrijevanja grožđa može znatno utjecati na razgradnju jabučne kiseline. Tako je razgradnja jabučne kiseline naglašenija tijekom toplog vremena jer se aktivnost jabučnog enzima proporcionalno povećava s povećanjem temperature, dok na sadržaj vinske kiseline temperatura nema direktnog utjecaja (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

Za razliku od jabučne, vinska kiselina se značajno ne smanjuje tijekom dozrijevanja. Njena koncentracija ostaje relativno ista, iako treba uzeti u obzir da se volumen bobice povećava (Jackson, 2014).

Vinsku kiselinu sintetiziraju mnoge biljke, no u značajnijim koncentracijama jedino biljke iz porodice *Vitaceae* (Jackson, 2014). Vinska kiselina je glavna kiselina grožđa, te najzastupljenija kiselina mošta i vina koja u znatnoj mjeri utječe na formiranje kiselog okusa.

Ova kiselina sekundarni je proizvod metabolizma šećera, a askorbinska kiselina smatra se glavnim međuproduktom u biogenezi vinske kiseline (Loewus i Stafford, 1958).

Koncentracija vinske kiseline u grožđu u trenutku berbe varira i do 15 g/L, dok koncentracija u moštu varira od 2 do 6 g/L. Ta je kiselina relativno jaka kiselina, a njena vrijednost pH kreće se u rasponu 3.0 – 3.5 (Ribéreau-Gayon., 2006b).

Vinska kiselina teži spajanju s kalijem i/ili kalcijem u vinu čime nastaju tartarati (soli vinske kiseline) što vino čini nestabilnim, pa je između ostalog potrebno provesti stabilizaciju vina na tartarate (Minguez i sur., 1998) kako bi konačni proizvod bio pripremljen za tržište.

Limunska je kiselina vrlo bitna zbog svoje biokemijske i metaboličke uloge u Krebsovom ciklusu (Kalathenos i sur., 1995). Ribéreau-Gayon i sur. (2006b) navode da se količina limunske kiseline u vinu kreće u rasponu 0.2 – 1 g/L.

Mliječna kiselina nastaje tijekom alkoholne i malolaktične fermentacije. Kvasci tijekom alkoholne fermentacije proizvode manje količine iste, dok se većina mliječne kiseline sintetizira tijekom malolaktične fermentacije u kojoj bakterije, većinom mliječno kisele, prevode jabučnu u mliječnu kiselinu (Jackson, 2014).

Margalit (1997) navodi da se jantarna kiselina stvara isključivo tijekom alkoholne fermentacije, te svojom količinom pridonosi ukupnoj kiselosti vina. Njezine se vrijednosti u vinu kreću u rasponu od 0.5 do 1.5 g/L te je vrlo stabilna kiselina, a na njenu količinu u vinu utječu soj kvasaca koji provodi fermentaciju, količina šećera u moštu te vrijednosti pH mošta (Shimazu i Watanabe, 1981).

Istraživanje sastava pojedinačnih organskih kiselina kultivara Kraljevina ukazala je na varijabilnost ovisno o istraživanom vinogradarskom položaju (Jeromel, 2005).

Aragon i sur. (1998) su istraživali utjecaj bistrenja, soja kvasaca i temperature fermentacije na koncentraciju organskih kiselina u vinu 'Malvasie' i 'Muscatela' i zaključili su da na sastav organskih kiselina u vinu najveći utjecaj ima kultivar.

Garcia i sur. (2001) su utvrdili da podloga na koju je vinova loza cijepljena utječe na koncentraciju organskih kiselina u vinu.

Gómez-Plaza i sur. (2000) u vinima dobivenih od sedam klonova kultivara Monastrell utvrdio značajne razlike u mineralnom sastavu, organskim kiselinama i intenzitetu boje.



## 2.5. Polifenolni spojevi

Polifenoli su velika i kompleksna skupina spojeva od presudne važnosti za kakvoću vina. Njihov veliki utjecaj na senzorna svojstva vina (Hernanz i sur., 2007) i povoljan učinak na zdravlje ljudi (Babu i Liu, 2009), čini ih podjednako zanimljivom temom istraživanja danas, kao i na samim počecima, krajem 19.st. (Kennedy i sur., 2006).

Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji su građeni od aromatskih prstenova na kojima je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, a pojavljuju se u sjemenkama i plodovima mnogih kritosjemenjača (Kahle i sur., 2006; Vinson i sur., 2005).

Polifenolni spojevi u vinu ekstrahiraju se tijekom procesa vinifikacije iz različitih dijelova grožđa - kožice, sjemenke i peteljke (Soleas i sur., 1997). Kultivar, godina proizvodnje, okolinski i klimatski uvjeti, bolesti loze, tip tla, geografski položaj i stupanj zrelosti utječu na koncentraciju polifenola u grožđu (Macheix i sur., 1994; Revilla i sur., 1997; Gómez-Plaza i sur., 2000; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Mulero i sur., 2009; Orduña, 2010; Cejudo-Bastante i sur., 2011).

Klimatske promjene koje obuhvaćaju povišene temperature, suše i jači intenzitet UV zračenja u većini vinorodnih područja svijeta postale su značajni čimbenici metabolizma fenolnih spojeva. Ipak, presudni utjecaj na sadržaj polifenola ima genotip, odnosno kultivar (Castillo-Muñoz i sur., 2007; Pomar i sur., 2005; Guerrero i sur., 2009).

Polifenolni spojevi vrlo su značajni čimbenici kakvoće vina budući da utječu na boju vina (Thorngate, 1997), senzorne karakteristike poput gorčine i astringencije (Robichaud i Noble, 1990), oksidacijske reakcije (Cheynier i Ricardo Da Silva, 1991), reakcije sa proteinima (Ricardo da Silva i sur., 1991) i promjene vina tijekom starenja (Haslam, 1980).

U grožđu i vinu zastupljene su dvije glavne skupine fenolnih spojeva, neflavonoidi i flavonoidi. Predstavnici neflavonoida u grožđu i vinu su fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne) i stilbeni, a predstavnici flavonoida su flavonoli, flavanonoli i flavan-3-oli (Jackson, 2014; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

Bijelo grožđe i vino sadrže manje koncentracije polifenolnih spojeva u odnosu na crno te se kreću od 50-350 mg/L u grožđu i 800 do 4 000 mg/l u vinu (Margalit, 1997; Cheynier i sur., 1998).

Najzastupljeniji polifenolni spojevi u moštu bijelih kultivara su hidroksicimetne kiseline iz mesa bobice, te monomerni flavanoli većinom iz kože bobice (Kennedy, 2008).

Glavne hidroksicimetne kiseline u bijelim vinima su kafeinska i kaftarna kiselina (Chamkha i sur., 2003; Singleton i sur., 1986), a flavanoli katehini i proantocijanidini. Njihov utjecaj se očituje u kakvoći vanjskog izgleda bijelih vina, ali i okusa.

Polifenolni sastav vina ovisi o kultivaru grožđa (Gatto i sur., 2008; Mattivi i sur., 2006; Yang i sur., 2009; Katalinić i sur., 2010; Liang i sur., 2011) koji se koristi u proizvodnji (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b) i uvjetima vinifikacije. Dio polifenola potječe od mikroorganizama i drvenih bačava u kojima se vino čuva, a dio se može ekstrahirati i iz peteljke ili lišća tijekom postupka prerade grožđa (Iland i sur., 2011).

S obzirom da se bijela vina dobivaju od samotoka ili od mošta uz lagano prešanje, u njihovom polifenolnom profilu dominiraju ne flavonoidi koji uglavnom potječu iz mesa bobice. Duži kontakt s kožicom (maceracija) nakon muljanja, a prije prešanja ili veliki pritisak tijekom prešanja, doprinose većoj koncentraciji flavonoida u bijelom vinu (Iland i sur., 2011).

Grožđe i vino sadrže niz polifenolnih spojeva, derivata osnovne strukture fenola (hidroksibenzen). Fenol je najjednostavniji aromatski alkohol, molekulske mase 94.1. Sadrži jedan benzenski prsten i hidroksilnu skupinu kao funkcionalnu skupinu. Upravo zbog hidroksilnih skupina i nezasićenih dvostrukih veza osjetljivi su na oksidaciju, što ih čini dobrim antioksidansima (Rice-Evans i sur., 1997). Ishodišni spoj u biosintezi polifenolnih spojeva je aminokiselina fenilalanin koji nastaje u putu nastanka šikiminske kiseline (Adams, 2006).

Sve veći interes za polifenolima potiču i najnovija istraživanja koja dokazuju njihova blagotvorna djelovanja na ljudsko zdravlje kod upala, tumora, kardiovaskularnih bolesti i sl. (Falchi i sur., 2006; Singletary i sur., 2003; Rodriguez-Vaquero i sur., 2007).

De la Presa-Owens i sur. (1995a, 1995b) su uspoređujući fenolni sastav mošta i vina kultivara Macabeo, Xarello i Parellada utvrdili da se oni razlikuju na osnovi koncentracije određenih polifenolnih spojeva. Za navedene razlike među kultivarima, kako kod mošta, tako i kod vina, autori smatraju da su genetski uvjetovane stoga što su bile postojane tijekom različitih vegetacijskih sezona i kod različitih načina vinifikacije.

Istraživanja vina različitih klonskih kandidata pokazala su da se ona mogu značajno razlikovati u intenzitetu i tonalitetu boje i koncentraciji pojedinačnih polifenola (Santesteban i Royo, 2006). Polifenolni sastav, antioksidacijska aktivnost i boja vina istraživana je u klonovima Concord grožđa iz Brazila (de Sá Borges i sur., 2013).

### 2.5.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najvažnija i najopsežnija grupa polifenola (Iland i sur., 2011). Struktura i sastav flavonoida u najvećoj mjeri su određeni samim genetskim profilom pojedinog kultivara. Tako većina istraživanja potvrđuje kako agrotehničke i ampelotehničke mjere provedene u vinogradima, kao i okolišni uvjeti, više utječu na koncentraciju samih flavonoida negoli na njihov međusobni odnos (Arozarena i sur., 2002). Važan dio strukture i boje vina potječe od flavonoida koji se nalaze u kožici, sjemenkama i mesu grožđa.

Flavonoidi obuhvaćaju različite grupe spojeva poput flavona, flavonola, flavanona, flavanonola, flavana, flavanola, antocijanidina i antocijanina, kalkona i dihidrokalkona (Baderschneider i Winterhalter, 2001).

Flavonoidi se u prirodi javljaju kao slobodni ili vezani s drugim flavonoidima, šećerima, neflavonoidima ili kombinacijom istih. Kemijska raznolikost proizlazi iz mnogo različitih aglikona i glikozida kao i pojave reakcija kondenzacije pri čemu monomerni flavonoidi tvore dimerne i veće forme stvarajući cijeli niz heterogenih struktura (Garrido i Borges, 2013).

Polimerni flavonoidi čine većinu u ukupnim fenolima nađenim u svim fazama proizvodnje vina. Vrlo su korisni obzirom na stabilne, specifične strukture, te obzirom da okolišni uvjeti relativno malo utječu na njihovo nakupljanje i biosintezu (Markham i sur., 1989).

Značajnu ulogu u strukturi i boji vina igraju i flavonoidi koje nalazimo u kožici, sjemenci i (nešto rjeđe) u mesu bobice. Osnovnu strukturu C6-C3-C6 (aglikon) sačinjavaju dva benzenska prstena, povezana propanskim lancem, koji može ili ne mora formirati treći, heterociklički prsten. Obzirom na heterociklički prsten flavonoide dijelimo na različite grupe spojeva. Najzastupljeniji flavonoidi u grožđu su antocijani, flavanoli, flavonoli (Adams, 2006).

#### 2.5.1.1. Flavanoli (flavan-3-oli)

Flavan-3-oli su najzastupljeniji flavonoidi u grožđu odgovorni za osjet gorčine i astrigencije kod grožđa i vina (Kennedy i sur., 2006). Koncentracija i sastav flavanola u grožđu ovisi o mnogo čimbenika, kao što su kultivar, godina, ekološki uvjeti i rok berbe (Rodríguez Montealegre i sur., 2006; Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Flavanoli se mogu naći u obliku slobodnih monomera (katehini), oligomera i polimera koje nazivamo proantocijanidini ili kondenzirani tanini. Glavni monomer u grožđu *Vitis vinifera* je katehin i njegov izomer epikatehin, a u manjoj mjeri galatni ester epikatehina, epikatehingalat te galokatehin (Kennedy i sur., 2006; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Oligomere flavanola i proteina nazivamo kondenzirani tanini, dok oligomere flavanola i antocijanidina nazivamo proantocijanidini.

Flavanoli nastaju prije šare, a sastav i sadržaj im se mijenja tijekom dozrijevanja grožđa. Najviše ih nalazimo u sjemenci bobice (Singleton i sur., 1966; Czochanska i sur., 1979; Romeyer i sur., 1986). Ekstrakcija flavanola koji potječu iz sjemenki, tijekom vinifikacije je povećana što je duže vrijeme trajanja maceracije, što su veće temperature i viši sadržaj alkohola tijekom maceracije i fermentacije (Singleton i Draper 1964; Meyer i Hernández, 1970; Oszmianski i sur., 1986).

Osnovne jedinice flavanola mogu se međusobno spajati u svim kombinacijama, što može dati jako veliki broj različitih oligomernih i polimernih spojeva (Boulton i sur., 2009). Svi ti spojevi imaju izraženu trpkocu, gorčinu i talože se nakon vezanja s proteinima.

Katehin je glavni flavanol u kožici grožđa, dok epikatehin dominira u sjemenkama. Oba spoja imaju gorak okus kada se nalaze u obliku monomera. Općenito, gorčina opada, a trpkoca se pojačava s povećanjem stupnja polimerizacije, tj. povećanjem veličine molekule, odnosno dužine lanca (Cheynier i sur., 2006). Najkraći polimeri nalaze se u sjemenkama (4 do 20 podjedinica) koje mogu vinu dati gorak okus. Tanini kožice su obično dulji (25 do 100 podjedinica) pa imaju bolji utjecaj na okus vina (Kennedy i sur., 2001; Monagas i sur., 2006). Katehin i epikatehin u sjemenkama često su esterificirani galnom kiselinom što pojačava njihovu astringentnost (Vidal i sur., 2003; Dixon i sur., 2005).

U bijelim vinima proizvedenim bez maceracije monomeri i oligomeri flavanola su nađeni u malim koncentracijama (nekoliko mg/L) (Cheynier i sur., 1989; Ricardo da Silva i sur., 1993; Betes-Saura i sur., 1996; Chamkha i sur., 2003), pri čemu katehini dominiraju. Katehini su prekursori posmeđivanja u bijelim vinima te značajno pridonose okusnom profilu (Singleton i Noble, 1976). Veliki razmak od berbe do prešanja, pogotovo ako je

dodan SO<sub>2</sub> zbog prevencije oksidacije, kao i tijekom prešanja, rezultira većom koncentracijom flavonoida u bijelom moštu i vinu (Yokotstuka, 1990; Somers i Pocock, 1991).

#### 2.5.1.2. *Flavonoli*

Flavonoli su žuti pigmenti u glikozidnoj formi, smješteni u lišću loze i kožici bobice s ulogom zaštite od UV zračenja (Haselgrove i sur., 2000; Price i sur., 1995), pa je njihova biosinteza direktno ovisna o osunčanosti grožđa (Downey i sur., 2004).

Neki flavonoli su detektirani i u mesu bobice (Pereira i sur., 2006), no u sjemenci do danas nisu pronađeni (Rodriguez Montealegre i sur., 2006).

Koncentracija flavonola u bobici ovisi o razvojnem stadiju bobice te genetskim i ekološkim čimbenicima. Biosinteza flavonola nastupa već u cvatnji, no glavina se sintetizira nakon šare, a koncentracija im konstantno raste tijekom dozrijevanja bobice (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Ukupan sadržaj flavonola kreće se od 2 do 30 mg/kg bobice kod bijelih sorata, te od 4 do 78 mg/kg bobice kod crnih sorata (Mattivi i sur., 2006). Rodriguez Montealegre i sur. (2006) dobili su znatno veće vrijednosti sadržaja flavonola u istraživanim kultivarima pa su tako utvrdili vrijednosti od 170 mg/kg bobica kod sorte Viognier te 200 mg/kg bobica kod Shiraza.

Svaki kultivar posjeduje specifični flavonolski profil koji se može koristiti u taksonomskoj klasifikaciji (kvalitativno i kvantitativno) (Mattivi i sur., 2006; Masa i sur., 2007).

U grožđu su identificirani glikozidi sljedećih aglikona: kvercetin, kemferol, izoramnetin, miricetin, laricitrin i siringetin. Glavni flavonoli pronađeni u grožđu su 3-glikozidi kvercetina, pogotovo kvercetin-3-glukozid i kvercetin-3-glukuronid (Downey i sur., 2003; Price i sur., 1995; Iland i sur., 2011).

U bijelim vinima su detektirani samo kvercetin, kemferol i izoramnetin. Flavonoli miricetin, laricitrin i siringetin su specifični za crne kultivare i nisu pronađeni u ni jednom bijelom kultivaru (Mattivi i sur., 2006; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Kvercetin je najzastupljeniji flavonol svih bijelih kultivara kao što su Chardonnay, Rajnski rizling, Viogner i Sauvignon bijeli, u kojima je zastupljen s preko 70 % ukupnih flavonola (Mattivi i sur., 2006).

Koncentracija flavonola uvelike ovisi o izloženosti sunčevoj svjetlosti (Price i sur., 1995; Di Profio i sur., 2011) i razlikuje se između kultivara. U bijelim kultivarima koncentracija varira od 2-30 mg /kg po bobici, odnosno 4-78 mg /kg u crnim kultivarima (Mattivi i sur. 2006).

U bijelim vinima proizvedenim bez maceracije, flavanoli nisu nađeni ili ih ima samo u tragovima (flavonoli iz mesa bobice). Kvercetin-3-glukuronid je jedini flavonol pronađen u samotoku i vinu bijelih kultivara (Betes-Saura i sur. 1996) uz tragove kemferol-3-glukozida u Rizlingu rajnskom (Baderschneider i Winterhalter, 2001). Prosječna koncentracija je bila 0.5 i 0.25 mg/L u samotoku i vinu. Ribéreau-Gayon i sur. (2006b) navode koncentracije flavonola u crnim vinima do 100 mg/L, dok ih kod bijelih vina koja nisu bila u kontaktu s kožicom ima svega 1-3 mg/L.

Koncentraciju flavonola u vinu može povećati prisutnost lišća u masulju (Somers i Ziemelis, 1985). Odgođeno prešanje grožđa, uz dodani SO<sub>2</sub> zbog sprječavanja oksidacije, kao i samo prešanje rezultira povećanom koncentracijom flavonola u moštu i vinu. (Yokotstuka, 1990; Somers i Pocock, 1991). Maceracija bijelog masulja čiji je cilj veća ekstrakcija tvari arome i naglašavanje sortnog karaktera također rezultira povećanjem koncentracije flavonola (Cheynier i sur. 1989; Ricardo da Silva i sur. 1993).

#### 2.5.1.3. *Kondenzirani tanini*

Kondenzirani tanini ili proantocijanidini raznolika su grupa oligomera i polimera čije podjedinice čine flavanoli, a iz kojih nastaju antocijanidini (Teixeira i sur., 2013; Garrido i Borges, 2013). Nalaze se u čvrstim djelovima bobice poput kože i sjemenke kao i u mesu. Njihova koncentracija, struktura i stupanj polimerizacije ovisi o smještaju u tkivu bobice, a ekstrahiraju se u mošt tijekom postupaka proizvodnje vina (prešanja, maceracije i fermentacije) (Ricardo da Silva i sur., 1991).

Proantocijanidini u grožđu i vinu prisutni su uglavnom u polimernim oblicima (60-80%), nakon čega slijede oligomeri (15-30%), dok monomerni flavanoli (katehini) predstavljaju samo mali dio (manje od 10%) (Sun i sur., 2001).

Poznati proantocijanidini u grožđu *V. vinifera* su uglavnom oligomeri i polimeri katehina i epikatehina povezani C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> vezom. Procijanidini i prodelfinidini, koji se hidroliziraju do cijanidina i delfinidina, najznačajniji su kondenzirani tanini u grožđu i vinu (He i sur., 2008). Tanini u sjemenci grožđa su polimeri flavanola (katehina i epikatehina) i monomera epigalokatehina povezanih i/ili C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> vezama (tip B), a tanini kože sadrže epigalokatehin i tragove galokatehina i epigalokatehingalata (He i sur., 2008).

Polimeri proantocijanidina nisu analizirani u bijelim vinima, a derivati flavonola nisu pronađeni u vinima iz Champagne iako je u grožđu bilo prisutno oko 20 mg/kg proantocijanidina (Mané, 2007). Uzrok tomu može biti adsorpcija većih polimera ili oksidacija tijekom prešanja. Povećanje razine kisika prije fermentacije rezultira manjom količinom u vinu, potvrđujući ulogu oksidacije (Cheynier i sur., 1989; Ricardo da Silva i sur., 1993).

Identifikacija i proučavanje fizikalno-kemijskih svojstava proantocijanidina je važna tema istraživanja u enologiji, s obzirom da ovi spojevi utječu na senzorna svojstva vina (boja, okus, astringencija i gorčina). Proantocijanidini su važni u procesu starenja vina zbog njihove sklonosti procesima oksidacije, kondenzacije i polimerizacije (Garrido i Borges, 2013).

### 2.5.2. Neflavonoidni

Neflavonoidne spojeve dijelimo na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, hlapive fenole i stilbene (Rentzsch i sur., 2009). Iako ovi spojevi nisu obojeni, poznato je da pospješuju i stabiliziraju boju crnih vina (Rentzsch i sur., 2009). Neflavonoidi se nalaze u grožđu i vinu u malim koncentracijama, uz iznimku hidroksicimetnih kiselina (Kennedy i sur., 2006). Najznačajniji predstavnici neflavonoida u bijelim vinima su već spomenute fenolne kiseline i stilbeni. Ostali neflavonoidi u vinu potječu od dozrijevanja u drvenim bačvama (galna i elaginska kiselina).

#### 2.5.2.1. *Hidroksicimetne kiseline*

Hidroksicimetne kiseline imaju karakterističnu C6-C3 građu te formalno pripadaju grupi fenilpropanoida (Rentzsch i sur., 2009). Najpoznatije hidroksicimetne kiseline su kafeinska, p-kumarinska, ferulinska i sinapinska kiselina (Rentzsch i sur., 2009). Hidroksicimetne kiseline su glavni polifenolni spojevi u bijelim vinima i odgovorni su za boju bijelih vina (Kennedy i sur., 2006), a prvi put su otkrivene u grožđu i vinu sredinom 20. stoljeća (Ribéreau-Gayon i sur., 1963). Dokazano je da hidroksicimetne kiseline u grožđu ne nalazimo u slobodnoj formi već su vezane u obliku estera s vinskom kiselinom (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Jackson, 2014). Tartaratni esteri hidroksicimetnih kiselina čine 80% svih polifenola u moštu od bijelog grožđa (Betes Saura i sur., 1996).

Esteri hidroksicimetnih kiselina i vinske kiseline počinju se nakupljati u bobici tijekom i nakon cvatnje, a najviše koncentracije postižu netom prije šare. Nakon toga, njihova koncentracija opada i na toj se razini zadrži tijekom dozrijevanja bobice, sve do berbe (Easterling i sur., 2000; Braidot i sur., 2008).

Hidroksicimetne kiseline mogu biti prisutne i u *cis* i *trans* obliku, ali ipak je *trans* oblik stabilniji, pa ih se u tom obliku više i nalazi (Rentsch i sur., 2009).

Mnogi autori u svojim istraživanjima navode da je kaftarna kiselina najzastupljeniji polifenolni spoj u bijelim vinima (Darias-Martin i sur., 2000; Fernández- Pachón i sur., 2006; Ružić i sur., 2011). Razine slobodnih hidroksicimetnih kiselina u grožđu su vrlo niske, pri čemu se njihov sadržaj povećava dozrijevanjem vina odnosno hidrolizom tartaratnih estera (Andres-Lacueva i sur., 1996; Somers i sur., 1987). Singleton i sur. (1986), analizirali su mošt 37 kultivara vinove loze te utvrdili koncentracije hidroksicimetnih kiselina od 16 mg/L pa sve do 430 mg/L, s prosječnom vrijednosti od 145 mg/L mošta. Koncentracije u vinu im se kreću oko 100 mg/L (Rentsch i sur., 2009).

Hidroksicimetne kiseline su bezbojne u razrijeđenoj alkoholnoj otopini, ali su vrlo osjetljive na oksidaciju (posebno kaftarna), uslijed čega poprimaju žute, tamnožute i smeđe tonove (Boulton i sur. 2009; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Kao primarni supstrat za polifenoloksidaze, odgovorne su za oksidaciju i posmeđivanje bijelih moštova (Cheynier i sur., 1989; Jackson, 2014).

#### 2.5.2.2. *Hidroksibenzojeve kiseline*

Hidroksibenzojeve kiseline derivati su benzenske kiseline, koju karakterizira karakteristična C6-C1 građa (Rentsch i sur., 2009). Najpoznatije hidroksibenzojeve kiseline koje su pronađene u vinima su galna, gentizinska, p-hidroksibenzojeva, protokatehinska, salicilna, siringinska, vanilinska kiselina (Rentsch i sur., 2009). Različite hidroksibenzojeve kiseline u vinima se uglavnom nalaze u slobodnoj formi (Pena-Neira i sur., 2000; Pozo-Bayon i sur., 2003; Vanhoenacker i sur., 2001). Galna kiselina je najzastupljenija hidroksibenzojeva kiselina.

Iako potječe iz grožđa, može nastati i hidrolizom kondenziranih tanina (Garrido i Borges, 2013). Razine hidroksibenzojevih kiselina u vinu znatno ovise o kultivaru vinove loze i uzgojnim uvjetima (Pozo-Bayon i sur., 2003; Pena-Neira i sur., 2000). U grožđu su ove kiseline uglavnom prisutne kao glikozidi ili esteri (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).



### 2.5.2.3. Stilbeni

Stilbeni su derivati cimetine kiseline, a sastoje se od dva benzenska prstena vezana etanskim ili ponekad etilenskim lancem (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Prirodno su prisutni u nekoliko jestivih biljaka i nekoliko vrsta roda *Vitis*, većinom u kožici u fazi zrelosti. Imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje s obzirom na svoja antioksidativna, antikancerogena i antimutagena svojstva (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Koncentracija stilbena u bobici se razlikuje između kultivara (Gatto i sur, 2008), a ovisi i o čimbenicima poput klime, infekcije patogenima (Jeandet i sur., 1995; Perrone i sur., 2007) te enološkim postupcima (Gambutti i sur., 2004). Prema Jeandet i sur. (1995) starenje vina nema velikog utjecaja na koncentraciju stilbena, dok Garrido i Borges (2013) navode da vina koja dulje dozrijevaju sadrže više stilbena. Sinteza stilbena se povećava uslijed infekcije patogena i abiotičkog stresa - UV zračenja i katalize teških metala (Bavaresco i sur., 1997; Garrido i Borges, 2013), pa su u zdravom grožđu koncentracije normalno niske ili se ne mogu ni detektirati (Iland i sur., 2011).

Najpoznatiji predstavnik ove skupine polifenola je resveratrol, fitoaleksin kojeg loza proizvodi kao reakciju na gljivične infekcije (*Botrytis cinerea* ili *Plasmopara viticola*), a dolazi kao *cis*- i *trans*-izomer (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Prisutnost ovog spoja u vinu opisana je tek 1992. godine (prema jednima zaslugom dvojice znanstvenika; Siemana i Creasy s Cornell Sveučilišta, prema drugima zaslugom Selwen St. Leger i suradnika). Siemann i Creasy (1992) su objavili količine od 2.86 do 0.03  $\mu\text{mol/l}$  u crnim i 0.438-0.001  $\mu\text{mol/l}$  u bijelim vinima. *Cis*-resveratrol je manje stabilni izomer *trans*-resveratrola (Chong i sur., 2009) prisutan je u vinu iako ga u grožđu ima samo u tragovima (Garrido i Borges, 2013).

Koncentracija *trans*-resveratrola u soku grožđa je u rasponu 0.09–0.18 mg/L dok su koncentracije slobodnih *trans*- i *cis*-resveratrola 0.1–0.8 mg/L u bijelim vinima (Stecher i sur., 2001). U grožđu i vinu su identificirani i drugi derivati stilbena poput piceida (resveratrol- glukozid), astringin (3'-OH-*trans*-piceid), pterostilben te oligomerne i polimerne forme, koje se nazivaju viniferini ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, i  $\delta$ -  $\epsilon$ -viniferini) (Jiang i sur., 2010). Viniferini nastaju oksidativnom polimerizacijom monomernog resveratrola aktivnošću peroksidaze (Teixeira i sur., 2013).

Prisutnost stilbena u vinu je od nedavno iznimno zanimljiva tema istraživanja, uz naglasak na korelaciju između njihovog profila i enoloških postupaka te različitih kultivara vinove

loze (Garrido i Borges, 2013). Razlog tomu je opće prihvaćena činjenica da polifenoli imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje (Sun i sur., 2006). U tom smislu najintenzivnije je proučavan *trans*-resveratrol, čija biološka aktivnost prevenira kardiovaskularne bolesti i rak (Ito i sur., 2003). Ostali stilbeni imaju također slična svojstva pa istraživanja novih derivata stilbena imaju poseban značaj (Guebailia i sur., 2006).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kultivar Kraljevina (*Vitis vinifera L.*)

Kraljevina je kultivar vinove loze rasprostranjen u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, a najviše u Prigorju, u okolici Sv. Ivana Zeline gdje je nekad bio jedan od vodećih kultivara i „bazno“ vino gotovo svih proizvođača. Kultivar je regionalizacijom preporučen za sva vinogorja podregija Prigorje-Bilogora, Zagorje-Međimurje i Moslavina, a nešto je ima i na Plešivici i Pokuplju, dok je u ostalim krajevima vrlo rijetka. Poznata je i pod sinonimima: Kraljevina crvena, Imbrina, Brina, Moravina, Kraljevina, Kralovina, Königstraube, Roter Portugieser, Piros oporto, Porthogese rosso, Portugais rose, Portugais rouge. Ovaj kultivar pronađen je i u okolici Rijeke (Kastav) pod imenom Šiler (Maletić i sur., 2015). Osim u Hrvatskoj, uzgaja se još i u Sloveniji, pod nazivom Rdeča Kraljevina, te Mađarskoj pod sinonimom Piros leanyka.

U Republici Hrvatskoj Kraljevina se uzgaja na 166,17 ha (APPRRR, 2016).

Neki sinonimi upućuju na portugalsko podrijetlo, no nisu pronađene nikakve povijesne niti genetičke veze sa tom zemljom. U međunarodnoj bazi podataka European Vitis Database nisu utvrđene druge primke pod ovim nazivom ili nekim već poznatim sinonimima, kao ni drugi kultivari čiji bi genetski profil bio istovjetan Kraljevini. Kao mogući razlog postojanja ovih sinonima navodi se bečki trgovac sadnicama vinove loze u Austrougarskoj Monarhiji podrijetlom iz Portugala (Maletić i sur., 2015).

Nekoć se uzgajala i u samom središtu Zagreba, a i danas je vrlo česta u zagrebačkoj okolici. Godine 1999. dobila je status „županijske robne marke“, što je dodatno pridonijelo njezinoj popularnosti i tržišnom opstanku.

Kod nas se uzgaja odavna, a među prvima je opisuje i glasoviti austrougarski ampelograf Franz Xaver Trummer 1841. godine. Kasnije su je opisivali i istraživali mnogi, navodeći kako je riječ o zahvalnom i vrijednom kultivaru, omiljenom kod ovdašnjih vinogradara.

#### *Ampelografske karakteristike*

Vrh mladice je otvoren, gladak, s izraženom antocijanskom obojenošću. Boja mladih listića je brončanozelena, s crvenkastim rubom. Odrasli list je okrugao, trodijelan, otvorenog sinusa peteljke u obliku slova U. Lice i naličje plojke je golo, s tek rijetkim čekinjastim dlačicama po nervaturi naličja. Cvijet je morfološki i funkcionalno

hermafroditan, odnosno s potpuno razvijenim prašnicima i tučkom. Zreli grozd je srednje dug do dug, ljevkastoga ili konusnog oblika, srednje zbijen do zbijen. Zrele bobice su okrugle, zelenožute boje, a na sunčanoj strani najčešće dobiju ružičaste ili crvenkaste nijanse.

Međutim, veličina grozda i izgled bobica variraju, ponajviše zbog visoke unutarSORTNE varijabilnosti pa bobice mogu biti i potpuno crvene te posute točkama i pjegama različite veličine i intenziteta. Meso je srednje čvrsto, neutralna mirisa i okusa (Maletić i sur., 2015).

#### *Gospodarske karakteristike*

Kraljevina kreće s vegetacijom srednje kasno do kasno, a dozrijeva srednje kasno (u III. razdoblju prema Pulliatu). Bujna je do vrlo bujna sorta.

Kultivar nije posebno osjetljiv na standardne gljivične bolesti, osim u vlažnim godinama na *Botrytis*. Zbog kasnijeg kretanja vegetacije nije izložena kasnim proljetnim mrazovima. Nije otporna na niske zimske temperature, pupovi joj u pravilu izmrznu na temperaturi nižoj od -15 °C. No osjetljivost na niske temperature ovisi o kondiciji i ishranjenosti loze, dužini trajanja i datumu pojave u razdoblju mirovanja pa se eventualne štete mogu pojaviti i na drugim, višim ili nižim temperaturama. U slučaju nepovoljnih uvjeta u vrijeme cvatnje rado se osipa. Nije izbirljiva po pitanju tla, uspijeva dobro i na laporastim tlima ako su rahla i topla (Mirošević i Turković, 2003).

Kultivar se odlikuje visokom rodnošću pupova te visokim prinosima po trsu i jedinici površine. U sjeverozapadnoj Hrvatskoj se smatra jednim od najrodnijih kultivara, čiji se prinosi kreću od 12 pa do više od 20 t/ha.

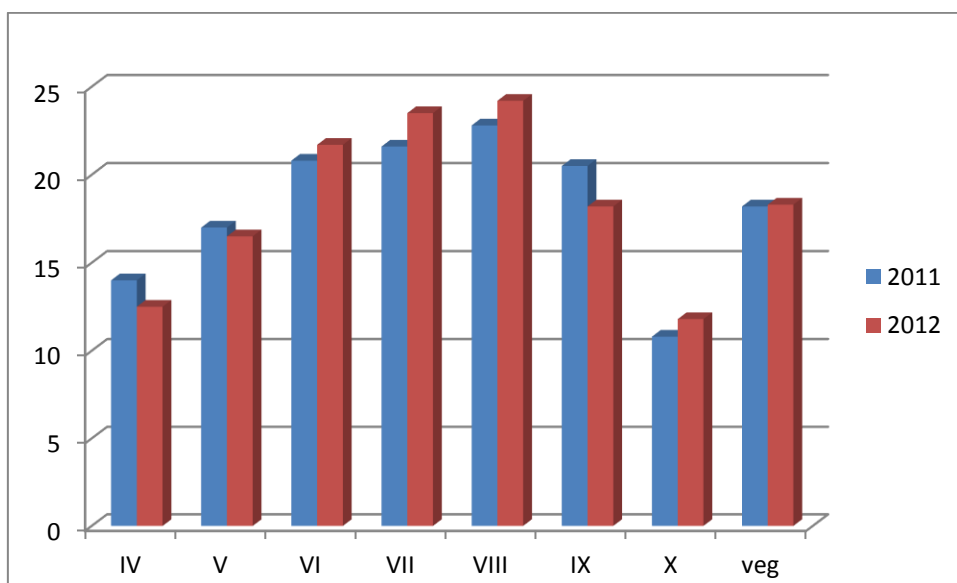
Iako je kultivar visoke i redovne rodnosti, pokazuje značajne razlike ovisno o položaju i tehnologiji, ali se često ističu i „tipovi“ Kraljevine, odnosno klonske razlike unutar kultivara koje se nerijetko označuju različitim imenima. Tako se uvriježilo mišljenje da postoje tri različita tipa: „crvena“, „zelena“ i „mirisava“ ili „pikasta“. Te se razlike odnose na boju i izgled kožice, a o tome u pravilu ovisi i kvaliteta vina. Tako je najkvalitetnija „mirisava“ („pikasta“), ali i najmanje rodna. S druge strane, najrodnija je „zelena“, ali jednako tako daje i najslabija vina. To je bio i razlog pokretanja projekta klonske selekcije Kraljevine 2003. godine gdje je visoka unutarSORTNA raznolikost i dokazana, ali je također utvrđeno da su ove odlike u izravnoj vezi s tehnologijom uzgoja. Na bolesti je srednje osjetljiva, a nešto više je sklona sivoj plijesni, kada je obilje vlage tijekom dozrijevanja grožđa.

Koncentracija šećera je niža do srednja. Ukupna kiselost je redovito visoka, što je i sortno obilježje njezinih vina. Preporuča se brza prerada grožđa i kontrolirana fermentacija s ciljem zadržavanja nježnih aroma vina. Vina su joj najčešće svijetle žutozelenkaste boje, blagog i ugodnog mirisa te laganog i svježeg okusa. Upravo su ta svojstva koja se zadnjih godina sve više traže na tržištu, glavni adut ovog kultivara (Maletić i sur., 2015).

### 3.2. Klimatske značajke vinogorja Zelina

Na prostoru vinogorja Zelina prevladavaju uvjeti umjerene kontinentalne klime. Prosječna količina oborina iznosi oko 910 mm. Kod analize mjesečnih količina oborina, jako su važna dva razdoblja u uzgoju poljoprivrednih kultura, a to su vegetacijsko razdoblje (IV do IX mjesec) i van-vegetacijsko razdoblje (od X do III mjeseca). Na temelju prosječnih mjesečnih vrijednosti oborina, utvrđeno je da u vegetacijskom razdoblju prosječno padne 517,8 mm, a izvan vegetacije nešto manje odnosno 393,1 mm oborina.

Podaci o vremenskim prilikama za 2011. i 2012. godinu dobiveni su od Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ).



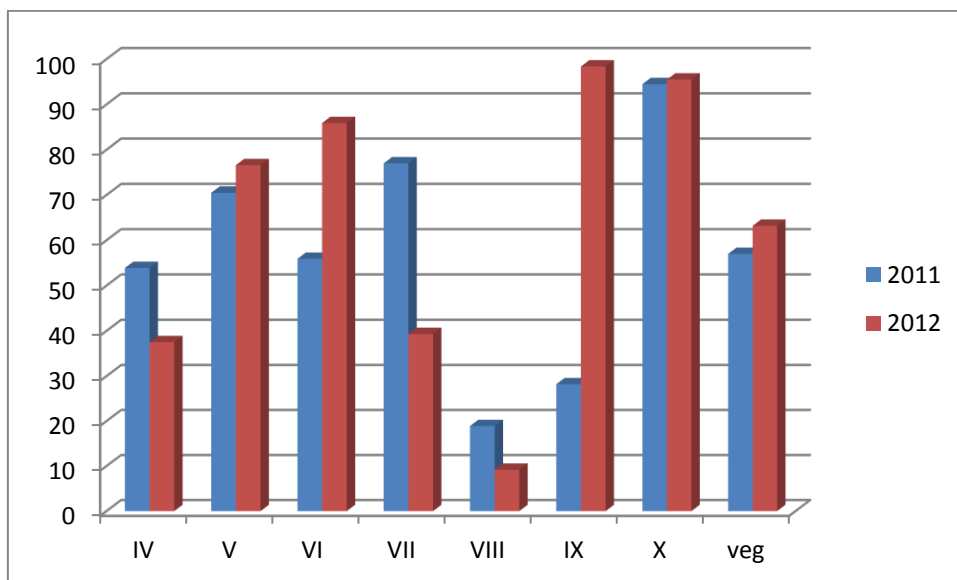
Grafikon 1. Srednje mjesečne temperature zraka u vegetaciji, Zagreb – Maksimir, 2011 i 2012. godina

Iz grafikona 1. možemo vidjeti da je u promatranom razdoblju mjesec s najvišom prosječnom temperaturom u 2012. godini bio kolovoz sa temperaturom od 23.5°C, dok je najhladniji mjesec u vegetaciji bio listopad 2011. godine s prosječnom temperaturom od

10.8°C. Srednja godišnja temperatura 2011. godine je iznosila 12.0°C, a 2012. godine 12.5°C, dok je srednja vegetacijska temperatura 2011. iznosila je 18,2°C, a 2012. godine 18.3°C. Mjesec sa najvećom prosječnom temperaturom 2012. godine bio je kolovoz s 24.2°C, dok je najhladniji bio mjesec listopad 2011. godine sa srednjom mjesečnom temperaturom od 10,8°C.

Iz grafikona 1. je također vidljivo da su prosječne temperature 2011. godine bile više u mjesecu travnju, svibnju i rujnu, a 2012. godine u lipnju, srpnju i kolovozu te listopadu. Upravo se ovakav raspored prosječnih temperatura po mjesecima odrazio i na srednju vegetacijsku temperaturu. Naime standardna devijacija između srednjih godišnjih temperatura promatranih godina iznosi svega 0.1°C, što možemo smatrati zanemarivom razlikom.

Temeljem svega navedenog možemo zaključiti da su klimatske prilike bile iznimno povoljne za uzgoj vinove loze i dozrijevanje grožđa u 2011. i 2012. godini. Optimalne srednje dnevne temperature za dozrijevanje grožđa kreću se između 20-30°C. U obje promatrane godine u razdoblju cvatnje, te rasta i razvoja bobica vladale su pogodne temperature za odvijanje svake fenofaza vinove loze.



Grafikon 2. Količina oborina u vegetaciji, 2011. i 2012. godina

Ukupna količina oborina u vegetacijskom periodu 2011. godine iznosila je 398.9 mm, a 2012. godine 442.4 mm što je zadovoljavajuće za uspješan rast i razvoj vinove loze. Ukupna godišnja količina oborina u 2011. godini iznosila je 554.3 mm, a 2012. godini 722.4 mm. Iz promatranih podataka vidljivo je da obje godine bile prosječne. Međutim

također se vidi da je količina oborina svih mjeseci izuzev srpnja i kolovoza bila znatno viša. Tako je u srpnju 2012. godine palo 39.3 mm oborina skoro polovicu manje nego 2011. kada je palo 77 mm, a u kolovozu 2012. samo 9.2 mm oborina, za razliku od 2011. kada je u u istom mjesecu palo 18.9 mm. Možemo zaključiti kako je 2012. bila sušna u periodu dozrijevanja što je utjecalo i na raniji početak berbe grožđa te godine.

### 3.3. Provođenje pokusa

Istraživanje je provedeno 2011. i 2012. godine na klonskim kandidatima kultivara Kraljevina (*Vitis vinifera L.*) posađenim u Svetom Ivanu Zelini u dva eksperimentalna nasada na položaju Puščak u vlasništvu OPG Puhelek Purek i položaju Krčina u vlasništvu OG Jarec Kure. Individualni trsovi odabrani su masovnom pozitivnom selekcijom u sklopu projekta „Klonska selekcija vinove loze, cv. Kraljevina“ Istraživanje je provedeno na 9 klonskih kandidata kultivara Kraljevina (VV-438, VV-406, VV-479, VV-486, VV-483, VV-423, VV-360, VV-434, VV-482) koji su izdvojeni zbog dostatnog broja trsova sa kojih je osigurana minimalna količina grožđa potrebna za kvalitetno provođenje mikrovinifikacijskog postupka alkoholne fermentacije. Svaki genotip, tj. klonski kandidat je zastupljen sa po 7-10 klonskih potomaka u oba pokusna vinograda. Kao podloga korišten je Kober 5BB (*Vitis berlandieri X Vitis rupestris*), a uzgojni oblik je dvostruki *Guyot*.

Berba grožđa svakog klonskog kandidata zasebno obavljena je ručno, u trenutku tehnološke zrelosti. Grožđe je pobrano u PVC sanduke kapaciteta 20 kg, a primarna prerada i vinifikacija obavljena je na OPG- u Puhelek Purek u čijem je vlasništvu jedan od pokusnih vinograda.

#### 3.3.1. Primarna prerada grožđa i vinifikacija

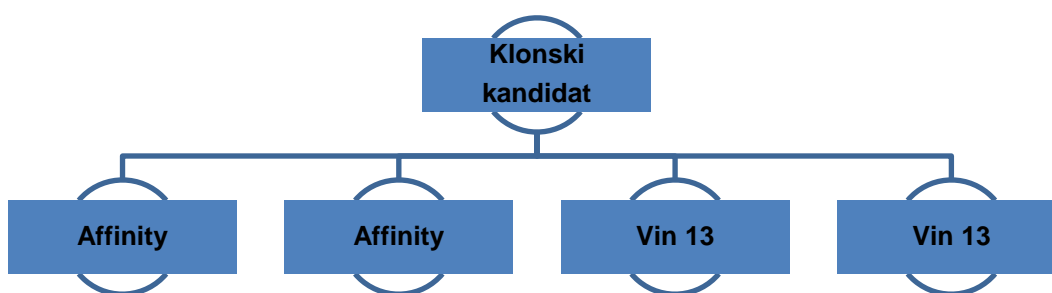
Grožđe se muljalo i runilo pomoću mehaničke muljače – runjače. Nakon muljanja, runjenja te prešanja grožđa svakog klonskog kandidata zasebno dobiveni mošt je sulfiritan s 5% - tnom otopinom sumporaste kiseline u količini od 100 ml/hL i ostavljen na taloženju 24 h nakon čega je odvojen od taloga i rastočen u 4 posude zapremnine 10 l po svakom klonskom kandidatu (ukupno 36 posuda). Nakon odvajanja mošta s taloga uzeti su uzorci za daljnju analizu, te je mošt u svakoj posudi inokuliran selekcioniranim kvascem. U pokusu su se za provođenje kontrolirane alkoholne fermentacije koristila dva različita komercijalna soja kvasaca i to Anchor Vin 13 i Uvaferm Affinity tj. pokus je na svakom klonskom kandidatu postavljen u dva tretmana od kojih je svaki obuhvatio dva ponavljanja:

Tretman A : vinifikacija korištenjem komercijalnog soja kvasca Anchor Vin 13

Tretman B : vinifikacija korištenjem komercijalnog soja kvasca Uvaferm Affinity

Kako bi se ujednačile koncentracije alkohola svih vina u pojedinoj godini te izbjegle kasnije razlike prilikom senzornog ocjenjivanja vina u moštovima svih klonskih kandidata, osim klonskog kandidata VV-360 proveden je postupak pojačavanja.

Tijekom alkoholne fermentacije redovito se pratila razgradnja šećera i temperatura, koja nije prelazila 15 °C. Po završetku alkoholne fermentacije obavljen je prvi pretok i sulfitiranje s 5%-tnom otopinom sumporaste kiseline u koncentraciji 100 mL/hl, te su uzeti uzorci za analizu vina, a ostatak vina se čuvao u uvjetima podruma do trenutka senzorne ocjene koja se provodila 6 mjeseci po završetku alkoholne fermentacije.



Grafički prikaz pokusa

Za istraživanje su izabrana dva različita komercijalna soja kvasaca: *Saccharomyces cerevisiae* cv. Anchor Vin13, te *Saccharomyces cerevisiae* cv. Affinity ECA5. Ovi sojevi kvasca nabavljeni su od tvrtke Lallemand (Kanada), a odabrani su sa ciljem stvaranja izraženijeg aromatskog profila vina kultivara Kraljevine.

#### *Anchor VIN 13 (unutarvrtni hibrid Saccharomyces cerevisiae)*

Soj Anchor VIN 13 nastao je selekcijom i hibridizacijom dvaju kvasaca pozitivnih enoloških svojstava *Saccharomyces cerevisiae* u Institutu za Biotehnologiju vina Fakulteta Stellenbosch, Južna Afrika. Soj Anchor VIN 13 ima svojstvo oslobađanja hlapivih tiola (egzotično voće) i izraženiju sintetizu estera. Preporučuje se za alkoholnu fermentaciju Chardonnaya, Rajnskog rizlinga, Pinota sivog i bijelog, Traminca, Graševine i muškarnih sorata. Anchor VIN 13 je idealan za proizvodnju aromatičnih rose vina iz svih crnih kultivara grožđa. Anchor VIN 13 preporučuje se kod hlađenih alkoholnih fermentacija. Temperatura alkoholne fermentacije mora biti ispod 16°C. Ovaj soj ima vrlo snažnu sposobnost alkoholne fermentacije. Otporan je na niske temperature (10°C) a optimalna



temperatura alkoholne fermentacije mu je od 12-16°C. Osmotolerantan je do 116°Oe i tolerantan na alkohol do 16.5 vol.%. Proizvodi malo pjene u alkoholnoj fermentaciji, male količine glicerola (5-7 g/L), malo hlapive kiseline, male koncentracije SO<sub>2</sub>. Ovaj soj ima male potrebe za hranjivima (dušikom) u moštu. Killer faktor pozitivan soj kvasca. Dozira se u količinama od 25-40 g/100 l ovisno o kultivaru, zdravstvenom stanju grožđa i uvjetima u moštu ([www.oenobrand.com](http://www.oenobrand.com)).

#### *Affinity ECA5 (Saccharomyces cerevisiae)*

Soj Affinity je idealan za proizvodnju vina neutralnih bijelih i crnih sorata vinove loze zbog stvaranja izraženijeg aromatskog profila vina. Ovaj kvasac ima veliki genetski potencijal za stvaranjem aromatskih prekursora i aroma u vinu. Stvara estere, spojeve koji imaju važnu ulogu u formiranju arome nearomatičnih kultivara, a voćni karakter pojedinih estera je značajan za aromu mladih bijelih vina. Uz kvasac dodaje se i specifična hrana za ovaj kvasac Stimula® koja je bitna za metabolizam kvasaca i stvaranje aromatskih spojeva. Primjenom ovog kvasca poboljšana je aromatski profila vina na mnogim kultivarima grožđa ([www.winebiz.com.au](http://www.winebiz.com.au)).

### 3.3.2. Kemijska analiza sastava mošta i vina

#### 3.3.2.1. Osnovna fizikalno – kemijska analiza mošta i vina

*Koncentracija šećera* u moštu određena je refraktometrijski i izražena u stupnjevima Oechsleovim (°Oe).

*Ukupna kiselost mošta i vina* izražena je u g/L kao vinska, a određivana je metodom neutralizacije uzorka s 0,1 M NaOH uz indikator bromtimol plavi prema metode O.I.V.-a (2007).

*pH vrijednost* mošta i vina određena je mjerenjem na pH metru Beckman expandomatic tip SS 2.

*Alkohol* u vinu određen je metodom destilacije prema O.I.V.-u (2012) na osnovu specifične težine destilata pri 20°C, d(20/20). Iz dobivenih vrijednosti pomoću tablica po Riechardu očitane su odgovarajuće količine alkohola u vol %.

*Reducirajući šećeri* u vinu određeni su titracijskom metodom po Rebeleinu prema Zoecklein i sur. (2001).

*Ukupni suhi ekstrakt* u vinu određen je denzimetrijski iz ostatka destilacije, a odgovarajuće vrijednosti dobivene su iz specifične težine ekstrakta pri 20°C,  $d(20/20)$ , očitane iz tablica po Riechardu u g/L, prema metodi O.I.V.-a (2012).

*Ekstrakt bez šećera* u vinu je dobiven računski oduzimanjem sadržaja reducirajućih šećera od vrijednosti ukupnog suhog ekstrakta.

*Hlapiva kiselost* vina izražena u g/L kao octena kiselina određena je metodom destilacije u struji vodene pare prema O.I.V. (2012). Destilat se uz nekoliko kapi indikatora fenolftaleina titrira sa 0,1 M NaOH do pojave svijetlo ružičaste boje.

*Pepeo* je određivan sagorijevanjem suhe tvari u mufolnoj peći pri 525°C metodom propisanom od O.I.V.-a (2012).

*Slobodni i ukupni sumporni dioksid* u vinu određen je alkalimetrijski metodom po Paulu propisanom od O.I.V.-a (2012).

#### 3.3.2.2. *Postupak ekstrakcije i određivanje aromatskih spojeva iz vina*

Proveden je postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi. Korištene su LichrolutEN (Merck, Njemačka) kolonice. Kolonica je prethodno kondicionirana s 3 mL diklormetana, 3 mL metanola i 3 mL 12 % otopine etanola 50 ml vina nanoseno je na kolonicu. Nakon toga kolonica se sušila u struji vakuuma 20 minuta. Željeni spojevi eluirani su s 800  $\mu$ L diklormetana.

Aromatski spojevi određeni su plinsko-kromatografskom analizom na HP 6890 plinskom kromatografu uz 5793 Agilent spektrometru masa kao detektoru. Analiza je provedena na ZB-WAX koloni dimenzija 60 m x 0,25 mm promjera kolone, te debljine filma nepokretne faze 0,5  $\mu$ m (Phenomenex, SAD). Početna temperatura kolone bila 40 °C 15 minuta potom je podignuta na 210 °C brzinom od 2 °C/min. Temperatura injektora bila je 200 °C. Volumen injektiranog uzorka bio je 3  $\mu$ L. Vrijeme trajanja analize bilo je 120 minuta. Plin nosilac bio je helij, a protok plina bio je 1 mL/min. Spojevi su detektirani spektrometrom masa.

#### 3.3.2.3. *Određivanje organskih kiselina*

Organske kiseline (vinska, jabučna, mliječna, limunska i jantarna) određene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, Agilent 1050 (Palo Alto, SAD). Uzorak je prethodno filtriran pomoću PTFE membranskih filtera (0,45  $\mu$ m). Identifikacija i kvantifikacija provedena je pri valnoj duljini  $\lambda=210$  nm na Aminex HPX-87H (BioRad, Hercules, CA, SAD).

#### 3.3.2.4. *Određivanje slobodnih aminokiselina*

Uzorci su direktno injektirani u kromatografski sustav. Automatskim uzorkivačem provedena je predkolonska derivatizacija s *o*-ftaldialdehidom (OPA). Uzorci su analizirani HPLC Agilent 1100 opremljenim automatskim uzorkivačem i fluorescentnim detektorom (FLD). Valna duljina eskcitacije bila je 356 nm, a emisije 445 nm. Separacija aminokiselina provedena je na Lichrosphere RP C18 koloni (125 mm x 4 mm x 5 µm). Protok pokretne faze bio je 0,8 mL min<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2.5. *Određivanje udjela pojedinačnih fenolnih spojeva u vinu*

Volumen od 2 mL vina se prethodno filtrira kroz PTFE membranski filter veličine pore 0.22 µm u tekućinskokromatografski sustav (HPLC tvrte Agilent 1100). Analiza je provedena na fenil-heksilnoj koloni (Phenomenex, SAD) uz detektor s nizom dioda. Vrijeme trajanja analize bilo je 65 minuta. Kromatogrami su istovremeno bilježeni detektorom s nizom dioda pri različitim valnim duljinama i fluorescencijskim detektorom na različitim valnim duljinama eskcitacije i emisije.

DAD:  $\lambda=280$  nm (hidroksibenzojeve kiseline),  $\lambda=320$  nm (hidroksicimetne kiseline),  $\lambda=360$  nm (flavonoli)

FLD:  $\lambda_{ex}=225$  nm /  $\lambda_{em}=320$  (flavan-3-oli)

Istovremeno su snimljeni i UV-Vis spektri pojedinih sastavnica u rasponu valnih duljina od 200 nm do 650 nm. Identifikacija sastavnica vina provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni te pripadnih UV-Vis spektara i fluorescencije na karakterističnim valnim duljinama eskcitacije i emisije s vremenima zadržavanja, spektrima i fluorescencijom standardnih spojeva. Masene koncentracije identificiranih spojeva određene su pomoću baždarnih krivulja načinjenih analizom vanjskog standarda.

#### 3.3.2.6. *Određivanje slobodnog $\alpha$ -amino dušika (FAN)*

Slobodan  $\alpha$ -amino dušik (FAN) određen je spektrofotometrom „Specord 400“, Analytik Jena, Jena, Njemačka. Metoda se temelji na derivatizaciji primarnih amino grupa s *o*-ftaldialdehid/N-acetil-L-cistein reagensom (Dukes i Butzke, 1998).

### 3.3.3. Senzorna analiza vina

Senzorna analiza vina provedena je 6 mjeseci nakon završene alkoholne fermentacije, pri čemu je korištena metoda 100 pozitivnih bodova (OIV, 2007). Metoda se temelji na ocjenjivanju pojedinačnih svojstava vina pri čemu se zavisno od intenziteta i kakvoće dodjeljuje određeni broj bodova. Sveukupna suma dobivenih bodova po pojedinim kategorijama se zbraja, a može iznositi od minimalno 40 do maksimalno 100 bodova. U ocjenjivanju vina sudjelovalo je 8 kvalificiranih degustatora.

### 3.3.4. Statistička analiza podataka

#### 1. – Mošt

Utjecaj godina berbe i klonova na osnovne karakteristike mošta (ukupne fenole, šećer, ukupnu kiselost, pH, vinsku, jabučnu i limunsku kiselinu te FAN) i na sadržaj pojedinih aminokiselina u moštu analiziran je linearnim modelima. U prvoj fazi analize testiran je puni model, sa godinama i klonovima, te interakcijom godina\*klon kao faktorima. Efekt godine (ili interakcije klon\*godina) je za sva analizirana svojstva, kao i sve aminokiseline bio signifikantan, uz  $p < 0.01$ , te je radi toga u daljnjoj analizi korišten model samo sa klonom kao faktorom, a pojedine godine analizirane su odvojeno.

Razlike aritmetičkih sredina svih klonova testirane su za sva analizirana svojstva za koja se efekt klona pokazao signifikantnim uz  $p < 0.05$ . Polazna razina vjerojatnosti kod multiplih usporedbi korigirana je Bonferronijevom korekcijom, a usporedbe koje su nakon korekcije imale  $p < 0.05$  (5%) označene su kao statistički značajne.

Za prikaz odnos klonova temeljem svih osnovnih karakteristika mošta i svih aminokiselina u moštu, korišten je graf prvih dvaju glavnih sastavnica procijenjenih analizom glavnih sastavnica (PCA).

#### 2. – Vino

Učinak klonova i kvasaca na osnovna svojstva vina te na sadržaj aminokiselina, polifenola i aroma u vinu u svakoj pojedinoj godini testiran je linearnim modelima sa klonom kao jednim faktorom, kvascem kao drugim, te interakcijom klon\*kvasac kao trećim efektom u modelu.

Razlike aritmetičkih sredina razina faktora testirane su za ona analizirana svojstva i za one faktore čiji se efekt pokazao signifikantnim uz  $p < 0.05$ . Polazna razina vjerojatnosti kod multiplih usporedbi korigirana je Bonferronijevom korekcijom, a

usporedbe koje su nakon korekcije imale  $p < 0.05$  (5%) označene su kao statistički značajne.

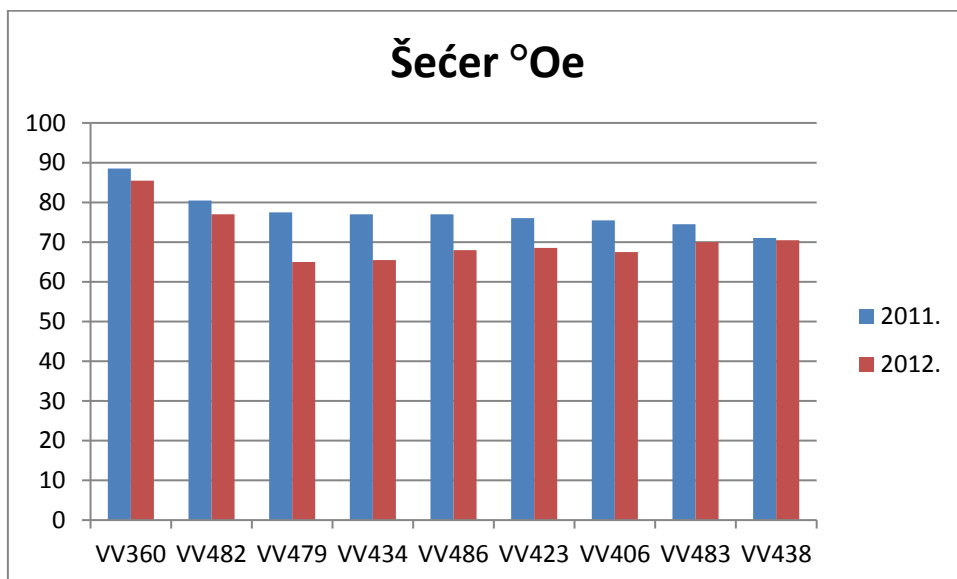
Za prikaz odnos klonova i kvasaca temeljem svih osnovnih svojstava vina, i sadržaja svih aminokiselina, polifenola i aroma u vinu, korišten je graf prvih dvaju glavnih sastavnica procijenjenih analizom glavnih sastavnica (PCA).

Za sve statističke analize i prikaz rezultata korišteni su programski paketi SAS 9.4 (SAS Institute, Cary NC) i R (R core team, 2015).

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Mošt

#### 4.1.1. Koncentracija šećera



Grafikon 3: Koncentracija šećera (°Oe) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Kod svih klonskih kandidata kultivara Kraljevine zabilježene su veće koncentracije šećera u 2011. godini u odnosu na 2012. što je odraz klimatskih prilika. Naime, bez obzira što je 2012. godina u periodu dozrijevanja (srpanj i kolovoz) bila sušnija, sa manjom količinom oborina i višim temperaturama, vrijednosti koncentracije šećera u moštu bile su nešto niže uslijed deset dana ranije berba grožđa ponajprije zbog uočenog pada ukupne kiselosti, te najavljenog dužeg kišnog perioda u rujnu. Berba grožđa klonskih kandidata 2011. godine obavljena je 14.09., a 2012. godine 04.09.

Tablica 7: Koncentracija šećera (Oe°) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

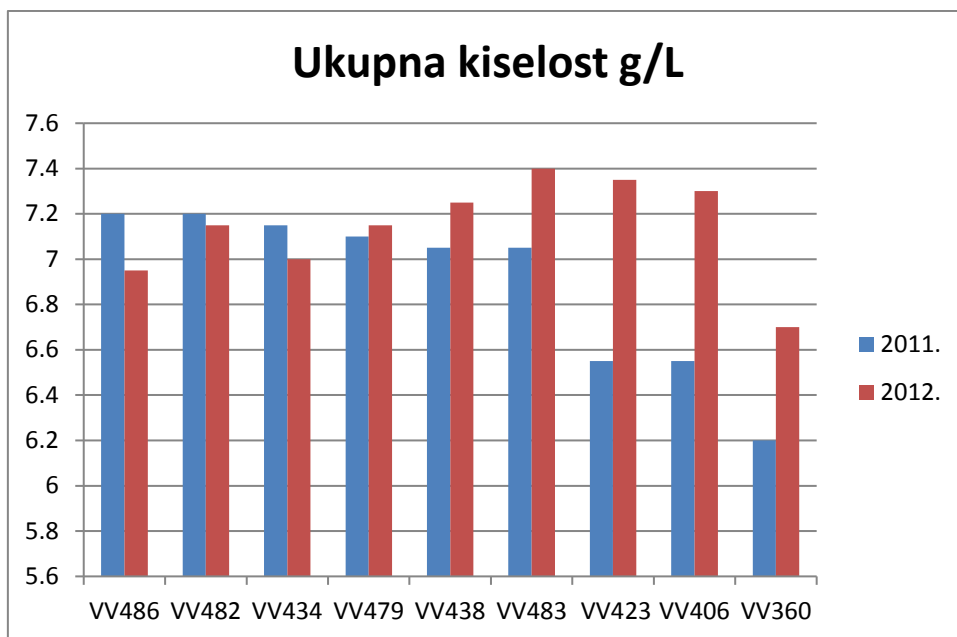
Klonski kandidat	Šećer (Oe°)	
	2011	2012
VV – 360	88 <sup>A</sup>	86 <sup>A</sup>
VV – 482	81 <sup>B</sup>	77 <sup>B</sup>
VV – 479	77 <sup>C</sup>	65 <sup>E</sup>
VV – 434	77 <sup>C</sup>	66 <sup>DE</sup>
VV – 486	77 <sup>C</sup>	68 <sup>CDE</sup>
VV – 423	76 <sup>C</sup>	69 <sup>CD</sup>
VV – 406	76 <sup>C</sup>	68 <sup>CDE</sup>
VV – 483	75 <sup>C</sup>	70 <sup>C</sup>
VV – 438	72 <sup>D</sup>	71 <sup>C</sup>

Iz prikazanih rezultata sadržaja šećera u moštovima 9 klonskih kandidata vidljivo je da se po nakupljenom sadržaju šećera u moštu signifikantno izdvojio klonski kandidat VV-360 sa 88°Oe 2011. godine, te 86°Oe 2012. godine što je u skladu sa prethodnim istraživanjima provedenim na klonskim kandidatima ovog kultivara gdje je najviši prosječni sadržaj šećera ostvario upravo VV-360, a iznosio je 75,3 °Oe (Preiner i sur., 2009).

Nakon klonskog kandidata VV-360 slijedi klonski kandidat VV-482 koji je 2011. godine ostvario 81°Oe, a 2012. godine 77°Oe. Klonski kandidat kod kojeg je uočeno najmanje variranje između godina u nakupljanju šećera je VV-438, a iznosilo je svega 1°Oe. Dobiveni rezultati značajno odstupaju od prosjeka kultivara s obzirom da je poznato da se u proizvodnji vina Kraljevine kao uobičajeni postupak koristi pojačavanje mošta dodatkom saharoze sa ciljem povišenja sadržaja alkohola u vinu na oko 11 vol%.

Klonski kandidat koji se izdvojio sa najnižom koncentracijom nakupljenog šećera 2011. godine je VV-438 sa 72°Oe, a 2012. godine to je bio klonski kandidat VV-479 sa nakupljenih 65°Oe što je u skladu sa literaturnim podacima koji govore da ovaj kultivar nakuplja nešto niže koncentracije šećera, koje se u normalnim godinama dozrijevanja kreću od 65-70°Oe, (Mirošević i sur., 2002), te daje svježija vina nižih alkohola (Licul i sur. 1979, Sučević, 1950).

#### 4.1.2. Ukupna kiselost



Grafikon 4: Koncentracije ukupne kiselosti (g/L) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Među ispitivanim klonskim kandidatima utvrđena je različitost u koncentraciji ukupnih kiselina u moštovima klonskih kandidata. U 2011. godini ukupna kiselost kretala se od 6.2 g/L do 7.2 g/L, a 2012. godine od 6.7 g/L do 7.4 g/L. Kao i kod koncentracije šećera u moštu raniji rok berbe je utjecao na nešto višu ukupnu kiselost u 2012. godini.

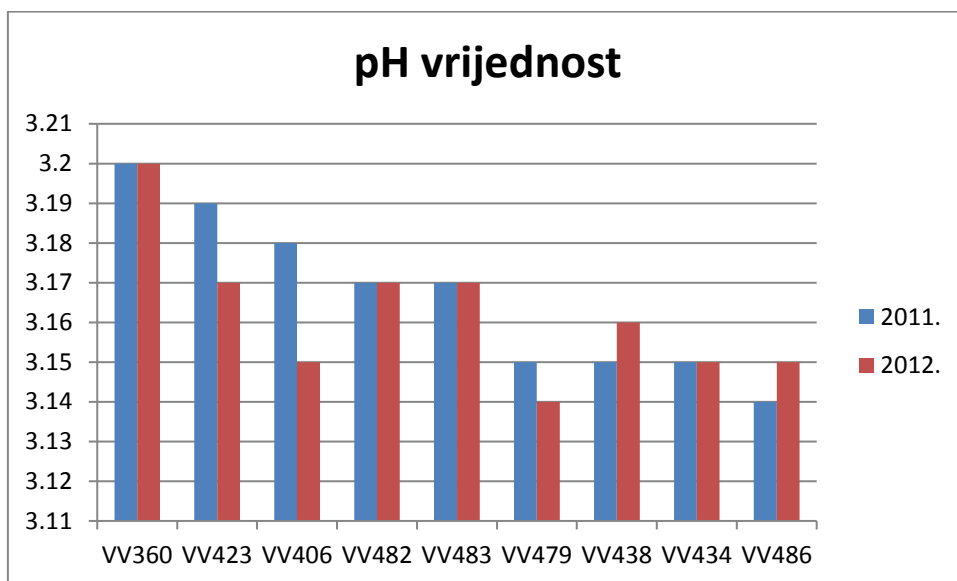


Tablica 8. Koncentracije ukupne kiselosti (g/L) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Klonski kandidat	Ukupna kiselost (g/L kao vinska )	
	2011	2012
VV – 486	7.2 <sup>A</sup>	7.0 <sup>CD</sup>
VV – 482	7.2 <sup>A</sup>	7.2 <sup>BC</sup>
VV – 434	7.1 <sup>A</sup>	7.0 <sup>CD</sup>
VV – 479	7.1 <sup>A</sup>	7.2 <sup>BC</sup>
VV – 438	7.1 <sup>A</sup>	7.3 <sup>AB</sup>
VV – 483	7.1 <sup>A</sup>	7.4 <sup>A</sup>
VV – 423	6.5 <sup>B</sup>	7.4 <sup>A</sup>
VV – 406	6.5 <sup>B</sup>	7.3 <sup>AB</sup>
VV – 306	6.2 <sup>C</sup>	6.7 <sup>D</sup>

Signifikantno najniža ukupna kiselost u obje godine utvrđena je kod klona VV-360 koja je 2011. godine iznosila 6.2 g/L, a 2012. godine 6.7 g/L, dok je najviša ukupna kiselost 2011. godine zabilježena kod klonova VV-486 i VV-482 sa 7.2 g/L, te 2012. godine kod klonskih kandidata VV-483 i VV-423 sa 7.4 g/L ukupne kiselosti. Klonski kandidat VV-360 se u obje godine izdvojio najvišom koncentracijom šećera, te najnižom koncentracijom ukupnih kiselina.

#### 4.1.3. pH vrijednost



Grafikon 5: pH vrijednost moštova klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

pH vrijednost mošta klonskih kandidata kultivara Kraljevine u obje godine kretala se između 3.14-3.20. Sukladno vrijednostima ukupne kiselosti mijenjala se i pH vrijednost. Klonski kandidat VV-360 koji je imao najnižu vrijednost ukupne kiselosti u obje godine imao je i najvišu pH vrijednost.

Tablica 9. pH vrijednost moštova klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Klonski kandidat	pH vrijednost	
	2011	2012
VV – 360	3.20 <sup>A</sup>	3.20 <sup>A</sup>
VV – 423	3.19 <sup>AB</sup>	3.17 <sup>B</sup>
VV – 406	3.18 <sup>ABC</sup>	3.15 <sup>BC</sup>
VV – 482	3.17 <sup>BCD</sup>	3.17 <sup>B</sup>
VV – 483	3.17 <sup>BCD</sup>	3.17 <sup>B</sup>
VV – 479	3.15 <sup>DE</sup>	3.14 <sup>C</sup>
VV – 438	3.15 <sup>DE</sup>	3.16 <sup>B</sup>
VV – 434	3.15 <sup>DE</sup>	3.15 <sup>BC</sup>
VV – 486	3.14 <sup>E</sup>	3.15 <sup>BC</sup>

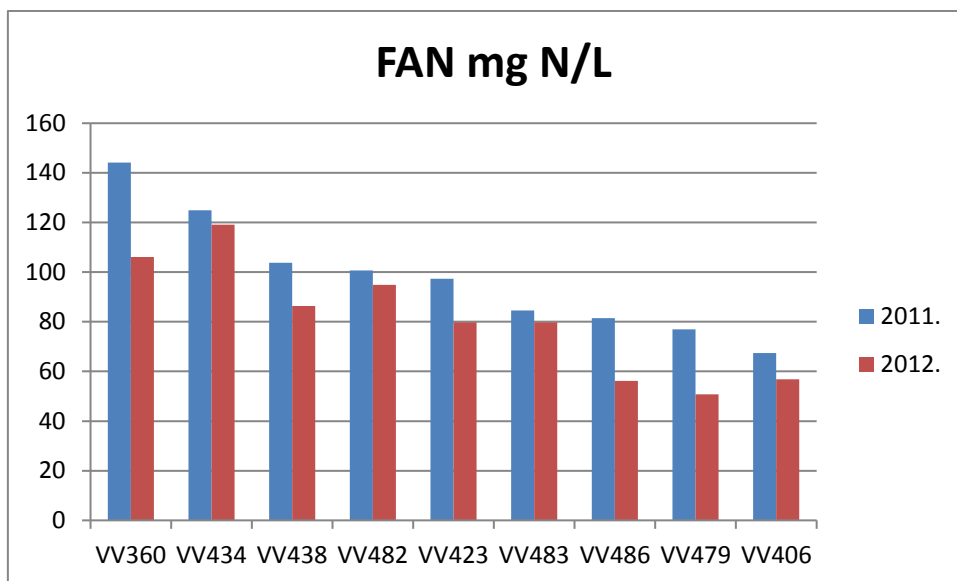
#### 4.1.4. Pojedinačne organske kiseline

Tablica 10. Koncentracija organskih kiselina (g/L) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, berba 2011. i 2012. godina

Klonski kandidat	Vinska kiselina		Jabučna kiselina		Limunska kiselina	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012
VV - 483	8.31 <sup>A</sup>	8.30 <sup>B</sup>	2.21 <sup>BC</sup>	2.62 <sup>BC</sup>	0.21 <sup>CD</sup>	0.14 <sup>BC</sup>
VV - 423	8.27 <sup>A</sup>	8.43 <sup>A</sup>	2.03 <sup>DEF</sup>	2.18 <sup>D</sup>	0.22 <sup>BCD</sup>	0.18 <sup>A</sup>
VV - 482	8.20 <sup>A</sup>	8.19 <sup>BC</sup>	1.96 <sup>EF</sup>	2.77 <sup>AB</sup>	0.20 <sup>D</sup>	0.18 <sup>A</sup>
VV - 486	8.00 <sup>AB</sup>	8.10 <sup>CD</sup>	1.97 <sup>EF</sup>	2.93 <sup>A</sup>	0.21 <sup>D</sup>	0.12 <sup>C</sup>
VV - 479	7.90 <sup>ABC</sup>	8.03 <sup>D</sup>	2.05 <sup>CDE</sup>	2.69 <sup>BC</sup>	0.25 <sup>ABC</sup>	0.16 <sup>AB</sup>
VV - 438	7.82 <sup>ABC</sup>	8.08 <sup>CD</sup>	2.30 <sup>B</sup>	2.57 <sup>C</sup>	0.25 <sup>ABC</sup>	0.18 <sup>A</sup>
VV - 434	7.49 <sup>BCD</sup>	8.16 <sup>C</sup>	2.80 <sup>A</sup>	2.93 <sup>A</sup>	0.23 <sup>BCD</sup>	0.19 <sup>A</sup>
VV - 406	7.41 <sup>CD</sup>	7.74 <sup>E</sup>	1.88 <sup>F</sup>	2.08 <sup>D</sup>	0.28 <sup>A</sup>	0.19 <sup>A</sup>
VV - 360	7.12 <sup>D</sup>	7.79 <sup>E</sup>	2.17 <sup>BCD</sup>	2.75 <sup>C</sup>	0.23 <sup>BCD</sup>	0.11 <sup>C</sup>

Kemijskom analizom mošta utvrđene su značajne razlike u koncentracijama vinske i jabučne kiseline u obje godine istraživanja (Tablica 10). Koncentracija vinske kiseline 2011. godine kretala se od 7.12 g/L (VV-360) do 8.31 g/L (VV-483), a koncentracija jabučne od 1.88 g/L (VV-406) do 2.80 g/l (VV-434). Klonski kandidati koji su imali nešto višu vinsku kiselinu bili su siromašniji sadržajem jabučne kiseline s time da se klonski kandidat VV-483 izdvojio višim sadržajem i vinske i jabučne kiseline što je u skladu sa vrijednostima ukupne kiselosti utvrđene kod navedenog klonskog kandidata, a koje su u odnosu na druge kandidate bile značajno veće. Kod koncentracije limunske kiseline signifikantnost među ispitivanim klonskim kandidatima nije bila toliko naglašena iako je također postojala. Tako je u obje godine najveća vrijednost utvrđena kod klonskog kandidata VV-406 dok je najveće odstupanje između praćenih proizvodnih godina utvrđeno kod klonskih kandidata VV-306 (0.12 g/L) te VV-486 (0.09 g/L).

#### 4.1.5. Slobodni $\alpha$ -amino dušik (FAN)



Grafikon 6: Slobodni  $\alpha$  – amino dušik (FAN) (mg N/L) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Kao što je vidljivo na grafikonu 6. klonski kandidati razlikovali su se u koncentracijama FAN-a pri čemu je također vidljiv i utjecaj godine. Tako su svi moštovi u 2011. godini imali više FAN-a u odnosu na 2012. godinu pri čemu je najmanje odstupanje utvrđeno kod klonskih kandidata VV-482 i VV-483 gdje su razlike bile oko 10 mg N/L.

Tablica 11: Slobodni  $\alpha$  – amino dušik (FAN) (mg N/L) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina 2011. i 2012. godine

Klonski kandidat	FAN (mg N/L)	
	2011	2012
VV – 360	144.21 <sup>A</sup>	106.10 <sup>B</sup>
VV – 434	124.88 <sup>B</sup>	119.19 <sup>A</sup>
VV – 438	103.74 <sup>C</sup>	86.43 <sup>CD</sup>
VV – 482	100.71 <sup>C</sup>	94.85 <sup>C</sup>
VV – 423	97.39 <sup>C</sup>	79.77 <sup>D</sup>
VV – 483	84.52 <sup>D</sup>	79.76 <sup>D</sup>
VV – 486	81.53 <sup>D</sup>	56.87 <sup>E</sup>
VV – 479	79.93 <sup>D</sup>	50.79 <sup>E</sup>
VV – 406	67.42 <sup>E</sup>	56.87 <sup>E</sup>

Iz tablice 11. možemo zaključiti da između klonskih kandidata unutar i između dvije istraživane godine postoje statistički značajne razlike. Klonski kandidati koji su se izdvojili najvišim koncentracijama slobodnih  $\alpha$ -aminokiselina (FAN-a) su VV-360 i VV-434. Klonski kandidat VV-360 izdvojio se 2011. godine sa najvišom prosječnom koncentracijom od 144,21 mg N/L što je po većini literaturnih navoda (Henschke i Jiranek, 1993; Bell i Henschke, 2005) iznad minimalnih koncentracija koje su dovoljne za rast i razmnožavanje kvasaca, te normalno provođenje alkoholne fermentacija. Odmah iza klonskog kandidata VV-360 slijedi klonski kandidat VV-434 sa 124.88 mg N/L koji se ujedno 2012. godine izdvojio najvišom prosječnom koncentracijom slobodnih  $\alpha$ -aminokiselina sa 119,85 mg N/L, što je po literaturnim navodima ispod optimalne razine. Klonski kandidat VV-360 te iste godine sa prosječnom koncentracijom od 106,10 mg N/L slijedi odmah iza njega.

#### 4.1.6. Aminokiseline u moštu

Kemijskom analizom mošta utvrđene su značajne razlike u sadržaju pojedinačnih aminokiselina kod klonskih kandidata kutivara Kraljevina. Kao najzastupljenija aminokiselina u obje godine izdvojio se arginin čije koncentracije su se kretale od 197.08 mg/L kod klonskog kandidata VV-406 do 438.37 mg/L kod klonskog kandidata VV-360, dok su najmanje razlike uočene u koncentracijama izoleucina, cisteina, valina i fenilalanina. Dobiveni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji govore da je aminokiselina arginin uz prolin najzastupljenija aminokiselina u moštu. Upravo zbog toga klonski kandidat VV-360 sa 952.04 mg/L izdvojio se signifikantno najvišim sadržajem ukupnih slobodnih aminokiselina, dok se klonski kandidata VV-406 sa 492.38 mg/L izdvojio najnižim. Osim arginina u prosjeku najzastupljenije aminokiseline bile su alanin, aspartat, lizin, treonin, tirozin, serin, glutamat (tablica 12, 13).

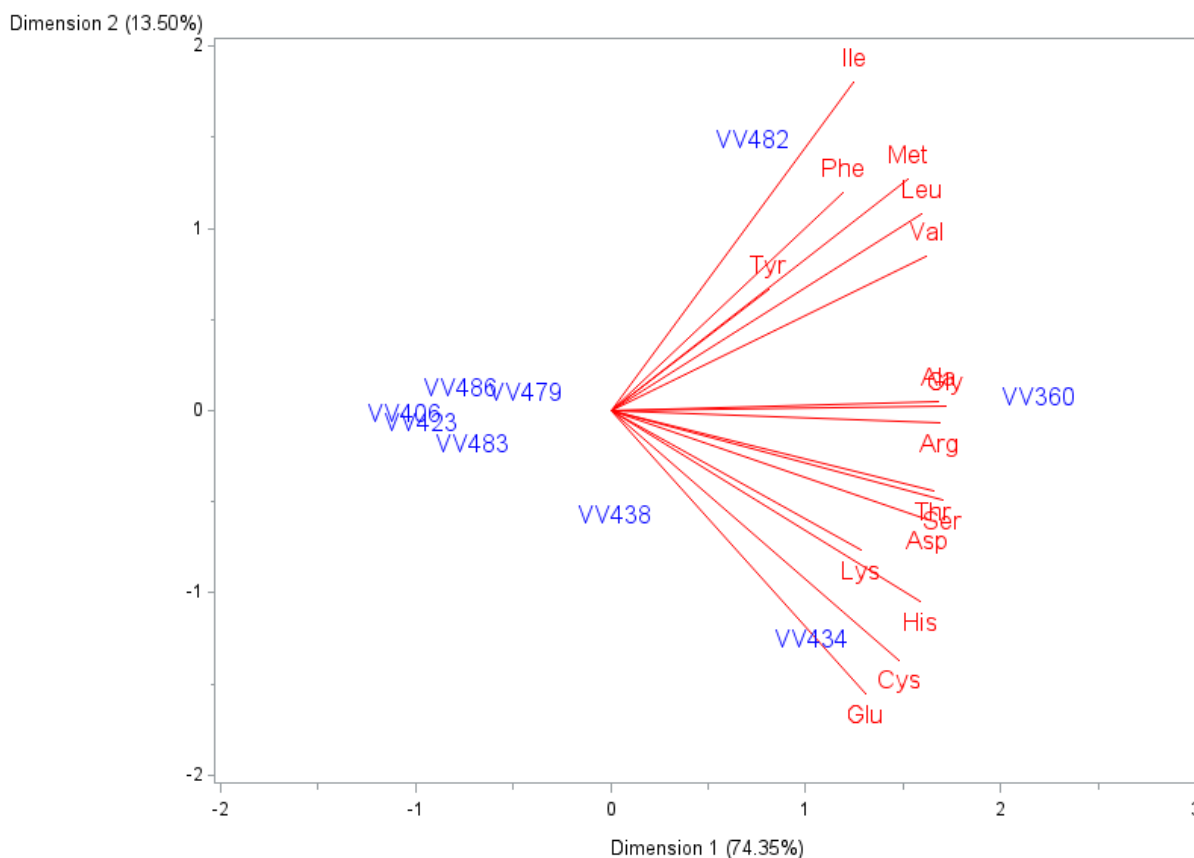
Tablica 12. Koncentracije pojedinačnih aminokiselina u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. godina

Klonski kandidat	Glu	Asp	Cys	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Val	Met	Phe	Ile	Leu	Lys	Ukupne ak
VV360	28.10 <sup>B</sup>	125.47 <sup>A</sup>	9.64 <sup>A</sup>	38.86 <sup>A</sup>	36.60 <sup>A</sup>	9.93 <sup>A</sup>	113.57 <sup>A</sup>	598.42 <sup>A</sup>	94.03 <sup>A</sup>	21.27 <sup>ABC</sup>	6.80 <sup>A</sup>	26.89 <sup>A</sup>	5.11 <sup>B</sup>	7.51 <sup>B</sup>	25.10 <sup>A</sup>	32.93 <sup>AB</sup>	1180.19 <sup>A</sup>
VV406	15.08 <sup>F</sup>	43.83 <sup>F</sup>	4.80 <sup>C</sup>	17.59 <sup>D</sup>	11.58 <sup>F</sup>	4.42 <sup>D</sup>	50.64 <sup>E</sup>	266.00 <sup>G</sup>	38.18 <sup>G</sup>	18.28 <sup>BC</sup>	2.18 <sup>E</sup>	13.81 <sup>C</sup>	1.72 <sup>C</sup>	4.11 <sup>CD</sup>	13.63 <sup>C</sup>	29.11 <sup>CD</sup>	534.94 <sup>I</sup>
VV423	16.87 <sup>DEF</sup>	45.72 <sup>F</sup>	4.24 <sup>C</sup>	18.10 <sup>D</sup>	11.57 <sup>F</sup>	4.74 <sup>CD</sup>	65.90 <sup>D</sup>	334.40 <sup>F</sup>	39.24 <sup>FG</sup>	16.48 <sup>C</sup>	2.90 <sup>DE</sup>	15.24 <sup>BC</sup>	1.82 <sup>C</sup>	3.12 <sup>E</sup>	13.55 <sup>C</sup>	25.82 <sup>D</sup>	619.67 <sup>H</sup>
VV434	32.28 <sup>A</sup>	88.89 <sup>B</sup>	9.83 <sup>A</sup>	31.63 <sup>B</sup>	32.80 <sup>B</sup>	7.52 <sup>B</sup>	99.07 <sup>B</sup>	557.82 <sup>B</sup>	61.13 <sup>B</sup>	21.84 <sup>AB</sup>	4.29 <sup>C</sup>	17.63 <sup>B</sup>	1.97 <sup>C</sup>	4.20 <sup>CD</sup>	17.74 <sup>B</sup>	36.25 <sup>A</sup>	1024.86 <sup>B</sup>
VV438	27.70 <sup>B</sup>	64.04 <sup>C</sup>	7.21 <sup>B</sup>	25.31 <sup>C</sup>	23.28 <sup>C</sup>	6.44 <sup>BC</sup>	66.73 <sup>D</sup>	398.67 <sup>D</sup>	51.18 <sup>C</sup>	16.50 <sup>C</sup>	3.21 <sup>CDE</sup>	16.50 <sup>BC</sup>	4.42 <sup>B</sup>	4.33 <sup>CD</sup>	16.03 <sup>BC</sup>	30.82 <sup>BC</sup>	762.33 <sup>D</sup>
VV479	20.63 <sup>C</sup>	61.50 <sup>CD</sup>	5.75 <sup>BC</sup>	19.26 <sup>D</sup>	13.24 <sup>E</sup>	4.86 <sup>CD</sup>	66.64 <sup>D</sup>	360.58 <sup>E</sup>	46.49 <sup>D</sup>	23.28 <sup>A</sup>	3.81 <sup>DC</sup>	16.74 <sup>B</sup>	0.54 <sup>D</sup>	4.69 <sup>C</sup>	15.66 <sup>BC</sup>	27.08 <sup>D</sup>	690.72 <sup>E</sup>
VV482	18.65 <sup>CDE</sup>	57.96 <sup>D</sup>	5.14 <sup>C</sup>	24.90 <sup>C</sup>	16.52 <sup>D</sup>	7.30 <sup>B</sup>	77.61 <sup>C</sup>	507.65 <sup>C</sup>	57.95 <sup>B</sup>	22.07 <sup>AB</sup>	5.53 <sup>B</sup>	24.99 <sup>A</sup>	6.36 <sup>A</sup>	8.77 <sup>A</sup>	23.15 <sup>A</sup>	31.15 <sup>BC</sup>	895.65 <sup>C</sup>
VV483	19.56 <sup>CD</sup>	52.60 <sup>E</sup>	5.28 <sup>C</sup>	19.23 <sup>D</sup>	13.66 <sup>E</sup>	5.22 <sup>CD</sup>	65.86 <sup>D</sup>	359.84 <sup>E</sup>	44.25 <sup>DE</sup>	19.57 <sup>ABC</sup>	3.06 <sup>DE</sup>	14.93 <sup>BC</sup>	0.81 <sup>D</sup>	3.61 <sup>DE</sup>	14.19 <sup>C</sup>	26.11 <sup>D</sup>	667.73 <sup>F</sup>
VV486	15.63 <sup>EF</sup>	44.07 <sup>F</sup>	4.28 <sup>C</sup>	17.89 <sup>D</sup>	10.30 <sup>G</sup>	4.93 <sup>CD</sup>	60.07 <sup>D</sup>	345.37 <sup>EF</sup>	42.20 <sup>EF</sup>	20.14 <sup>ABC</sup>	3.09 <sup>DE</sup>	15.55 <sup>BC</sup>	0.85 <sup>D</sup>	4.13 <sup>CD</sup>	15.13 <sup>BC</sup>	30.87 <sup>BC</sup>	634.45 <sup>G</sup>

Tablica 13. Koncentracije pojedinačnih aminokiselina u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2012. godina

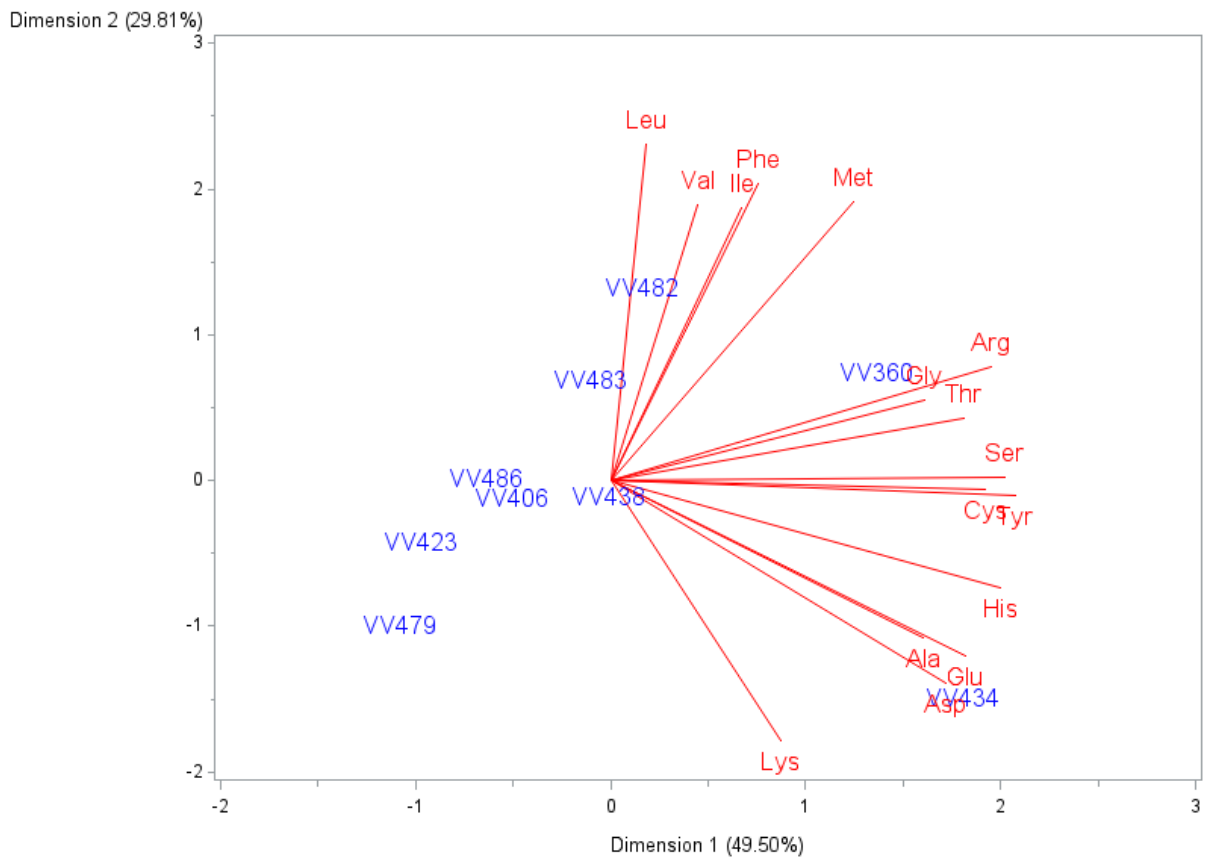
Klonski kandidat	Glu	Asp	Cys	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Val	Met	Phe	Ile	Leu	Lys	Ukupne ak
VV360	29.37 <sup>B</sup>	50.61 <sup>B</sup>	1.62 <sup>AB</sup>	36.40 <sup>A</sup>	14.08 <sup>B</sup>	15.28 <sup>A</sup>	52.93 <sup>A</sup>	278.32 <sup>A</sup>	119.65 <sup>B</sup>	50.76 <sup>B</sup>	9.28 <sup>B</sup>	17.07 <sup>B</sup>	5.54 <sup>B</sup>	7.42 <sup>A</sup>	13.74 <sup>C</sup>	21.86 <sup>F</sup>	723.90 <sup>B</sup>
VV406	19.64 <sup>CD</sup>	41.72 <sup>C</sup>	1.21 <sup>DE</sup>	18.48 <sup>C</sup>	5.27 <sup>DE</sup>	5.05 <sup>D</sup>	31.07 <sup>E</sup>	128.16 <sup>E</sup>	98.05 <sup>D</sup>	36.01 <sup>E</sup>	8.87 <sup>B</sup>	9.47 <sup>DE</sup>	4.40 <sup>C</sup>	5.01 <sup>B</sup>	8.77 <sup>EF</sup>	28.68 <sup>DE</sup>	449.82 <sup>F</sup>
VV423	16.50 <sup>DE</sup>	30.72 <sup>D</sup>	0.94 <sup>E</sup>	18.58 <sup>C</sup>	4.84 <sup>DEF</sup>	3.37 <sup>E</sup>	27.70 <sup>E</sup>	108.26 <sup>F</sup>	105.88 <sup>C</sup>	30.68 <sup>F</sup>	6.21 <sup>C</sup>	7.34 <sup>EF</sup>	4.06 <sup>CD</sup>	3.37 <sup>C</sup>	9.78 <sup>DE</sup>	29.92 <sup>D</sup>	408.11 <sup>H</sup>
VV434	49.09 <sup>A</sup>	75.04 <sup>A</sup>	1.84 <sup>A</sup>	34.75 <sup>A</sup>	18.32 <sup>A</sup>	8.66 <sup>B</sup>	47.09 <sup>B</sup>	253.44 <sup>B</sup>	186.33 <sup>A</sup>	60.86 <sup>A</sup>	6.39 <sup>C</sup>	11.79 <sup>CD</sup>	4.58 <sup>C</sup>	2.37 <sup>D</sup>	6.69 <sup>G</sup>	60.95 <sup>A</sup>	828.15 <sup>A</sup>
VV438	21.01 <sup>C</sup>	44.13 <sup>C</sup>	1.13 <sup>DE</sup>	26.73 <sup>B</sup>	8.12 <sup>C</sup>	5.86 <sup>C</sup>	41.95 <sup>C</sup>	155.72 <sup>C</sup>	118.28 <sup>B</sup>	45.70 <sup>C</sup>	8.07 <sup>B</sup>	12.22 <sup>C</sup>	4.70 <sup>C</sup>	2.11 <sup>D</sup>	13.31 <sup>C</sup>	29.19 <sup>D</sup>	538.19 <sup>D</sup>
VV479	19.66 <sup>CD</sup>	44.78 <sup>C</sup>	1.11 <sup>DE</sup>	21.08 <sup>C</sup>	3.28 <sup>F</sup>	3.06 <sup>E</sup>	18.87 <sup>F</sup>	102.71 <sup>G</sup>	64.89 <sup>E</sup>	21.70 <sup>G</sup>	4.08 <sup>D</sup>	6.35 <sup>F</sup>	3.63 <sup>D</sup>	2.09 <sup>D</sup>	7.74 <sup>FG</sup>	40.54 <sup>B</sup>	365.52 <sup>I</sup>
VV482	15.04 <sup>E</sup>	32.81 <sup>D</sup>	1.27 <sup>CD</sup>	26.90 <sup>B</sup>	5.71 <sup>D</sup>	5.33 <sup>CD</sup>	35.46 <sup>D</sup>	256.58 <sup>B</sup>	98.75 <sup>D</sup>	38.11 <sup>DE</sup>	9.03 <sup>B</sup>	19.79 <sup>A</sup>	7.13 <sup>A</sup>	6.65 <sup>A</sup>	19.11 <sup>A</sup>	30.57 <sup>D</sup>	608.19 <sup>C</sup>
VV483	25.82 <sup>B</sup>	42.01 <sup>C</sup>	1.55 <sup>BC</sup>	20.76 <sup>C</sup>	3.67 <sup>EF</sup>	5.11 <sup>D</sup>	37.96 <sup>D</sup>	143.24 <sup>D</sup>	55.06 <sup>F</sup>	40.79 <sup>D</sup>	11.82 <sup>A</sup>	13.42 <sup>C</sup>	6.66 <sup>A</sup>	3.44 <sup>C</sup>	16.03 <sup>B</sup>	33.76 <sup>C</sup>	461.05 <sup>E</sup>
VV486	16.63 <sup>DE</sup>	33.62 <sup>D</sup>	1.29 <sup>CD</sup>	16.20 <sup>C</sup>	7.46 <sup>C</sup>	8.53 <sup>B</sup>	10.43 <sup>G</sup>	138.59 <sup>D</sup>	103.47 <sup>C</sup>	31.48 <sup>F</sup>	8.86 <sup>B</sup>	12.05 <sup>C</sup>	4.35 <sup>C</sup>	3.38 <sup>C</sup>	10.71 <sup>D</sup>	26.10 <sup>E</sup>	433.11 <sup>G</sup>

U 2011. godini većina aminokiselina (osim alanin, tirozin, valin, fenilalanin, lizin) izdvojila se sa većom prosječnom koncentracijom nego 2012. godine. To ukazuje na povezanost koncentracije aminokiselina i agrotehničkih zahvata u vinogradu, pa možemo pretpostaviti da je izostanak gnojidbe, te niži sadržaj dušičnih tvari u tlu utjecao na slabiju sintezu aminokiselina u grožđu.



Slika 1. Analiza glavnih sastavnica za komponente mošta u 2011. Točke predstavljaju prikaz klonskih kandidata u 2 dimenzije, a vektori predstavljaju korelacije izvedenih i izvornih varijabli odnosno „smjer djelovanja“ pojedinih varijabli.

Iz slike 1. možemo vidjeti da su se po aminokiselinskom sastavu izdvojili klonski kandidati VV-360, VV-434, te VV-482. Klonski kandidat VV-360 sadrži najviše aminokiseline alanin, glicin, arginin, klonski kandidat VV-434 sadrži najviše glutaminske kiseline, cisteina i histidina, dok klonski kandidat VV-482 sadrži najviše izoleucina, metionina, fenilalanina i tirozina u odnosu na ostale klonske kandidate.

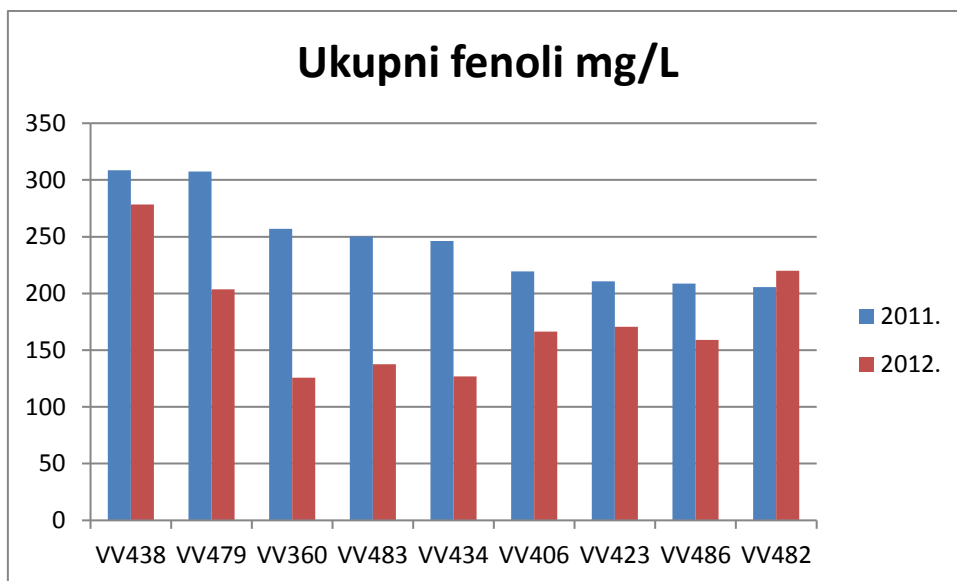


Slika 2. Analiza glavnih sastavnica za komponente mošta u 2012. Točke predstavljaju prikaz klonskih kandidata u 2 dimenzije, a vektori predstavljaju korelacije izvedenih i izvornih varijabli odnosno „smjer djelovanja“ pojedinih varijabli.

Iz slike 2. vidljivo je da su se klonski kandidati VV-360 i VV-434 ponovno izdvojili od ostalih klonskih kandidata prema sadržaju aminokiselina. Klonski kandidat VV-360 izdvojio se najvišim sadržajem arginina i glicina, dok se klonski kandidat VV-434 izdvojio najvišim sadržajem glutaminske kiseline i aspartata. Aminokiselina alanin u ovoj godini najviša je kod klonskog kandidata VV-434, dok je u predhodnoj godini alanin bio najviši kod klonskog kandidata VV-360. U ovoj se godini klonski kandidat VV-482 ne izdvaja tako jako kao u predhodnoj godini, a po aminokiselinskom sastavu sličan mu je klonski kandidat VV-483.



#### 4.1.7. Ukupni fenoli



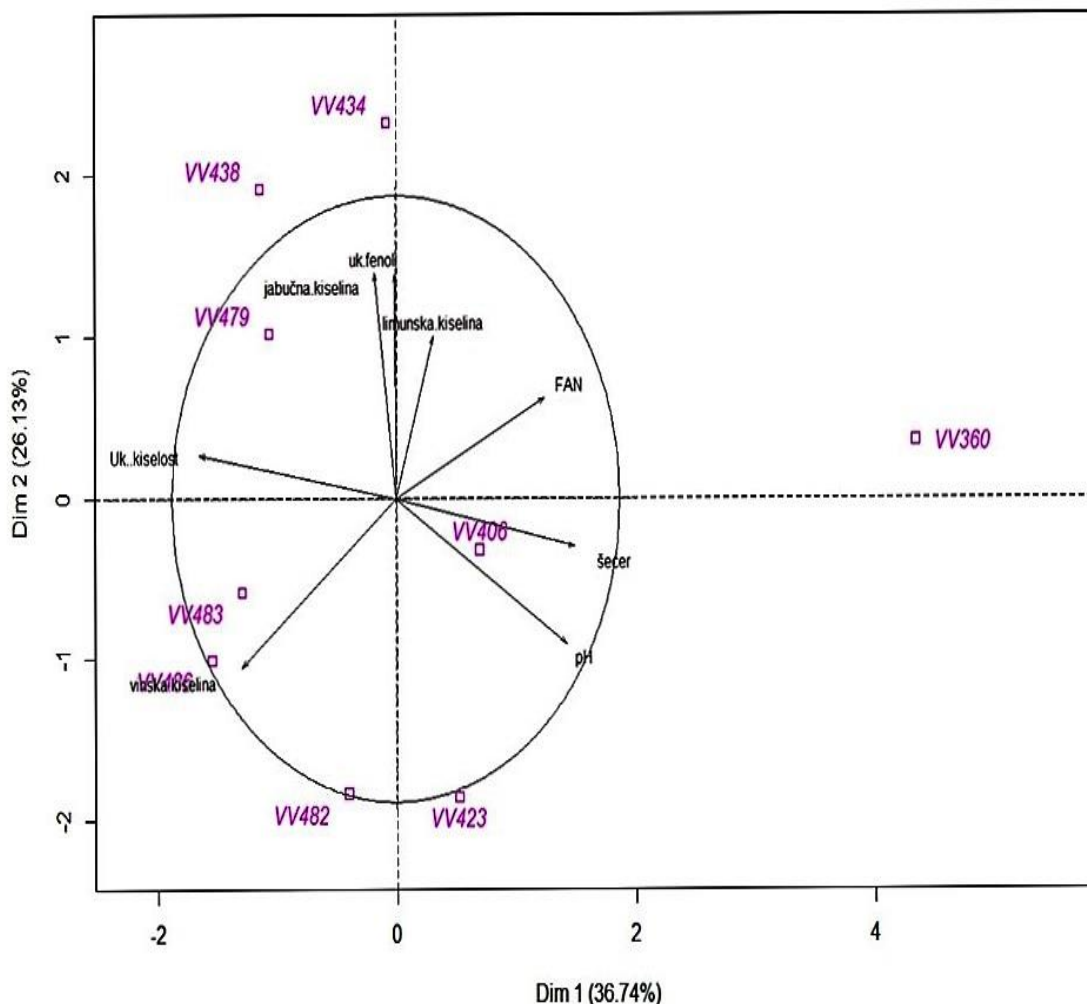
Grafikon 7: Koncentracije ukupnih fenola (mg/L) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina u 2011. i 2012. godini

Tablica 14. Koncentracije ukupnih fenola (mg/L) u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. i 2012. godine

Klonski kandidat	Ukupni fenoli (mg/L)	
	2011	2012
VV – 438	308.42 <sup>A</sup>	278.25 <sup>A</sup>
VV – 479	307.36 <sup>A</sup>	203.64 <sup>C</sup>
VV – 360	256.86 <sup>B</sup>	125.71 <sup>G</sup>
VV – 483	250.21 <sup>B</sup>	137.58 <sup>F</sup>
VV – 434	246.10 <sup>B</sup>	126.94 <sup>FG</sup>
VV – 406	219.34 <sup>C</sup>	166.42 <sup>DE</sup>
VV – 423	210.64 <sup>C</sup>	170.57 <sup>D</sup>
VV – 486	208.55 <sup>C</sup>	159.04 <sup>E</sup>
VV – 482	205.44 <sup>C</sup>	220.02 <sup>B</sup>

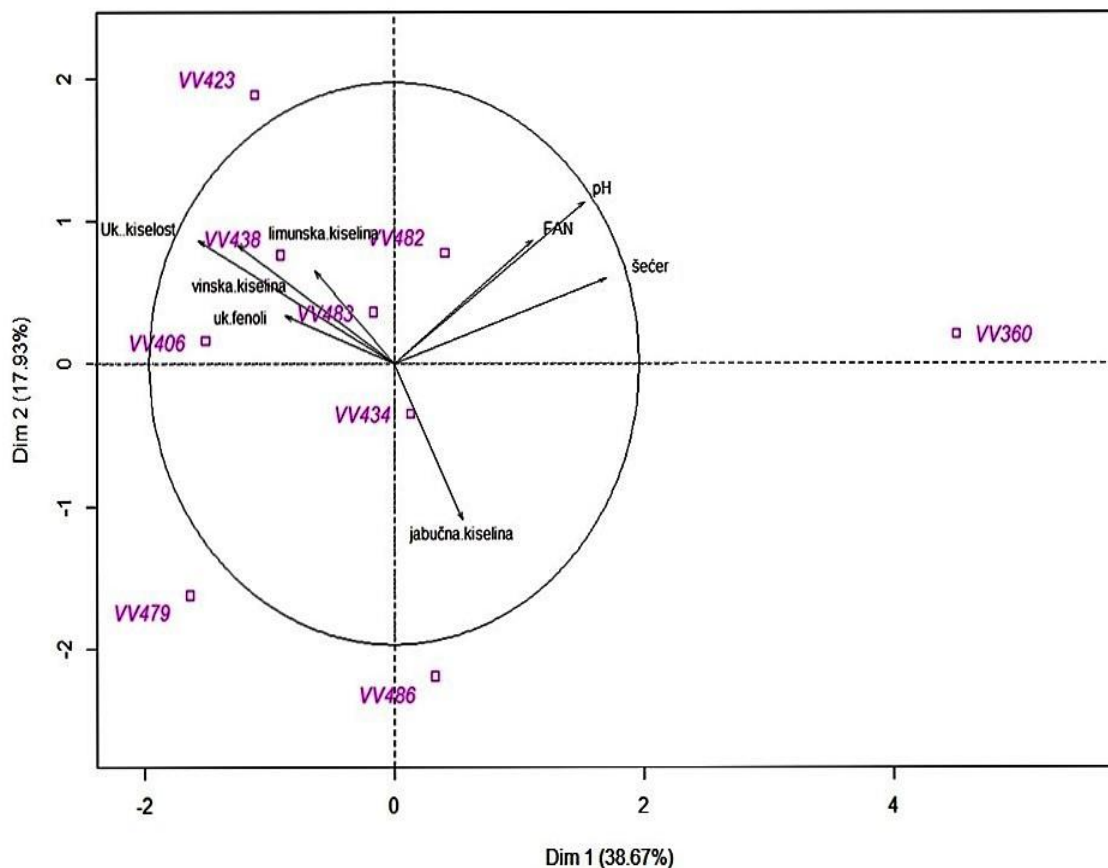
Koncentracija ukupnih fenola u moštovima 2011. godine kretala se u rasponu od 205.44 mg/L (VV-482) do 308.42 mg/L (VV-438), a 2012. godine od 125.71 mg/L (VV-360) do 278.25 mg/L (VV-438). Veće koncentracije ukupnih fenola zabilježene su 2011. godine kod svih istraživanih klonskih kandidata, osim klonskog kandidata VV-482 mg/L (grafikon

6). Općenito manje koncentracije ukupnih fenola u moštovima svih klonskih kandidata u 2012. godini mogu se povezati sa činjenicom da uvjeti dozrijevanja tj. godina, temperatura i količina oborina mogu značajno utjecati na njihovu sintezu..



Grafikon 8: Analiza glavnih sastavnica (PCA) za pojedine grupe spojeva mošta u 2011. godini

Klonski kandidat VV-360 se po kemijskom sastavu mošta u 2011. godini razlikuje od većine ostalih klonskih kandidata. Ovaj klonski kandidat ima najviši sadržaj šećera u moštu, više koncentracije FAN-a i pH vrijednosti od ostalih klonskih kandidata, ali ima manju ukupnu kiselost i najmanje vinske kiseline za razliku od ostalih istraživanih klonskih kandidata.



Grafikon 9: Analiza glavnih sastavnica (PCA) za pojedine grupe spojeva mošta u 2012. godini

Klonski kandidat VV-360 se po kemijskom sastavu mošta i u 2012. godini razlikuje od većine ostalih klonskih kandidata, no ovaj put su korelacije izvornih i izvedenih varijabli drugačije, pa ovaj klonski kandidat ima viši sadržaj šećera, više koncentracije FAN-a i više vrijednosti pH od ostalih, ali ima i manju ukupnu kiselost, limunsku kiselinu, vinsku kiselinu i ukupne fenole od svih ostalih.

## 4.2. Vino

### 4.2.1. Osnovni kemijski sastav vina

Tablica 15. Osnovni kemijski sastav vina klonskih kandidata berbe 2011. i 2012. godine

Klonski kandidat		Alkohol (vol%)	Ekstrakt bez šećera (g/L)	Ukupna kiselost (g/L)*	Hlapiva kiselost (g/L)**	pH	Pepeo (g/L)	Ukupni fenoli (mg/L)
VV-360	2011	12.57 <sup>A</sup>	17.46 <sup>AB</sup>	6.00 <sup>B</sup>	0.64 <sup>ABCD</sup>	3.23 <sup>A</sup>	2.05 <sup>A</sup>	190.30 <sup>A</sup>
	2012	11.85 <sup>A</sup>	16.48 <sup>A</sup>	6.30 <sup>C</sup>	0.24 <sup>C</sup>	3.21 <sup>A</sup>	1.90 <sup>A</sup>	138.76 <sup>B</sup>
VV-406	2011	11.38 <sup>C</sup>	16.00 <sup>DE</sup>	5.93 <sup>B</sup>	0.68 <sup>ABC</sup>	3.21 <sup>B</sup>	1.97 <sup>B</sup>	158.80 <sup>D</sup>
	2012	11.79 <sup>AB</sup>	16.75 <sup>A</sup>	6.73 <sup>A</sup>	0.37 <sup>AB</sup>	3.15 <sup>D</sup>	1.90 <sup>A</sup>	134.60 <sup>BCD</sup>
VV-423	2011	11.66 <sup>B</sup>	16.20 <sup>CDE</sup>	6.00 <sup>B</sup>	0.74 <sup>A</sup>	3.20 <sup>B</sup>	1.90 <sup>CD</sup>	170.48 <sup>C</sup>
	2012	11.68 <sup>CD</sup>	16.58 <sup>A</sup>	6.73 <sup>A</sup>	0.32 <sup>B</sup>	3.19 <sup>BC</sup>	1.56 <sup>D</sup>	131.92 <sup>D</sup>
VV-434	2011	11.63 <sup>B</sup>	17.75 <sup>A</sup>	6.11 <sup>B</sup>	0.57 <sup>D</sup>	3.20 <sup>B</sup>	2.05 <sup>A</sup>	168.81 <sup>C</sup>
	2012	11.64 <sup>D</sup>	16.40 <sup>A</sup>	6.73 <sup>A</sup>	0.32 <sup>B</sup>	3.16 <sup>D</sup>	1.80 <sup>B</sup>	120.58 <sup>F</sup>
VV-438	2011	11.13 <sup>D</sup>	17.00 <sup>ABC</sup>	6.53 <sup>A</sup>	0.59 <sup>CD</sup>	3.21 <sup>AB</sup>	1.95 <sup>BCD</sup>	134.89 <sup>F</sup>
	2012	11.65 <sup>D</sup>	16.08 <sup>AB</sup>	6.80 <sup>A</sup>	0.30 <sup>BC</sup>	3.17 <sup>CD</sup>	1.59 <sup>D</sup>	126.63 <sup>E</sup>
VV-479	2011	11.20 <sup>D</sup>	14.90 <sup>F</sup>	6.58 <sup>A</sup>	0.61 <sup>BCD</sup>	3.20 <sup>B</sup>	1.88 <sup>D</sup>	151.88 <sup>E</sup>
	2012	11.62 <sup>D</sup>	15.03 <sup>C</sup>	6.70 <sup>AB</sup>	0.30 <sup>BC</sup>	3.16 <sup>D</sup>	1.36 <sup>F</sup>	137.11 <sup>BC</sup>
VV-482	2011	11.68 <sup>B</sup>	15.70 <sup>DEF</sup>	6.58 <sup>A</sup>	0.66 <sup>ABCD</sup>	3.23 <sup>A</sup>	1.64 <sup>E</sup>	166.19 <sup>C</sup>
	2012	11.81 <sup>AB</sup>	16.08 <sup>AB</sup>	6.73 <sup>A</sup>	0.31 <sup>BC</sup>	3.17 <sup>CD</sup>	1.36 <sup>F</sup>	135.84 <sup>BCD</sup>
VV-483	2011	11.72 <sup>B</sup>	16.60 <sup>BCD</sup>	6.63 <sup>A</sup>	0.71 <sup>AB</sup>	3.17 <sup>C</sup>	2.01 <sup>AB</sup>	176.82 <sup>B</sup>
	2012	11.75 <sup>BC</sup>	16.10 <sup>AB</sup>	6.38 <sup>BC</sup>	0.37 <sup>AB</sup>	3.20 <sup>AB</sup>	1.67 <sup>C</sup>	133.44 <sup>CD</sup>
VV-486	2011	11.43 <sup>C</sup>	15.60 <sup>EF</sup>	6.45 <sup>A</sup>	0.58 <sup>CD</sup>	3.20 <sup>B</sup>	1.97 <sup>BC</sup>	167.11 <sup>C</sup>
	2012	11.66 <sup>D</sup>	15.35 <sup>BC</sup>	6.68 <sup>AB</sup>	0.40 <sup>A</sup>	3.16 <sup>CD</sup>	1.50 <sup>E</sup>	144.51 <sup>A</sup>

\*izražena kao vinska kiselina \*\*izražena kao octena kiselina

U tablici 15. prikazani su rezultati osnovne fizikalno-kemijske analize vina 9 klonskih kandidata kutivara Kraljevina. U skladu sa koncentracijom šećera u moštu najvišu koncentraciju alkohola u vinu imao je klonski kandidat VV-360 koji je ujedno jedini klonski kandidat čiji mošt nije podvrgnut postupku pojačavanja. Očito su 2011. i 2012. godina bile vrlo povoljne za dozrijevanje grožđa jer kultivar Kraljevina vrlo rijetko i to samo u izuzetno dobrim godinama može postići prirodnu koncentraciju šećera, koja će osigurati više od 11 vol% alkohola u vinu. Klonski kandidat VV-360 se u obje godine izdvojio se najvećom koncentracijom nakupljenog šećera koja je 2011. godine iznosila 88°Oe što odgovara prirodnoj alkoholnoj jakosti 12 vol%, a 2012. godine 85°Oe što daje 11,5 vol%. Kako bi se ujednačile koncentracije alkohola svih vina u pojedinoj godini te izbjegle kasnije razlike prilikom senzornog ocjenjivanja vina u ostalim klonskim kandidatima proveden je postupak pojačavanja u skladu s koncentracijom šećera u ishodišnom moštu klonskog kandidata VV-360. Prema dobivenim rezultatima vidimo da su se vrijednosti koncentracije alkohola u vinima ispitivanih klonskih kandidata u obje godine kretale između 11.13-12.57 vol% a to su nešto veće vrijednosti od očekivanog za ovaj kultivar.

Najveća prosječna koncentracija ekstrakta bez šećera 2011. godine zabilježena je kod klonskog kandidata VV-434 sa 17.75 g/L, te klonskog kandidata VV-360 čija je vrijednost iznosila 17.46 g/L. 2012. godine vrijednosti ekstrakta bez šećera bile su nešto niže, a najveća koncentracija zabilježena je kod klonskog kandidata VV-406 sa 16.75 g/L. Slijede ga klonski kandidat VV-423, te klonski kandidati VV-360 i VV-434 kod kojih je također zabilježena i najveća koncentracija 2011. godine. Herceg (2016) u svom istraživanju navodi vrijednosti ekstrakta bez šećera u vinima kultivara Kraljevina koje su se kretale od 15.6 g/L do 19.7 g/L što je u skladu sa ovim istraživanjem.

U svim vinima došlo je do smanjenja ukupne kiselosti u odnosu na kiselost mošta, najvjerojatnije uslijed smanjenja vinske kiseline zbog taloženja tartarata, dok značajne razlike u koncentraciji ukupne kiselosti i pH između klonskih kandidata nisu utvrđene.

Relativno niske vrijednosti hlapive kiselosti ukazuju na pravilan tijek alkoholne fermentacije u oba tretmana, kao i na pozitivna enološka svojstva korištenih sojeva kvasaca.

Vina klonskih kandidata signifikantno su se razlikovala u koncentracijama pepela pri čemu su zabilježene nešto više koncentracije pepela u vinima klonskih kandidata iz 2011. godine. Tako su se klonski kandidati VV-360 i VV-434 koji su se izdvojili najvišom koncentracijom ekstrakta bez šećera izdvojili i najvišim vrijednostima pepela koja je

iznosila 2.05 g/L , s tim da se je klonski kandidat VV-360 uz VV-406 i sljedeće godine izdvojio najvećom koncentracijom pepela u vinu koja je iznosila 1.9 g/L. Prema Miroševiću i sur. (2002) količina pepela u vinima Kraljevine kreće se u rasponu od 1.4 do 2.0 g/L dok Herceg (2016) navodi vrijednosti količine pepela u 11 vina Kraljevine koje su se kretale od 1.47 do 1.8 g/L, što je u skladu sa našim rezultatima.

Koncentracije ukupnih fenola bile su veće kod svih klonskih kandidata u 2011. godini pri čemu se najvećom koncentracijom izdvojio klonski kandidat VV-360. U 2012. godini zabilježenu razlike između klonskih kandidata bile su signifikantne pri čemu je najveća koncentracija utvrđena kod klonskog kandidata VV-486. Najniža koncentracija ukupnih fenola u obje istraživane godine utvrđena je kod klonskog kandidata VV-438.

#### 4.2.2. Pojedinačne organske kiseline

Tablica 16: Koncentracije organskih kiselina (g/L) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berba 2011. i 2012 godina

Klonski kandidat	Vinska kiselina		Jabučna kiselina		Mliječna kiselina		Limunska kiselina		Jantarna kiselina	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
VV - 360	3.23 <sup>E</sup>	4.86 <sup>E</sup>	2.10 <sup>BC</sup>	2.39 <sup>C</sup>	0.14 <sup>A</sup>	0.14 <sup>BC</sup>	0.23 <sup>A</sup>	0.11 <sup>C</sup>	0.87 <sup>BCD</sup>	0.53 <sup>A</sup>
VV - 406	3.48 <sup>D</sup>	4.96 <sup>E</sup>	1.84 <sup>D</sup>	1.91 <sup>D</sup>	0.09 <sup>AB</sup>	0.14 <sup>CD</sup>	0.26 <sup>A</sup>	0.19 <sup>AB</sup>	1.10 <sup>A</sup>	0.27 <sup>CD</sup>
VV - 423	3.87 <sup>C</sup>	6.08 <sup>A</sup>	1.86 <sup>D</sup>	2.07 <sup>D</sup>	0.13 <sup>AB</sup>	0.17 <sup>AB</sup>	0.21 <sup>A</sup>	0.19 <sup>AB</sup>	1.01 <sup>AB</sup>	0.31 <sup>C</sup>
VV - 434	3.28 <sup>E</sup>	5.18 <sup>D</sup>	2.74 <sup>A</sup>	2.82 <sup>A</sup>	0.11 <sup>AB</sup>	0.14 <sup>BC</sup>	0.25 <sup>A</sup>	0.17 <sup>AB</sup>	0.73 <sup>D</sup>	0.42 <sup>B</sup>
VV - 438	3.89 <sup>C</sup>	5.49 <sup>C</sup>	2.16 <sup>B</sup>	2.48 <sup>BC</sup>	0.11 <sup>AB</sup>	0.19 <sup>A</sup>	0.22 <sup>A</sup>	0.18 <sup>AB</sup>	1.01 <sup>AB</sup>	0.26 <sup>CDE</sup>
VV - 479	3.37 <sup>DE</sup>	5.41 <sup>C</sup>	1.94 <sup>CD</sup>	2.64 <sup>AB</sup>	0.09 <sup>B</sup>	0.19 <sup>A</sup>	0.24 <sup>A</sup>	0.15 <sup>B</sup>	1.15 <sup>A</sup>	0.38 <sup>B</sup>
VV - 482	4.09 <sup>B</sup>	6.10 <sup>A</sup>	1.82 <sup>D</sup>	2.64 <sup>AB</sup>	0.14 <sup>A</sup>	0.11 <sup>D</sup>	0.23 <sup>A</sup>	0.20 <sup>A</sup>	0.93 <sup>BC</sup>	0.23 <sup>DE</sup>
VV - 483	4.25 <sup>AB</sup>	5.78 <sup>B</sup>	2.04 <sup>BC</sup>	2.50 <sup>BC</sup>	0.13 <sup>AB</sup>	0.13 <sup>CD</sup>	0.24 <sup>A</sup>	0.16 <sup>AB</sup>	0.92 <sup>BC</sup>	0.20 <sup>E</sup>
VV - 486	4.37 <sup>A</sup>	5.85 <sup>B</sup>	1.86 <sup>D</sup>	2.79 <sup>A</sup>	0.12 <sup>AB</sup>	0.14 <sup>BC</sup>	0.22 <sup>A</sup>	0.11 <sup>C</sup>	0.84 <sup>CD</sup>	0.23 <sup>DE</sup>

U svim vinima 2011. i 2012. godine utvrđeno je smanjenje vinske kiseline, najvjerojatnije uslijed taloženja tartarata. Koncentracije jabučne kiseline neznatno su se smanjile, pri čemu je i dalje signifikantno najviša vrijednost utvrđena kod vina klonskog kandidata VV-434 i to u obje godine. Limunska kiselina jedina je organska kiselina kod koje nisu zabilježene značajne razlike između klonskih kandidata.

Signifikantne razlike u koncentraciji jantarne kiseline utvrđene su u obje istraživane godine pri čemu su veće koncentracije jantarne kiseline utvrđene u 2011. godini. Tako se 2011. godine u vinima ispitivanih klonskih kandidata koncentracija jantarne kiseline kretala od 0.84 g/L (VV-486) do 1.15 g/L (VV-479), a 2012. godine od 0.20 g/L (VV-483) do 0.53 g/L (VV-360). U 2011. godini utvrđena je i signifikantna različitost između korištenih sojeva kvasca pri čemu je signifikantno veća koncentracija utvrđena kod vina klonskih kandidata VV-360, VV-434 i VV-486 dobivenih primjenom Vin13 soja kvasca. Međutim taj trend nije zabilježen u 2012. godini kada su razlike bile neznačajne. Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima koji navode povezanost između soja kvasca i sinteze jantarne kiseline tijekom fermentacije (Shimazu i Watanabe, 1981.).

#### 4.2.3. Aminokiseline u vinu

Razmatrajući rezultate dobivenih aminokiselina u vinu svakog klonskog kandidata, vidimo da se većina aminokiselina troši tijekom alkoholne fermentacije, međutim razina potrošnje značajno varira obzirom na klonski kandidat, korišteni soj kvasaca i godinu. Samim time je i ukupni sadržaj aminokiselina u vinima svih klonskih kandidata značajno manji u usporedbi sa vrijednostima dobivenim za analizirane moštove.

Tablica 17: Koncentracije pojedinačnih aminokiselina (mg/L) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. godina

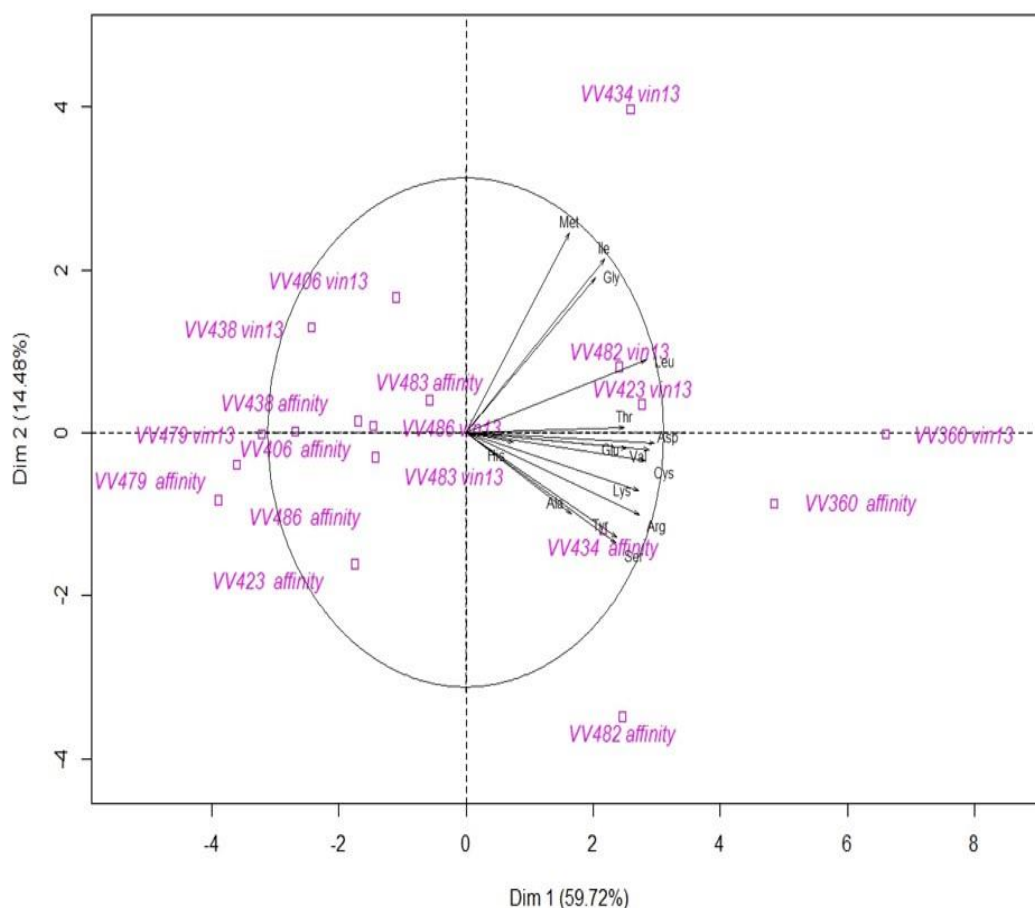
Klon	Glu	Asp	Cys	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Val	Met	Phe	Ile	Leu	Lys
VV360	12.24 <sup>A</sup>	19.82 <sup>A</sup>	36.68 <sup>A</sup>	4.59 <sup>B</sup>	15.12 <sup>DE</sup>	4.64 <sup>B</sup>	5.87 <sup>A</sup>	65.70 <sup>A</sup>	21.57 <sup>A</sup>	49.00 <sup>A</sup>	3.94 <sup>A</sup>	5.21 <sup>A</sup>	0.00	4.21 <sup>A</sup>	17.55 <sup>A</sup>	9.73 <sup>A</sup>
VV406	7.54 <sup>D</sup>	8.45 <sup>D</sup>	14.57 <sup>D</sup>	1.55 <sup>EF</sup>	16.89 <sup>D</sup>	3.15 <sup>E</sup>	2.66 <sup>D</sup>	12.25 <sup>F</sup>	14.55 <sup>DE</sup>	1.36 <sup>C</sup>	1.16 <sup>E</sup>	3.60 <sup>B</sup>	0.00	2.41 <sup>C</sup>	10.29 <sup>D</sup>	4.60 <sup>F</sup>
VV423	8.54 <sup>C</sup>	16.03 <sup>B</sup>	22.69 <sup>B</sup>	2.65 <sup>D</sup>	26.54 <sup>C</sup>	3.57 <sup>CD</sup>	4.81 <sup>B</sup>	28.66 <sup>D</sup>	18.17 <sup>B</sup>	3.88 <sup>C</sup>	2.52 <sup>C</sup>	2.02 <sup>E</sup>	0.00	1.80 <sup>D</sup>	11.81 <sup>C</sup>	5.68 <sup>D</sup>
VV434	10.76 <sup>B</sup>	16.13 <sup>B</sup>	22.30 <sup>B</sup>	3.25 <sup>C</sup>	15.52 <sup>DE</sup>	5.85 <sup>A</sup>	3.81 <sup>C</sup>	35.45 <sup>B</sup>	16.67 <sup>C</sup>	19.94 <sup>B</sup>	3.03 <sup>B</sup>	5.15 <sup>A</sup>	0.00	3.77 <sup>B</sup>	14.29 <sup>B</sup>	7.15 <sup>C</sup>
VV438	7.78 <sup>CD</sup>	6.51 <sup>E</sup>	15.08 <sup>D</sup>	1.68 <sup>E</sup>	11.03 <sup>F</sup>	3.45 <sup>D</sup>	2.20 <sup>DE</sup>	7.37 <sup>GH</sup>	18.64 <sup>B</sup>	1.23 <sup>C</sup>	1.02 <sup>E</sup>	3.81 <sup>B</sup>	0.00	2.28 <sup>C</sup>	9.30 <sup>E</sup>	3.73 <sup>H</sup>
VV479	5.63 <sup>E</sup>	6.62 <sup>E</sup>	13.94 <sup>DE</sup>	1.13 <sup>G</sup>	15.09 <sup>E</sup>	2.34 <sup>H</sup>	1.79 <sup>E</sup>	6.35 <sup>H</sup>	15.14 <sup>D</sup>	0.95 <sup>C</sup>	0.71 <sup>F</sup>	2.34 <sup>D</sup>	0.00	1.20 <sup>E</sup>	6.71 <sup>F</sup>	4.31 <sup>G</sup>
VV482	10.50 <sup>B</sup>	15.47 <sup>B</sup>	20.93 <sup>B</sup>	6.03 <sup>A</sup>	33.68 <sup>A</sup>	3.60 <sup>C</sup>	5.79 <sup>A</sup>	32.23 <sup>C</sup>	18.83 <sup>B</sup>	16.28 <sup>B</sup>	2.87 <sup>B</sup>	2.22 <sup>DE</sup>	0.00	2.40 <sup>C</sup>	14.44 <sup>B</sup>	9.31 <sup>B</sup>
VV483	7.32 <sup>D</sup>	10.81 <sup>C</sup>	18.22 <sup>C</sup>	2.82 <sup>D</sup>	28.41 <sup>B</sup>	2.85 <sup>F</sup>	4.70 <sup>B</sup>	23.34 <sup>E</sup>	14.29 <sup>E</sup>	1.91 <sup>C</sup>	1.51 <sup>D</sup>	2.81 <sup>C</sup>	0.00	2.25 <sup>C</sup>	10.19 <sup>D</sup>	4.30 <sup>G</sup>
VV486	6.37 <sup>E</sup>	7.70 <sup>DE</sup>	12.28 <sup>E</sup>	1.30 <sup>FG</sup>	16.00 <sup>DE</sup>	2.65 <sup>G</sup>	2.02 <sup>DE</sup>	9.43 <sup>G</sup>	16.61 <sup>C</sup>	1.78 <sup>C</sup>	1.49 <sup>D</sup>	2.16 <sup>DE</sup>	0.00	1.31 <sup>E</sup>	7.35 <sup>F</sup>	5.29 <sup>E</sup>

Tablica 18: Koncentracije pojedinačnih aminokiselina (mg/L) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2012. godina

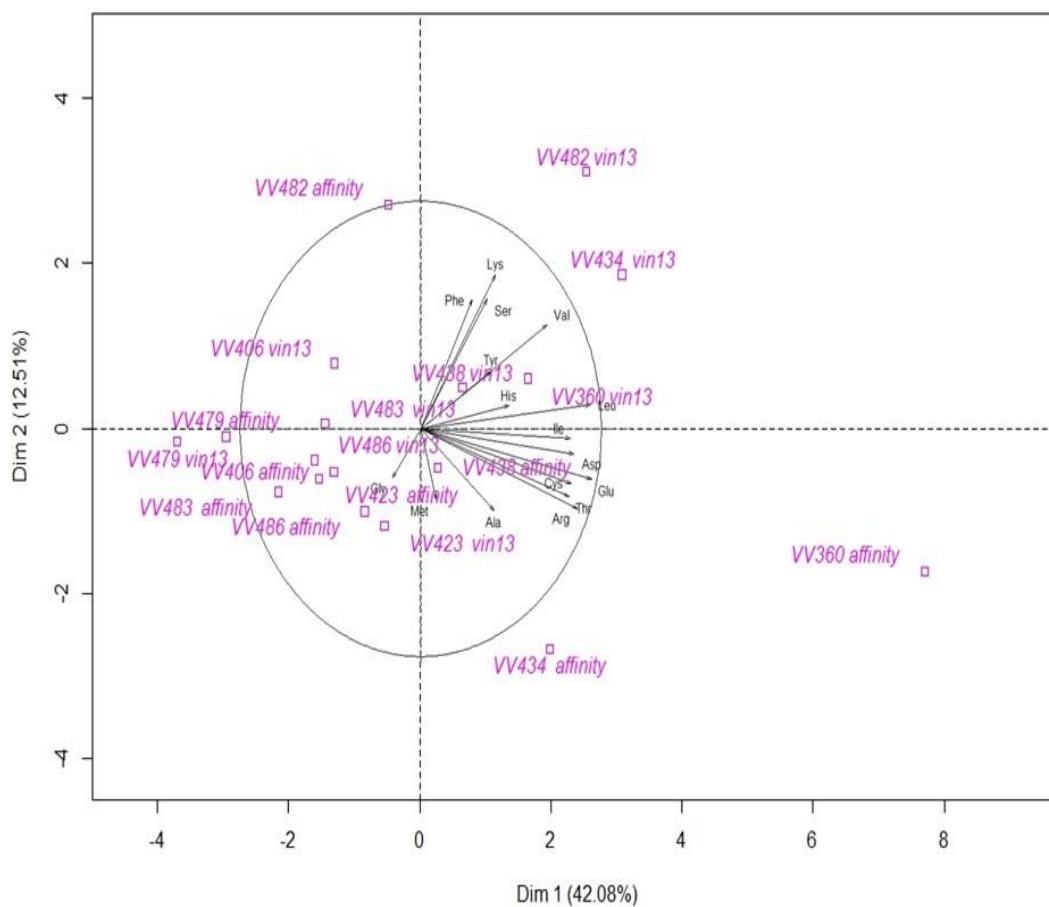
Klon	Glu	Asp	Cys	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Val	Met	Phe	Ile	Leu	Lys
VV360	13.27 <sup>A</sup>	14.67 <sup>A</sup>	29.33 <sup>A</sup>	4.37 <sup>B</sup>	18.62 <sup>A</sup>	5.71 <sup>C</sup>	3.87 <sup>A</sup>	27.92 <sup>A</sup>	17.31 <sup>AB</sup>	2.10 <sup>CD</sup>	2.29 <sup>A</sup>	0.71 <sup>E</sup>	0.74	3.29 <sup>A</sup>	18.54 <sup>A</sup>	5.48 <sup>B</sup>
VV406	4.98 <sup>D</sup>	6.44 <sup>E</sup>	17.99 <sup>E</sup>	1.52 <sup>F</sup>	17.33 <sup>AB</sup>	4.70 <sup>D</sup>	1.24 <sup>F</sup>	9.16 <sup>E</sup>	13.41 <sup>CDE</sup>	0.77 <sup>CDE</sup>	0.90 <sup>C</sup>	1.15 <sup>D</sup>	1.14	0.22 <sup>F</sup>	7.93 <sup>D</sup>	3.23 <sup>E</sup>
VV423	7.17 <sup>C</sup>	7.66 <sup>D</sup>	20.80 <sup>C</sup>	1.28 <sup>G</sup>	11.85 <sup>D</sup>	6.39 <sup>B</sup>	1.46 <sup>E</sup>	14.45 <sup>C</sup>	13.95 <sup>CD</sup>	0.23 <sup>DE</sup>	0.00 <sup>D</sup>	1.17 <sup>D</sup>	0.55	0.42 <sup>E</sup>	6.69 <sup>E</sup>	3.80 <sup>D</sup>
VV434	10.43 <sup>B</sup>	12.58 <sup>B</sup>	26.34 <sup>B</sup>	2.26 <sup>C</sup>	10.25 <sup>E</sup>	2.74 <sup>E</sup>	2.95 <sup>B</sup>	18.98 <sup>B</sup>	17.88 <sup>A</sup>	9.13 <sup>A</sup>	1.61 <sup>B</sup>	2.93 <sup>B</sup>	2.90	1.08 <sup>D</sup>	15.53 <sup>B</sup>	3.65 <sup>D</sup>
VV438	7.46 <sup>C</sup>	9.66 <sup>C</sup>	17.84 <sup>E</sup>	1.84 <sup>E</sup>	14.40 <sup>C</sup>	7.32 <sup>A</sup>	2.56 <sup>C</sup>	10.83 <sup>D</sup>	13.38 <sup>CDE</sup>	1.86 <sup>CDE</sup>	1.59 <sup>B</sup>	3.53 <sup>A</sup>	2.03	1.99 <sup>B</sup>	11.56 <sup>C</sup>	4.89 <sup>C</sup>
VV479	2.20 <sup>F</sup>	2.11 <sup>G</sup>	14.59 <sup>F</sup>	2.06 <sup>D</sup>	6.85 <sup>F</sup>	4.57 <sup>D</sup>	1.00 <sup>G</sup>	6.60 <sup>F</sup>	14.41 <sup>C</sup>	0.00 <sup>E</sup>	0.00 <sup>D</sup>	0.67 <sup>E</sup>	0.00	0.00 <sup>G</sup>	2.81 <sup>G</sup>	2.95 <sup>F</sup>
VV482	6.76 <sup>C</sup>	6.08 <sup>EF</sup>	19.09 <sup>DE</sup>	5.73 <sup>A</sup>	15.92 <sup>B</sup>	2.93 <sup>E</sup>	2.06 <sup>D</sup>	9.52 <sup>DE</sup>	12.60 <sup>E</sup>	2.17 <sup>C</sup>	2.05 <sup>A</sup>	1.63 <sup>C</sup>	1.88	1.56 <sup>C</sup>	15.47 <sup>B</sup>	9.88 <sup>A</sup>
VV483	3.67 <sup>E</sup>	5.59 <sup>F</sup>	17.94 <sup>E</sup>	1.97 <sup>DE</sup>	13.32 <sup>C</sup>	6.38 <sup>B</sup>	1.38 <sup>EF</sup>	7.01 <sup>F</sup>	16.32 <sup>B</sup>	0.00 <sup>E</sup>	0.63 <sup>C</sup>	1.68 <sup>C</sup>	0.61	0.08 <sup>FG</sup>	6.10 <sup>F</sup>	3.38 <sup>E</sup>
VV486	5.64 <sup>D</sup>	6.22 <sup>E</sup>	19.55 <sup>CD</sup>	1.15 <sup>G</sup>	9.24 <sup>E</sup>	5.78 <sup>C</sup>	2.49 <sup>C</sup>	8.71 <sup>E</sup>	12.85 <sup>DE</sup>	5.38 <sup>B</sup>	0.15 <sup>D</sup>	2.61 <sup>B</sup>	1.31	0.17 <sup>F</sup>	8.26 <sup>D</sup>	2.48 <sup>G</sup>



Prema prikazanim rezultatima u tablicama 17. i 18. vidljivo je da od svih klonskih kandidata najviše gotovo svih aminokiselina sadrži klonski kandidat VV-360. I u vinima svih klonskih kandidata najzastupljenija je aminokiselina arginin dok se najmanjim koncentracijama izdvajaju već u moštu spomenuta aminokiseline fenilalanin te valin. Prema Bisson (1991) raspodjela aminokiselina u vinu na kraju alkoholne fermentacije nije u korelaciji sa početnim aminokiselinskim sastavom mošta što se može utvrditi i iz ovog istraživanja. Utvrđeno je postojanje signifikantne različitosti kako među klonskim kandidatima tako i među vinima zavisno od korištenog soja kvasca pri čemu je značajan utjecaj na njihovu raspodjelu imala i sama proizvodna godina što je vidljivo kroz grafikone 10. i 11.



Grafikon 10. Analiza glavnih komponenta (PCA) prema analizi pojedinačnih aminokiselina za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine



Grafikon 11. Analiza glavnih komponentata (PCA) prema analizi pojedinačnih aminokiselina za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine

Usporedivši korištene sojeve kvasca dobiveni rezultati ukazuju na signifikantno veću koncentraciju glutaminske kiseline, treonina, arginina i alanina te manju koncentraciju aspartata, histidina, glicina i valina u vinima klonskih kandidata dobivenih korištenjem soja kvasca Affinity i to u obje istraživane godine. Isto tako rezultati ukazuju na signifikantno značajnu različitost vina klonskog kandidata VV-360 pri čemu je na sastav pojedinačnih aminokiselina u 2011. godini veći utjecaj imao soj kvasca VIN13, a u 2012. soj kvasca Affinity.

#### 4.2.4. Sastav pojedinačnih polifenolnih spojeva u vinu

Prema dobivenim rezultatima ovog istraživanja vidljive su značajne razlike u polifenolnom sastavu vina između dvije ispitivane godine, dok odabrani sojevi kvasaca nisu imali značajan utjecaj na sastav polifenolnih spojeva u vinu. Utvrđene razlike u koncentracijama pojedinačnih polifenolnih spojeva između vina pojedinih klonskih kandidata i godine su očekivane s obzirom da su fenolne komponente u vinu ovisne o kultivaru, klimatskim uvjetima, tehnologiji uzgoja vinove loze i tehnikama vinifikacije (Boulton i sur., 2009; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Downey i sur., 2006; Keller, 2010). Dobiveni rezultati ukazuju na relativno niske koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva u vinima svih klonskih kandidata gdje se kao dominantna hidrokisimna kiselina izdvojila kaftarna kiselina čije koncentracije su u obje godine bile značajno najveće kod vina klonskog kandidata VV-479. U sastavu hidrosibenzojevih kiselina razlike su bile još manje pri čemu se u 2011. nesigifikantno većom koncentracijom galne kiseline, a u 2012. sigifikantno većom izdvojio klonski kandidat VV-438. Po sadržaju ukupnih flavonola nametnuo se klonski kandidat VV-360 koji je u obje godine imao značajno najveću koncentraciju epikatehina te klonski kandidat VV-434 koji se izdvojio većom koncentracijom procijanidina B1. Uspoređujući vrijednosti ukupnih flavonola te hidrosibenzojevih i hidrosicimnih kiselina (tablica 21) značajno najvećom koncentracijom ukupnih hidrosicimnih kiselina i to u obje istraživane godine izdvojio se klonski kandidat VV-479 te uz njega u 2012. godini VV-486. Temeljem dobivenih vrijednosti ukupnih hidrosibenzojevih kiselina niti jedno vino klonskih kandidata se nije posebno istaknulo.

Tablica 19. Koncentracija pojedinačnih polifenola (mg/L) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. godine

Klon	Kaftarna	Kafeinska	Kutarna	P- kumarinska	Fertarna	Ferulinska	Galna	Siringinska	Katehin	Epikatehin	Procijanidin		Trans resveratrol
											B1	B2	
VV360	4.36 <sup>B</sup>	0.75 <sup>A</sup>	0.63 <sup>A</sup>	0.09 <sup>ABCD</sup>	1.21 <sup>F</sup>	1.22 <sup>D</sup>	0.55	0.10	1.42 <sup>CD</sup>	3.24 <sup>A</sup>	0.36 <sup>CDE</sup>	0.24 <sup>B</sup>	0.38
VV406	3.40 <sup>C</sup>	0.52 <sup>BC</sup>	0.13 <sup>E</sup>	0.08 <sup>BCD</sup>	1.60 <sup>C</sup>	1.38 <sup>BC</sup>	0.35	0.18	1.38 <sup>DE</sup>	2.02 <sup>E</sup>	0.31 <sup>DE</sup>	0.33 <sup>A</sup>	0.37
VV423	2.12 <sup>E</sup>	0.23 <sup>E</sup>	0.29 <sup>D</sup>	0.07 <sup>CD</sup>	1.38 <sup>E</sup>	1.29 <sup>CD</sup>	0.84	0.17	1.27 <sup>E</sup>	1.99 <sup>E</sup>	0.28 <sup>E</sup>	0.15 <sup>CD</sup>	0.46
VV434	2.23 <sup>E</sup>	0.53 <sup>BC</sup>	0.33 <sup>CD</sup>	0.06 <sup>D</sup>	1.49 <sup>D</sup>	0.92 <sup>F</sup>	0.85	0.30	1.37 <sup>DE</sup>	3.03 <sup>B</sup>	0.54 <sup>A</sup>	0.06 <sup>D</sup>	0.48
VV438	4.95 <sup>A</sup>	0.56 <sup>B</sup>	0.33 <sup>C</sup>	0.05 <sup>D</sup>	1.50 <sup>D</sup>	1.08 <sup>E</sup>	0.90	0.19	1.35 <sup>DE</sup>	2.71 <sup>C</sup>	0.37 <sup>BCD</sup>	0.16 <sup>C</sup>	0.40
VV479	5.19 <sup>A</sup>	0.48 <sup>BCD</sup>	0.40 <sup>C</sup>	0.13 <sup>A</sup>	1.83 <sup>A</sup>	1.42 <sup>AB</sup>	0.58	0.15	1.63 <sup>B</sup>	2.29 <sup>D</sup>	0.54 <sup>A</sup>	0.14 <sup>C</sup>	0.41
VV482	2.79 <sup>D</sup>	0.43 <sup>CD</sup>	0.60 <sup>AB</sup>	0.12 <sup>AB</sup>	1.29 <sup>F</sup>	1.39 <sup>BC</sup>	0.37	0.15	1.52 <sup>BC</sup>	2.33 <sup>D</sup>	0.46 <sup>AB</sup>	0.32 <sup>A</sup>	0.34
VV483	2.23 <sup>E</sup>	0.41 <sup>D</sup>	0.30 <sup>D</sup>	0.12 <sup>ABC</sup>	1.73 <sup>B</sup>	1.39 <sup>A</sup>	0.68	0.16	1.86 <sup>A</sup>	2.58 <sup>C</sup>	0.45 <sup>ABC</sup>	0.11 <sup>CD</sup>	0.34
VV486	2.91 <sup>D</sup>	0.54 <sup>B</sup>	0.53 <sup>B</sup>	0.06 <sup>CD</sup>	1.63 <sup>C</sup>	1.35 <sup>BC</sup>	0.26	0.14	1.33 <sup>DE</sup>	1.70 <sup>F</sup>	0.35 <sup>DE</sup>	0.08 <sup>D</sup>	0.40

Tablica 20. Koncentracija pojedinačnih polifenola (mg/L) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2012. godine

Klon	Kaftarna	Kafeinska	Kutarna	P- kumarinska	Fertarna	Ferulinska	Galna	Siringinska	Katehin	Epikatehin	Procijanidin		Trans resveratrol
											B1	B2	
VV360	5.56 <sup>C</sup>	0.59 <sup>C</sup>	0.68 <sup>CD</sup>	0.19 <sup>A</sup>	0.32 <sup>AB</sup>	0.15	1.81 <sup>AB</sup>	0.38 <sup>AB</sup>	0.41 <sup>G</sup>	12.88 <sup>A</sup>	0.90 <sup>B</sup>	0.73 <sup>DE</sup>	0.42
VV406	4.89 <sup>D</sup>	0.30 <sup>E</sup>	0.28 <sup>F</sup>	0.14 <sup>BC</sup>	0.27 <sup>BCD</sup>	0.37	1.58 <sup>C</sup>	0.19 <sup>D</sup>	1.63 <sup>AB</sup>	7.85 <sup>F</sup>	1.03 <sup>B</sup>	0.68 <sup>EF</sup>	0.47
VV423	3.49 <sup>F</sup>	0.90 <sup>A</sup>	0.38 <sup>E</sup>	0.17 <sup>AB</sup>	0.24 <sup>CD</sup>	0.29	1.18 <sup>D</sup>	0.30 <sup>C</sup>	1.54 <sup>BC</sup>	8.34 <sup>E</sup>	1.05 <sup>B</sup>	0.47 <sup>G</sup>	0.48
VV434	3.95 <sup>E</sup>	0.77 <sup>B</sup>	0.34 <sup>EF</sup>	0.13 <sup>CD</sup>	0.34 <sup>AB</sup>	0.46	1.13 <sup>D</sup>	0.12 <sup>D</sup>	1.67 <sup>A</sup>	11.12 <sup>B</sup>	1.39 <sup>A</sup>	0.83 <sup>C</sup>	0.38
VV438	3.40 <sup>F</sup>	0.83 <sup>AB</sup>	0.78 <sup>B</sup>	0.11 <sup>D</sup>	0.27 <sup>BCD</sup>	0.50	1.91 <sup>A</sup>	0.35 <sup>BC</sup>	0.88 <sup>F</sup>	7.65 <sup>G</sup>	1.02 <sup>B</sup>	0.78 <sup>CD</sup>	0.38
VV479	7.72 <sup>A</sup>	0.62 <sup>C</sup>	0.62 <sup>D</sup>	0.14 <sup>CD</sup>	0.33 <sup>ABC</sup>	0.25	1.80 <sup>AB</sup>	0.42 <sup>A</sup>	1.37 <sup>E</sup>	9.03 <sup>D</sup>	1.06 <sup>B</sup>	1.12 <sup>A</sup>	0.35
VV482	4.05 <sup>E</sup>	0.33 <sup>E</sup>	0.73 <sup>BC</sup>	0.19 <sup>A</sup>	0.23 <sup>D</sup>	0.39	1.70 <sup>BC</sup>	0.33 <sup>BC</sup>	1.47 <sup>CD</sup>	9.64 <sup>C</sup>	1.13 <sup>B</sup>	0.48 <sup>G</sup>	0.36
VV483	6.51 <sup>B</sup>	0.45 <sup>D</sup>	0.70 <sup>BCD</sup>	0.15 <sup>BC</sup>	0.27 <sup>BCD</sup>	0.23	0.97 <sup>E</sup>	0.45 <sup>A</sup>	1.43 <sup>DE</sup>	6.33 <sup>I</sup>	0.98 <sup>B</sup>	0.60 <sup>F</sup>	0.45
VV486	6.72 <sup>B</sup>	0.89 <sup>A</sup>	0.88 <sup>A</sup>	0.19 <sup>A</sup>	0.37 <sup>A</sup>	0.26	0.88 <sup>E</sup>	0.13 <sup>D</sup>	1.62 <sup>AB</sup>	6.76 <sup>H</sup>	1.02 <sup>B</sup>	0.96 <sup>B</sup>	0.46

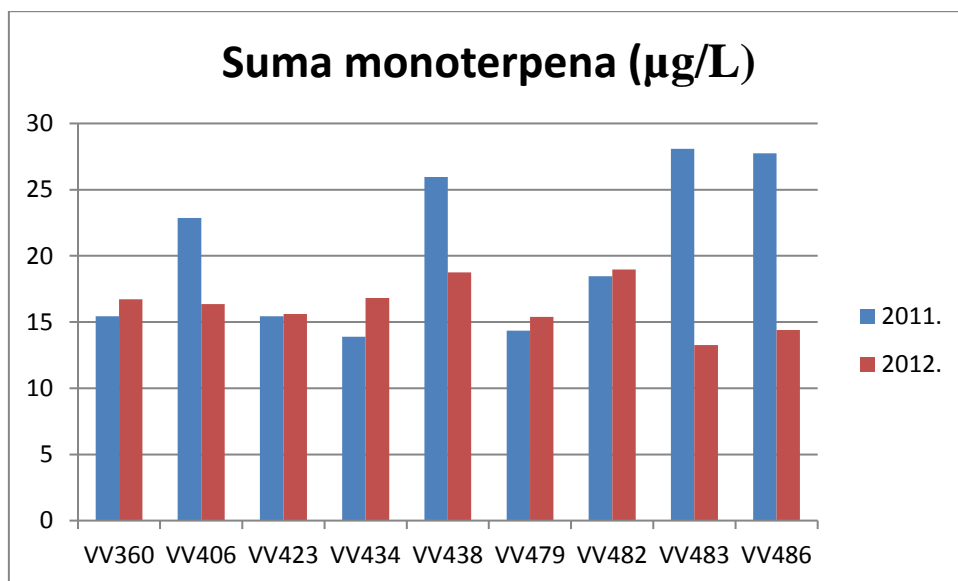
Tablica 21. Vrijednosti ukupnih flavanola, hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina (mg/L) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. i 2012. godine

Klon	Ukupni flavanoli (mg/L)		Ukupne hidroksicimetne kiseline (mg/L)		Ukupne hidroksibenzojeve kiseline (mg/L)	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012
VV360	5.28 <sup>A</sup>	14.93 <sup>A</sup>	8.29 <sup>B</sup>	7.51 <sup>C</sup>	0.66 <sup>BCD</sup>	2.19 <sup>AB</sup>
VV406	4.04 <sup>D</sup>	11.20 <sup>C</sup>	7.12 <sup>C</sup>	6.27 <sup>D</sup>	0.53 <sup>CD</sup>	1.78 <sup>C</sup>
VV423	3.64 <sup>E</sup>	11.41 <sup>C</sup>	5.43 <sup>E</sup>	5.48 <sup>E</sup>	1.01 <sup>AB</sup>	1.48 <sup>D</sup>
VV434	5.01 <sup>B</sup>	15.01 <sup>A</sup>	5.57 <sup>E</sup>	6.00 <sup>D</sup>	1.14 <sup>A</sup>	1.26 <sup>E</sup>
VV438	4.60 <sup>C</sup>	10.33 <sup>D</sup>	8.55 <sup>B</sup>	5.91 <sup>DE</sup>	1.09 <sup>A</sup>	2.26 <sup>A</sup>
VV479	4.62 <sup>C</sup>	12.59 <sup>B</sup>	9.46 <sup>A</sup>	9.67 <sup>A</sup>	0.69 <sup>BCD</sup>	2.23 <sup>A</sup>
VV482	4.64 <sup>C</sup>	12.73 <sup>B</sup>	6.64 <sup>CD</sup>	5.92 <sup>DE</sup>	0.52 <sup>CD</sup>	2.03 <sup>B</sup>
VV483	5.02 <sup>B</sup>	9.35 <sup>E</sup>	6.30 <sup>D</sup>	8.34 <sup>B</sup>	0.85 <sup>ABC</sup>	1.42 <sup>DE</sup>
VV486	3.46 <sup>E</sup>	10.37 <sup>D</sup>	7.04 <sup>C</sup>	9.33 <sup>A</sup>	0.41 <sup>D</sup>	1.01 <sup>F</sup>

Iz tablice 21. vidljivo je da su u 2011. godini hidroksicimetne kiseline najzastupljenija grupa polifenolnih spojeva što je u skladu i sa literaturnim podacima (Ong i Nagel, 1978; Boulton i sur.,2009; Jackson, 2014; Vanzo i sur., 2007). Uspoređujući dvije godine u 2012. godini u vinima svih klonskih kandidata zabilježene su značajno veće koncentracije ukupnih flavanola, a to povećanje je vezano uz povećanje koncentracija epikatehina u svim ispitivanim vinima. Prosječne koncentracije ukupnih flavanola kretale su se u 2011. godini kretala od 3.45 mg/L (VV-486 ) do 5.28 mg/L (VV-360), a 2012. godine od 9,35 mg/L (VV-483) do 15.02 mg/L (VV-434). U obje godine najveća prosječna koncentracija galne kiseline zabilježena je kod klonskog kandidata VV-438 sa 0.90 mg/L 2011. i 1.91 mg/L 2012. godine, dok je najmanja prosječna koncentracija zabilježana kod klonskog kandidata VV-486 sa 0.26 mg/L u 2011., te VV-483 2012. godine sa 0.97 mg/L.

#### 4.2.5. Aromatski spojevi u vinu

##### 4.2.5.1. Terpeni



Grafikon 12. Koncentracija sume monoterpena (µg/L) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

Analizirajući rezultate te uspoređujući sumu pet najzastupljenijih terpenskih spojeva u vinima devet klonskih kandidata utvrđeno je da se u 2011. godini klonski kandidat VV-483 sa 28.09 µg/L izdvojio najvećom koncentracijom ukupnih monoterpena, dok se klonski kandidat VV-434 sa vrijednošću 13.88 µg/L izdvojio najmanjom koncentracijom. Klonski kandidat VV-483 sa 13.26 µg/L se sljedeće, 2012. godine izdvojio najmanjom

koncentracijom, a klonski kandidat VV-482 sa 18.96 µg/L najvećom koncentracijom. Toliko odstupanje uvjetovano je značajno manjom koncentracijom *cis*-ruža oksida čija koncentracija je kod navedenog klonskog kandidata u 2011. godini iznosila 4.65 µg/L a u 2012. svega 0.86 µg/L. Koncentracije geraniola, citronelola, nerola i α-terpineola u obje istraživane godine bile su ispod praga senzorne detekcije te ovi spojevi nisu doprinijeli značajno mirisima istraživanih vina klonskih kandidata. Najzastupljeniji spoj u vinima svih klonskih kandidata u obje godine istraživanja bio je linalol (tablica 22 i 23), pri čemu su utvrđene signifikantne razlike u koncentraciji linalola kako između klonskih kandidata tako i između dvije istraživane godine. Koncentracije linalola u 2011. godine u vinima ispitivanih klonskih kandidata kretala se u rasponu od 3.58 µg/L u vinu klonskog kandidata VV-360 do 12.53 µg/L u vinu klonskog kandidata VV-438, dok su se 2012. godine koncentracije kretale u rasponu od 3,41 µg/L u vinu klonskog kandidata VV-483 do 7.56 µg/L u vinu klonskog kandidata VV-423. Uz njega među zastupljenijim monoterpenima izdvojio se citronelol kojega je u 2011. godini signifikantno najviše bilo u vinu klonskog kandidata VV-360 a u 2012. uz već spomenuti izdvojio se i klonski kandidat VV-482. Prema ukupnoj sumi monoterpena signifikantno većim sadržajem izdvojila su se vina dobivena primjenom soja kvasca Vin13.

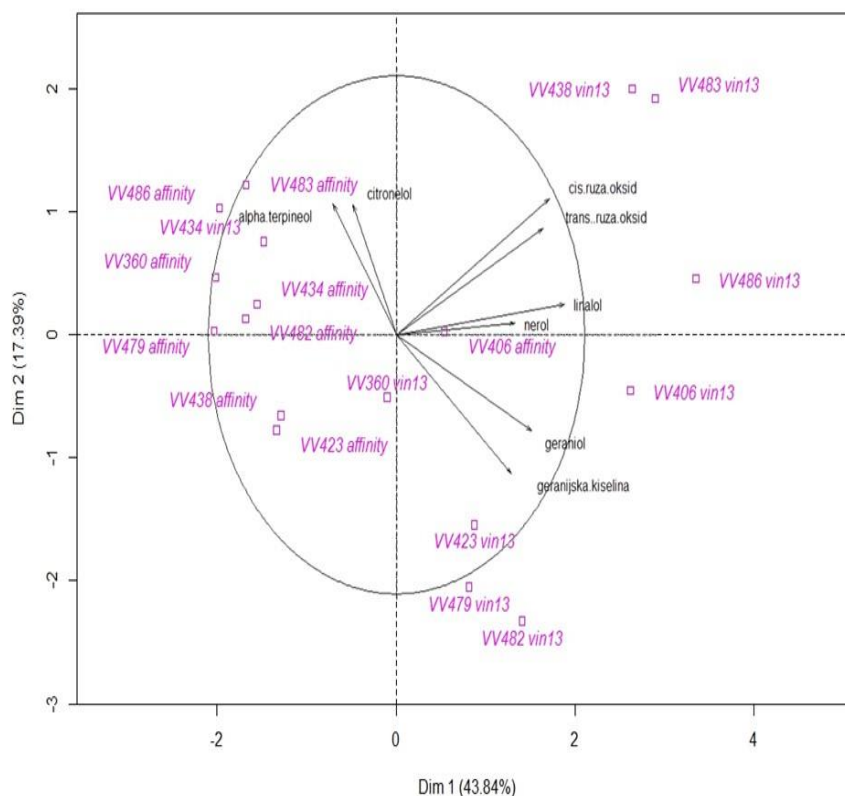
Tablica 22. Koncentracije monoterpena ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2011. godine

Klon	<i>Trans</i> -ruža oksid	<i>Cis</i> -ruža oksid	Geraniol	Linalol	Geranijska kiselina	Alpha-terpineol	Citronelol	Nerol	$\Sigma$ monoterpena
VV360	n.d.	n.d.	1.56 <sup>C</sup>	3.58 <sup>D</sup>	1.22 <sup>DEF</sup>	2.33 <sup>E</sup>	6.00 <sup>A</sup>	0.74 <sup>D</sup>	15.43 <sup>CD</sup>
VV406	2.35	3.92	1.70 <sup>A</sup>	7.85 <sup>BC</sup>	1.59 <sup>A</sup>	2.89 <sup>C</sup>	1.95 <sup>F</sup>	0.62 <sup>E</sup>	22.86 <sup>B</sup>
VV423	n.d.	n.d.	1.68 <sup>AB</sup>	7.93 <sup>BC</sup>	1.31 <sup>CD</sup>	2.54 <sup>D</sup>	1.25 <sup>G</sup>	0.73 <sup>D</sup>	15.44 <sup>CD</sup>
VV434	n.d.	n.d.	1.24 <sup>E</sup>	3.72 <sup>D</sup>	1.09 <sup>G</sup>	3.64 <sup>B</sup>	3.14 <sup>D</sup>	1.06 <sup>B</sup>	13.88 <sup>D</sup>
VV438	1.13	3.65	1.28 <sup>E</sup>	12.53 <sup>A</sup>	1.19 <sup>EF</sup>	2.43 <sup>DE</sup>	2.30 <sup>E</sup>	1.44 <sup>A</sup>	25.95 <sup>AB</sup>
VV479	n.d.	n.d.	1.4 <sup>D</sup>	6.79 <sup>C</sup>	1.37 <sup>BC</sup>	2.31 <sup>E</sup>	1.87 <sup>F</sup>	0.60 <sup>E</sup>	14.34 <sup>D</sup>
VV482	n.d.	n.d.	1.58 <sup>BC</sup>	9.62 <sup>ABC</sup>	1.42 <sup>B</sup>	2.02 <sup>F</sup>	3.18 <sup>D</sup>	0.63 <sup>E</sup>	18.45 <sup>C</sup>
VV483	1.11	4.65	1.62 <sup>ABC</sup>	9.9 <sup>AB</sup>	1.13 <sup>FG</sup>	4.42 <sup>A</sup>	3.63 <sup>C</sup>	1.53 <sup>A</sup>	28.09 <sup>A</sup>
VV486	1.21	3.81	1.53 <sup>C</sup>	12.3 <sup>A</sup>	1.24 <sup>DE</sup>	2.39 <sup>E</sup>	4.40 <sup>B</sup>	0.85 <sup>C</sup>	27.74 <sup>A</sup>



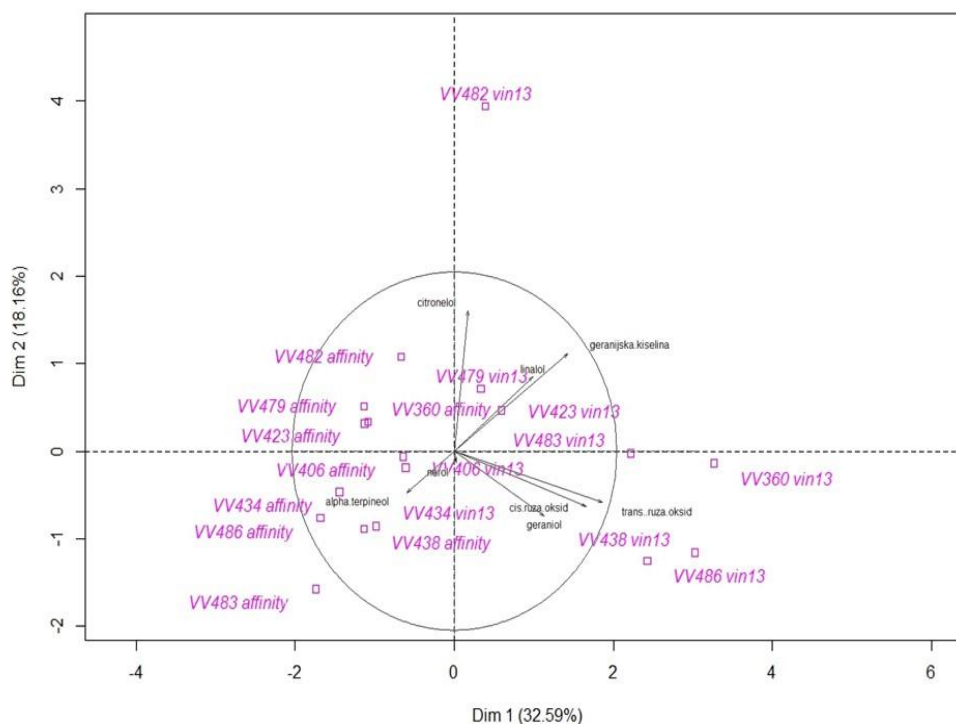
Tablica 23. Koncentracije monoterpena ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, 2012. godina

Klonski kandidat	<i>Trans</i> -ruža oksid	<i>Cis</i> -ruža oksid	Geraniol	Linalol	Geranijska kiselina	Alpha-terpineol	Citronelol	Nerol	$\Sigma$ monoterpena
VV360	1.21	3.71	2.06 <sup>CD</sup>	4.24	1.46 <sup>B</sup>	1.76 <sup>E</sup>	3.37 <sup>B</sup>	1.43 <sup>A</sup>	16.73
VV406	n.d.	n.d.	1.95 <sup>D</sup>	6.90	1.34 <sup>C</sup>	3.04 <sup>B</sup>	1.75 <sup>F</sup>	1.37 <sup>AB</sup>	16.36
VV423	n.d.	n.d.	2.02 <sup>CD</sup>	7.56	1.44 <sup>B</sup>	2.12 <sup>D</sup>	1.86 <sup>F</sup>	0.61 <sup>D</sup>	15.60
VV434	n.d.	n.d.	2.14 <sup>BC</sup>	5.39	1.10 <sup>D</sup>	4.30 <sup>A</sup>	2.49 <sup>D</sup>	1.41 <sup>AB</sup>	16.82
VV438	1.13	2.51	2.90 <sup>A</sup>	4.65	1.38 <sup>BC</sup>	2.88 <sup>B</sup>	2.09 <sup>E</sup>	1.22 <sup>C</sup>	18.76
VV479	n.d.	n.d.	1.90 <sup>D</sup>	6.17	1.37 <sup>BC</sup>	1.71 <sup>E</sup>	2.85 <sup>C</sup>	1.40 <sup>AB</sup>	15.39
VV482	n.d.	n.d.	1.38 <sup>E</sup>	6.75	1.73 <sup>A</sup>	2.50 <sup>C</sup>	5.38 <sup>A</sup>	1.22 <sup>C</sup>	18.96
VV483	1.04	0.86	2.26 <sup>B</sup>	3.41	1.46 <sup>B</sup>	2.90 <sup>B</sup>	1.50 <sup>G</sup>	1.17 <sup>C</sup>	13.26
VV486	1.12	4.83	1.50 <sup>E</sup>	4.18	1.16 <sup>D</sup>	1.73 <sup>E</sup>	1.54 <sup>G</sup>	1.33 <sup>B</sup>	14.40



Grafikon 13. Analiza glavnih komponentata (PCA) prema analizi pojedinačnih monoterpena za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine

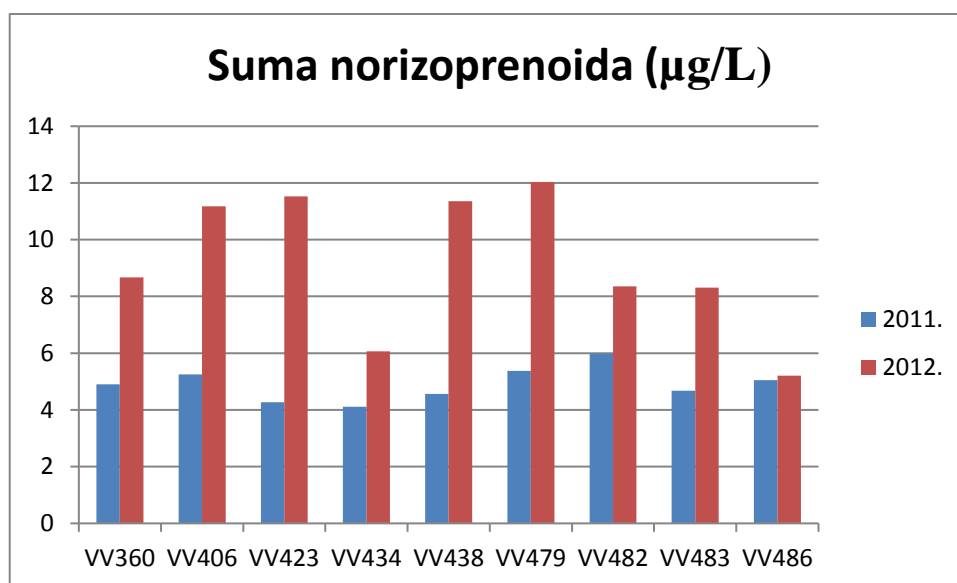
Na grafikonu 13. je prikaz distribucije vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema sastavu pojedinačnih monoterpena, pri čemu prva glavna komponenta objašnjava 43,84% ukupne varijabilnosti, a druga glavna komponenta 17,39% ukupne varijabilnosti uzoraka vina.



Grafikon 14. Analiza glavnih komponenta (PCA) prema analizi pojedinačnih monoterpena za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine

Na grafikonu 14. je prikaz distribucije vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema sastavu pojedinačnih monoterpena, pri čemu prva glavna komponenta objašnjava 32,59% ukupne varijabilnosti, a druga glavna komponenta 18,16% ukupne varijabilnosti uzoraka vina. Grafičkim prikazom prvih dviju glavnih komponenta pomoću dijagrama rasipanja utvrđena je velika heterogenost klonskih kandidata u obje godine istraživanja, pogotovo u korelacijama između varijabli. Vina klonskih kandidata razdvajaju se prema korištenom soju kvasca u obje godine istraživanja. Pa tako vina dobivena fermentacijom sa sojem kvasca Affinity u 2011. i 2012. godini korelirana su sa  $\alpha$ -terpineolom, dok su vina dobivena sojem kvasca Vin13 najvećim dijelom korelirana sa ostalim aromatskom spojevima i to linalolom, nerolom, geranijskom kiselinom i geraniolom. Prisutnost *trans* i *cis* ruža oksida u obje godine istraživanja utvrđena je samo u vinima klonskih kandidata VV-438, VV-483 i VV-486 pri čemu je utvrđena korelacija sa sojem kvasca Vin13.

#### 4.2.5.2. Norizoprenoidi



Grafikon 15. Koncentracija sume analiziranih norizoprenoida ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

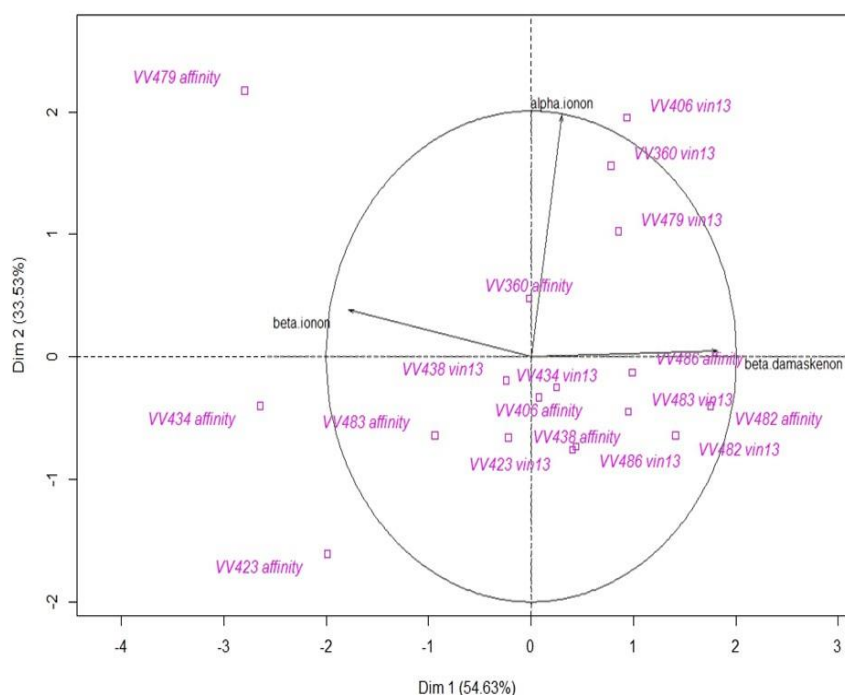
Između koncentracija analiziranih norizoprenoida u vinima devet klonskih kandidata utvrđena je signifikantna razlika što se može vidjeti na grafikonu 15. Sva vina klonskih kandidata su u 2012. godini imala više koncentracije norizoprenoida nego 2011. godine. Pretpostavlja se da je grožđe te godine imalo više koncentracije pojedinih karotenoida na što su utjecale klimatske prilike i raniji početak berbe 2012. godine. Značajna razlika utvrđena je i između korištenih sojeva kvasaca pri čemu je signifikantno veća suma norisoprenoida utvrđena kod vina dobivenih sojem kvasca Vin13 i to u obje istraživane godine.

Tablica 24. Koncentracija norizoprenoida ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

Klonski kandidat	$\beta$ -damaskenon		$\epsilon$ -ionon		$\beta$ -ionon		$\Sigma\text{C13}$ norizoprenoida	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
VV - 360	3.67 <sup>DE</sup>	6.55 <sup>D</sup>	1.23 <sup>AB</sup>	2.10 <sup>A</sup>	n.d.	0.02 <sup>DE</sup>	4.90 <sup>DE</sup>	8.67 <sup>C</sup>
VV - 406	4.04 <sup>BC</sup>	9.31 <sup>B</sup>	1.16 <sup>B</sup>	1.82 <sup>B</sup>	0.07 <sup>D</sup>	0.05 <sup>D</sup>	5.25 <sup>BC</sup>	11.18 <sup>B</sup>
VV - 423	3.45 <sup>E</sup>	9.78 <sup>AB</sup>	0.59 <sup>D</sup>	1.74 <sup>BC</sup>	0.23 <sup>B</sup>	0.01 <sup>E</sup>	4.27 <sup>GH</sup>	11.53 <sup>AB</sup>
VV - 434	3.03 <sup>F</sup>	4.36 <sup>E</sup>	0.82 <sup>C</sup>	1.62 <sup>D</sup>	0.26 <sup>B</sup>	0.09 <sup>C</sup>	4.11 <sup>H</sup>	6.07 <sup>D</sup>
VV - 438	3.62 <sup>DE</sup>	9.42 <sup>B</sup>	0.82 <sup>C</sup>	1.74 <sup>BC</sup>	0.13 <sup>C</sup>	0.21 <sup>A</sup>	4.56 <sup>FG</sup>	11.36 <sup>AB</sup>
VV - 479	3.64 <sup>DE</sup>	10.31 <sup>A</sup>	1.29 <sup>A</sup>	1.68 <sup>CD</sup>	0.45 <sup>A</sup>	0.04 <sup>DE</sup>	5.38 <sup>B</sup>	12.03 <sup>A</sup>
VV - 482	5.17 <sup>A</sup>	7.24 <sup>C</sup>	0.80 <sup>C</sup>	1.02 <sup>F</sup>	0.02 <sup>E</sup>	0.10 <sup>BC</sup>	5.98 <sup>A</sup>	8.36 <sup>C</sup>
VV - 483	3.80 <sup>CD</sup>	6.80 <sup>CD</sup>	0.79 <sup>C</sup>	1.38 <sup>E</sup>	0.10 <sup>CD</sup>	0.13 <sup>B</sup>	4.68 <sup>EF</sup>	8.31 <sup>C</sup>
VV - 486	4.22 <sup>B</sup>	4.09 <sup>E</sup>	0.84 <sup>C</sup>	1.01 <sup>F</sup>	n.d.	0.11 <sup>BC</sup>	5.05 <sup>CD</sup>	5.21 <sup>E</sup>

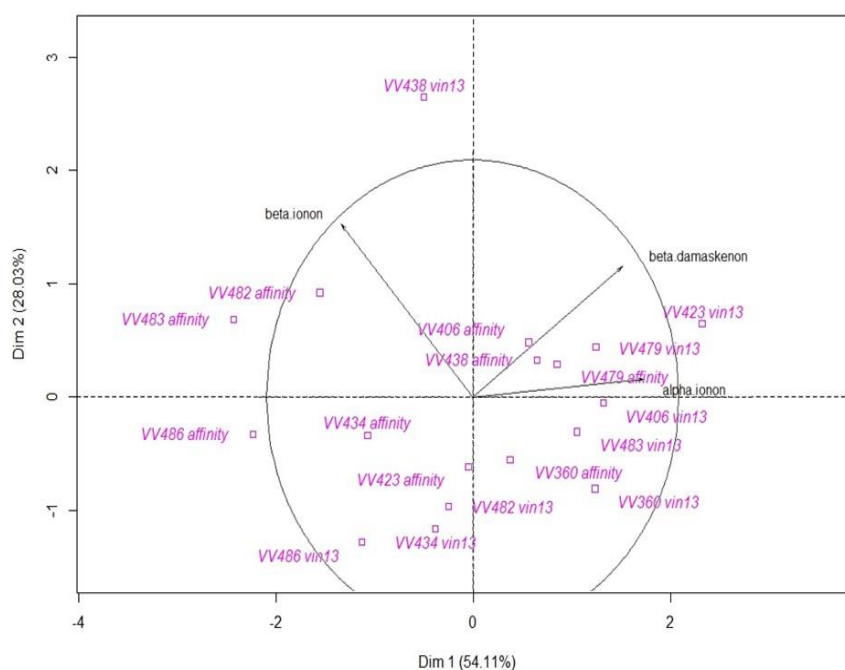
n.d. nije detektirano

2011. godine najmanja prosječna vrijednost analiziranih norizoprenoida sa 4.11  $\mu\text{g/L}$  zabilježena je kod klonskog kandidata VV-434, a najveća kod klonskog kandidata VV-482 sa 5.98  $\mu\text{g/L}$  koji se u 2011. godine također izdvojio i najvećom koncentracijom ukupnih terpenkih spojeva. 2012. godine najmanja prosječna vrijednost ispitivanih norizoprenoida zabilježena je kod klonskog kandidata VV-486 sa 5.21  $\mu\text{g/L}$ , dok je najveća vrijednost ovih spojeva zabilježena kod klonskog kandidata VV-479 sa 12.03  $\mu\text{g/L}$ . Najveću prosječnu koncentraciju  $\beta$ -damaskenona 2011. godine imao je klonski kandidat VV-482 (5,17  $\mu\text{g/L}$ ), a najveću prosječnu koncentraciju  $\beta$ -ionona imao je klonski kandidat VV-479 (0,45  $\mu\text{g/L}$ ) koji je 2012. godine imao i najveću prosječnu koncentraciju  $\beta$ -damaskenona (10,31  $\mu\text{g/L}$ ), a klonski kandidat VV-438 te iste godine imao je najveću prosječnu koncentraciju  $\beta$ -ionona (0.21  $\mu\text{g/L}$ ).  $\beta$ -damascenon i  $\beta$ -ionon u obje godine detektirani su iznad praga detekcije (tablica 24) te se smatraju važnim sastavnicama cvjetnih aroma u vinima uključenim u ovo istraživanje.



Grafikon 16. Analiza glavnih komponenta (PCA) prema analizi pojedinačnih norisoprenoida za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine

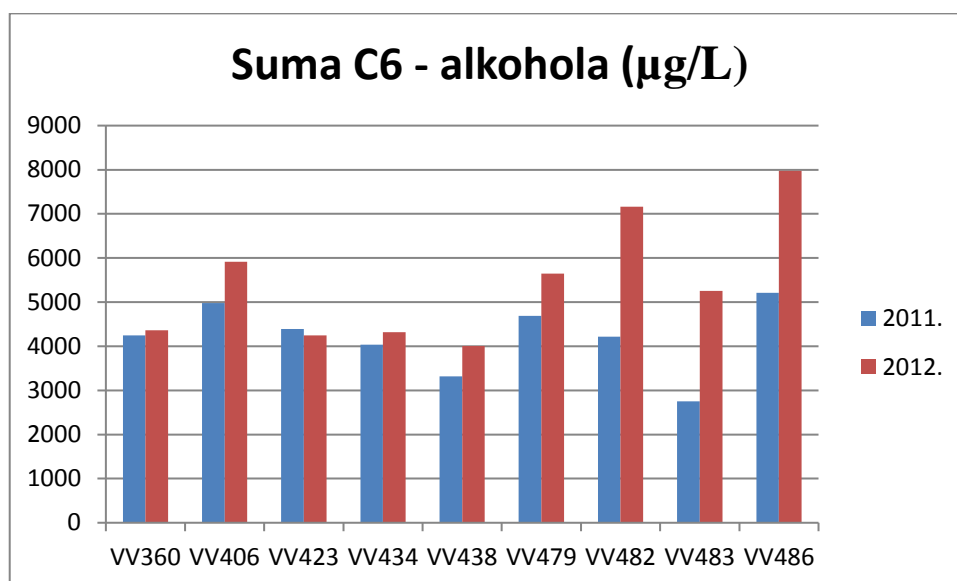
Na grafikonu 16. je prikaz distribucije vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema sastavu pojedinačnih norisoprenoida, pri čemu prva glavna komponenta objašnjava 54,63% ukupne varijabilnosti, a druga glavna komponenta 33,53% ukupne varijabilnosti uzoraka vina



Grafikon 17. Analiza glavnih komponenta (PCA) prema analizi pojedinačnih norizoprenoida za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine

Na grafikonu 17. je prikaz distribucije vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema sastavu pojedinačnih monoterpena, pri čemu prva glavna komponenta objašnjava 54,11% ukupne varijabilnosti, a druga glavna komponenta 28,03% ukupne varijabilnosti uzoraka vina. Grafičkim prikazom prvih dviju glavnih komponenta pomoću dijagrama rasipanja (grafikoni 16 i 17) utvrđena je velika heterogenost klonskih kandidata u obje godine istraživanja. Razlika se primjećuje u odnosu varijabli, ali i u odnosu klonskih kandidata i korištenih sojeva kvasaca. Na koncentracije  $\beta$ -damaskenona i  $\alpha$ -ionona signifikanto veći utjecaj imao je soj kvasca Vin13 dok su se po većoj koncentraciji  $\beta$ -ionona izdvojila vina dobivena primjenom soja kvasca Affinity.

#### 4.2.5.3. Viši alkoholi



Grafikon 18. Koncentracija sume analiziranih viših alkohola ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

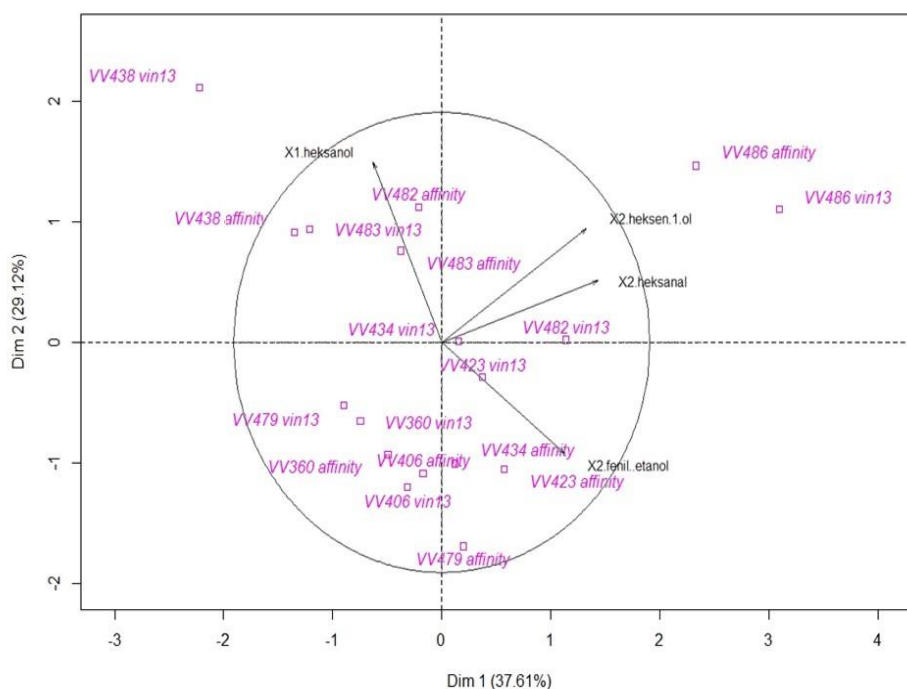
Iz grafikona 18. vidljivo je da postoje razlike u koncentraciji sume analiziranih viših alkohola između vina klonskih kandidata, a značajne su razlike vidljive i između dvije istraživane godine. Suma prosječne koncentracije analiziranih viših alkohola u 2011. godine kretale su se u rasponu od 2753.89  $\mu\text{g/L}$  (VV-483) do 5214.36  $\mu\text{g/L}$  (VV-486), a 2012. godine u rasponu od 4003.5  $\mu\text{g/L}$  (VV-438) do 7972.09  $\mu\text{g/L}$  (VV-486). Klonski kandidat VV-486 izdvojio se najvećom koncentracijom ispitivanih viših alkohola u obje godine istraživanja.



Tablica 25. Koncentracija pojedinačnih C6 alkohola u ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

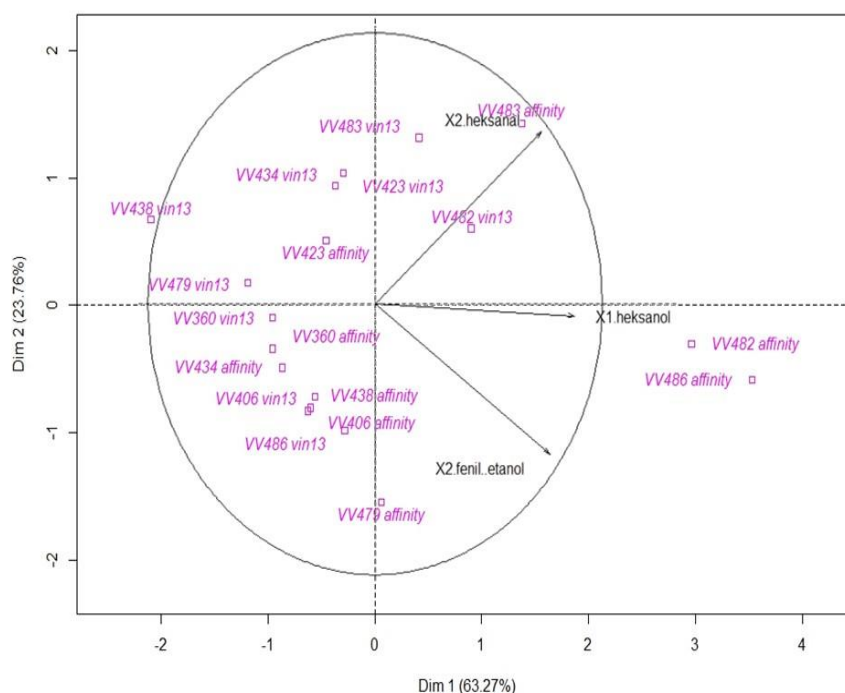
Klonski kandidat	2-heksanal		1-heksanol		2-fenil -etanol		$\Sigma$ C6-alkohola	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
VV - 360	n.d.	n.d.	1.65 <sup>BC</sup>	1.77 <sup>DE</sup>	4241.53 <sup>E</sup>	4359.25 <sup>F</sup>	4243.30 <sup>E</sup>	4360.90 <sup>F</sup>
VV - 406	n.d.	n.d.	1.55 <sup>CD</sup>	1.77 <sup>DE</sup>	4976.08 <sup>B</sup>	5915.93 <sup>C</sup>	4977.85 <sup>B</sup>	5917.48 <sup>C</sup>
VV - 423	1.25 <sup>C</sup>	1.21	1.61 <sup>BCD</sup>	1.53 <sup>E</sup>	4388.85 <sup>D</sup>	4239.75 <sup>G</sup>	4391.59 <sup>D</sup>	4242.60 <sup>G</sup>
VV - 434	0.57 <sup>D</sup>	0.61	1.69 <sup>BC</sup>	1.47 <sup>E</sup>	4035.38 <sup>F</sup>	4315.03 <sup>FG</sup>	4038.32 <sup>F</sup>	4317.28 <sup>FG</sup>
VV - 438	n.d.	n.d.	1.42 <sup>D</sup>	4.17 <sup>A</sup>	3313.62 <sup>G</sup>	4002.08 <sup>H</sup>	3317.79 <sup>G</sup>	4003.50 <sup>H</sup>
VV - 479	n.d.	n.d.	1.65 <sup>BC</sup>	1.64 <sup>E</sup>	4690.13 <sup>C</sup>	5641.53 <sup>D</sup>	4691.77 <sup>C</sup>	5643.17 <sup>D</sup>
VV - 482	1.94 <sup>B</sup>	1.78	2.47 <sup>A</sup>	2.79 <sup>B</sup>	4212.83 <sup>E</sup>	7160.83 <sup>B</sup>	4217.39 <sup>E</sup>	7165.23 <sup>B</sup>
VV - 483	2.54 <sup>A</sup>	n.d.	1.82 <sup>B</sup>	2.22 <sup>CD</sup>	2749.61 <sup>H</sup>	5249.61 <sup>E</sup>	2753.89 <sup>H</sup>	5253.98 <sup>E</sup>
VV - 486	1.08 <sup>C</sup>	1.67	2.38 <sup>A</sup>	2.54 <sup>BC</sup>	5205.13 <sup>A</sup>	7968.63 <sup>A</sup>	5214.36 <sup>A</sup>	7972.09 <sup>A</sup>

Od ispitivanih viših alkohola u ovom istraživanju najzastupljeniji je bio 2-fenil etanol, čiji miris cvijeća i ruže, pozitivno utječe na aromu vina, te se smatra jednim od najvažnijih aromatičnih alkohola (Lilly i sur., 2006). Njegove koncentracije kretale su se u rasponu od 2749.61  $\mu\text{g/L}$  (VV-438) do 5205.13  $\mu\text{g/L}$  (VV-486) 2011. godine, te od 4002.08  $\mu\text{g/L}$  (VV-438) do 7968.63  $\mu\text{g/L}$  (VV-486) 2012. godine. Vrijednosti 1-heksanola kretale su se od 1.42  $\mu\text{g/L}$  kod klonskog kandidata VV-438 do 2.47 kod klonskog kandidata VV-482 u 2011. godine dok je najveća koncentracija u 2012. godini izmjerena kod klonskog kandidata VV-438 i to 4.17  $\mu\text{g/l}$ .



Grafikon 19. Analiza glavnih komponenta (PCA) prema analizi pojedinačnih viših alkohola za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine

Na grafikonu 19. je prikaz distribucije vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema sastavu pojedinačnih analiziranih C6-alkohola pri čemu prva glavna komponenta objašnjava 37,61% ukupne varijabilnosti, a druga glavna komponenta 29,12% ukupne varijabilnosti uzoraka vina



Grafikon 20. Analiza glavnih komponenta (PCA) prema analizi pojedinačnih viših alkohola za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine

Na grafikonu 20. je prikaz distribucije vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema sastavu pojedinačnih analiziranih C6-alkohola, pri čemu prva glavna komponenta objašnjava 63,3% ukupne varijabilnosti, a druga glavna komponenta 23,8% ukupne varijabilnosti uzoraka vina. Grafičkim prikazom prvih dviju glavnih komponenta pomoću dijagrama rasipanja utvrđena je velika heterogenost klonskih kandidata u obje godine istraživanja. Vidljivo je kako vina dobivena sojem kvasaca Affinity sadrže više 2-fenil etanola, nego vina dobivena sojem kvasca Vin13. Provedeno istraživanje ukazuje na različite sposobnosti korištenih sojeva kvasaca pri stvaraju pojedinačnih viših alkohola. Uspoređujući korištene sojeve kvasaca primjećujemo veće koncentracije viših alkohola u svim vinima koja su bila inokulirana sojem kvasca Affinity. Kvasci korišteni u ovom istraživanju izabrani su sa ciljem stvaranja izraženijeg aromatskog profila vina sorte Kraljevina, a soj kvasca Affinity u obje godine istraživanja stvorio je u odnosu na soj kvasca Vin13 signifikantno veće koncentracije viših alkohola.

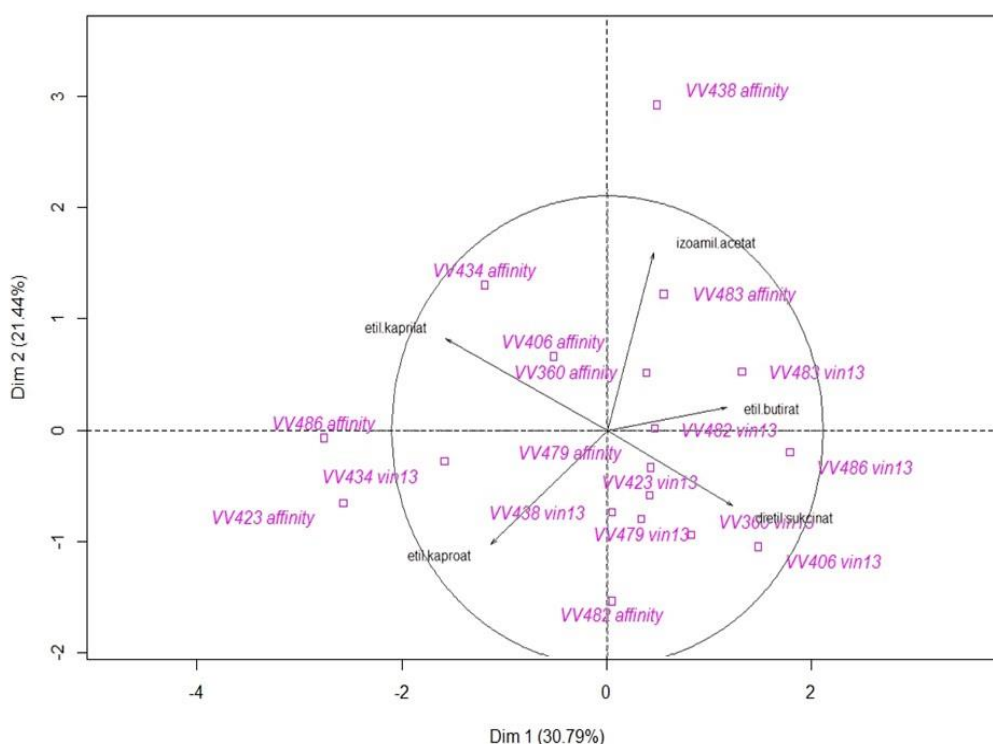
#### 4.2.5.4. Esteri

Tablica 26. Koncentracija pojedinačnih estera u ( $\mu\text{g/L}$ ) u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. i 2012. godine

Klonski kandidat	Etil butirat		Izoamil acetat		Etil kaproat		Etil kaprilat		Dietil sukcinat		$\Sigma$ estera	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
VV - 360	30.97 <sup>D</sup>	62.78 <sup>B</sup>	3143.20 <sup>D</sup>	3505.8 <sup>A</sup>	159.02 <sup>G</sup>	196.44 <sup>I</sup>	434.35 <sup>E</sup>	234.06 <sup>B</sup>	158.67 <sup>A</sup>	139.01 <sup>E</sup>	3926.21 <sup>D</sup>	4138.09 <sup>A</sup>
VV - 406	53.19 <sup>B</sup>	55.06 <sup>C</sup>	2843.35 <sup>E</sup>	2065.18 <sup>D</sup>	153.91 <sup>H</sup>	304.67 <sup>H</sup>	441.32 <sup>D</sup>	165.79 <sup>E</sup>	140.77 <sup>B</sup>	144.95 <sup>D</sup>	3632.53 <sup>E</sup>	2735.64 <sup>D</sup>
VV - 423	53.11 <sup>B</sup>	77.51 <sup>A</sup>	2441.78 <sup>F</sup>	1762.00 <sup>E</sup>	437.44 <sup>D</sup>	495.53 <sup>B</sup>	570.80 <sup>B</sup>	124.68 <sup>G</sup>	116.44 <sup>F</sup>	168.99 <sup>B</sup>	3619.56 <sup>E</sup>	2628.71 <sup>E</sup>
VV - 434	31.37 <sup>D</sup>	81.05 <sup>A</sup>	3450.23 <sup>C</sup>	2937.05 <sup>C</sup>	503.85 <sup>A</sup>	326.73 <sup>F</sup>	625.32 <sup>A</sup>	127.44 <sup>G</sup>	118.36 <sup>F</sup>	118.84 <sup>G</sup>	4729.12 <sup>B</sup>	3591.11 <sup>C</sup>
VV - 438	77.25 <sup>A</sup>	47.88 <sup>D</sup>	3990.53 <sup>A</sup>	2911.08 <sup>C</sup>	462.62 <sup>C</sup>	425.64 <sup>D</sup>	521.13 <sup>C</sup>	271.6 <sup>A</sup>	130.30 <sup>E</sup>	134.84 <sup>F</sup>	5181.81 <sup>A</sup>	3791.03 <sup>B</sup>
VV - 479	81.75 <sup>A</sup>	67.12 <sup>B</sup>	2901.05 <sup>E</sup>	1233.03 <sup>F</sup>	483.23 <sup>B</sup>	318.97 <sup>G</sup>	425.92 <sup>F</sup>	183.78 <sup>D</sup>	136.01 <sup>CD</sup>	141.31 <sup>E</sup>	4027.95 <sup>D</sup>	1944.21 <sup>F</sup>
VV - 482	34.95 <sup>CD</sup>	42.46 <sup>E</sup>	3176.30 <sup>D</sup>	2868.28 <sup>C</sup>	463.50 <sup>C</sup>	595.63 <sup>A</sup>	207.07 <sup>H</sup>	159.68 <sup>F</sup>	138.30 <sup>BC</sup>	192.98 <sup>A</sup>	4020.12 <sup>D</sup>	3859.03 <sup>B</sup>
VV - 483	57.58 <sup>B</sup>	48.46 <sup>D</sup>	3760.75 <sup>B</sup>	3349.78 <sup>B</sup>	175.68 <sup>F</sup>	377.90 <sup>E</sup>	326.54 <sup>G</sup>	126.74 <sup>G</sup>	134.15 <sup>DE</sup>	158.79 <sup>C</sup>	4454.70 <sup>C</sup>	4061.66 <sup>A</sup>
VV - 486	38.89 <sup>C</sup>	35.95 <sup>F</sup>	2941.05 <sup>E</sup>	1856.93 <sup>E</sup>	313.51 <sup>E</sup>	464.35 <sup>C</sup>	573.34 <sup>B</sup>	193.69 <sup>C</sup>	136.52 <sup>CD</sup>	159.16 <sup>C</sup>	4003.31 <sup>D</sup>	2710.08 <sup>DE</sup>

Suma hlapivih estera koji su detektirani u ovom istraživanju u 2011. godini bila je najmanja kod vina klonskog kandidata VV-423 sa koncentracijom 3619.56  $\mu\text{g/L}$ , a najveća kod klonskog kandidata VV-438 sa koncentracijom od 5181.81  $\mu\text{g/L}$ . U 2012. godini suma hlapivih estera kretala se od najmanjih 1944.21  $\mu\text{g/L}$  kod klonskog kandidata VV-479 do najvećih koncentracija od 4138.09  $\mu\text{g/L}$  kod klonskog kandidata VV-360. Shodno tome upravo su se ovim redoslijedom kretale i koncentracije izoamilnog acetata s obzirom da je u ovom istraživanju on bio najzastupljeniji ester u svim vinima u obje godine istraživanja. Tako su se koncentracije izoamil acetata kretale u rasponu od 2441.78  $\mu\text{g/L}$  (VV-423) do 3990.53  $\mu\text{g/L}$  (VV-438) 2011. godine, te 2012. godine u rasponu od 1233.03  $\mu\text{g/L}$  (VV-479) do 3505.8  $\mu\text{g/L}$  (VV-360). Takvi rezultati znače da je njegov miris koji se opisuje kao banana i voće, bio prisutan u mirisu svih analiziranih vina, a najviše kod klonskog kandidata VV-438 u 2011. godini, te VV-360 u 2012. godini, pošto su te vrijednosti iznad senzornog praga detekcije od 0.03 mg/L (Moreno i sur., 2005). Od ostalih estera čije su koncentracije iznad pragova detekcije izdvaja se etil butirat čiji miris podsjeća na bananu, jagodu i ananas s pragom detekcije od 0.02 mg/L (Bavčar i sur., 2011) kojeg je najviše zabilježeno 2011. godine kod klonskog kandidata VV-479 sa koncentracijom od 81.75  $\mu\text{g/L}$ , te 2012. godine kod klonskog kandidata VV-434 sa koncentracijom od 81.05  $\mu\text{g/L}$ . Etil kaproat i etil kaprilat spadaju u skupinu etil estera masnih kiselina. Između vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina utvrđene su signifikantne razlike u koncentraciji etil kaproata i etil kaprilata u obje istraživane godine. Koncentracije etil kaproata u 2011. godini kretale su se od 153.91  $\mu\text{g/L}$  (VV-406) do 503.85  $\mu\text{g/L}$  (VV-434). U 2012. godini koncentracije etil kaproata kretala se od 196.44  $\mu\text{g/L}$  (VV-360) do 595.63  $\mu\text{g/L}$  (VV-482).

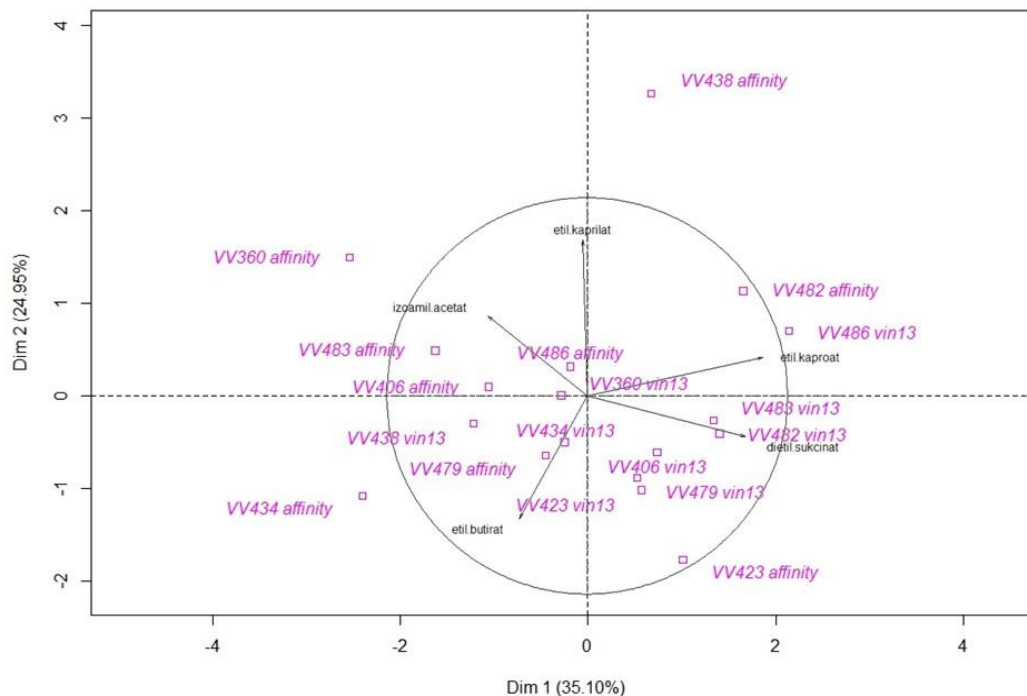
Temeljem dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti da soj kvasaca nema značajan utjecaj pri sintezi etil kaprilata te da u stvaranju ovog estera veću ulogu ima sastav mošta. Naime, uspoređujući dobivene rezultate nije uočena ponovljivost korištenih sojeva kvasaca tako 2011. godine nešto veće koncentracije etil kaproata uočene su u vinima klonskih kandidata inokuliranih sojem kvasaca Affinity, dok sljedeće, 2012. godine značajno veće koncentracije zabilježene su u vinima dobivenim sa sojem kvasca Vin13. Koncentracije etil kaprilata u 2011. godini kretale su se od 207.07  $\mu\text{g/L}$  (VV-482) do 625.32  $\mu\text{g/L}$  (VV-434). U 2012. godini koncentracija etil kaprilata kretale su se od 124.68  $\mu\text{g/L}$  (VV-423) do 271.6  $\mu\text{g/L}$  (VV-438). Dobiveni rezultati istraživanja pokazuju da koncentracije etil kaprilata nisu iznad senzornog praga detekcije u većini vina klonskih kandidata. Jedino klonski kandidati VV-434 i VV-438 u 2011. godini imaju koncentracije etil kaprilata iznad senzornog praga detekcije, dok u 2012. godini ni jedan klonski kandidat nema koncentracije iznad senzornog praga detekcije.



Grafikon 21. Analiza glavnih komponenata (PCA) prema analizi pojedinačnih analiziranih estera za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine

Na grafikonu 21. je prikaz distribucije vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2011. godine u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema sastavu pojedinačnih analiziranih estera, pri čemu

prva glavna komponenta objašnjava 30,79% ukupne varijabilnosti, a druga glavna komponenta 21,44% ukupne varijabilnosti uzoraka vina



Grafikon 22. Analiza glavnih komponentata (PCA) prema analizi pojedinačnih analiziranih estera za vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine

Na grafikonu 22. je prikaz distribucije vina klonskih kandidata kultivara Kraljevina berbe 2012. godine u dvodimenzijском koordinatnom sustavu definiranom glavnim komponentama (PC1 i PC2) prema sastavu pojedinačnih analiziranih estera, pri čemu prva glavna komponenta objašnjava 35,1% ukupne varijabilnosti, a druga glavna komponenta 24,95% ukupne varijabilnosti uzoraka vina. Rezultati analize glavnih komponentata pokazuju kako se sastav pojedinačnih estera značajno razlikuje između dvije godine. Razlika se primjećuje u korelacijama između varijabli, ali i u odnosu klonskih kandidata i korištenih sojeva kvasaca. U obje istraživane godine signifikantno veća suma estera utvrđena je kod vina dobivenih sa sojem kvasca Affinity i to najvećim dijelom zbog signifikantno veće koncentracije izoamil acetata koji je ujedno bio i najzastupljeniji ester. U 2011. godini najvećom sumom estera izdvojio se klonski kandidat VV-438 dobiven primjenom soja kvasca Affinity dok je u 2012. godini najveća koncentracija sume estera utvrđena kod vina klonskog kandidata VV-360 dobivenog također primjenom soja kvasca Affinity.

### 4.3. Senzorna analiza vina

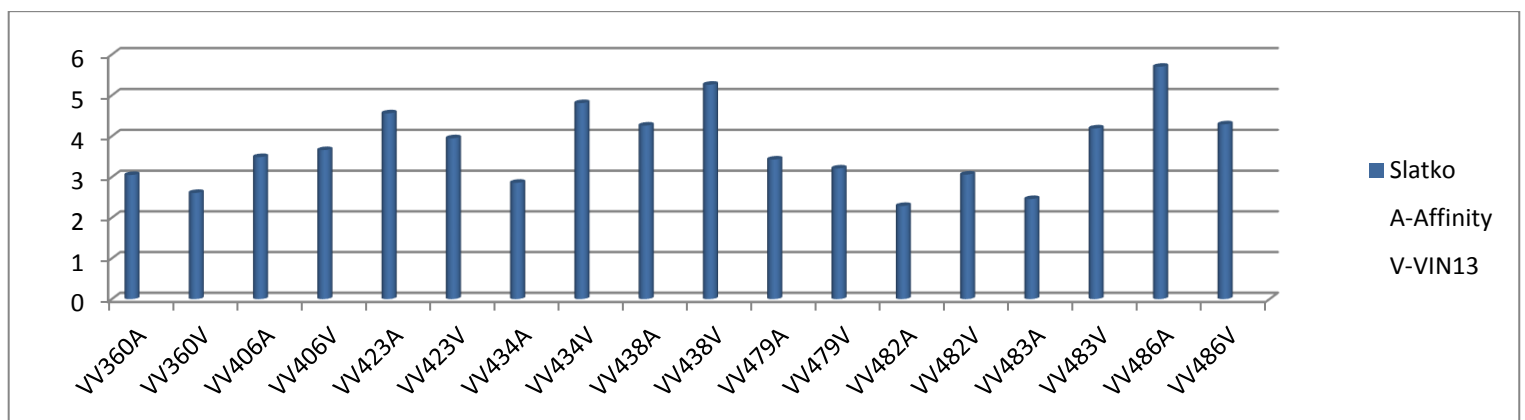
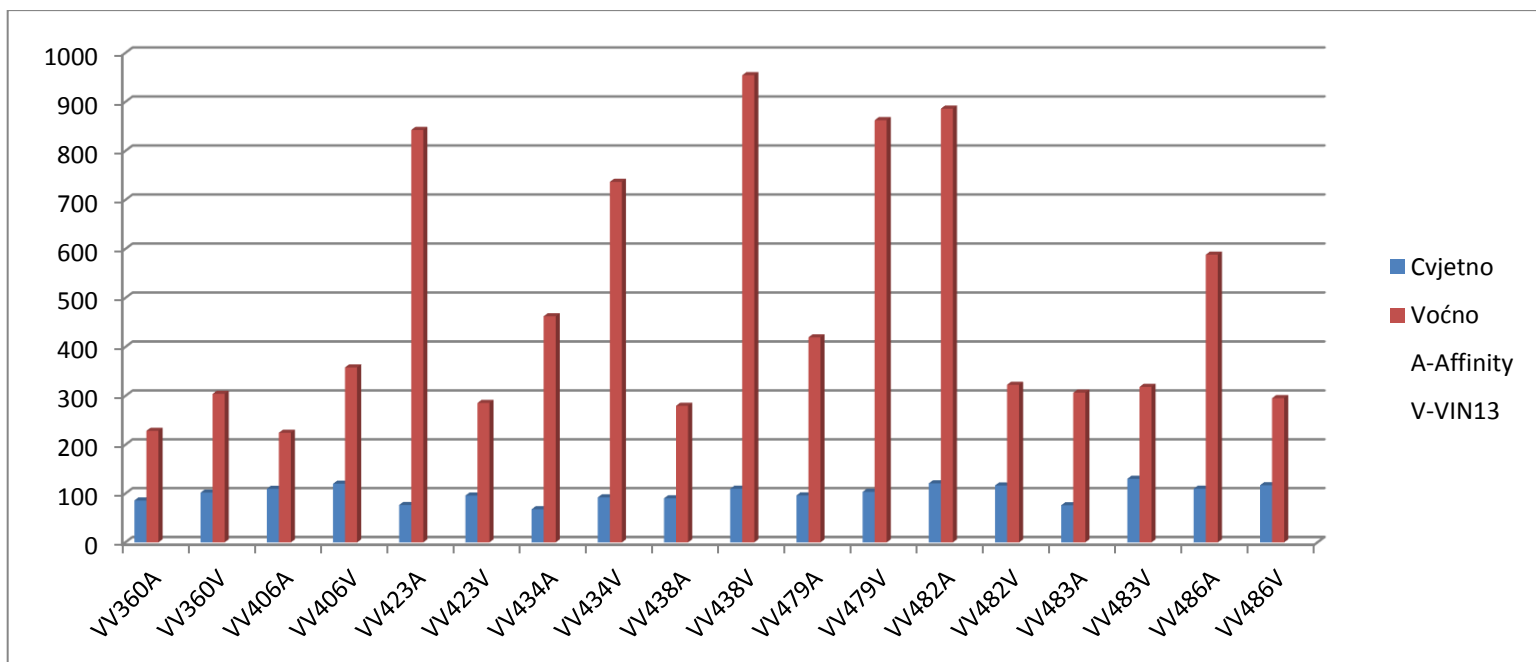
Senzorno ocjenjivanje vina provedeno je metodom 100 pozitivnih bodova (O.I.V.). U ocjenjivanju je sudjelovalo osam iskusnih ocjenjivača i dobrih poznavatelja vina kultivara Kraljevina, a dobiveni rezultati, aritmetičke vrijednosti njihovih ocjena prikazane su u tablici 27. Ocjenjivanje vina berbe 2011. i 2012. godine provedeno je na znanstveno – nastavnom pokušalištu Jazbina, Agronomskog fakulteta šest mjeseci po završetku alkoholne fermentacije.

Tablica 27. Senzorna ocjena vina berbe 2011. i 2012. metodom 100 pozitivnih bodova (O.I.V.)

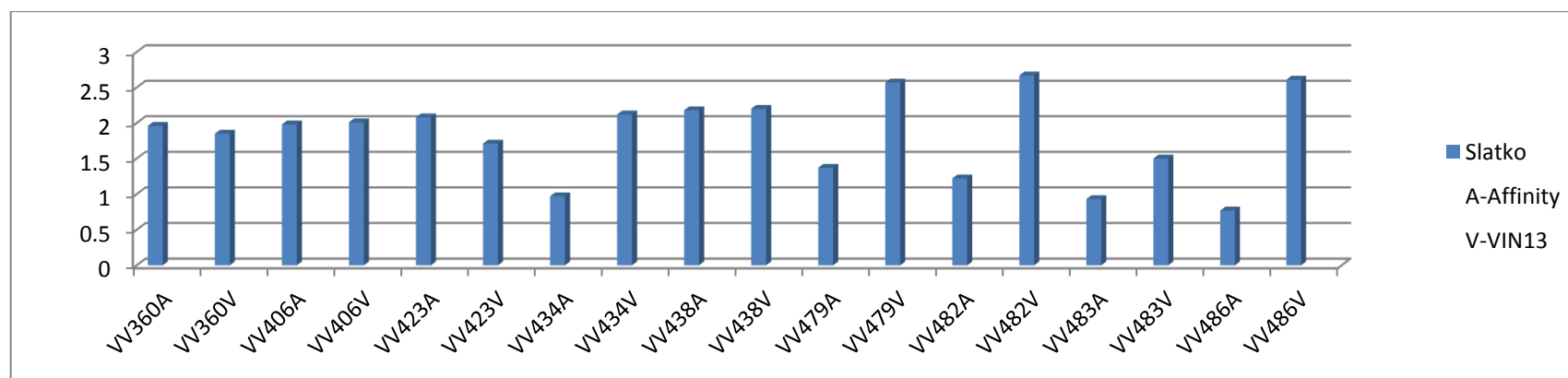
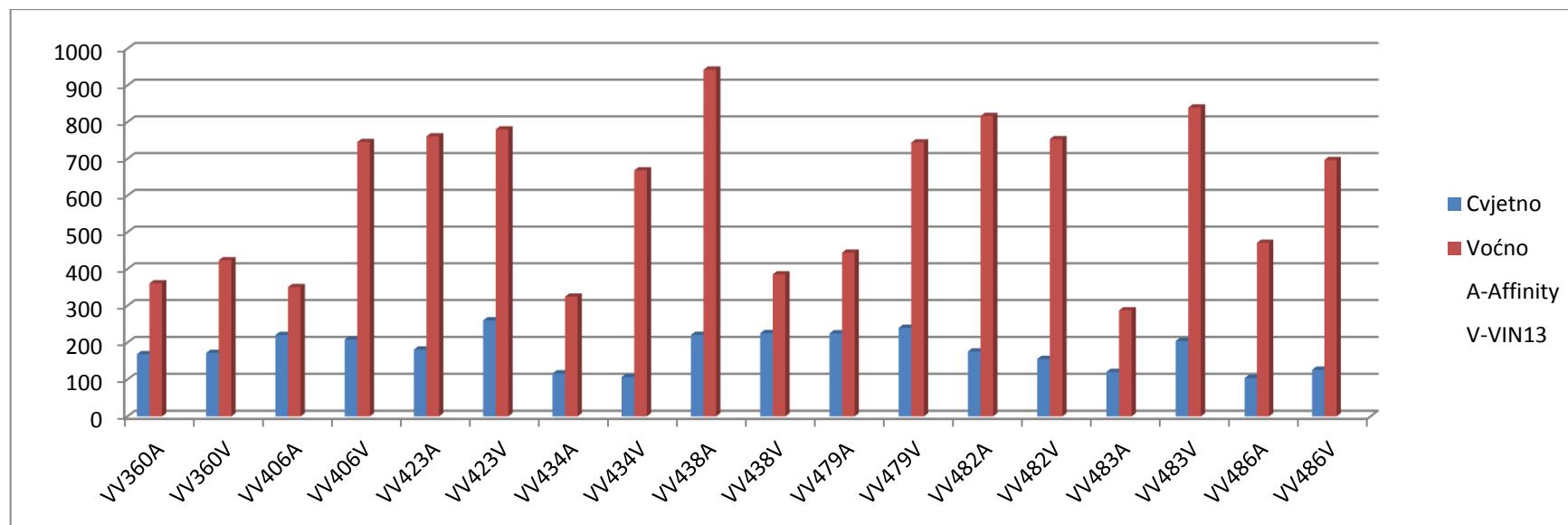
Klonski kandidat	Soj kvasca	Ocjena	
		2011	2012
VV-438	VIN13	79,6	81,6
	Affinity	76,4	79,1
VV-406	VIN13	80,2	79,3
	Affinity	80,8	79,8
VV-479	VIN13	78,2	79,8
	Affinity	76,8	76,8
VV-486	VIN13	80,8	78,3
	Affinity	79,8	77,8
VV-483	VIN13	78,2	80,5
	Affinity	77,6	79,1
VV-423	VIN13	75,0	78,3
	Affinity	77,4	78,4
VV-360	VIN13	80,4	80,3
	Affinity	79,8	79,8
VV-434	VIN13	78,0	79,3
	Affinity	76,4	78,3
VV-482	VIN13	82,4	79,6
	Affinity	77,6	78,6

Dobiveni rezultati senzornog ocjenjivanja ukazuju na razlike u kakvoći dobivenih vina Kraljevine zavisno od klonskog kandidata, korištenog soja kvasca, ali i godine. Tako se je kao najbolje ocijenjeno vino 2011. godine izdvojilo ono dobiveno alkoholnom fermentacijom grožđa klonskog kandidata VV-482 sa visokih 82.4 bodova, pri čemu je korišten soj kvasca Vin13, dok je 2012. godine najbolje ocijenjeno vino dobiveno od grožđa klonskog kandidata VV-438 sa 81.6 bodova, a fermentacija je također provedena sojem kvasca Vin13. Komercijalni sojevi kvasaca različito su utjecali na kakvoću vina pri čemu su vina dobivena s kvascem Anchor Vin13 imala općenito bolja organoleptična svojstva u obje godine istraživanja u odnosu na ona fermentirana sa Uvaferm Affinity. S ciljem procjene utjecaja analiziranih aromatskih spojeva na senzorna svojstva vina izračunan je OAV (odor activ value) koji se dobiva dijeljenjem koncentracije pojedinog spoja sa njegovom pragom percepcije. Samo spojevi sa vrijednošću OAV veći od 1 zasebno pridonose aromi vina (Güth, 1997). Međutim i pojedini spojevi čiji je OAV manji od 1 mogu doprinjeti kompleksnosti arome zahvaljujući sinergističkom djelovanju (Francis i sur. 2005). U slučaju klonskih kandidata kultivara Kraljevina aromatski spojevi sa OAV većim od 1 bili su *trans*-ruža-oksidi, *cis*-ruža-oksidi, linalol,  $\beta$ -damaskenon,  $\alpha$ -ionon,  $\beta$ -ionon, izoamilni acetat, etil kaprilat, etil butirat i etil kaprat. Grupiranjem izdvojenih OAV spojeva sličnih svojstava (opisnih deskriptora) tj. zbrajanjem njihovih vrijednosti dobivamo tzv. aromatske serije. S obzirom na izdvojene spojeve u ovom radu te prema literaturnim navodima (Genovese i sur. 2013) formirane aromatske serije za vina klonskih kandidata Kraljevine bile su cvjetno, voćno i slatko. Na grafikonu 23. i 24. prikazana je različitost u njihovom intenzitetu zavisno od klonskog kandidata te korištenog soja kvasca. U obje godine istraživanja bila je dominantna voćna struktura mirisa i to posebice kod vina dobivenih primjenom soja kvasca Affinity. Među klonskim kandidatima izdvojili su se VV-438, VV-479, VV-482 i VV-486 koji su ujedno imali i nešto naglašeniji miris na slatko. Općenito najmanje razlike utvrđene su u intenzitetu cvjetnih mirisa. Usporedivši dobivene vrijednosti sa rezultatima ocjenjivanja vina metodom 100 bodova vidimo da najbolje ocijenjena vina i to klonskog kandidata VV-482 dobivenog sojem kvasca Vin13 u 2011. i VV-483 dobivenog također sojem kvasca Vin13 u 2012. godini se nisu posebno izdvojila po aromama voćnog i slatkog u odnosu na druge kandidate. Razlog te nedosljednosti može biti i u činjenici da je kemijska analiza provedena odmah po završetku alkoholne fermentacije dok su vina senzorno kušana nekoliko mjeseci kasnije pri čemu je moglo doći do promjena u aromatskom profilu, posebice kada znamo da se radi o mikroviniifikacijama.





Grafikon 23: Prikaz aromatskih serija vina klonskih kandidata Kraljevine berbe 2011. godine



Grafikon 24: Prikaz aromatskih serija vina klonskih kandidata Kraljevine berbe 2012. godine

## 5.RASPRAVA

### 5.1. Osnovni kemijski sastav mošta i vina

Dobiveni rezultati istraživanja ukazali su na opravdanost klonske selekcije kultivara Kraljevina pri čemu je potvrđena njihova značajna različitost zavisno od mogućnosti nakupljanja šećera, ukupne kiselosti kao i aminokiselinskog profila te sastava pojedinačnih organskih kiselina. Kao što navode davne 1950. Sušević te 1973. godine Felja unutar Kraljevine izražena je varijabilnost koja upućuje na potrebu selekcije. Po rezultatima stvorenog šećera u obje istraživane godine izdvojio se klonski kandidat VV-360 koji po postignutim koncentracijama nije u skladu sa dosadašnjim literaturnim navodima (Mirošević, 2003, Jeromel, 2005) koji govore o skromnim mogućnostima kultivara Kraljevine za nakupljanjem šećera. Kako osnovne parametre kakvoće vina ne čini samo potencijalni alkohol važno je naglasiti i razlike u ukupnoj kiselosti te pH vrijednosti između klonskih kandidata. U trenutku berbe grožđa vrijednosti pH koje osiguravaju mikrobiološku i kemijsku stabilnost moštova trebale bi se kretati između 3.1-3.2., a upravo su to vrijednosti pH utvrđene kod svih istraživanih klonskih kandidata. Realna kiselost ili pH vrijednost ima veliki utjecaj na kvalitetu vina, kao i na niz biokemijskih i fizikalno-kemijskih procesa tijekom dozrijevanja i starenja vina. Vina sa nižim vrijednostima pH su kiselijeg i svježijeg okusa, lakše se čuvaju i mikrobiološki su stabilnija. Tako u grupi klonskih kandidata sa višim sadržajem vinske kiseline možemo izdvojiti VV-483, VV-482 i VV-423 dok se višim sadržajem jabučne kiseline nametnuo klonski kandidat VV-434 koji je zajedno sa klonskim kandidatima VV-479 i VV-486 u obje godine imao i niži pH što može biti interesantna spoznaja s gledišta tehnologije proizvodnje pjenušavih vina. Suprotno njima već spomenuti klonski kandidat VV-360 pokazao je nešto manju sklonost ka nakupljanju pojedinačnih organskih kiselina što je vidljivo kroz niže koncentracije kako vinske tako i jabučne kiseline, a što je potvrđeno i najmanje zabilježenom ukupnom kiselošću u obje godine istraživanja. Ostali klonski kandidati nisu se temeljem analize osnovnog fizikalno-kemijskog sastava mošta posebno izdvojili izuzev klonskog kandidata VV-438 koji je pokazao sposobnost nakupljanja nešto većih koncentracija polifenolnih spojeva što je vidljivo kroz najveću koncentraciju ukupnih fenola u obje istraživane godine, a što je potvrđeno i kasnijom analizom dobivenih vina koja su kod navedenog klonskog kandidata bila bogatija galnom kiselinom. Jakobović (2012) u svojem istraživanju navodi koncentracije ukupnih fenola u moštovima redovne berbe Rajnskog rizlinga u rasponu od 394 do 482 mg/L što je puno više od rezultata ovog

istraživanja, dok Mozetič i sur., (2006) u moštu bijelog kultivara Rebule navode koncentraciju ukupnih fenola koja je iznosila 118.6 mg/L. Prema Jagatić Korenika (2015) koncentracije ukupnih fenola kod udomaćenih bijelih kultivara kretala se od 163.15 do 483.3 mg/L dok je kod kultivara Kraljevina ta vrijednost iznosila 189.04 mg/L. Naši rezultati u skladu su sa navedenim vrijednostima s time da je općenito veća koncentracija utvrđena u 2011. godini u kojoj je utvrđena i veća različitost među ispitivanim klonskim kandidatima uvjetovana najvjerojatnije nešto kasnijim rokom berbe. U moštu sa sadržajem asimilacijskog dušik (YAN) manjim od 140 mg N/L može doći do problema u fermentaciji i to zbog nedostatnog rasta kvasaca te slabe fermentativne aktivnosti dok sastav iznad 400 mg N/L dovodi do povećanja biomase i rasta kvasca, te nesmetanog odvijanje procesa fermentacije (Henschke i Jiranek, 1993; Zoecklein i sur., 1999; Bell i Henschke, 2005). Dobiveni rezultat FAN-a ukazuju da su vrijednosti sadržaja slobodnog amino dušika kod svih klonskih kandidata niže od onih koje se navode kao optimalne za nesmetano odvijanje procesa fermentacije, a kreću se od 67,42 mg N/L (VV-406) do 144,21 (VV-360) 2011. godine, te 2012. godine od 56,24 (VV-486) do 119,095 (VV-434) mg N/L. U 2011. godini svi klonski kandidati imali su veće koncentracije slobodnih aminokiselina nego 2012. godine. To ukazuje na povezanost koncentracije aminokiselina i agrotehničkih zahvata u vinogradu. Pretpostavka je da je nedostatak gnojidbe te niži sadržaja dušičnih tvari u tlu uvjetovao slabiju sintezu aminokiselina u grožđu što nam potvrđuje i rezultati gnojidbenog pokusa koje je na tri pokusna kultivara proveo Karoglan (2009). Razlike u osnovnom kemijskom sastavu vina klonskih kandidata u skladu su sa razlikama utvrđenim u korištenom moštu. Tako je u vinima klonskog kandidata VV-434 u obje istraživane godine utvrđena najveća koncentracija jabučne kiseline, a koncentracija vinske kiseline bila je značajno veća u vinima klonskih kandidata VV-483, VV-482 i VV-486. Od ostalih osnovnih parametara kakvoće vina važno je izdvojiti različitosti u koncentracijama jantarne kiseline čija je sinteza direktno vezana uz alkoholnu fermentaciju. Jantarna kiselina se može sintetizirati i iz šećera i iz aminokiselina radom kvasaca ovisno o uvjetima rasta i slobodnom izvoru dušika, a njezina direktna sinteza ovisna je o reakcijama unutar TCA ciklusa (De Klerk, 2010). Mnogi autori navode da jantarna kiselina nastaje tijekom fermentacije metabolizmom kvasaca, te da određeni sojevi kvasaca tijekom fermentacije mogu stvoriti i više od 1.0 g/L jantarne kiseline (Margalit, 1997; Boulton i sur., 2009). U ovom istraživanju temperatura fermentacije bila je jednaka za sva vina, međutim postoje razlike u aminokiselinskom profilu, te sadržaju dušika u moštovima, a pretpostavka je da je na sintezu jantarne kiseline utjecao i soj kvasaca. Tako je u 2011. godini značajno veća koncentracija utvrđena u vinima dobivenim fermentacijom sa sojem kvasca Vin13 dok u 2012. godini razlika je također postojala ali nije bila signifikantna. Pepeo u vinu čine mineralni spojevi koji su dospjeli u vino iz čvrstih dijelova grožđa, a

potječu iz tla. Koncentracije u vinu variraju u rasponu od 1.5 – 3 g/L (Ribéreau – Gayon, 2006b). S obzirom da se bijela vina često dobivaju bez procesa maceracije, uglavnom sadrže relativno niže koncentracije pepela u vinu u odnosu na crna. Količina mineralnih tvari u vinu, a posebno njihov sastav, pod utjecajem su prije svega karakteristika zemljišta na kojem se uzgaja vinova loza i vremenskih uvjeta u godini sazrijevanja grožđa. Možemo pretpostaviti da je nedostatak agrotehničkih zahvata prvenstveno gnojidbe te nešto manja količina oborina u periodu dozrijevanja grožđa utjecala na općenito nešto niže vrijednosti pepela u vinima klonskih kandidata u 2012. godini koje su usprkos tome u svim uzorcima bile iznad 1.4 g/L s izuzetkom vina klonskog kandidata VV-482 koji se u obje godine izdvojio značajno najmanjom koncentracijom pepela. Prema Pravilniku o vinu kvalitetno vino u prometu mora sadržavati minimalnu količina od 17 g/L ekstrakta bez šećera, te 1.4 g/L pepela u vinu (Pravilnik o proizvodnji vina NN 02/2005) što prema dobivenim rezultatima ekstrakta bez šećera ne bi zadovoljila velika većina vina ispitivanih klonskih kandidata. Tako temeljem dobivenih rezultata možemo izdvojiti klonske kandidate VV-360, VV-434 i VV-438 koji su u 2011. godini zadovoljili navedene kriterije. No, s obzirom na činjenicu da je kod svih klonskih kandidata sadržaj pepela bio relativno visok možemo pretpostaviti da jedan od razloga nižih vrijednosti ekstrakta bez šećera, posebice u 2012. godini i sami postupak proizvodnje dobivenih vina tj. problem mikroviniifikacije samih uzorka.

## 5.2. Aminokiseline mošta i vina

Ukupno je izdvojeno 20 najčešćih aminokiselina pronađenih u grožđu i moštu i one predstavljaju 28 – 39% ukupnog dušika ovisno radi li se o moštu bijeloga ili crnog grožđa (Rapp i Versini, 1996). Koncentracije aminokiselina u moštu variraju između 170-4000 mg/L , dok u vinima variraju između 3-4000 mg/L (Carnevallier i sur., 2000; Ribéreau-Gayon i sur., 2006b; Boulton i sur., 2009) što prvenstveno ovisi o kultivaru, podlozi, kultivaciji, gnojidbi, vremenu berbe, regiji uzgoja, klimatskim prilikama, te načinu prerade grožđa. Kod istraživanih klonskih kandidata ukupne koncentracije aminokiselina u moštu bile su u skladu sa literaturnim podacima pri čemu su se u obje godine sa najvećim prosjecima nametnuli klonski kandidati VV-360 (1180.19 i 723.90 mg/L) te VV-434 (1024.86 i 828.15 mg/L), sa vrijednostima koje su također u pozitivnoj vezi sa vrijednostima FAN-a koje su također bile najveće upravo kod navedenih klonskih kandidata. Prema Bouzas-Cid i sur. (2015) na razlike u koncentracijama aminokiselina značajan utjecaj imaju klimatske prilike pri čemu su njihovi rezultati ukazali da sušnije i

toplije godine uvjetuju veći ukupni sadržaj aminokiselina što potvrđuju i istraživanja Ortega-Heras i sur. (2014). U našem istraživanju to nije bio slučaj s obzirom da je veća koncentracija aminokiselina utvrđena upravo u nešto hladnijoj i vlažnijoj 2011 godini. Najzastupljenije aminokiseline u moštu i vinu su prolin i arginin koje predstavljaju 21% do 55% ukupnog dušika (Huang i Ough, 1989; Sponholz, 1991; Spayd i Andersen – Bagge, 1996; Stines i sur., 2000; Soufleros i sur., 2003; Herbert i sur., 2005), a slijede ih alanin, asparagin, asparaginska kiselina, glutamat, glutaminska kiselina, serin, treonin. Kod svih ispitivanih klonskih kandidata kultivara Kraljevina najzastupljenija aminokiselina bila je arginin za kojom slijede alanin, asparagin, lizin, glutamat i serin. U obje istraživane godine najmanje zastupljene bile su aminokiseline valin, izoleucin i fenil alanin. Nadalje, aminokiselinski profil grožđa određivan je diljem vinogradarsko-vinarskog svijeta (Huang i Ough, 1991; Kliewer, 1970; Ough i Bell, 1980; Sponholz, 1991), te je ustanovljeno da njihov sastav varira ovisno o kultivaru i vinogradarskoj regiji. Dobiveni rezultati u skladu su sa navedenim literaturnim navodima pri čemu su utvrđene razlike u aminokiselinskom sastavu izdvojile tri klonska kandidata i to VV-360, VV-482 i VV-434 i to u obje istraživane godine na temelju većeg sadržaj arginina, glicina ali i histidina. Prema istraživanju Bell i sur. (1979), ukupan udio dušika u moštu kao i relativan udio pojedinih dušičnih spojeva utječu na rast kvasaca, brzinu i tijek fermentacije, formiranje spojeva fermentacije te na organoleptička svojstva vina. Arginin je kvantitativno najvažnija aminokiselina koju kvasac koristi iz grožđa (Boulton i sur., 2009), te ju po završetku alkoholne fermentacije uslijed autolize kvašćevih stanica oslobađa nazad u medij (Fugelsang i Edwards, 2007). To potvrđuju i naši rezultati gdje je u vinima svih klonskih kandidata i po završetku alkoholne fermentacije upravo ona bila najzastupljenija. Jiranek i sur. (1995a) ustanovili su da kvasci najviše koriste arginin, serin, glutamat, treonin, asparagin i lizin, te da sojevi kvasaca pokazuju i razliku s obzirom na aminokiseline koje koriste, ali i s obzirom na količinu potrošenog dušika uopće. Upravo iz tog razloga različiti sojevi mogu pokazati različitu efikasnost u trenutku kada izvor dušika postane ograničen. S obzirom na korištena dva soja kvasca u našem istraživanju dobiveni rezultati u skladu su sa dosadašnjim podacima pri čemu je utvrđen signifikantan utjecaj kvasca u obje istraživane godine i to kod svih analiziranih aminokiselina s izuzetkom fenil alanina u obje godine te serina u 2012 godini. Tako su vina klonskih kandidata dobivena primjenom soja kvasca Affinity imala veće koncentracije glutamata, arginina, alanina i metionina dok su vina dobivena korištenjem soja kvasca Vin13 imala više asparagina, histidina, glicina, tirozina i valina. Promatrajući pojedinačno klonske kandidate i koncentracije aminokiselina ponovno se izdvojio klonski kandidat VV-360 pri čemu je u 2011. godini veći utjecaj na formirani aminokiselinski profil imao soj kvasca Vin13 dok je u 2012. godini to bio soj kvasca Affinity. Najmanji utjecaj korištenog soja kvasca utvrđen je u proizvodnji vina od klonskog kandidata VV-479 kod

kojega u obje istraživane godine nije utvrđena razlika u koncentracijama većine aminokiselina. Općenito gledajući najmanje razlike s obzirom na koncentracije utvrđene su kod aminokiseline tirozin koju su kvasci jednakomjerno iskoristili. Interesantna je i spoznaja da su veće koncentracije aminokiseline metionin u 2011. godini utvrđene u većini vina klonskih kandidata dobivenih primjenom soja kvasca Vin13 dok je u 2012. godini veća koncentracija utvrđena u vinima klonskih kandidata dobivenih primjenom soja kvasca Affinity. Razlog tome može biti izraženija potreba soja kvasca Affinity za sintezom pojedinih aminokiselina u 2012. godini koja je općenito bila siromašnija aminokiselinama što je kasnije dovelo i do većeg oslobađanja aminokiseline metionin ali i cistein vino.

### 5.3. Polifenolni sastav vina

Polifenolni spojevi važni su čimbenici kakvoće vina najvećim dijelom smješteni u kožici te sjemenci bobice. Kultivar, godina proizvodnje, okolinski i klimatski uvjeti, bolesti loze, tip tla, geografski položaj i stupanj zrelosti utječu na koncentraciju polifenola u grožđu (Orduña, 2010; Cejudo-Bastante i sur., 2011). Koncentracije polifenolnih spojeva bijelog grožđe i vina se kreću od 50-350 mg/L u grožđu i 800 do 4 000 mg/ L u vinu (Margalit, 1997; Cheynier i sur., 1998). Kao što je već navedeno u moštovima klonskih kandidata kultivara Kraljevina koncentracija ukupnih fenola bila je relativno niska, a taj trend nastavio se i u dobivenim vinima. Jagatić Korenika (2015) u svojim rezultatima navodi koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina od 14.87 do 18.79 mg/L što je u usporedbi sa našim rezultatima i više nego dvostruko veća vrijednost ako ih usporedimo sa najvećom utvrđenom koncentracijom koja je zabilježena kod vina klonskog kandidata VV-479 (9.46-9.67 g/L) i to u obje istraživane godine. Prema Moreno-Arribas i Polo (2009) najzastupljenija hidroksicimetna kiselina je *trans*-kaftarna, s udjelom od 50% ukupnih hidroksicimetnih kiselina što je vidljivo i iz rezultata našeg istraživanja. Razlog tomu je činjenica da je *trans*-kaftarna uglavnom smještena u mesu bobice i tijekom prešanja se brzo oslobađa u mošt (Garrido i Borges, 2013). Kaftarna kiselina je dominantni spoj i u istraživanju bijelih vina različitih kultivara (Maslov, 2014) gdje se kretala u rasponu od 18.79 do 83.62 mg/L što je mnogo više nego u ovom istraživanju. Darias Martin i sur., (2008) navode koncentracije *trans*-kaftarne kiseline od 4.35 do 60.95 mg/L dok je najviša zabilježena koncentracija kod vina klonskih kandidata iznosila od 5.19 u 2011. do 7.72 mg/L u 2012 godini i to kod VV-479. Osim kaftarne kiseline spojevi koji su značajnije zastupljeni su tartaratni esteri p-kumarinske i ferulinske kiseline, te *trans*-p-kumaril glukozid (Somers i sur., 1987). Razine slobodnih hidroksicimetnih kiselina u grožđu su

vrlo niske, pri čemu se njihov sadržaj povećava dozrijevanjem vina odnosno hidrolizom tartaratnih estera (Andres-Lacueva i sur., 1996; Somers i sur., 1987). Izuzev već spomenute kaftarne kiseline koncentracije ostalih hidroksicimetnih kiselina i to kod svih klonskih kandidata u obje istraživane godine bile su niske. Postojanje značajne razlike u vrijednostima ukupnih flavanola između vina klonskih kandidata i godine objašnjava činjenica da njihova koncentracija i sastav ovise o mnogo čimbenika, kao što su kutivar, godina, ekološki uvjeti i rok berbe (Rodríguez Montealegre i sur., 2006; Moreno – Arribas i Polo, 2009). Tako su Kovačević Ganić i sur. (2005) uspoređujući tri različita roka berbe grožđa Malvazije istarske utvrdili da se koncentracije hidroksicimetnih kiselina, hidroksibenzojevih kiselina, monomera flavan-3-ola i ukupnih fenolnih spojeva tijekom dozrijevanja grožđa smanjuju tj. manje količine navedenih spojeva utvrđene su u moštu i vinu kasnijeg roka berbe. Prema Jagatić Korenika (2015) prosječne koncentracije ukupnih flavanola kretale su se od značajno najmanjih 4.01 mg/L kod vina kultivara Kraljevina do značajno najvećih 5.62 mg/L kod vina Škrlet što je u skladu sa ovim istraživanjem za 2011. godinu, dok su naše vrijednosti prosječne koncentracije za 2012. godinu značajno veće i iznosile su 15.01 mg/L u vinu klonskog kandidata VV-434. Ružić i sur. (2011) navode prosječne koncentracije epikatehina u nemaceriranim bijelim vinima od 4.77 mg/L što je u skladu sa našim istraživanjem u 2011. godini ali ne i u 2012. godini gdje su se vrijednosti epikatehina kretale od najmanje 6.33 pa do najviše 12.88 mg/L. Gürbüz i sur. (2007) navode koncentracije epikatehina od 0.5 – 11.77 mg/L u vinima bijelih kultivara. Koncentracije hidroksibenzojevih kiselina i njihovih derivata u vinu su obično male u usporedbi s hidroksicimetnim kiselinama, a ovise o kultivaru i uvjetima uzgoja (Moreno Arribas i Polo, 2009). Najznačajniji predstavnik ove grupe polifenola je galna kiselina (Garrido i Borges, 2013; Maslov, 2014) što dokazuju i rezultati ovog istraživanja. Statistički značajne razlike utvrđene su između klonskih kandidata unutar godine, ali i između dvije istraživane godine. Prosječna vrijednosti koncentracije galne kiseline, a time i ukupnih hidroksibenzojevih kiselina bile su značajno veće 2012. godine. Koncentracije galne kiseline u bijelim vinima, prema Maslov (2014), kretala se u rasponu od 1.77 do 7.01 mg/L što je puno više od rezultata ovog istraživanja. Darias – Martin i sur. (2008) navode koncentraciju za galnu kiselinu u rasponu od 0.97 do 1.64 mg/L kod bijelih kultivara. Jakobović (2012) u svom istraživanju navodi koncentracije galne kiseline kod kultivara Rajnski rizling od 7.19 do 12.23 mg/L, dok Komes i sur. (2007) za isti kultivar navodi koncentracije od 0.50 mg/L. Jagatić Korenika (2015) u svom istraživanju navodi najveću prosječnu koncentraciju galne kiseline kod vina Škrlet (2.39 mg/L), a najmanju kod vina Pošip (0.73 mg/L) dok je kod Kraljevine iznosila 1.25 mg/L. U našem istraživanju u 2011. vrijednosti galne kiseline i to kod vina svih klonskih kandidata bila je ispod 1 mg/L pri čemu nije utvrđena signifikantna različitost dok u 2012. godini najveća zabilježena



koncentracija iznosila je 1.81 mg/L što je u skladu sa rezultatima Jagatić Korenika (2015). Stilibeni su polifenolni spojevi prisutni u nekoliko vrsta roda *Vitis*, smješteni većinom u kožici a koji imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje obzirom na svoja antioksidativna, antikancerogena i antimutagena svojstva (Moreno-Arribas i Polo, 2009). U ovom istraživanju ne postoje značajne razlike u koncentraciji *trans* – resveratrola u vinima klonskih kandidata kultivara Kraljevina, a dobivene vrijednosti su u skladu s koncentracijama slobodnih *trans*- i *cis*- resveratrola od 0.1 – 0.8 mg/L u bijelim vinima prema Stecher i sur. (2001). Minussi i sur. (2003) navode koncentracije od 0.3-0.6 mg/L, dok je Jagatić Korenika (2015) u svom istraživanju zabilježila u vinima kultivara Kraljevina najveću prosječnu koncentraciju *trans* – resveratrola od 0.71 mg/L što je nešto veća vrijednost u odnosu na ovo istraživanje.

Općenito gledajući većina autora u svojim istraživanjima smatra povećanje udjela fenolnih spojeva u bijelim vinima pozitivnim trendom i to zbog njihovog djelovanja na antioksidacijsku aktivnost i ljudsko zdravlje (Gómez-Míguez i sur., 2007; Hernanz i sur., 2007; Makris i sur., 2003; Fuhrman i sur., 2001), ali ujedno ističe i kako ne treba zaboraviti činjenicu da povišena koncentracija fenolnih spojeva u bijelim vinima može smanjiti njihovu kakvoću uslijed povećanja gorčine, trpkocće te sklonosti oksidaciji i posmeđivanju.

#### 5.4. Aromatski spojevi u vinu

Terpeni su aromatski spojevi primarne ili sortne arome grožđa i vina, nosioci arome muškatinih kultivara. U grožđu te kasnije u moštu se nalaze u slobodnom, hlapivom obliku te vezani, bezmirisni, uglavnom kao glikozidni pekursori arome koji se tijekom prerade grožđa oslobađaju u vino. Međutim, važnu ulogu imaju i kod nearomatičnih kultivara zbog svojeg niskog praga senzorne detekcije (Vilanova i Sieiro, 2006). Iako je njihova koncentracija u grožđu i vinu od nearomatičnih kultivara relativno mala, često su predmet istraživanja (Reynolds i sur., 1993; Cabaroglu i sur., 1997; Selli i sur., 2006b; Peinado i sur., 2004; Rocha i sur., 2005; Cabrita i sur., 2006; Vilanova i Sieiro, 2006; Sanchez Palomo i sur., 2006; Rodriguez Bencomo i sur., 2008). I kod kultivara Kraljevina sadržaj aromatskih spojeva općenito te analiziranih pojedinačnih monoterpena bio je nizak, a utvrđene razlike unutar vina devet klonskih kandidata vrlo male. Obzirom da kultivar Kraljevina ne pripada skupini aromatičnih kultivara, potpuno je očekivano da se niti jedan klonski kandidat ni u jednoj istraživanoj godini nije izdvojio kao značajno različit u sadržaju terpenskih spojeva što potvrđuju i literaturni izvori kao Marais i Rapp (1991) te Versini i sur. (1990). Oni u svojim istraživanjima zaključuju da je moguće opravdano razlikovati

klonove temeljem njihovog sadržaja terpena kod aromatičnih kultivara dok kod manje aromatičnih kultivara nisu dokazali statistički opravdanu razliku između klonova temeljem sadržaja terpenskih spojeva. Međutim, ponekad je i kod aromatičnih kultivara teško utvrditi međuklonske razlike temeljem koncentracije slobodnih terpena što je vidljivo iz istraživanja McCarthy (1992) koji je u grožđu 10 klonova kultivara Muškat bijeli utvrdio da nema opravdane razlike u koncentraciji slobodnih terpena između klonskih kandidata. Gómez-Plaza i sur., (2000) ispitivali su razlike u sadržaju aromatskih spojeva u vinu sedam klonova sorte Monastrell. Temeljem signifikantnih razlika kod nekoliko aromatskih komponenti uspjeli su grupirati klonove primjenom diskriminantne analize, što opet pokazuje kako je moguće na temelju aromatskih spojeva utvrditi unutarsortnu varijabilnost i kod aromatski neutralnih sorata. Temeljem rezultata naših istraživanja značajna različitost među ispitivanim klonskim kandidatima postojala je u 2011. godini koja je ujedno bila i „bogatija“ pojedinačnim monoterpenima što se je očitovalo i u većoj koncentraciji pojedinačnih te ukupnih monoterpena, dok u 2012. godini su razlike postojale ali nisu bile značajne. Općenito gledajući dobivene vrijednosti monoterpena u usporedbi sa literaturnim podacima (Radeka i sur. 2008, Ribéreau-Gayon i sur. 2006b) vrlo su male. Međutim mogu se usporediti sa rezultatima Vilanova i sur. (2013) koji su u vinima Pinota bijelog utvrdili koncentracije nerola od 1.02 µg/L, dok su se vrijednosti citronelola kretale od tragova. kod Pinota bijelog do 2.46 µg/L kod Rizlinga rajnskog. Kao dva najzastupljenija spoja i to kod svih klonskih kandidata u obje istraživane godine izdvojili su se linalol i citronelol dok je prisutnost *trans* i *cis* ruža oksida i to u obje godine utvrđeno jedino kod vina klonskih kandidata VV-483, VV-486 i VV-438. U 2012. godini njima se pridružio i klonski kandidat VV-360. Važno je za istaknuti da su vrijednosti navedenih oksida koje su se kretale od 1.11 do 2.35 µg/L za *trans* i 0.86 do 4.83 za *cis* oblik bile iznad praga detekcije te samim time uz sinergističko djelovanje ostalih monoterpena pozitivno utjecali na aromu vina klonskih kandidata. Značajan utjecaj na koncentraciju monoterpena u obje godine imao je i korišteni soj kvasca pri čemu su vina dobivena korištenjem soja kvasca Vin13 u obje godine istraživanja bila bogatija geraniolom, linalolom, nerolom, te geranijskom kiselinom dok su se vina svih klonskih kandidata dobivena korištenjem soja kvasca Affinity u obje godine istraživanja izdvojila većim koncentracijama α-terpineola. Razlike u koncentracijama pojedinih monoterpena i to linalola, citronelola te α-terpineola primjenom različitih sojeva kvasca dobili su u svom istraživanju i Patrignani i sur. (2016). Prema literaturnim navodima (Gerós i sur. 2012) *S. cerevisiae* sojevi kvasca razlikuju se u svojoj sposobnosti enzimatske redukcije primarno nerola i geraniola koji tijekom alkoholne fermentacije mogu preći u citronelol, linalol te α-terpineola čime možemo objasniti i utvrđene razlike u našem istraživanju. Veliki utjecaj na aromu grožđa i vina aromatskih sorata, osim monoterpena imaju i norizoprenoidi (Strauss

i sur., 1987; Winterhalter i sur., 1990b; Schneider i sur., 2001). Najzastupljeniji norizoprenoidi u grožđu i vinu su  $\beta$ -ionon i  $\beta$ -damaskenon (Botelho, 2008) koji su uz  $\alpha$ -ionon detektirani i u ovom istraživanju. Općenito gledajući više norizoprenoida utvrđeno je u vinima svih klonskih kandidata iz 2012. godine što je primarno uvjetovala veća koncentracija  $\beta$ -damaskenon. Među klonskim kandidatima utvrđena je značajna različitost u koncentracijama predstavnika norizoprenoida s time da se je u 2011. godini izdvojio klonski kandidat VV-482 a odmah ga slijede klonski kandidati VV-479 i VV-406 dok u 2012. godini od navedenih se višim koncentracijama norizoprenoida ponovno se izdvojio jedino VV-479 a uz njega VV-438 i VV-423. I u slučaju ove grupe aromatskih spojeva soj kvasca pokazao je značajan utjecaj pri čemu su vina dobivena sa sojem kvasca Vin13 bila bogatija  $\beta$ -damaskenonom i  $\alpha$ -iononom.

Viši alkoholi i esteri glavi su predstavnici fermentacijske arome vina pri čemu na njihovu sintezu ima utjecaj veliki broj čimbenika, od sastava mošta, temperature fermentacije, soja kvasca pa sve do uvjeta dozrijevanja. U našem istraživanju temeljem dobivenih rezultata u obje godine najvećom sumom izdvojila su se vina klonskog kandidata VV-486, te za njim VV-406, primarno zahvaljujući većoj koncentraciji 2-fenil alkohola dok u koncentracijama 2-heksanala i 1-heksanola razlike nisu bile toliko značajne. Kao što je bilo i za očekivati značajna razlika utvrđena je između korištenih sojeva kvasca s time da su se u obje godine većim koncentracijama stvorenog 2-fenil etanola nametnula vina dobivena sojem kvasca Affinity. Viši alkoholi nastaju tijekom alkoholne fermentacije i to razgradnjom šećera te aminokiselina pri čemu se kao prekursor u sintezi 2-fenil etanola navodi aminokiselina fenilalanin (Ribéreau-Gayon i sur. 2006a). Rezultati našeg istraživanja ne ukazuju na postojanje korelacije između ta dva spoja, naprotiv navedene više koncentracije 2-fenil etanola utvrđene su u vinima čiji moštovi nisu bili prebogati fenilalaninom. Uspoređujući dobivene koncentracije 2-fenil etanola u vinima svih klonskih kandidata sa literaturnim podacima (Ribéreau-Gayon i sur. 2006a) koji navode vrijednosti od 10 -100 mg/L ili prema Vilanova i sur. (2013) gdje su se one kretale od 8.6 mg/L kod Pinota bijelog do 18.6 mg/L kod Chardonnaya, možemo zaključiti da su one bile izuzetno niske, a isto to vrijedi i za ostala dva analizirana C6 spoja. Hlapivi esteri čine važnu skupinu spojeva najvećim dijelom formiranu tijekom alkoholne fermentacije čija prisutnost značajno utječe na intezitet voćnih aroma u vinu (Vararu i sur. 2016). Kao i na ostale spojeve koji čine fermentacijsku aromu i na njihovu sintezu najveći utjecaj imaju korišteni kvasci kao i ostali vanjski čimbenici: temperatura, dostupnost hraniva, pH, razina kisika, prisutnost nezasićenih masnih kiselina i sterola (Lilly i sur. 2006). Dobiveni rezultati kao najzastupljeniji ester i to u obje godine i kod vina svih klonskih kandidata izdvojio su izoamilni acetat što je i u skladu sa literaturnim navodima (Ribéreau-Gayon i sur. 2006a) koji ističe njegov pozitivan doprinos aromom koja podsjeća na bananu. U 2011. godini

značajno najveća koncentracija utvrđena je kod vina klonskog kandidata VV-438 dok je u 2012. godini to bilo vino klonskog kandidata VV-360. Među etil esterima masnih kiselina najznačajniji su etil kaproat, kaprilat i kaprat koji također su nosioci voćnih nota u vinu a čije koncentracije se kreću od 0.03 pa sve do 1.3 (etil kaproat) i 2.3 (etil kaprilat) mg/L (Belitz i sur. 2009). Koncentracijama stvorenog etil kaproata u obje godine izdvojila su se vina klonskog kandidata VV-438 te VV-482 dok su kod etil kaprilata najveće koncentracije utvrđene kod vina klonskih kandidata VV-486 i VV-438 u 2011. te VV-438 i VV-360 u 2012. godini. Kao što je bilo i za očekivati u obje godine utvrđen je značajan utjecaj kvasca na sintezu navedenih spojeva pri čemu je soj kvasca Vin13 u obje godine stvorio više etil butirata dok je na sintezu svih ostalih estera značajno veći utjecaj imao soj kvasca Affinity.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju dvogodišnjeg istraživanja mošta i vina 9 klonskih kandidata kultivara Kraljevina utvrđeno je postojanje razlika koje su varirale zavisno od klonskog kandidata ali i korištenog soja kvasca što je u konačnici rezultiralo i posebnostima senzornih svojstava dobivenih vina.

Ispitivani klonski kandidati su odabrani na temelju pozitivnih ampelografskih karakteristika koje su bile stabilne tijekom ispitivanog razdoblja, a po kojima su se jasno razlikovali od ostalih klonskih kandidata, tj. od prosjeka kultivara. Analiza osnovnog kemijskog sastava mošta među 9 klonskih kandidata korištenih u ovom istraživanju izdvojila je klonski kandidat VV-360 koji je imao značajno najveću koncentraciju šećera te najmanju ukupnu kiselost te se dodatno izdvojio višim vrijednostima slobodnog amino dušika i vrijednosti pH i to u obje istraživane godine. Uz njega značajno višim sadržajem šećera u odnosu na ostale kandidate izdvojio se i VV-482 koji je ujedno imao i nešto višu ukupnu kiselost. Najmanjim vrijednostima nakupljenog šećera i to u obje godine istraživanja izdvojio se kandidat VV-479.

Temeljem dobivenih koncentracija pojedinačnih organskih kiselina mošta klonski kandidat VV-360 u obje godine istraživanja izdvojio se najmanjim vrijednostima vinske kiseline dok su se značajno većim vrijednostima kako vinske tako i jabučne kiseline izdvojili kandidati oznake VV-483 i VV-482. Značajno najveću koncentraciju jabučne kiseline i to u obje godine istraživanja imao je klonski kandidat VV-434.

Po aminokiselinskom profilu istraživane klonske kandidate možemo svrstati u tri grupe i to VV-360 u kojem je dominantna aminokiselina arginin, VV-434 uz koji se veže glutaminska kiselina i to u obje godine istraživanja, te preostalih 7 klonskih kandidata u kojima se aminokiselinski profil nije značajno razlikovao. Navedena dva klonska kandidata razlikuju su se u odnosu na druge i značajno najvećim vrijednostima slobodnog amino dušika i to u obje istraživane godine.

U osnovnom fizikalno-kemijskom sastavu vina značajna različitost utvrđena je kod vrijednosti pepela pri čemu se je u obje godine istraživanja izdvojio klonski kandidat VV-360. Uz njega u 2011 godini značajno veći sadržaj pepela imala su i vina klonskih kandidata VV-434 i VV-483.

Trend kretanja pojedinačnih organskih kiselina nastavio se i u analiziranim vinima klonskih kandidata gdje je ponovno kod kandidata VV-360 utvrđena najmanja koncentracija vinske kiseline dok je klonski kandidat VV-434 imao značajno najveću vrijednost jabučne kiseline. Utjecaj ispitivanog soja kvasca, ali i proizvodne godine uočen je u sintezi jantarne kiseline gdje je u 2011. godini značajno veću koncentraciju jantarne kiseline sintetizirao soj Vin13 i to kod svih klonskih kandidata što međutim nije bio slučaj u 2012. godini kada dobivene vrijednosti nisu bile signifikantno različite.

Polifenolni profil dobivenih vina klonskih kandidata ukazao je na postojanje značajnih razlika u koncentracijama pojedinih grupa fenolnih spojeva. Tako je u obje godine istraživanja klonski kandidat VV-479 imao najviše hidroksicimetnih kiselina među kojima je bila najzastupljenija *trans*-kaftarna, klonski kandidat VV-438 najviše hidroksibenzojevih pri čemu je najzastupljenija bila galna kiselina dok se klonski kandidat VV-360 izdvojio značajno većim koncentracijama ukupnih flavanola i to posebice epikatehina.

Istraživani klonski kandidati razlikovali su se po aromatskom profilu pri čemu je također utvrđen i značajan utjecaj godine, ali i korištenog soja kvasca. Po sastavu primarnih aroma kao najzastupljenij monoterpen kod svih klonskih kandidata je bio linalol s time da se je po ukupnoj sumi monoterpena i to u obje godine istraživanja izdvojio klonski kandidat VV-438. On je uz to imao i najveći sadržaj estera i to posebice izoamil acetata. Dobiveni rezultati ukupne sume C13 norizoprenoida izdvojili su klonski kandidat VV-479 dok se je po sadržaju viših alkohola izdvojio klonski kandidat VV-486. Utjecaj soja kvasca bio je značajan u obje istraživane godine pri čemu je soj Vin13 stvorio veće koncentracije norizoprenoida i monoterpena dok je soj kvasca Affinity pozitivno utjecao na vrijednosti viših alkohola i estera.

Razlike u dobivenim rezultatima sastava vina 9 klonskih kandidata potvrdila je i provedena senzorna analiza vina pri čemu je u 2011. najbolje ocijenjeno vino klonskog kandidata VV-482 a u 2012. godini VV-438, oba dobivena korištenjem soja kvasca Vin13.

I na kraju rezultati provedenog istraživanja ukazuju na postojanje velike različitosti kako u kemijskom tako i u senzornom sastavu vina izdvojenih klonskih kandidat. te su ovakva istraživanja vrijedna i dobrodošla u postupku klonske selekcije. Na osnovi dosadašnjih spoznaja zaključujemo da bi daljnja istraživanja trebala obuhvatiti i specifičnosti vinogradarskog položaja, ampelotehnike, ali i tržišno dostupna enološka sredstva, koja dodatno potenciraju ekstrakciju polifenolnih i aromatskih spojeva. Time bi se stekao bolji

uvid u potencijal svakog klonskog kandidata, a sve s ciljem maksimalnog iskorištenja prirodnog potencijala kultivara u svrhu dobivanja visokokvalitetnih vina.

## POPIS LITERATURE

1. Adams, D. O. (2006). Phenolics and Ripening in Grape Berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:249-256.
2. Agenbach, W. A. A. (1977). A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. In *Proceedings of South African Society for Enology and Viticulture*, Cape Town.
3. Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3187-3195.
4. Amerine, M. A., Ough, C. S. (1980). *Methods for analysis of musts and wines*. John Wiley and Sons, New York, 794p.
5. Amerine, M. A., Roessler, E. B. (1983). *Wines, Their Sensory Evaluation*. Freeman, New York, 1604–1611.
6. Anderson, M. M., Smith, R. J., Williams, M. A., Wolpert, J. A. (2008). Viticultural evaluation of French and California Chardonnay clones grown for production of sparkling wine. *American journal of enology and viticulture*, 59(1), 73-77.
7. Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R. M., Buxadera, S., Torre-Bonat, M. C. (1996). Polyphenol content in sparkling wines (Cava) at different aging period. In J. Vercauteren, C. Ch`eze, M. C. Dumon, J. F. Weber (Eds.), *Polyphenols communications 96/XVIIIth International Conference on Polyphenols* (Vol. 2, pp. 305–306). Bordeaux: Secretariat du Groupe Polyphenols.
8. Anonymous 3. Pravilnik o stavljanju na tržište materijala za vegetativno umnažanje loze. NN 133/06, 67/10, 30/11, 77/13.
9. Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., Carnacini, A. (1999). Yeast influence on volatile composition of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1139–1144.
10. Aragon, P., Atienza, J., Climent, M. D. (1998). Influence of clarification, yeast type, and fermentation temperature on the organic acid and higher alcohols of Malvasia and Muscatel wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 49(2): 211-219.
11. Arias-Gil, M., Garde-Cerdan, T., Ancin-Azpilicueta, C. (2007). Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. *Food Chemistry*. 103: 1312-1318.
12. Arozarena, I., Ayestarán, B., Cantalejo, M. A., Navarro, M., Vera, M., Abril, I., Casp, A. (2002). Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- And low-quality vineyards over two years. *Eur. Food Res. Technol.* 214:303-309.
13. Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Langlois, D., Nicklaus, S., Chabanet, C., Etiévant, P. (2005). Perception of wine fruity and woody notes. Influence of perithreshold odorants. *Food Qual. Pref.* 16:504-510.
14. Babo, A. Frhr. von, Mach, E. (1883). *Handbuch des Weinbaues und der Kellerwirtschaft*. Erster Band: Weinbau, Berlin.
15. Babu, P. V. A., Liu, D. (2009). Flavonoids and cardiovascular health. In: Watson RR (ed), *Complementary and alternative therapies and the aging population*. Academic press, San Diego.
16. Baderschneider, B., Winterhalter, P. (2001). Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening



- for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2788–2798.
17. Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Journal of bioscience and bioengineering*, 108(2), 99-104.
  18. Barre, P., Bely, M., Sablayrolles, J. M. (1991). Automatic detection and correction of assimilable nitrogen deficiency during alcoholic fermentation under enological conditions. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine: Seattle, Washington, Usa 18-19 June 1991* (pp. 211-214). American Society for Enology and Viticulture, ASEV.
  19. Bartowsky, E. J., Pretorius, I. S. (2009). Microbial formation and modification of flavor and off-flavor compounds in wine. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. H. König et al. (eds.), pp. 209-231. Springer-Verlag, Berlin.
  20. Battistutta, F., Celotti, E., Zironi, R., Colugnati, G., Gottardo, L. (1996). Relationship between genotype and phenolic and aromatic fractions in cv. Chardonnay at grape harvest. *Acta Horticulturae*, 427, 241-250.
  21. Baumes, R. L., Bayonove, C. L., Barillere, J. M., Samson, A., Cordonnier, R. E. (1989). La macération pelliculaire dans la vinification en blanc. Incidence sur la composante volatile des vins. *Vitis*, 28, 31-48.
  22. Baumes, R., Wirth, J., Bureau, S., Gunata, Y., Razungles, A. (2002). Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: Experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Anal. Chim. Acta* 458:3-14.
  23. Bavaresco, L., Petegolli, D., Cantu, E., Fregoni, M., Chiusa, G., Trevisan, M. (1997). Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 36, 77-83.
  24. Bavčar, D., Baša Češnik, H., Vanzo, A., Gašperlin, L., Košmerl, T. (2011): Impact of Alternative Skin Contact Procedures on the Aroma Composition of White Wine, *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 32, No. 2, 190-203
  25. Belancic, A., Agosin, E., Ibacache, A., Bordeu, E., Baumes, R., Razungles, A., Bayonove, C. (1997). Influence of sun exposure on the aromatic composition of Chilean Muscat grape cultivars Moscatel de Alejandria and Moscatel rosada. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(2), 181-186.
  26. Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*, 4th revised and extended edn. Berlin (DE): Springer.
  27. Bell, A. A., Ough, C. S., Kliewer, W. M. (1979). Effects on must and wine composition, rates of fermentation and wine quality of nitrogen fertilization *Vitis vinifera* var. Thompson Seedless grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 30 (2):124-129.
  28. Bell, S. J., Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242-295.
  29. Bellman R. B., Gallander J. F. (1979). *Deacidification of wine*. Oxford University Press, UK.
  30. Bely, M., J. M., Sablayrolles, P., Barre (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 70: 246-252.

31. Bely, M., Rinaldi, A., & Dubourdieu, D. (2003). Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96 (6), 507-512.
32. Betes-Saura C., Andres-Lacueva C., Lamuela-Raventos R. M. (1996). Phenolics in white free run juices and wines from Penedes by high-performance liquid chromatography: changes during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3040-3046.
33. Bettiga, L. J. (2003). Comparison of seven Chardonnay clonal selections in the Salinas Valley. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54, 207-210.
34. Bidan, P. (1975). Relation entre la teneur des vins en alcools superieurs et la teneur des mouts en substances azotees en particulier en acides amines. *Bulletin de l'OIV*.
35. Bisson, L. F. (1991). Influence of nitrogen on Yeasts and fermentations of grapes. *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, J. M. Rantz (Ed.). pp 78-89. *Am. Soc. Enol. Vitic.*, Davis, CA.
36. Boidron, R. (1995). Clonal selection in France: methods, organization, and use. In *Proceedings of the International Symposium on Clonal Selection: June 20 & 21, Oregon Convention Centre, Portland, Oregon, USA, 1995* (pp. 1-7). American Society for Enology and Viticulture, ASEV.
37. Boss, P. K., Pearce, A. D., Zhao, Y., Nicholson, E. L., Dennis, E. G., Jeffery, D. W. (2015). Potential grape-derived contributions to volatile ester concentrations in wine. *Molecules*, 20(5), 7845-7873.
38. Botelho, G. M. A. (2008). Characterisation of the aroma components of clonal grapes and wines from Aragonez and Trincadeira *Vitis vinifera* L. cultivars, *doktorski rad, Food Science, Univ. De Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal*.
39. Boulton, R. B., Singleton, V. L., Singleton, V. L., Bisson, L. F. (2009). *Principles and Practices Of Winemaking*. New York: Springer-Verlag New York, LLC.
40. Bouzas-Cid, Y., Falqué, E., Orriols, I., Trigo-Córdoba, E., Díaz-Losada, E., Fornos-Rivas, D., Mirás-Avalos, J. M. (2015). Perfis de aminoácidos de duas variedades galegas brancas de videira (godello and treixadura). *Ciência Téc. Vitiv*, 30(2), 84-93.
41. Braidot, E., Zancani, M., Petrusa, E., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., Macri, F. (2008). Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signal. Behav.* 3, 626–632.
42. Cabaroglu, T., Canbas, A., Baumes, R., Bayonove, C., Lepoutre, J. P., Günata, Z. (1997). Aroma Composition of a White Wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir as Affected by Skin Contact, *Journal of Food Science*, 62, 4, 680–683.
43. Cabrita, M. J., Costa Freitas, A. M., Laureano, O. i Di Stefano, R., (2006): Glycosidic aroma compounds of some Portuguese grape cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 86(6), 922-931.
44. Calleja, A., Falqué, E. (2005). Volatile composition of Mencia wines. *Food chemistry*, 90(3), 357-363.
45. Câmara J. S., Alves M. A., Marques J. C. (2007). Classification of Boal, Malvasia Sercial and Verdelho wines based on terpenoid patterns, *Food Chemistry*, 101, 475-484.
46. Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Marqués, J. C., Cacho, J. (2006). Quantitative gas chromatography–olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines. *Analytica Chimica Acta*, 563(1), 180-187.

47. Carnevillier, V., Charpentier, C., Feuillat, M. (2000). Production de Peptides par *Saccharomyces cerevisiae* au Cours de la Fermentation et de L'Autolyse sur Moût Chardonnay. 6e Symposium International d'oenologie (pp. 287-289). Paris.
48. Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Hermosin-Gutierrez, I. (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* Red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.* 55(3):992–1002.
49. Castino, M. (1988). Connaissance de la composition du raisin et du vin. Passage au vin des substances non transformées par la fermentation. Apparition dans le vin des substances nées lors de la fermentation. *Bulletin de l'OIV*, 61(689-690), 539-553.
50. Cejudo-Bastante, M. J., Pérez-Coello, M. S., Hermosin-Gutiérrez, I. (2011). Effect of wine micro-oxygenation treatment and storage period on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. *LWT—Food Science and Technology*, 44(4), 866–874.
51. Chamkha, M., Cathala, B., Cheynier, V., Douillard, R. (2003). Phenolic composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot noir vintages. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3179-3184.
52. Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60:165-178.
53. Cheynier, V., Digaud, J., Souquet, J. M., Barillère, J. M., Moutounet, M. (1989). Effect of Pomace Contact and Hyperoxidation on the Phenolic Composition and Quality of Grenache and Chardonnay Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 36-42.
54. Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57: 298-305.
55. Cheynier, V., Moutounet, M., Sarni-Manchado, P. (1998). *Oenologie: Fondaments scientifiques et technologiques*. Lavoisier: Cachan, Francuska.
56. Cheynier, V., Ricardo Da Silva, J. M. (1991). Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyl-tartaric acid and polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 39:1047–1049.
57. Chomsri, N. (2008). Impact of Protease Activity of Yeasts on Wine Fermentation and Formation of Volatile and Non-volatile Metabolites. Dissertation, Justus-Liebig-University Giessen, Germany.
58. Chong, J., Poutaraud, A., Huguene, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* 177, 143–155.
59. Cirami, R., Ewart, J. W. (1995). Clonal selection, evaluation, and multiplication in Australia. In *Proceedings of the International Symposium on Clonal Selection: June 20 & 21, Oregon Convention Centre, Portland, Oregon, Usa, 1995* (pp. 52-59). American Society for Enology and Viticulture, ASEV.
60. Collas, A., Barillere, J. M., Bougerey, C., Palgé, C. (1995). Clonal selection in Champagne. In *Proceedings of the International Symposium on Clonal Selection: June 20 & 21, Oregon Convention Centre, Portland, Oregon, Usa, 1995* (pp. 33-39). American Society for Enology and Viticulture, ASEV.
61. Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S., Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*. 1: 1-22.
62. Cooper, T.G. (1982). Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In J.N. Strathern, E.W. Jones & J.R. Broach (Eds), *The Molecular Biology of the Yeast*

- Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression (pp. 39-99). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
63. Cordonnier, R., Bayonov, C. (1974). Mise and evidence dans la baie de raisin var muscat d'alexandria de monoterpènes liés révélables par une à plusieurs enzymes du fruit. *C. R. AC. Sci.*, 278, 3387 – 3390.
  64. Cox, A., Capone, D. L., Eley, G. M., Perkins, M. V., Sefton, M. A. (2005). Quantitative analysis, occurrence, and stability of (E)-1-(2, 3, 6 -trimethylphenyl) buta-1,3-diene in wine. *J. Agric. Food Chem.* 53:3584-3591.
  65. Cramer, A. C., Vlassides, S., Block, D. E. (2002). Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(1), 49-60.
  66. Czochanska, Z., Foo, L. Y., Porter, L. J. (1979). Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry*. 18:1819-1822.
  67. Darias-Martín, J. J., Andrés-Lacueva, C., Díaz-Romero, C., Lamuela-Raventós, R. M. (2008). Phenolic profile in varietal white wines made in the Canary Islands. *Eur. Food Res. Technol.*, 226: 871-876.
  68. Darias-Martín, J. J., Rodríguez, O., Díaz, E., Lamuela-Raventós, R. M. (2000). Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chemistry*. 71, 483-487.
  69. De Klerk, J. L. (2010). Succinic acid production by wine yeasts (Doctoral dissertation, Stellenbosch: University of Stellenbosch).
  70. De la Presa-Owens, C., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., De la Torre-Boronat, M. C. (1995a). Differentiation and grouping characteristics of varietal grape musts from Penedès region (I). *Am. J. Enol. Vitic.*, 46: 283-291.
  71. De la Presa-Owens, C., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., De la Torre-Boronat, M. C. (1995b). Characterization of Macabeo, Xarel.lo, and Parellada white wines from the Penedès region. II. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46: 529-541.
  72. de Sá Borges, R., da Silva, G. A., Roberto, S. R., de Assis, A. M., Yamamoto, L. Y. (2013): Phenolic compounds, favorable oxi-redox activity and juice color of 'Concord' grapevine clones. *Scientia Horticulturae*, 161, 188-192.
  73. Delcourt, F., Taillandier, P., Vidal, F., Strehaiano, P. (1995). Influence of pH, malic acid and glucose concentrations on malic acid consumption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(2), 321-324.
  74. Delcroix, A., Günata, Y. Z., Sapis, J. C., Salmon, J. M., Bayonove, C. (1994). Glycosidase activities of 3 enological yeast strains during winemaking – Effect on the terpenol content of Muscat wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 291-296.
  75. Dharmadhikari, M. (2001). Nitrogen metabolism during fermentation. *Vineyard & Vintage View*, 17 (2), 5-7.
  76. Di Profio, F., Reynolds, A. G., Kasimos, A. (2011). Canopy management and enzyme impacts on Merlot, Cabernet franc, and Cabernet sauvignon. I. Yield and berry composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 62: 139-151.
  77. Di Stefano, R., Maggiorotto, G., Meila, V., Di Bernardi, D., Speracio, A., Fina, B., Sparla, S. (1995). Evaluazione dei composti terpenici durante il processo di appassimento dell' uva Zibibbo di Pantelleria. *L'Enotecnico*, 30, 11: 73-84.
  78. Dimitriadis, E., Williams, P. J. (1984). The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes. *American Journal of Enology and viticulture*, 35(2), 66-71.

79. Dixon, R. A., Xie, D. Y., Sharma, S. B. (2005). Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, 165, 9-28.
80. Downey, M. O., Dokoozlian, N. K., Krstic, M. P. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57: 257-268.
81. Downey, M. O., Harvey, J. S., Robinson, S. P. (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 10: 55-73.
82. Downey, M., Harvey, J., Robinson, S. (2003). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Austr. J. Grape Wine Res.*, 9, 110–121.
83. Duchêne, E., Legras, J. L., Karst, F., Merdinoglu, D., Claudel, P., Jaegli, N., Pelsy, F. (2009). Variation of linalool and geraniol content within two pairs of aromatic and non-aromatic grapevine clones. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(2), 120-130.
84. Dukes, B. C., Butzke, C. E. (1998). Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(2), 125-134.
85. Dumont, A., Dulau, L. (1997). The role of yeasts in the formation of wine flavours. In M. affecting grape composition and wine quality – a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 44(4), 409-430.
86. Duteurtre, B., Bourgeois, C., Chollot, B. (1971). Study of the assimilation of proline by brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 77, 28-35.
87. Easterling, D., Evans, J., Groisman, P., Karl, T., Kunkel, K. E., Ambenje, P. (2000). Observed variability and trends in extreme climate events: A brief review. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* 81, 417–425.
88. Ebeler, S. E., Thorngate, J. H. (2009). Wine chemistry and flavor: Looking into the crystal glass. *J. Agric. Food Chem.* 57:8098-8108.
89. Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 40(1), 1027-1047.
90. Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J. Agric. Food Chem.* 55:4501-4510.
91. Esti, M., Tamborra P. (2006): Influence of winemaking techniques on aroma precursors, *Analytica Chimica Acta*, Volume 563, Issues 1–2, 173–179
92. Falchi, M., Bertelli, A., Scalzo, R. L., Morassut, M., Morelli, R., Das, S., Cui, J. H., Das, D. K. (2006). Comparison of cardioprotective abilities between the flesh and skin of grapes. *J. Agric. Food Chem.* 54:6613–6622.
93. Falco, V. (2004). Caracterização do aroma de vinhos da *Vitis Vinifera* L. Var. Touriga Nacional. 179 p. Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os- Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.
94. Felja, M. (1973). Kraljevina – Agronomske inovacije, Zagreb br.3 – 4.
95. Fernández-Pachón, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. C. (2006). Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity, *Analytica Chimica Acta* 563, 101–108.

- 96.Ferreira, V. (2010). Volatile aroma compounds and wine sensory attributes. *Managing wine quality: viticulture and wine quality*, 1.
- 97.Ferreira, V., Fernandez, P., Pena, C., Escudero, A., Cacho, J. F. (1995). Investigation of the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.* 67(3), 381-392.
- 98.Ferreira, V., López, R., Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science Food and Agriculture* 80:1659-1667.
- 99.Francis, I. L., Newton, J. L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 114-126.
- 100.Fugelsang, K. C., Edwards, C. G. (2007). *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2nd Ed. New York: Springer.
- 101.Fuhrman, B., Volkova, N., Suraski, A., Aviram, M. (2001). White wine with red wine-like properties: Increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. *J. Agr. Food Chem.*, 49: 3164-3168.
- 102.Gallander, J. F. (1977). Deacidification of eastern table wines with *Schizosaccharomyces Pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 28(2): 65-68.
- 103.Gambutì, A., Stollo, D., Ugliano, M., Lecce, L., Moio, L. (2004). Trans-resveratrol, quercetin, (+)-catechin, (-)-epikatechin content in south italian monovarietal wines: Relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 5747-5751.
- 104.Garcia, M., Gallego P., Daverede, C., Ibrahim, H. (2001). Effect of three rootstocks on grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Negrette grown hydroponically on potassium, calcium and magnesium nutrition. *S. Afr. Enol. Vitic.* 22(2): 101-103.
- 105.García-Carpintero, E. G., Sánchez-Palomo, E., Gallego, M. G., González-Viñas, M. A. (2011). Volatile and sensory characterization of red wines from cv. Moravia Agría minority grape variety cultivated in La Mancha region over five consecutive vintages. *Food Research International*, 44(5), 1549-1560.
- 106.Garde-Cerdán, T., Ancín-Aytilicuenta, C. (2008). Effect of the addition of different qualities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 501-510.
- 107.Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Lara, J. F., Pardo, F., Ancín-Azpilicuenta, C., & Salinas, M. R. (2009). Study of the evolution of nitrogen compounds during grape ripening. Application to differentiate grape varieties and cultivated systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(6), 2410-2419.
- 108.Garrido, J., Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective, *Food Research International* 54 (2013) 1844–1858.
- 109.Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C.; Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F. (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11773–11785.
- 110.Genovese, A., Lamorte, S. A., Gambuti, A., Moio, L. (2013). Aroma of Aglianico and Uva di Troia grapes by aromatic series. *Food research international*, 53(1), 15-23.
- 111.Gerós, H., Chaves, M., Delrot, S. (Eds.). (2012). *The biochemistry of the grape berry*. Bentham Science Publishers.

112. Giudici, P., Kunkee, R. E. (1994). The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(1), 107-112.
113. Gockowiak, H., Henschke, P. A. (1992). Nitrogen composition of grape juice and implications for fermentation: results of a survey made in N-E Victoria. *Australian Grapegrower and Winemaker Annual Technical*, 340, 131, 133-138.
114. Gómez - Plaza, E., Gil - Muñoz, R., Martínez Cutillas, A. (2000). Multivariate classification of wines from seven clones of Monastrell grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 497-501.
115. Gómez-Míguez, M. J., González-Miret, M. L., Hernanz, D., Angeles Fernández, M., Vicario, I. M., Heredia, F. J. (2007). Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *J. Food Eng.*, 78: 238-245.
116. Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., Carreno-Espín, J., Fernández-López, J. A., Martínez-Cutillas, A. (1999). Investigation on the aroma of wines from seven clones of Monastrell grapes. *European Food Research and Technology*, 209(3-4), 257-260.
117. Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., i Martínez, A. (2000). Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine-making techniques, storage, temperature and length of storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3), 736–741.
118. González Álvarez, M., Gonzalez-Berreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gandara, J. (2011). Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromatic obtained by GC-MS. *Food Chemistry*, 129(3): 890-898.
119. González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2013). Wine aroma compounds in grapes: A critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55:202-218.
120. Guebailia, H. A., Chira, K., Richard, T., Mabrouk, T., Furiga, A., Vitrac, X., Monti, J. P., Delaunay, J. C., Mérillon, J. M. (2006). Hopeaphenol: The first resveratrol tetramer in wines from North Africa. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9559–9564.
121. Guedes de Pinho, P., Ferreira, A. C. S., Pinto, M. M., Benitez, J. G. Hogg, T. A. (2001). Determination of carotenoid profiles in grapes, musts, and fortified wines from Douro varieties of *Vitis vinifera*. *J. Agric. Food Chem.* 49:5484-5488.
122. Guerrero R. F., Liazid, A., Palma, M., Puertas, B., González-Barrio, R., Gil-Izquierdo, A., García-Barroso, C., Emma Cantos-Villar, E. (2009). Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *J. Agric. Food Chem.* 112:949-955.
123. Guitart, A., Hernández Orte, P., Ferreira, V., Peña, C., Cacho, J. (1999). Some observations about the correlation between the amino acid content of musts and wines of the Chardonnay variety and their fermentation aromas. *Am. J. Enol. Vitic.* 50:253-258.
124. Günata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L. Cordonnier, R. E. (1985). The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr. A.* 331:83-90.
125. Gürbüz, O., Göçmen, D., Dağdelen, F., Gürsoy, M., Aydin, S., Şahin, Büyükuysal, L., Usta, M. (2007). Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100(2), 518-525.

126. Güth, H. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants on different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45,8: 3027-3032.
127. Hardie, W. J., Aggenbach, S. J., Jaudzems, V. G. (1996). The plastids of the grape pericarp and their significance in isoprenoid synthesis. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2:144-154.
128. Haselgrove, L., Botting, D., Heeswijck, R. V., Høj, P. B., Dry, P. R., Ford, C., Land, P. G. I. (2000). Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L cv. Shiraz grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 141-149.
129. Haslam, E. (1980). In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the aging of red wines. *Phytochemistry*. 19:1577–1582.
130. He, F., Pan, Q.-H., Shi, W., Duan, C. -Q. (2008). Chemical synthesis of proanthocyanidins in vitro and their reactions in aging wines. *Molecules*, 13(12), 3007–3032.
131. Heard, G. M. (1999). Novel yeasts in winemaking-looking to the future. *Food Australia*, 51, 347-352.
132. Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P. (1998). Selective effects of sulphur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 865-867.
133. Henschke, P. A., & Jiranek, V. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. *Wine microbiology and biotechnology*, 77-164.
134. Henschke, P. A., Jiranek, V. (1991). Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape must. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine: Seattle, Washington, Usa 18-19 June 1991* (pp. 172-184). American Society for Enology and Viticulture, ASEV.
135. Herbert, P., Cabrita, M. J., Ratola, N., Laureano, O., Alves, A. (2005). Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region: evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *Journal of Food Engineering*, 66, 315-322.
136. Herceg, V. (2015). *Kakvoća vina Kraljevine vinogorja Zelina*, diplomski rad, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
137. Hernández-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., & Ferreira, V. (2006a). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 150-160.
138. Hernández-Orte, P., Cacho, J. F., Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *J. Agric. Food Chem.* 50:2891-2899.
139. Hernández-Orte, P., Guitart, A., Cacho, J. (1999). Changes in the concentration of amino acids during the ripening of *Vitis vinifera* Tempranillo variety from the Denomination d'Origin Somonto (Spain). *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 144–154.
140. Hernández-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic



- composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chemistry*, 89(2), 163-174.
141. Hernanz, D., Recamales, A. F., Gonzales-Miret, M. L., Gómez-Miguez, M. J., Vicario, I. M., Heredia, F. J. (2007). Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *Journal of Food Engineering* 80: 327-335.
  142. Herraiz, T., Ough, C. S. (1993). Formation of ethyl esters of amino acids by yeasts during the alcoholic fermentation of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:41- 48.
  143. Houtman, A. C., Du Plessis, C. S. (1986). The effect of grape cultivar and yeast strain on fermentation rate and concentration of volatile components in wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 7, 14–20.
  144. Howell, K. S., Cozzolino, D., Bartowsky, E., Fleet, G. H., Henschke, P.A. (2006). Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interaction during wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, 71 (9), 5420-5426.
  145. Howell, K. S., Klein, M., Swiegers, J.H., Hayasaka, Yoji., Isey, G.M. (2005). Genetic determinants of volatile-thiol release by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 5420-5426.
  146. Huang, Z., Ough, C. S. (1989). Effect of vineyard locations, varieties and rootstocks on the juice amino acid composition of several cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 135-139.
  147. Huang, Z., Ough, C. S. (1991). Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 42(3): 261-267.
  148. Iland, P., Dry, P., Proffitt, T., Tyerman, S. (2011). *The Grapevine: from the science to the practice of growing vines for wine*, Patrick Iland Wine Promotions, Adelaide, Australija.
  149. Ingledew, W. M., Kunkee, R. E., (1985). Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36: 65-76.
  150. Ingledew, W. M., Magnus, C. A., Sosulski, F. W. (1987). Influence of oxygen on proline utilization during wine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 246-248.
  151. Ito, T., Akao, Y., Yi, H., Ohguchi, K., Matsumoto, K., Tanaka, T., Iinuma, M., Nozawa, Y. (2003). Antitumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vaticanol C. *Carcinogenesis*, 24, 1489–1497.
  152. Ivić, S., Herjavec, S., Gajdoš-Kljusurić, J., Budić-Leto, I. (2009): Influence of Cold Maceration on Chemical and Sensory Properties of Vugava // 32nd World Congress of Vine and Wine & 7th General Assembly of the OIV, Zagreb, Hrvatska, 1-7.
  153. Jackson, D. I., Lombard, P. B., (1993). *Environmental and management practices*
  154. Jackson, R. (2014). *Wine science – Principles and Applications*, 4th Edition. Academic Press, London, Oxford, Boston, New York, San Diego.
  155. Jagatić Korenika, A. M. (2015). Utjecaj hladne maceracije na polifenolni sastav i senzorna svojstva vina kultivara Pošip, Maraština, Malvazija, Kraljevina i Škrlet (*Vitis vinifera* L.), Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu.
  156. Jakobović, S. (2012). Utjecaj dozrelosti grožđa Rizlinga rajnskog na sintezu polifenolnih spojeva i prekursora pojave netipične arome starenja vina, Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu.

157. Janusz, A., Capone, D. L., Puglisi, C. J., Perkins, M. V., Elsey, G. M., Sefton, M. A. (2003). (E)-1-(2,3,6-Trimethylphenyl)buta-1,3-diene: A potent grape-derived odorant in wine. *J. Agric. Food Chem.* 51:7759-7763.
158. Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., Trollat, P. (1995). Resveratrol content of wines of different ages: Relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 1-4.
159. Jeromel, A. (2005). Utjecaj različitih metoda otkiseljavanja na kakvoću vina Kraljevina crvena, Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
160. Jiang, L. Y., He, S., Jiang, K. Z., Sun, C. R., Pan, Y. J. (2010). Resveratrol and its oligomers from wine grapes are selective  $1O_2$  quenchers: Mechanistic implication by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry and theoretical calculation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9020–9027.
161. Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P. A. (1995 a). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 75-83.
162. Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P. A. (1995 b). Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 61, 461-467.
163. Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Ackermann, M., Ridder, F., Richling, E. (2006). Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion. *Mol. Nutr. Food Res.* 50:418-423.
164. Kalathenos, P., Sutherland, J. P., & Roberts, T. A. (1995). Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(3), 245-250.
165. Karoglan Kontić, J., Preiner, D., Šimon, S., Zdunić, G., Poljuha, D., Maletić, E. (2009.) Sanitary Status of Croatian Native Grapevine Varieties. *Agroculturæ Conspectus Scientificus* 74, 99-103.
166. Karoglan, M. (2009). Utjecaj dušične gnojidbe na kemijski sastav mošta i vina sorti Graševina, Chardonnay i Rajnski rizling (*Vitis vinifera* L.). Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
167. Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinč, P. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* 119, 715–723.
168. Keller, M. (2010). *The science of grapevines: Anatomy and physiology*. Academic Press: San Diego, Kalifornija, SAD
169. Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolic: Observations and recent findings. *Cien. Inv. Agr.* 35:107-120.
170. Kennedy, J. A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E. J., Jones, G. P. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.* 49:5348–5355.
171. Kennedy, J. A., Saucier, C., Glories, Y. (2006). Grape and wine phenolics: History and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* 3, 20–21.
172. Killian, E., Ough, C. S. (1979). Fermentation esters – formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 301–305.

173. King, S. E., Swiegers, H. J., Travis, B., Francis, L. I., Bastian, E. P. S., Pretorius, I. S. (2008). Coinoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10829-10837.
174. Kliewer, W. M. (1966). Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* 41(6): 923-931.
175. Kliewer, W. M. (1970). Free amino acids and other nitrogenous substances in grape wines. *Journal of Food Science*. 35: 17-21.
176. Koblet, W., Candolfi Vasconcelos, M.C., Zweifel, W., Howell, G.S. (1994). Influence of leaf removal, rootstock and training system on yield and fruit composition of Pinot Noir grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 2: 118-186.
177. Komes, D., Ulrich, D., Kovačević Ganić, K., Lovrić, T. (2007): Study of phenolic and volatile composition of white wine during fermentation and a short time of storage, *Vitis*, 46 (2), 77-84.
178. Komes, D., Ulrich, D., Lovric, T. (2006). Characterization of odor-active compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 1-7.
179. Kotseridis, Y., Baumes, R. L., Skouroumounis, G. K. (1999). Quantitative determination of free and hydrolytically liberated  $\beta$ -damascenone in red grapes and wines using a stable isotope dilution assay. *J. Chromatogr. A*. 849:245-254.
180. Kovačević Ganić, K., Peršurić, Đ., Komes, D., Banović, M., Dragović-Uzelac, V., Piljac, J. (2005). Phenolic composition and antioxidant activity of Malvasia Istriana must and wine. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*. 2-3-4: 91-98.
181. Kunkee, R. E. (1991). Relationship between nitrogen content of must and sluggish fermentation. In J. M. Rantz (Ed.), *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine* (pp. 148-155), 18-19 June 1991, Seattle Davis, California: American Society for Enology and Viticulture.
182. Large, P. J. (1986). Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* 2: 1-34.
183. Lee, S. J., Noble, A. C. (2003). Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8036-8044.
184. Lee, S. J., Noble, A. C. (2006). Use of partial least squares regression and multidimensional scaling on aroma models of California Chardonnay wines. *American journal of enology and viticulture*, 57(3), 363-370.
185. Liang, Z., Owens, C. L., Zhong, G. Y., Cheng, L. (2011). Polyphenolic profiles detected in the ripe berries of *Vitis vinifera* germplasm. *Food Chem.* 129, 940–950.
186. Licul, R., Mirošević, N., Premužić, D., Vičić, M., Mežnarić, D. (1979). „Zaštita geografskog porijekla stolnog vina Prigorska Kraljevina“, stručno-znanstvena studija, Fakultet poljoprivrednih znanosti, Zagreb.
187. Lilly, M., Bauer, F. F., Styger, G., Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2006). The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS yeast research*, 6(5), 726-743.
188. Linsenmeier, A. W., Lohnertz, O. (2007). Changes in norisoprenoid levels with long-term nitrogen fertilisation in different vintages of *Vitis vinifera* var. Riesling wines. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 28(1), 17.

189. Loewus, F. A., Stafford, H. A. (1958). Observations on the Incorporation of C14 into Tartaric Acid and the Labeling Pattern of D-Glucose from an Excised Grape Leaf Administered L-Ascorbic Acid-6-C14. *Plant physiology*, 33(2), 155.
190. López, R., Ferreira, V., Hernández, P., Cacho, J. F. (1999). Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties. A comparative study. *J. Sci. Food Agric.* 79:1461-1467.
191. Loureiro, M. D., Moreno-Sanz, P., Suarez, B., (2011). Clonal preselection of grapevine cultivars of the appellation "Cangas Quality Wine" (Asturias, Spain). *Hort. Sci. (Prague)*, 38: 71–80.
192. MacDonald, J., Reeve, P. T. V., Ruddlesden, J. D., White, F. H. (1984). Current approaches to brewery fermentations. *Progress in industrial microbiology*.
193. Macheix, J. J., Fleuriert, A. Billot, J. (1994). *Fruit phenolics*. Boca Raton: CRC Press Inc.
194. Makris, D. P., Psarra, E., Kallithraka, S., Kefalas, P. (2003). The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Res. Int.*, 36: 805-814.
195. Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I. (2008). *Vinova loza: ampelografija, ekologija i oplemenjivanje*. Školska knjiga, Zagreb.
196. Maletić, E., Preiner, D., Pejić, I., Karoglan Kontić, J., Šimon, S., Husnjak, S., Marković, Z., Andabaka, Ž., Stupić, D., Žulj Mihaljević, M., Merkaš, S., (2015). *Sorte vinove loze hrvatskog zagorja, Krapina*.
197. Mané, C., Sommerer, N., Yalcin, T., Cheynier, V., Cole, R. B., Fulcrand, H. (2007). Assessment of the molecular weight distribution of tannin fractions through MALDI-TOF MS analysis of protein-tannin complexes. *Anal. Chem.*, 79, 2239–2248 manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food*.
198. Marais J. (1983). Terpenes in the Aroma of Grapes and Wines : A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* Vol 4. No. 2
199. Marais, J., Pool, H. J. (1980). Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis* 19, 151–164.
200. Marais, J., Rapp, A. (1991). The Selection of Aroma-Rich Clones of *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer and Weisser Riesling by Means of Terpene Analyses. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 12(1), 51.
201. Marais, J., Versini, G., Wyk, C. Rapp, A. (1992). Effect of region on free and bound monoterpene and C13-norisoprenoid concentrations in Weisser Riesling wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 13:71-77.
202. Margalit Y. (1997). *Concepts in Wine Chemistry*. The Wine Appreciation Guild, San Francisco, CA.
203. Markham, K. R. (1989). Flavonols, flavonols and their glycosides. In *Methods in plant biochemistry*. Plant phenolics.
204. Masa, A., Vilanova, M. (2008). Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albarin blanco (*Vitis vinifera* L.), *Food Chemistry* 107, 273-281.
205. Masa, A., Vilanova, M., Pomar, F. (2007). Varietal differences among the flavonoid profile of white grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1164:291–297.
206. Maslov, L. (2014). *Određivanje polifenola. Indol-3-octene kiseline i 2-aminoacetofenona u vinima tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti*, doktorski rad, Zagreb, 2014.

207. Mateo J. J., Jiménez M. (2000). Review: Monoterpenes in grape juice and wines, *J. Chromatogr. A*, 881, 557-567.
208. Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., Günata, Z. (2005). A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: Functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *J. Exp. Bot.* 56:2721-2731.
209. Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7692–7702.
210. Mauricio, J. C., Ortega, J. M., Salmon, J. M. (1995). Sugar uptake by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation at different initial ammoniacal nitrogen concentrations. *Acta Horticulturae*, 388, 197-202.
211. McCarthy, M. G. (1992). Clonal and Pruning Effects on Muscat à petite grains blanc Yield and Terpene Concentration. *American journal of enology and viticulture*, 43(2), 149-152
212. Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C., Mendes-Faia, A. (2009). The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(4), 571-583.
213. Mercado-Martín, G. I., Wolpert, J. A., Smith, R. J. (2006). Viticultural evaluation of eleven clones and two field selections of Pinot noir grown for production of sparkling wine in Los Carneros, California. *American journal of enology and viticulture*, 57(3), 371-376.
214. Meyer, B., Hernández, J. R. (1970). Seed tannin extraction in Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 21:184-188.
215. Miller, A. C., Wolff, S. R., Bisson, L. F., Ebeler, S. E. (2007). Yeast strain and nitrogen supplementation: Dynamics of volatile ester production in Chardonnay juice fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 470–483.
216. Minguez, S., Hernández, P. (1998). Tartaric Stabilization of Red, Rosé and White Wines With L(+) – Calcium Tartarate Crystal Seeding. *American Journal of Enology and Viticulture* 49:2:177-182.
217. Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., Durán, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chemistry*, 82, 3, 409–416.
218. Mirošević, N., Fazinić, M., Ivanković, Z., Herjavec, S., Mežnarić, D. (2002) „Kraljevina Zelina“ – županijska marka kvalitetnog bijelog vina, elaborat, Zagreb
219. Mirošević, N., Licul, R., Premužić, D. (1986). Zaštita geografskog porijekla stolnog vina prigorska kraljevina.
220. Mirošević, N., Turković, Z. (2003). Ampelografski atlas, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.
221. Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., Agosin, E. (2007). Influence of winefermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 675–687.
222. Monagas, M., Garrido, I., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (2006). Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Anal. Chim. Acta*, 563: 401-410.

223. Montedoro, G. F., Rici, A. (1987). I composti aromatici di derivazione fermentativa della produzione provenienti da uve aromatiche. I simposio internazionale, Le sostanze aromatiche dell'uva e del vino, Trento.
224. Monteiro, F. F., Bisson, L. F. (1991). Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations. *American journal of enology and viticulture*, 42(1), 47-57.
225. Monteiro, F. F., Bisson, L. F. (1992 a). Nitrogen supplementation of grape juice. I. Effect on amino acid utilization during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 1-10.
226. Monteiro, F. F., Bisson, L. F. (1992 b). Nitrogen supplementation of grape juice. II. Effect on amino acid urea release following fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 11-17.
227. Monteiro, F. F., Trousdale, E. K., Bisson, L. F. (1989). Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(1), 1-8.
228. Moreira, N., Mendes, F., Pereira, O., de Pinho, P. G., Hogg, T., Vasconcelos, I. (2002). Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 157-167.
229. Moreno, J. A., Zea, L., Moyano, L. i Medina, M. (2005): Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control* 16(4), 333-338.
230. Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. (2009). *Wine chemistry and biochemistry*. Springer science + Business media, LLC, New York, USA.
231. Moyano, L., Zea, L., Villafuerte, L., Medina, M. (2009). Comparison of odor-active compounds in sherry wines processed from ecologically and conventionally grown Pedro Ximenez grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3: 968-973.
232. Mozetič, B., Tomazič, I., Škvarc, A. i Trebše, P. (2006): Determination of polyphenols in white grape berries cv. Rebula. *Acta Chimica Slovenica* 53: 58-64
233. Mulero, J., Pardo, F., Zafrilla, P. (2009). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. *European Food Research and Technology*, 229 (5), 807–812.
234. Munyon, J. R., Nagel, C. W. (1977). Comparison of methods of deacidification of musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 28(2): 79-87.
235. Murat, M. L., Masneuf-Pomarède, I., Darriet, P., Lavigne, V., Tominaga, T., Dubourdieu, D. (2001 a). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon blanc wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 136-139.
236. Necula, C., Onache, A., Popa, C., Dumitru, I., Iordache, S. (2009). Physico-Chemical Characteristics of some Clonal Selections of Varieties Recently Homologated. *Bulletin UASVM Horticulture*, 66, 1.
237. Nikolas, P. (2006). Grapevine clones used in Australia. South Australian Research and Development Institute.
238. Noble, A. C., Flath, R. A., Forrey, R. R. (1980). Wine head space analysis. Reproducibility and application to varietal classification. *J. Agric. Food Chem.* 28:346 -353.
239. O.I.V. (2007). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. Vol. 1.
240. O.I.V. (2012). *International code of oenological practices*, 01, Paris

- 241.Oenobrand, Products, Yeasts. <http://www.oenobrand.com>, pristupljeno 9. Lipnja 2016.
- 242.Ong, B. Y., Nagel, C. W. (1978). Hydroxycinnamic acid-tartaric acid ester content in mature grapes and during the maturation of white Riesling grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29,4: 277-281.
- 243.Orduña, R. M. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43 (7), 1844–1855.
- 244.Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., Del-Villar-Garrachón, V., González-Huerta, C., Moro Gonzalez, L. C., Guadarrama Rodríguez, A., Martín de la Helguera, S. (2014). Study of the effect of vintage, maturity degree, and irrigation on the amino acid and biogenic amine content of a white wine from the Verdejo variety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(10), 2073-2082.
- 245.Oszmianski, J., Romeyer, F. M., Sapis, J. C., Macheix, J. J. (1986).Grape seed phenolics: Extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *Am. J. Enol. Vitic.* 37:7-12.
- 246.Ough, C. S. (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on ethyl carbamate formation in wines. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine: Seattle, Washington, Usa 18-19 june 1991* (pp. 165-171). American Society for Enology and Viticulture, ASEV.
- 247.Ough, C. S., Amerine, M. A. (1980). *Methods for analysis of must and wines*. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons: 377. str.
- 248.Ough, C. S., Bell, A. A. (1980). Effects of nitrogen fertilization of grapevines on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 122-123.
- 249.Ough, C. S., Tien How Lee. (1981). Effect of vineyard nitrogen fertilization level on the formation of some fermentation esters. *American Journal of Enology and Viticulture*. 32 (2): 125- 127.
- 250.Palomo, E. S., González-Viñas, M. A., Díaz-Maroto, M. C., Soriano-Pérez, A., & Pérez-Coello, M. S. (2007). Aroma potential of Albillo wines and effect of skin-contact treatment. *Food Chemistry*, 103(2), 631-640.
- 251.Palomo, E. S., Pérez-Coello, M. S., Díaz-Maroto, M. C., González Viñas, M. A., Cabezudo, M. D. (2006). Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat “a petit grains” wines and effect of skin contact. *Food Chemistry*, 95 (2), 279–289.
- 252.Patrignani, F., Chinnici, F., Serrazanetti, D. I., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., Riponi, C., Lanciotti, R. (2016). Production of Volatile and Sulfur Compounds by 10 *Saccharomyces cerevisiae* Strains Inoculated in Trebbiano Must. *Frontiers in microbiology*, 7.
- 253.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(4), 585-590.
- 254.Pena-Neira, A., Hernández, T., Garcia-Vallejo, C., Estrella, I., Suarez, J. A. (2000). A Survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *Eur. Food Res. Technol.* 210:445–448.
- 255.Pereira, G. E., Gaudillere, J. P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, Rolin, D. (2006). Microclimate Influence on Mineral and Metabolic Profiles of Grape Berries. *J. Agric. Food Chem.* 54:6765–6775.

256. Perrone, G., Nicoletti, I., Pascale, M., De Rossi, A., De Girolamo, A., Visconti, A. (2007). Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6807-6812.
257. Petric, I. V. (2013). Evaluacija klonskih kandidata Škrleta bijeloga (*Vitis vinifera* L.), temeljem pokazatelja rodnosti i kvalitete grožđa, doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
258. Pineau, B., Barbe, J. C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D. (2009). Examples of perceptive interactions involved in specific "red-" and "black-berry" aromas in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 57:3702-3708.
259. Pineau, B., Barbe, J. C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D. (2007). Which impact for  $\beta$  - damascenone on red wines aroma? *J. Agric. Food Chem.* 55:4103- 4108.
260. Plata, C., Millan, C., Mauricio, J. C., Ortega, J. M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts *Food Microbiology*, 20, 217–224.
261. Polášková, P., Herszage, J., Ebeler, S. E. (2008). Wine flavor: Chemistry in a glass. *Chem. Soc. Rev.* 37:2478-2489.
262. Pomar, F., Novo, M., Masa, A. (2005). Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1094:34–41.
263. Pozo-Bayón, M. A., Hernández, M. T., Martín-Álvarez, P. J., Polo, M. C. (2003). Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines Manufactured with Red and White Grape Varieties, *J. Agric. Food Chemistry*, 51(7), 2089–2095.
264. Preiner, D. (2012). Učinkovitost masovne pozitivne selekcije unutar populacija autohtonih sorata vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u Dalmaciji, doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
265. Preiner, D., Šimon, S., Karoglan Kontić, J., Pejić, I., Maletić, E. (2009). Masovna pozitivna klonska selekcija kultivara Kraljevina (*Vitis vinifera* L.), 44. hrvatski i 4. međunarodni simpozij agronoma, Opatija, 867-871.
266. Presa-Owens, C. D. L., Noble, A. C. (1997). Effect of storage at elevated temperatures on aroma of Chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 310-316.
267. Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675-729.
268. Price, S. F., Breen, P.J., Valladao, M., Watson, B. T. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot Noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:187–194.
269. Radeka, S. (2005). Maceracija masulja i primarne arome vina malvazija istarska. Doktorska disertacija, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet: 116 str.
270. Radeka, S., Herjavec, S., Peršurić, Đ., Lukić, I., Sladonja, B. (2008). Effect of Different Maceration Treatments on Free and Bound Varietal Aroma Compounds in Wine of *Vitis vinifera* L. cv. Malvazija istarska bijela. // *Food Technology and Biotechnology*. 46, 1; 86-92.
271. Radić, I. (1923). *Vinogradarstvo i pivničarstvo*, Zagreb
272. Ramey, D., Ough, C. S. (1980). Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 28, 5: 928-934.



273. Rankine, B. C. (1967). Formation of higher alcohols by wine yeasts and relationship to taste thresholds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18,12: 584-589.
274. Rapp A., Mandery H. (1986). Wine aroma. *Experientia* 42, 873-884.
275. Rapp, A. (1988). Wine aroma substances from gas chromatographic analysis. In H. F. Linskens, J. F. Jackson (Eds), *Wine analysis*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier
276. Rapp, A., Güntert, M. (1986). Changes in aroma substances during the storage of white wines in bottles. In: *The Shelf Life of Foods and Beverages* (G. Charalambous, ed.), pp. 141–167. Elsevier, Amsterdam.
277. Rapp, A., Versini, G. (1996). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Wein-Wissenschaft*, 51(3-4), 193-203.
278. Rauhut, D. (1993). Yeasts-production of sulfur compounds. In G. H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (pp. 183-223). Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.
279. Rauhut, D. (1996). Qualitätsmindernde schwefelhaltige Stoffe im Wein: Vorkommen, Bildung, Beseitigung. Dissertation, Justus-Liebig-University Giessen, Geisenheimer Berichte Band 24.
280. Rauhut, D., Kürbel, H., Prior, B., Löhnertz, O., Großmann, M. (1997). Synthetic media to monitor the different abilities of yeast strains to produce undesirable volatile sulfur compounds. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cool Climate Viticulture and Enology* (pp. 76-79), 16.-20 Juli 1996. Rochester, New York, USA VI.
281. Razungles, A., Bayonove, C. L., Cordonnier, R. E., Sapis, J. C. (1988). Grape carotenoids: Changes during the maturation period and localization in mature berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 39:44- 48.
282. Razungles, A., Günata, Z., Pinatel, S., Baumes, R., Bayonove, C. (1993). Étude quantitative de composés terpéniques, norisoprénoides et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins. *Sci. Alim.*, 13, 59-72.
283. Reazin, G., Scales, H., & Andreasen, A. (1970). Mechanism of major congener formation in alcoholic grain fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(4), 585-589.
284. Rentzch, M., Wilkens, A., Winterhalter, P. (2009). Non-flavonoid Phenolic Compounds. In *Wine chemistry and biochemistry*. Moreno-Arribas, M. V., i M. C. Polo (ed) pp.509-521. Springer science+Business media, LLC, New York, USA.
285. Revilla, E., Alonso, E., Kovac, V. (1997). The content of catechins and procyanidins in grapes and wines as affected by agroecological factors and technological practices. In T. R. Watkins (Ed.), *Wine. Nutritional and therapeutic benefits* (pp. 69–80). Washington DC: American Chemical Society.
286. Reynolds, A. G., Cliff, M., Wardle, D. A., King, M. (2004). Evaluation of winegrapes in British Columbia: 'Chardonnay' and 'Pinot noir' clones. *HortTechnology*. Oct-Dec, 14(4): 594 – 602.
287. Reynolds, A. G., Wardle, D. A., Dever, M. (1993). Terpene response to pressing, harvest date, skin contact in *Vitis vinifera*. *Hortic. Sci.* 28(9), 920-924.
288. Ribéreau-Gayon, P. (1963). Les acides-phénols de *Vitis vinifera*. *Compt. Rend.* 256:4108-4111.
289. Ribéreau-Gayon, P., Boidron, J. N., Terrier, A. (1975). Aroma of muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23,6: 1042-1046.

290. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006a): Handbook of Enology Volume 1, Second Edition. The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, West Sussex, England.
291. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., i Dubourdieu, D. (2006b): Handbook of Enology Volume 2, Second Edition. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, West Sussex, England.
292. Ricardo da Silva, J. M., Bourzeix, M., Cheynier, V., Moutounet, M. (1991). Procyanidin composition of Chardonnay, Mauzac and Grenache blanc grapes. *Vitis*. 30:245–252.
293. Ricardo da Silva, J. M., Cheynier, V., Samson, A., Bourzeix, M. (1993). Effect of pomace contact, carbonic maceration and hyperoxidation on the procyanidin composition of Grenache blanc wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 168–172.
294. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:152-159.
295. Robichaud, J. L., Noble, A. C. (1990). Astringency and bitterness of selected phenolics in wine, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53 (3), 343–353.
296. Robinson, A. (2011). Environmental influences on grape aroma potential (Doctoral dissertation, Murdoch University).
297. Rocha, S. M., Coutinho, P., Delgadillo, I., Cardoso, A. D., Coimbra, M. A. (2005). Effect of enzymatic aroma release on the volatile compounds of white wines presenting different aroma potentials. *J. Sci. Food Agric.* 85(2), 199-205.
298. Rodrigues, J., Carneiro, L., Clímaco, M. C. (1996). Aromatic characterization of six clones from cv. Fernão Pires. In: *Proceedings for the 4th International Symposium on Cool Climate Viticulture and Enology*, New York, 66-69.
299. Rodriguez Bencomo, J. J., Mendez Siverio, J. J., Perez Trujillo, J. P., Cacho, J. (2008). Effect of skin contact on bound aroma and free volatiles of Listan blanco wine. *Food Chemistry*, 110,1: 214-225
300. Rodriguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacon Vozmediano, J. L., Martinez Gascuena, J., Garcia Romero, E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in warm climates. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 687–693.
301. Rodriguez-Vaquero, M. J., Alberto, M. R., Manca de Nadra, M. C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 18:93–101.
302. Rojas, V., Gil, J. V., Pinaga, F., Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 283–289.
303. Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International journal of food microbiology*, 86(1), 169-180.
304. Romeyer, F., Macheix, J. J., Sapis, J.C. (1986). Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry*. 25:219–221.
305. Rosillo, L., Salinas, M. A. R., Garijo, J., Alonso, G. L. (1999). Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis: Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties. *J. Chromatogr. A*. 847:155-159.
306. Ruffner, H. P. (1982). Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review part B. *Vitis*. 21: 346-358.

307. Rusjan, D., Strlič, M., Košmerl, T., Prosen, H. (2009). The response of Monoterpenes to different enzyme preparations in Gewürztraminer (*Vitis vinifera* L.) wines. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 30, 56-64.
308. Ružić, I., Škerget, M., Knez, Ž., Runje, M. (2011). Phenolic content and antioxidant potential of macerated white wines. *European Food Research and Technology*, 233, 465–472.
309. Sablayrolles, J.M. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, 42, 418-424.
310. Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Culleré, I., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., Ferreira, V. (2010). Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *J. Agric. Food Chem.* 58:5574-5585.
311. Sanchez Palomo, E., Gómez Garcia-Carpintero, E., Gómez Gallego, M. A., Gonzalez Vinas, M. A. (2012). The Aroma of Royal Red Wines from La Mancha Region- Determination of Key Odorants. *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Techology, Toxicology and some Specific Aplication*, p. 147-170.
312. Santesteban, L. G., Royo, J. B. (2006). Water status, leaf area and fruit load influence on berry weight and sugar accumulation of cv. 'Tempranillo' under semiarid conditions. *Scientia Horticulturae*, 109, 60-65.
313. Sartorius, O. (1926). Zur Rebenselektion unter besonderer Beruecksichtigung der Metodik und der Ziele auf Grund von 6-bis 14 jaehrigen Beobachtungen an einem Klon. *Zeitschrift fuer Planzenzuechtung* 12: 31-74.
314. Scanes, K.T., Hohmann, S., & Prior, B.A. (1998). Glycerol production by yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 19 (1), 17-24.
315. Schmid, J., Ries, R., Rühl, E. H. (1995). Aims and achievements of clonal selection at Geisenheim. *Proceedings of the International Symposium on Clonal Selection, Oregon Convention Center Portland, Oregon USA*, 70-73.
316. Schneider, A., Carra, A., Akkak, A., This, P., Laucou, V., Botta, R. (2001). Verifying synonymies between grape cultivars from France and Northwestern Italy using molecular markers. *Vitis* 40(4):197-203.
317. Schoeffling, H., Faas, K. H., (1990). Wine test results from clones of the varieties Kerner, Mueller-Thurgau, Gewuerztraminer and Riesling during the development and redevelopment phases. *Vitis*, 499-503.
318. Schön, I., Martens, K., Van Dijk, P. (Eds.). (2009). *Lost sex: the evolutionary biology of parthenogenesis*. Springer Science & Business Media.
319. Scienza, A., Versini, G., Villa, P., de Micheli, L., Panont, A., Bogoni, M. (1994). Morphological, biochemical and quality traits of some new Chardonnay clones with different aroma content: A preliminary approach. 80-89.
320. Sefton, M. A, Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., Taylor, D. K. (2011). Occurrence, sensory impact, formation, and fate of damascenone in grapes, wines, and other foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 59:9717-9746.
321. Sefton, M. A. (1998). Hydrolytically-released volatile secondary metabolites from a juice sample of *Vitis vinifera* grape cvs. Merlot and Cabernet Sauvignon. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4:30-38.
322. Sefton, M. A., Francis, I. L., Williams, P. J. (1993). The volatile composition of Chardonnay juices: A study by flavor precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:359-370.

323. Sefton, M. A., Francis, I. L., Williams, P. J. (1994). Free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* grape cv. Sauvignon blanc. *J. Food Sci.* 59:142-147.
324. Sefton, M. A., Francis, I. L., Williams, P. J. (1996). The free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* grape cv. Semillon. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2:179-183.
325. Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T., Erten, H., Gunata, Z. (2006a). Aroma components of cv. Muscat of Bornova wines and influence of skin-contact treatment. *Food Chemistry*, 94,3: 319-326.
326. Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T., Erten, H., Lepoutre, J., Gunata Z. (2006b): Effect of skin contact on the free and bound aroma compounds of the white wine of *Vitis vinifera* L., cv. Narince. *Food Control* 17, 75-82.
327. Shimazu, Y., Watanabe, M. (1981). "Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation." *J. Ferment Technol.* 59(1): 27-32.
328. Shinohara, T., Kubodera, S., Yanagida, F. (2000). Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (1), 90-97.
329. Siemann, E. H., i Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 49–52.
330. Simpson, R. F. (1979). Aroma composition of bottle aged white wine. *Vitis* 18:148-154.
331. Simpson, R. F. (1979). Some important aroma components of white wine, *Food Technol. Aust.* 31, 516-522.
332. Singletary, K.W., Stansbury, M.J., Giusti, M., Breemen, R. B. V., Wallig, M., Rimando, A. (2003). Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents. *J. Agric. Food Chem.* 51:7280–7286.
333. Singleton V. L., Noble A. C. (1976). Wine Flavor and Phenolic Substances - Phenolic, Sulfur, and Nitrogen Compounds in Food Flavors, Chapter 3, pp 47–70, ACS Symposium Series, Vol. 26. American chemical society.
334. Singleton, V. L., Draper, D. E. (1964). The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 15:34-40.
335. Singleton, V. L., Draper, D. E., Rossi, J. A. (1966). Paper chromatography of phenolic compounds from grapes, particularly seeds, and some variety-ripeness relationships. *Am. J. Enol. Vitic.* 17:206-217.
336. Singleton, V. L., Zaya, J., Trousdale, E. (1986). Caftaric and coutaric acids in fruit of *Vitis*. *Phytochem.* 25: 2127-2133.
337. Skinkis, P. A., Bordelon, B. P., Wood, K. V. (2008). Comparison of monoterpene constituents in Traminette, Gewürztraminer, and Riesling winegrapes. *American journal of enology and viticulture*, 59(4), 440-445.
338. Skouroumounis, G., Sefton, M. (2002). The formation of  $\beta$ -damascenone in wine. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*. P. Winterhalter and R. Rouseff (eds.), pp. 241-254. ACS Symp. Series 802. Am. Chemical Society, Washington, DC.
339. Soleas, J. G., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M. (1997). Wine as a Biological Fluid: History, Production and Role in Disease Prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 11:287-313.
340. Somers, T. C., i Pocock, K. F. (1991). Phenolic assessment of white musts: varietal differences in free-run juices and pressings. *Vitis*, 30, 189–201.

- 341.Somers, T. C., Ziemelis, G. (1985). Flavonol haze in white wines. *Vitis*, 24, 43–50.
- 342.Somers, T., Verette, E., Pocock, K. (1987). Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.* 40:67–78.
- 343.Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., Tsarchopoulos, C., Biliaderis, C. G. (2003). Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistry*, 80, 261-273.
- 344.Spayd, S. E., Nagel, C. W., Edwards, C. G. (1995). Yeast growth in Riesling juice as affected by vineyard nitrogen fertilization. *American Journal of Enology and Viticulture*. 46(1): 49-55.
- 345.Spayd, S.E., Andersen-Bagge, J. (1996). Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 389-402.
- 346.Sponholz, W. R. (1988). Alcohols derived from sugars and other sources and fullbodiedness of wines. In: *Wine Analysis* (H. F. Liskens and J. F. Jackson, eds.), pp. 147–172. Springer-Verlag, Berlin.
- 347.Sponholz, W. R. (1991). Nitrogen compounds in grapes, must and wine. *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine* (pp. 67–77). Seattle, USA: American Society of Enology and Viticulture Davis, California.
- 348.Stecher, G., Huck, C. W., Popp, M., Bonn, G. K. (2001). Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371, 73–80.
- 349.Stines, A. P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P. A., Høj, P. B., van Heeswijck, R. (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 150-158.
- 350.Strauss, C. R., Wilson, B., Anderson, R., Williams, P. J. (1987). Development of precursors of C13 norisoprenoid flavorants in Riesling grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 38:23-27.
- 351.Stražimir, D. (1870). *Vinogradar, Varaždin*.
- 352.Sučević, O. (1950). „Prilog poznavanju sastava moštava sjeverne Hrvatske“, *Biljna proizvodnja* 4; 1-15, Zagreb.
- 353.Sun, B. S., Ricardo-da-Silva, J. M., Spranger, M. I. (2001). Quantification of catechins and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines, *Ciência Téc. Vitiv.* 16, 23-34.
- 354.Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11:139-173.
- 355.Swiegers, J. H., Capone, D. L., Pardon, K. H., Else, G. M., Sefton, M. A., Francis, I. L., Pretorius, I. S. (2007). Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast*, 24, 561-574.
- 356.Swiegers, J. H., Francis, I. L., Herderich, M. J., Pretorius, I. S. (2006). Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery: the choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 21, 34-42.

357. Swiegers, J. H., Kievit, R. L., Siebert, T., Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., King, E. S., Pretorius, I. S. (2009). The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiology*, 26, 204-211.
358. Šatović, F. (2000). Naše stare sorte vinove loze. *Sjemenarstvo* 17: 43-47.
359. Šimon, S. (2012). Detekcija unutar sorte genetske varijabilnosti kod vinove loze (*Vitis vinifera* L.), doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
360. Šimon, S., Petric, I. V., Pejić, I. (2008.). Performance of clonal candidates cv. Škrlet bijeli (*Vitis vinifera* L.) in regard to different environments. *Cereal research communications*. 36, 1607-1610.
361. Taillandier, P., Portugal, F. R., Fuster, A., Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food microbiology*, 24(1), 95-100.
362. Tamborra, P. (1992). Influenza della macerazione sul contenuto di terpeni liberi e glucosidi nel Moscatello selvatico. *Riv. Viti. Enol.* 65(2), 35-45.
363. Tamborra, P., Martino, N., Esti, M. (2004): Laboratory tests on glycosidase preparations in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513,1: 299-303.
364. Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., Gerós, H. (2013). Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments, *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 18711-18739
365. ter Schure, E.G., van Riel, N. A. W., Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 67-83.
366. Thorngate, J. H. (1997). The physiology of human sensory response to wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 48:271–279.
367. Thurston, P. A., R., Taylor, J., Anvenainen (1981). Effect of linoleic acid supplement on the synthesis by yeasts of lipids and acetate esters. *J. Inst. Brew.* 87: 92-95
368. Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003a). Effect of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 126-136.
369. Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M. (2003b). Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: Study of their buffering capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (4), 916-922.
370. Trummer, F. X., (1841). *Systematische Clasifikation und Beschreibung der im Herzogthume Steiermark vorkommenden Rebensorten*, Heransgegeten von der K. K. Landwirtschaft gesellschaft in Steiermark, Graz.
371. Turković, Z. (1955) „Historijat i utjecaj razvitka sortimenta vinove loze u sjevernoj Hrvatskoj“, *Agronomski glasnik* 4; 3-9, Zagreb.
372. Ugliano, M., Fedrizzi, B., Siebert, T., Travis, B., Magno, F., Versini, G., & Henschke, P. A. (2009). Effect of nitrogen supplementation and *Saccharomyces* species on hydrogen sulfide and other volatile sulfur compounds in Shiraz fermentation and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4948-4955.
373. Usseglio Tomasset, L. (1975): Volatiles of wine dependant on yeast metabolism. V: Proceedings of the 4th International Oenological Symposium. Valencia, Spain,

- May 26-29, 1975. Lemperle E., Frank J. (eds.) Valencia. International Association for Modern Winery Technology & Management: 346-370.
- 374.Valero, E., Millán, C., Ortega, J. M., Mauricio, J. C. (2003). Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(8), 830-835.
- 375.Vanhoenacker, G., De Villiers, A., Lazou, K., De Keukeleire, D., Sandra, P. (2001). Comparison of High-Performance Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy and Capillary Electrophoresis – Mass Spectroscopy for the analysis of phenolic compounds in diethyl etherextracts of red wines. *Chromatographia*. 54:309–315.
- 376.Vanzo, A., Cecotti, R., Vrhovsek, U., Torres, A. M., Mattivi, F., Passamonti, S. (2007). The fate of trans-caftaric acid administered into the rat stomach. *Journal of Agricultural*.
- 377.Vararu, F., Moreno-García, J., Zamfir, C. I., Cotea, V. V., Moreno, J. (2016). Selection of aroma compounds for the differentiation of wines obtained by fermenting musts with starter cultures of commercial yeast strains. *Food chemistry*, 197, 373-381.
- 378.Versini, G., Rapp, A., Volkmann, C., Scienza, A. (1990). Flavour compounds of clones from different grape varieties. *Vitis*, 513-524.
- 379.Versini, G., Scienza, A., Dell'Eva M., Dalla-Serra, A., Romano, F., (1988). Presenza ed interesse di sostanze monoterpene e norisopreniche in uve da cloni Chardonnay e Sauvignon bianco nel Trentino. *Atti dell'Accademia Italiana della vite e del vino*, 40,134-137.
- 380.Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Waters, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 564-573.
- 381.Vilanova, M., Genisheva, Z. A., Graña, M., Oliveira, J. M. (2013). Determination of odorants in varietal wines from international grape cultivars (*Vitis vinifera*) grown in NW Spain. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(2), 212-222.
- 382.Vilanova, M., Sieiro, C. (2006): Determination of free and bound terpene compounds in Albarino wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19,6-7: 694-697.
- 383.Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 145-157.
- 384.Villa, P. L., Panont, A., Bogoni, M., Scienza, A., Versini, G., Tedesco, G. (1993). Analisi della variabilità aromatica di una popolazione di Chardonnay. *Vignevini*, 20, 49-53.
- 385.Vinson, J. A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., Proch, J. (2005). Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* 24:44-50.
- 386.Vokurka, A. (2003). Istraživanje unutar sorte varijabilnosti vinove loze (*Vitis Vinifera L.*), magistrski rad, Agronomski fakultet, Zagreb.
- 387.Vukotinić - Farkaš, Lj., (1858). Pametarka: gospodarom u Hrvatskoj i Slavoniji, Narodna tiskara Ljudevita Gaja, Zagreb
- 388.Watson, T. G. (1976). Amino-acid pool composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source. *Journal of Genetics in Microbiology*. 96: 263-268.
- 389.Webb, A. D., Ingraham, J. L. (1963). Fusel oil. *Advances Appl. Micro.* 5: 317-353.

390. Williams, P. J., Sefton, M. A., Francis, L. (1992). Glycosidic precursors of varietal grape and wine flavor. In *Flavor Precursors-Thermal and Enzymatic Conversations*, Teranishi, R., Takeoka, G.R., Güntert, M. (eds), American Chemical Society, Washington DC.
391. Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., Dimitriadis, E. (1981). Origins of some volatile monoterpenes and nor-isoprenoids in grape and wine-biosynthetic and biogenetic considerations. In Berger, R., Nitz, S., Schreier P. (eds) *Topics in Flavour Research*. Eichborn Verlag Marzling-Hangenheim Germany.
392. Wilson, B., Strauss, C. R., Williams, P. J. (1984). Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing muscat grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32,4: 919-924.
393. Winterhalter, P., Ebeler, S. E., (eds.). (2013). *Carotenoid Cleavage Products*. ACS Symp. Series 1134. Am. Chemical Society, Washington, DC.
394. Winterhalter, P., Rouseff, R. (2002). Carotenoid-derived aroma compounds: An introduction. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*. P. Winterhalter and R. Rouseff (eds.), pp. 1-17. ACS Symp. Series 802. Am. Chemical Society, Washington, DC.
395. Winterhalter, P., Sefton, M. A., Williams, J. P. (1990a). 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.
396. Winterhalter, P., Sefton, M. A., Williams, P. J. (1990b). Volatile C13-norisoprenoid compounds in Riesling wine are generated from multiple precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:277-283.
397. Wolpert, J. A., Kasimatis, A. N., Weber, E. (1994). Field performance of six Chardonnay clones in the Napa Valley. *American journal of enology and viticulture*, 45(4), 393-400.
398. Yang, J., Martinson, T. E., Liu, R. H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chem.* 116, 332–339.
399. Yokotstuka, K. (1990). Effect of press design and pressing pressures on grape juice components. *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 15–21.
400. Zdunić, G. (2009). *Genetska i ampelografska karakterizacija sorte Plavac mali (Vitis vinifera L.)*, doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
401. Zdunić, G., Maletić, E., Vokurka, A., Karoglan Kontić, J., Pezo, I., Pejić, I. (2007.) Phenotypical, Sanitary and Ampelometric Variability within the Population of cv. Plavac mali (*Vitis vinifera L.*). *Agriculturae Conspectus Scientidicus* 72, 117-128.
402. Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B.H., Nury, F. (1999). *Wine Analysis and Production*. New York: Kluwer Academic.
403. Zoecklin, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (2001). *Wine analysis and Production*. Van Nostrand Reinhold Publishing Co., New York.



## ŽIVOTOPIS KANDIDATA

Ivana Puhelek rođena je 11. 04.1984. u Zagrebu. Živi u Svetom Ivan Zelina, gdje je pohađala osnovnu školu i opću gimnaziju. Maturirala je 2003. godine te iste godine upisala dodiplomski studij Bilinogojstvo na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Završila je smjer Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo te 8. rujna 2009. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivana Pejića obranila diplomski rad „Ampelografske karakteristike klonskih kandidata sorte Kraljevina (*Vitis Vinifera L.*) u 2008. godini “. Na istom fakultetu je 2011. godine upisala poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti.

Od 2011. godine zaposlena je kao znanstveni novak na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, gdje sudjeluje u nastavi na modulima Vinarstvo, Tehnologija vina, Kemija mošta i vina te Senzorna svojstva i ocjenjivanje vina. Do danas je sudjelovala na znanstvenom projektu „Uzroci netipične arome starenja vina“, stručnim projektima Zagrebačke županije „Poboljšanje kakvoće proizvoda od jabuka i kupina- proizvodnja vina od jabuka i kupina“, „Utjecaj folijarne gnojidbe aminokiselinama na kakvoću vina Kraljevina“ te Poboljšanje kakvoće vina Kraljevina folijarnom primjenom makro i mikro elemenata te VIP projektu “Primjena suvremene tehnologije u proizvodnji vina Frankovka”. U koautorstvu je objavila 11 znanstvenih i više stručnih radova te sudjelovala na većem broju stručnih i znanstvenih skupova.

Dugi niz godina sudjeluje u istraživanju na projektu klonska selekcija cv Kraljevina te aktivno sudjeluje u promociji i popularizaciji vina navedenog kultivara. Od 2014. godine ovlašten je predavač Ministarstva poljoprivrede te sudjeluje u edukaciji iz programa Održiva uporaba pesticida.

Članica je Povjerenstva za senzorno ocjenjivanje vina.

Titulom vinske kraljice okrunjena je 2010 godine tijekom koje je na području Hrvatske promovirala vinorodna područja i vinare Zagrebačke Županije, te širila kulturu pijenja vina.

Svoje vrijeme nesebično posvećuje gradu u kojem živi, te je trenutno na funkciji zamjenika gradonačelnika Svetog Ivana Zeline.

## Popis radova

1. Mihaljević Žulj, Marin; Tomaz, Ivana; Maslov Bandić, Luna; Puhelek, Ivana; Jagatić Korenika, Ana Marija; Jeromel, Ana. Influence of Different Yeast Strains on Metabolism of Tryptophan and Indole-3-Acetic Acid During Fermentation. // South african journal of enology and viticulture. 36 (2015) , 1; 44-49
2. Mihaljević Žulj, Marin; Greblički, Ivan, Maslov, Luna; Jagatić Korenika, Ana-Marija; Puhelek, Ivana; Jeromel, Ana. Kemijska i senzorna svojstva vina sorte Sokol (*Vitis vinifera* L.). // Glasnik zaštite bilja. 39 (2016) , 3; 6-13
3. Tomić, Antonija; Puhelek, Ivana; Mihaljević Žulj, Marin; Jeromel, Ana. Senzorna svojstva voćnih vina proizvedenih od kupina sorte Thornfree. // Glasnik zaštite bilja. 39 (2016) , 3; 38-43
4. Jagatić Korenika, Ana-Marija; Ivan, Naletilić; Mihaljević Žulj, Marin; Puhelek, Ivana; Jeromel, Ana. Utjecaj roka berbe i temperature maceracije na polifenolni sastav grožđa i vina sorte Frankovka (*Vitis vinifera* L.). // Glasnik zaštite bilja. 5 (2015) ; 92-97
5. Mihaljević Žulj, Marin; Puhelek, Ivana; Jagatić Koreniks, Ana Marija; Maslov Bandić, Luna; Pavlešić, Tomislav; Jeromel, Ana. Organic Acid Composition in Croatian Predicate Wines. // ACS. Agriculturae conspectus scintificus. 80 (2015) , 2; 113-117
6. Puhelek, Ivana; Jagatić Korenika, Ana Marija; Mihaljević Žulj, Marin; Maslov, Luna; Preiner, Darko; Jeromel, Ana. Aminoacids Profile of cv. Kraljevina (*Vitis vinifera* L.) Clones Candidates. // ACS. Agriculturae conspectus scintificus. 80 (2015) , 2; 109-112
7. Jagatić Korenika, Ana-Marija; Mihaljević Žulj, Marin; Puhelek, Ivana; Plavša, Tomislav; Jeromel, Ana. Study of phenolic composition and antioxidant capacity of Croatian macerated white wines. // Mitteilungen Klosterneuburg. 64 (2014) ; 171-180
8. Jagatić Korenika, Ana-Marija; Jeromel, Ana; Mihaljević Žulj, Marin; Puhelek, Ivana. Utjecaj hladne maceracije na kemijski sastav vina autohtonih hrvatskih sorti vinove loze. // Glasnik zaštite bilja. 35 (2012) , 4; 78-86

9. Puhelek, Ivana; Jagatić Korenika, Ana-Marija; Mihaljević Žulj, Marin; Jeromel, Ana. Senzorna svojstva vina proizvedena od klonskih kandidata kultivara Kraljevina. // Glasnik zaštite bilja. 5 (2012) ; 100-108
10. Jagatić Korenika, Ana-Marija; Jeromel, Ana; Puhelek Ivana; Mihaljević Žulj, Marin. Utjecaj hladne maceracije na kakvoću bijelih vina autohtonih sorti grožđa // 49th Croatian & 9th International Symposium on Agriculture.2014.
11. Mihaljević Žulj, Marin; Tomaz, Ivana; Maslov Bandić, Luna; Puhelek, Ivana; Jagatić Korenika, Ana Marija; Jeromel, Ana.Efekt dodatka amonijevog sulfata na metabolizam triptofana tijekom alkoholne fermentacije // 49th Croatian & 9th International Symposium on Agriculture.2014.
12. Puhelek, Ivana; Jagatić Korenika, Ana Marija; Mihaljević Žulj, Marin; Jeromel, Ana. Koncentracija organskih kiselina u vinima različitih klonskih kandidata kultivara Kraljevina(Vitis vinifera L.) // 48.Hrvatski i 8. Međunarodni simpozij Agronoma. 2013. 892-895

## 7. PRILOG

Prilog 1.1. Interakcija klon\*kvasac za osnovni kemijski sastav vina u 2011. godini

Klon	Kvasac	Ukupni fenoli (mg/L)		Alkohol (vol%)		Ekstrakt ukupni g/L		Šećer reducirajući g/L		Ekstrakt bez šećera g/L		Ukupne kiseline (kao vinska) g/L		Hlapive kiseline (kao octena) g/L		pH	
VV360	Affinity	188.59	AB	12.63	A	20.93	BCD	4.19	CDE	17.74	AB	6.05	CD	0.72	ABCD	3.25	A
VV360	VIN13	192.01	A	12.52	A	22.41	AB	6.23	ABC	17.18	ABC	5.95	CD	0.55	DE	3.22	AB
VV406	Affinity	159.58	EF	11.37	EF	19.05	EFGH	3.53	E	16.50	ABCDE	6.05	CD	0.78	AB	3.21	BC
VV406	VIN13	158.02	EF	11.40	EF	18.45	GHI	3.95	CDE	15.50	DEF	5.80	D	0.58	CDE	3.21	BC
VV423	Affinity	156.54	FG	11.62	CD	19.25	DEFGH	4.05	CDE	16.20	BCDE	6.05	CD	0.82	A	3.19	BCD
VV423	VIN13	184.42	AB	11.70	BC	23.30	A	8.10	A	16.20	BCDE	5.95	CD	0.66	ABCDE	3.22	AB
VV434	Affinity	166.13	CDE	11.42	EF	19.59	DEFG	3.10	E	17.50	ABC	6.05	CD	0.64	BCDE	3.20	BCD
VV434	VIN13	171.49	C	11.84	B	20.35	CDEF	3.35	E	18.00	A	6.18	BC	0.51	E	3.21	ABC
VV438	Affinity	143.65	H	11.23	FG	19.60	DEFG	3.55	E	17.05	ABCD	6.50	AB	0.58	CDE	3.21	ABC
VV438	VIN13	126.14	I	11.03	H	18.85	EFGHI	2.90	E	16.95	ABCDE	6.55	A	0.60	CDE	3.22	AB
VV479	Affinity	154.53	FG	11.35	EF	17.45	HI	3.05	E	15.40	DEF	6.73	A	0.60	CDE	3.18	CD
VV479	VIN13	149.22	GH	11.06	GH	17.08	I	3.68	DE	14.40	F	6.43	AB	0.63	BCDE	3.22	AB
VV482	Affinity	161.81	DEF	11.74	BC	18.55	FGHI	3.55	E	16.00	CDEF	6.65	A	0.65	ABCDE	3.25	A
VV482	VIN13	170.58	C	11.62	CD	20.50	CDE	6.10	ABCD	15.40	DEF	6.50	AB	0.67	ABCDE	3.22	AB
VV483	Affinity	182.41	B	11.67	BC	19.55	DEFG	4.20	CDE	16.35	ABCDE	6.70	A	0.69	ABCD	3.18	BCD
VV483	VIN13	171.24	C	11.77	BC	20.95	BCD	5.10	BCDE	16.85	ABCDE	6.55	A	0.74	ABC	3.16	D
VV486	Affinity	165.92	CDE	11.47	DE	18.80	EFGHI	3.95	CDE	15.90	CDEF	6.70	A	0.58	CDE	3.20	BC
VV486	VIN13	168.31	CD	11.39	EF	21.45	BC	7.15	AB	15.30	EF	6.20	BC	0.58	CDE	3.20	BCD

Prilog 1.1. Interakcija klon\*kvasac za osnovni kemijski sastav vina u 2011. godini

Klon	Kvasac	Pepeo g/L		Vinska		Jabučna		Mliječna		Limunska		Jantarna	
VV360	Affinity	1.98	CDEFG	3.32	GH	2.08	BCDEF	0.17	A	0.25	A	0.79	DE
VV360	VIN13	2.12	AB	3.14	H	2.12	BCD	0.11	AB	0.21	A	0.95	BCD
VV406	Affinity	1.96	CDEFG	3.53	FG	1.82	FG	0.11	AB	0.23	A	1.09	ABC
VV406	VIN13	1.99	CDEFG	3.43	GH	1.86	DEFG	0.08	B	0.29	A	1.11	ABC
VV423	Affinity	1.89	FG	3.95	DE	1.87	DEFG	0.13	AB	0.22	A	0.94	BCD
VV423	VIN13	1.91	EFG	3.80	EF	1.85	EFG	0.13	AB	0.20	A	1.07	ABC
VV434	Affinity	2.07	ABC	3.28	GH	2.83	A	0.11	AB	0.26	A	0.33	F
VV434	VIN13	2.03	BCD	3.27	GH	2.65	A	0.12	AB	0.24	A	1.14	AB
VV438	Affinity	1.89	G	3.78	EF	2.17	B	0.10	AB	0.23	A	0.96	BCD
VV438	VIN13	2.01	BCDEF	4.00	CDE	2.15	BC	0.13	AB	0.22	A	1.07	ABC
VV479	Affinity	1.59	H	3.43	GH	1.91	BCDEFG	0.09	AB	0.25	A	1.04	ABCD
VV479	VIN13	2.18	A	3.31	GH	1.96	BCDEFG	0.09	AB	0.23	A	1.26	A
VV482	Affinity	1.61	H	4.13	ABCD	1.81	G	0.14	AB	0.21	A	0.86	CDE
VV482	VIN13	1.67	H	4.05	BCDE	1.83	FG	0.14	AB	0.25	A	1.01	ABCD
VV483	Affinity	1.90	FG	4.23	ABCD	1.97	BCDEFG	0.12	AB	0.23	A	0.89	BCD
VV483	VIN13	2.12	AB	4.27	ABC	2.11	BCDE	0.14	AB	0.25	A	0.95	BCD
VV486	Affinity	2.02	BCDE	4.40	A	1.84	FG	0.15	AB	0.22	A	0.61	E
VV486	VIN13	1.92	DEFG	4.34	AB	1.89	CDEFG	0.09	AB	0.23	A	1.07	ABC

Prilog 1.2. Interakcija klon\*kvasac za osnovni kemijski sastav vina u 2012. godini

Klon	Kvasac	Ukupni fenoli (mg/L)		Alkohol (vol%)		Ekstrakt ukupni g/L		Šećer reducirajući g/L		Ekstrakt bez šećera g/L		Ukupne kiseline (kao vinska) g/L		Hlapive kiseline (kao octena) g/L	
VV360	Affinity	135.72	BCDE	11.87	A	19.70	A	4.10	ABCDE	16.60	AB	6.40	ABC	0.23	E
VV360	VIN13	141.80	AB	11.83	AB	19.30	ABC	3.95	ABCDE	16.35	ABC	6.20	BC	0.26	CDE
VV406	Affinity	132.88	CDEF	11.81	AB	19.40	ABC	3.95	ABCDE	16.45	ABC	6.80	A	0.35	ABCD
VV406	VIN13	136.31	BCDE	11.77	ABC	19.40	ABC	3.35	DE	17.05	A	6.65	ABC	0.39	AB
VV423	Affinity	129.29	EFG	11.69	CD	18.80	BCDEFG	3.70	CDE	16.10	ABC	6.80	A	0.31	BCDE
VV423	VIN13	134.55	BCDE	11.68	CD	19.25	ABCD	3.20	E	17.05	A	6.65	ABC	0.33	ABCDE
VV434	Affinity	123.06	GH	11.67	CD	19.40	ABC	3.85	BCDE	16.55	ABC	6.75	A	0.34	ABCDE
VV434	VIN13	118.10	H	11.61	D	19.10	ABCDE	3.85	BCDE	16.25	ABC	6.70	AB	0.31	BCDE
VV438	Affinity	124.43	GH	11.67	CD	19.10	ABCDE	4.30	ABCD	15.80	ABCD	6.75	A	0.32	ABCDE
VV438	VIN13	128.84	EFG	11.64	D	18.65	CDEFG	3.30	E	16.35	ABC	6.85	A	0.29	BCDE
VV479	Affinity	147.56	A	11.62	D	18.15	FG	4.55	ABC	14.60	D	6.65	ABC	0.24	DE
VV479	VIN13	126.65	FG	11.62	D	18.30	EFG	3.85	BCDE	15.45	BCD	6.75	A	0.37	ABC
VV482	Affinity	139.13	BCD	11.81	AB	19.00	ABCDEF	3.80	BCDE	16.35	ABC	6.75	A	0.34	ABCDE
VV482	VIN13	132.56	DEF	11.81	AB	19.65	AB	4.85	A	15.80	ABCD	6.70	AB	0.29	BCDE
VV483	Affinity	126.63	FG	11.77	ABC	19.55	AB	4.05	ABCDE	16.50	ABC	6.60	ABC	0.35	ABCDE
VV483	VIN13	140.26	ABC	11.73	BCD	18.40	DEFG	3.70	CDE	15.70	BCD	6.15	C	0.40	AB
VV486	Affinity	141.83	AB	11.66	CD	19.05	ABCDE	4.75	AB	15.30	CD	6.55	ABC	0.36	ABCD
VV486	VIN13	147.19	A	11.67	CD	18.10	G	3.70	CDE	15.40	BCD	6.80	A	0.44	A

Prilog 1.2. Interakcija klon\*kvasac za osnovni kemijski sastav vina u 2012. godini

Klon	Kvasac	pH		Pepeo g/L		Vinska		Jabučna		Mliječna		Limunska		Jantarna	
VV360	Affinity	3.21	AB	1.91	AB	4.99	G	2.33	EF	0.13	CDE	0.11	CD	0.55	A
VV360	VIN13	3.22	A	1.89	ABC	4.74	H	2.45	DE	0.16	ABCD	0.11	D	0.51	AB
VV406	Affinity	3.16	E	1.92	A	4.91	GH	1.93	G	0.14	BCDE	0.18	ABC	0.28	EFG
VV406	VIN13	3.15	E	1.88	ABC	5.01	G	1.89	G	0.14	BCDE	0.20	A	0.27	EFG
VV423	Affinity	3.18	BCDE	1.52	GHI	6.10	A	2.02	G	0.18	AB	0.19	A	0.28	EFG
VV423	VIN13	3.20	ABCD	1.60	FGH	6.05	AB	2.13	FG	0.16	ABCD	0.19	A	0.34	DEF
VV434	Affinity	3.16	DE	1.79	CD	5.31	F	2.75	ABCD	0.12	DE	0.17	ABCD	0.37	CDE
VV434	VIN13	3.16	DE	1.81	BCD	5.06	G	2.90	A	0.17	ABC	0.17	ABCD	0.48	ABC
VV438	Affinity	3.17	CDE	1.57	FGHI	5.59	DE	2.48	BCDE	0.20	A	0.18	AB	0.24	FG
VV438	VIN13	3.17	BCDE	1.61	EFG	5.39	EF	2.49	BCDE	0.18	AB	0.18	ABC	0.28	EFG
VV479	Affinity	3.16	E	1.33	K	5.38	EF	2.66	ABCD	0.18	AB	0.15	ABCD	0.43	BCD
VV479	VIN13	3.16	E	1.39	JK	5.43	EF	2.63	ABCDE	0.20	A	0.16	ABCD	0.34	DEF
VV482	Affinity	3.18	BCDE	1.31	K	6.03	AB	2.59	ABCDE	0.12	DE	0.20	A	0.24	FG
VV482	VIN13	3.17	BCDE	1.40	JK	6.18	A	2.70	ABCD	0.11	E	0.20	A	0.23	G
VV483	Affinity	3.20	ABCD	1.64	EF	5.73	CD	2.48	CDE	0.15	BCDE	0.17	ABCD	0.21	G
VV483	VIN13	3.20	ABC	1.71	DE	5.83	BCD	2.53	BCDE	0.12	DE	0.15	ABCD	0.20	G
VV486	Affinity	3.17	CDE	1.51	HI	5.84	BC	2.79	AB	0.16	ABCD	0.11	D	0.21	G
VV486	VIN13	3.16	DE	1.49	IJ	5.85	BC	2.79	ABC	0.12	DE	0.12	BCD	0.25	FG

Prilog 1.3 Interakcija klon\*kvasac za aromatski profil vina u 2011. godini

2011	Kvasac	Beta-damaskenon		Alpha-ionon		Beta-ionon		$\Sigma$ C13 norisoprenoida		Etil butirac		Izoamil acetat		Etil kaproat		Etil kaprilat	
VV360	affinity	3.33	HIJ	1.09	C	0	E	4.41	DE	11.78	K	3734	CD	147.01	K	559.2	G
VV360	Vin13	4.02	DEFG	1.37	AB	0	E	5.39	B	50.17	EF	2552.4	J	171.03	I	309.5	K
VV406	affinity	3.89	EFG	0.84	DE	0.12	D	4.84	CD	28.35	HI	3181	GH	114.9	M	609.18	E
VV406	Vin13	4.18	CDE	1.47	A	0.02	E	5.66	AB	78.03	C	2505.7	J	192.92	H	273.46	M
VV423	affinity	2.9	J	0.44	F	0.43	C	3.77	F	35.28	GH	2581.15	IJ	744.8	B	774.1	C
VV423	Vin13	4	DEFG	0.75	E	0.03	E	4.77	D	70.95	CD	2302.4	K	130.07	L	367.5	J
VV434	affinity	2.32	K	0.75	E	0.51	B	3.57	F	27.64	HIJ	3868.6	BC	385.64	F	517	H
VV434	Vin13	3.74	EFGH	0.89	DE	0.02	E	4.64	D	35.1	GH	3031.85	H	622.05	D	733.64	D
VV438	affinity	3.63	FGHI	0.76	E	0.12	D	4.5	D	96.93	A	4402.5	A	105.85	N	794.1	B
VV438	Vin13	3.61	GHI	0.88	DE	0.13	D	4.62	D	57.57	E	3578.55	DE	819.39	A	248.15	N
VV479	affinity	3.12	IJ	1.35	AB	0.91	A	5.37	B	74.82	C	2747.95	I	278.86	G	578.83	F
VV479	Vin13	4.16	CDEF	1.23	BC	0	E	5.39	B	88.68	B	3054.15	H	687.6	C	273	M
VV482	affinity	5.27	A	0.84	DE	0	E	6.11	A	27.17	IJ	3235.6	FG	751.3	B	298.65	L
VV482	Vin13	5.06	AB	0.77	DE	0.03	E	5.86	AB	42.74	FG	3117	GH	175.69	I	115.5	P
VV483	affinity	3.02	J	0.76	E	0.16	D	3.94	EF	48.18	F	3977	B	195.55	H	425.86	I
VV483	Vin13	4.57	BC	0.82	DE	0.04	E	5.43	B	66.98	D	3544.5	E	155.81	J	227.22	O
VV486	affinity	4.45	CD	0.92	D	0	E	5.36	BC	20.1	J	2518.05	J	473.37	E	918.17	A
VV486	Vin13	3.99	DEFG	0.75	E	0.01	E	4.75	D	57.68	E	3364.05	F	153.65	JK	228.5	O



Prilog 1.3 Interakcija klon\*kvasac za aromatski profil vina u 2011. godini

2011	Kvasac	Dietyl sukcinat		Σ estera		2-heksanal		1-heksanol		2-heksen-1-ol		2-fenil -etanol		Σ C6-alkohola		Trans- ruža oksid	
VV360	affinity	169.55	A	4621.54	CD	0		1.74	CDE	0		4469.05	G	4470.79	F	0	
VV360	Vin13	147.8	C	3230.89	I	0		1.81	CDE	0		4014	IJ	4015.81	HI	0	
VV406	affinity	130.15	EF	4063.57	EF	0		2.01	CDE	0		5246.05	C	5248.06	B	2.62	
VV406	Vin13	151.39	C	3201.49	I	0		1.54	CDE	0		4706.1	F	4707.64	E	2.08	
VV423	affinity	110.77	H	4246.1	E	1.02		1.36	DE	0		4777.95	EF	4780.33	DE	0	
VV423	Vin13	122.11	G	2993.03	J	1.41		1.7	CDE	0		3999.75	IJ	4002.86	HI	0	
VV434	affinity	104.24	I	4903.12	B	0		1.69	CDE	0.86		5053.55	D	5056.1	C	0	
VV434	Vin13	132.48	DE	4555.11	D	1.21		1.24	E	0.87		3017.2	M	3020.53	L	0	
VV438	affinity	123.44	G	5522.81	A	0		3.79	AB	0		3945	J	3948.79	I	0	
VV438	Vin13	137.16	D	4840.82	B	0		4.55	A	0		2682.25	N	2686.8	M	2.25	
VV479	affinity	146.96	C	3827.42	G	0		1.5	CDE	0		5678.1	A	5679.6	A	0	
VV479	Vin13	125.05	FG	4228.48	E	0		1.79	CDE	0		3702.15	K	3703.94	J	0	
VV482	affinity	164.85	AB	4477.57	D	1.23		3.76	AB	0		4276.95	H	4281.94	G	0	
VV482	Vin13	111.75	H	3562.68	H	2.33		1.82	CDE	0		4148.7	HI	4152.85	GH	0	
VV483	affinity	135.17	DE	4781.75	BC	0		2.27	C	2.52		3276.08	L	3280.86	K	0	
VV483	Vin13	133.13	DE	4127.64	EF	0		2.18	CD	1.61		2223.15	O	2226.93	N	2.22	
VV486	affinity	111.73	H	4041.43	F	1.3		3.18	B	4.82		5514.65	B	5523.96	A	0	
VV486	Vin13	161.31	B	3965.2	FG	2.03		1.89	CDE	5.23		4895.6	DE	4904.75	CD	2.42	

Prilog 1.3 Interakcija klon\*kvasac za aromatski profil vina u 2011. godini

2011	Kvasac	Cis-ruža oksid		Geraniol		Linalol		Geranijska kiselina		Alpha-terpineol		2-fenil-etanol		Citronelol		Nerol		Σ monoterpena	
VV360	affinity	0		1.37	EF	1.03	H	1.15	FGH	2.64	F			6.58	B	0	H	12.76	GHIJ
VV360	Vin13	0		1.75	D	6.14	EFG	1.29	DEF	2.03	HI			5.42	D	1.48	B	18.09	DEFG
VV406	affinity	3.82		1.23	FG	2.14	FGH	1.67	AB	3.03	D			1.71	J	0	H	16.21	EFGH
VV406	Vin13	4.02		2.16	A	13.56	CD	1.51	BC	2.76	EF			2.19	I	1.24	CDE	29.51	C
VV423	affinity	0		1.41	E	3.47	FGH	1.28	DEF	3.03	D			1.19	L	0	H	10.37	IJ
VV423	Vin13	0		1.95	B	12.39	D	1.34	DE	2.06	GHI			1.32	KL	1.46	B	20.51	DE
VV434	affinity	0		1.37	EF	1.24	GH	1.07	GH	3.83	B			2.05	I	1.03	G	10.58	HIJ
VV434	Vin13	0		1.12	GH	6.19	EF	1.12	GH	3.44	C			4.23	F	1.09	EFG	17.19	DEFG
VV438	affinity	0		1.26	EFG	1.07	H	1.06	H	1.34	K			1.45	K	1.04	FG	7.22	J
VV438	Vin13	7.31		1.31	EF	23.99	A	1.33	DE	3.53	C			3.15	G	1.83	A	44.68	A
VV479	affinity	0		1.04	H	2.72	FGH	1.22	DEFG	3.13	D			2.52	H	0	H	10.63	HIJ
VV479	Vin13	0		1.77	CD	10.86	DE	1.52	BC	1.48	K			1.22	KL	1.2	DEF	18.04	DEFG
VV482	affinity	0		1.37	EF	4.38	FGH	1.14	FGH	2.25	G			5.14	E	0	H	14.27	FGHI
VV482	Vin13	0		1.8	BCD	14.86	BCD	1.7	A	1.79	J			1.23	KL	1.26	CD	22.63	D
VV483	affinity	0		1.32	EF	1.64	FGH	1.06	H	6.71	A			1.12	L	1.67	A	14.16	FGHI
VV483	Vin13	9.31		1.93	BC	18.16	BC	1.21	EFGH	2.13	GH			6.14	C	1.4	BC	42.03	AB
VV486	affinity	0		1.28	EFG	5.87	FGH	1.11	GH	2.92	DE			7.55	A	0	H	18.73	DEF
VV486	Vin13	7.63		1.79	BCD	18.73	B	1.37	CD	1.86	IJ			1.26	KL	1.69	A	36.75	B

Prilog 1.4 Interakcija klon\*kvasac za aromatski profil vina u 2012. godini

2012	Kvasac	Beta-damaskenon		Alpha-ionon		Beta-ionon		Σ C13 norisoprenoida		Etil butirat		Izoamil acetat		Etil kaproat		Etil kaprilat	
VV360	affinity	7.17	FG	1.68	EF	0.02	EF	8.88	DE	80.58	B	3947.30	A	134.93	L	336.31	B
VV360	Vin13	5.94	HI	2.51	A	0.02	F	8.46	DE	44.99	FG	3064.30	D	257.96	J	131.80	IJ
VV406	affinity	9.75	BC	1.55	FG	0.08	E	11.37	BC	37.68	GH	2201.50	H	115.88	M	147.60	H
VV406	Vin13	8.88	CDE	2.08	B	0.03	EF	10.99	C	72.45	BC	1928.85	I	493.45	G	183.98	E
VV423	affinity	8.11	DEF	1.11	H	0.00	F	9.22	D	89.80	A	1900.85	I	507.01	F	127.64	JK
VV423	Vin13	11.45	A	2.37	A	0.02	EF	13.84	A	65.22	CD	1623.15	J	484.05	G	121.73	L
VV434	affinity	4.64	J	1.48	G	0.14	D	6.26	F	96.21	A	3510.00	B	134.58	L	133.75	I
VV434	Vin13	4.08	J	1.75	DE	0.04	EF	5.88	F	65.89	CD	2364.10	FG	518.89	E	121.14	L
VV438	affinity	9.78	BC	1.53	FG	0.06	EF	11.37	BC	30.63	HI	2794.80	E	714.36	A	379.50	A
VV438	Vin13	9.05	CD	1.95	BC	0.36	A	11.36	BC	65.13	CD	3027.35	D	136.93	L	163.70	G
VV479	affinity	9.89	BC	1.63	EFG	0.04	EF	11.56	BC	64.04	D	1455.65	K	181.20	K	190.45	D
VV479	Vin13	10.74	AB	1.73	DE	0.04	EF	12.50	B	70.21	CD	1010.40	L	456.75	H	177.11	F
VV482	affinity	7.82	EF	0.82	I	0.21	BC	8.84	DE	32.83	HI	3306.00	C	626.02	B	192.78	D
VV482	Vin13	6.67	GH	1.22	H	0.00	F	7.89	E	52.09	EF	2430.55	F	565.24	D	126.59	K
VV483	affinity	5.11	IJ	0.86	I	0.26	B	6.23	F	42.97	G	3426.90	BC	141.39	L	144.25	H
VV483	Vin13	8.49	DE	1.90	CD	0.01	F	10.40	C	53.95	E	3272.65	C	614.40	C	109.24	N
VV486	affinity	4.19	J	0.81	I	0.17	CD	5.16	F	27.67	I	2245.35	GH	358.95	I	114.54	M
VV486	Vin13	4.00	J	1.21	H	0.05	EF	5.25	F	44.24	FG	1468.50	JK	569.75	D	272.85	C

Prilog 1.4 Interakcija klon\*kvasac za aromatski profil vina u 2012. godini

2012	Kvasac	Diethyl succinat		Σ estera		2-heksanal		1-heksanol		2-heksen-1-ol		2-fenil -etanol		Σ C6-alkohola		Trans- ruža oksid	
VV360	affinity	114.92	G	4614.04	A	0.00		1.56	CDE	0.00		4720.10	J	4721.66	J	0.00	
VV360	Vin13	163.10	C	3662.15	E	0.00		1.74	BCD	0.00		3998.40	K	4000.14	K	2.41	
VV406	affinity	122.29	F	2624.95	I	0.00		1.48	DE	0.00		6089.35	F	6090.83	F	0.00	
VV406	Vin13	167.61	C	2846.34	H	0.00		1.63	CDE	0.00		5742.50	G	5744.13	G	0.00	
VV423	affinity	189.94	B	2815.24	H	1.23		1.36	E	0.00		4995.40	HI	4997.98	HI	0.00	
VV423	Vin13	148.04	D	2442.18	J	1.27		1.86	BC	0.00		3484.10	L	3487.23	L	0.00	
VV434	affinity	119.99	FG	3994.52	CD	0.00		1.53	CDE	0.00		5138.05	H	5139.58	H	0.00	
VV434	Vin13	117.70	FG	3187.71	G	1.14		1.85	BC	0.00		3492.00	L	3494.99	L	0.00	
VV438	affinity	121.25	F	4040.54	C	0.00		1.52	CDE	0.00		6005.55	F	6007.07	F	0.00	
VV438	Vin13	148.43	D	3541.53	E	0.00		1.31	E	0.00		1998.61	N	1999.92	N	2.26	
VV479	affinity	142.95	DE	2034.29	K	0.00		1.55	CDE	0.00		8030.80	B	8032.35	B	0.00	
VV479	Vin13	139.68	E	1854.14	L	0.00		1.74	BCD	0.00		3252.25	M	3253.99	M	0.00	
VV482	affinity	198.62	A	4356.24	B	1.68		3.32	A	0.00		7630.65	C	7635.64	C	0.00	
VV482	Vin13	187.35	B	3361.81	F	2.20		1.62	CDE	0.00		6691.00	D	6694.81	D	0.00	
VV483	affinity	121.05	F	3876.55	D	2.82		2.01	B	0.00		5614.55	G	5619.37	G	0.00	
VV483	Vin13	196.53	A	4246.77	B	2.27		1.64	CDE	0.00		4884.68	IJ	4888.59	IJ	2.08	
VV486	affinity	119.96	FG	2866.46	H	2.16		3.10	A	0.00		9481.40	A	9486.66	A	0.00	
VV486	Vin13	198.36	A	2553.70	IJ	0.00		1.67	BCDE	0.00		6455.85	E	6457.52	E	2.25	

Prilog 1.4 Interakcija klon\*kvasac za aromatski profil vina u 2012. godini

2012	Kvasac	Cis-ruža oksid		Geraniol		Linalol		Geranijska kiselina		Alpha-terpineol		2-fenil - etanol		Citronelol		Nerol		Σ monoterpena	
VV360	affinity	0.00		1.86	EF	1.40	B	1.13	GHI	1.75	GHI			3.99	B	1.44	A	11.56	BC
VV360	Vin13	7.42		2.27	CD	7.09	AB	1.79	A	1.78	GHI			2.76	F	1.43	A	21.91	ABC
VV406	affinity	0.00		1.92	EF	7.34	AB	1.33	EF	3.06	D			1.84	H	1.37	ABC	16.84	ABC
VV406	Vin13	0.00		1.99	E	6.47	AB	1.36	DE	3.03	D			1.67	H	1.38	ABC	15.88	ABC
VV423	affinity	0.00		1.29	H	8.58	AB	1.16	GHI	2.46	EF			1.65	H	0.00	G	15.13	ABC
VV423	Vin13	0.00		2.75	B	6.54	AB	1.72	AB	1.78	GHI			2.07	G	1.22	CDE	16.07	ABC
VV434	affinity	0.00		2.26	CD	1.76	AB	1.13	GHI	5.01	A			3.94	B	1.44	A	15.54	ABC
VV434	Vin13	0.00		2.03	DE	9.02	AB	1.06	HI	3.60	C			1.03	J	1.37	ABC	18.10	ABC
VV438	affinity	0.00		1.90	EF	1.08	B	1.21	FGH	1.87	GH			1.16	IJ	1.41	AB	8.61	C
VV438	Vin13	5.02		3.91	A	8.21	AB	1.56	C	3.89	C			3.03	E	1.03	F	28.91	A
VV479	affinity	0.00		1.46	GH	2.34	AB	1.23	EFG	1.69	HI			3.42	D	1.44	A	11.58	BC
VV479	Vin13	0.00		2.35	C	9.99	AB	1.51	CD	1.73	GHI			2.28	G	1.36	ABCD	19.20	ABC
VV482	affinity	0.00		1.51	GH	1.38	B	1.62	BC	2.20	FG			3.66	C	1.20	DE	11.55	BC
VV482	Vin13	0.00		1.26	H	12.13	A	1.84	A	2.80	DE			7.11	A	1.24	BCDE	26.37	AB
VV483	affinity	0.00		2.04	DE	1.18	B	1.05	I	4.46	B			1.30	I	1.17	EF	11.75	BC
VV483	Vin13	1.72		2.49	BC	5.64	AB	1.86	A	1.34	I			1.69	H	1.18	EF	14.77	ABC
VV486	affinity	0.00		1.33	H	1.09	B	1.07	HI	1.97	FGH			1.35	I	1.35	ABCD	8.13	C
VV486	Vin13	9.66		1.67	FG	7.28	AB	1.26	EFG	1.50	HI			1.73	H	1.31	ABCDE	20.68	ABC

Prilog 1.5 Interakcija klon\*kvasac za aminokiselinski profil vina u 2011. godini

2011	Kvasac	Glu		Asp		Cys		Ser		His		Gly		Thr		Arg	
VV360	affinity	10.82	CD	18.43	B	34.39	B	3.82	CD	17.06	H	5.24	B	6.24	B	54.80	B
VV360	Vin13	13.67	A	21.22	A	38.96	A	5.37	B	13.18	IJ	4.04	EF	5.51	BCD	76.60	A
VV406	affinity	6.88	IJKL	6.80	JK	13.01	HIJ	1.75	FG	15.43	HI	2.47	K	2.23	GHI	14.63	H
VV406	Vin13	8.20	GHI	10.10	GHI	16.13	FGH	1.36	GH	18.36	GH	3.84	FG	3.10	FGH	9.87	I
VV423	affinity	9.83	DE	14.01	EF	20.69	D	1.06	H	24.89	DE	2.13	L	1.53	I	26.50	EF
VV423	Vin13	7.25	HIJ	18.06	BC	24.70	C	4.24	C	28.20	BC	5.02	C	8.10	A	30.83	D
VV434	affinity	9.58	DEF	16.67	BCD	24.19	C	4.22	C	8.74	L	4.11	E	3.31	EFG	51.83	B
VV434	Vin13	11.95	BC	15.59	DE	20.42	DE	2.29	E	22.30	EF	7.60	A	4.31	DEF	19.07	G
VV438	affinity	8.49	FGH	7.23	JK	18.80	DEF	1.92	EF	12.56	IJK	3.68	GH	1.95	HI	10.11	I
VV438	Vin13	7.06	IJK	5.79	KL	11.36	IJ	1.44	FGH	9.50	L	3.23	I	2.46	GHI	4.62	J
VV479	affinity	5.65	L	4.34	L	12.08	IJ	1.30	GH	10.14	KL	2.47	K	1.54	I	5.50	J
VV479	Vin13	5.61	L	8.90	IJ	15.81	FGH	0.96	H	20.04	FG	2.21	L	2.04	HI	7.19	IJ
VV482	affinity	12.32	B	15.06	DE	19.99	DE	8.08	A	30.27	B	2.75	J	5.50	BCD	40.21	C
VV482	Vin13	8.69	EFG	15.88	CDE	21.88	CD	3.98	C	37.09	A	4.45	D	6.08	BC	24.25	F
VV483	affinity	8.84	EFG	9.61	HI	17.44	EFG	3.33	D	26.71	CD	3.62	H	4.47	DE	28.61	DE
VV483	Vin13	5.80	KL	12.02	FG	19.00	DEF	2.32	E	30.11	B	2.08	L	4.93	CD	18.08	GH
VV486	affinity	6.11	JKL	4.11	L	10.02	J	1.39	GH	11.06	JKL	2.52	K	1.59	I	8.30	IJ
VV486	Vin13	6.64	JKL	11.29	GH	14.54	GHI	1.21	H	20.95	FG	2.78	J	2.44	GHI	10.56	I

Prilog 1.5 Interakcija klon\*kvasac za aminokiselinski profil vina u 2011. godini

2011	Kvasac	Ala		Tyr		Val		Met		Phe		Ile		Leu		Lys	
VV360	affinity	23.95	A	54.63	A	3.30	B	4.42	C	0.00		3.28	C	15.02	C	9.32	B
VV360	Vin13	19.20	C	43.37	B	4.58	A	6.00	B	0.00		5.15	A	20.08	A	10.14	A
VV406	affinity	16.90	E	1.40	D	0.72	GH	2.72	FG	0.00		1.92	F	8.76	GH	3.27	K
VV406	Vin13	12.21	I	1.32	D	1.60	E	4.48	C	0.00		2.91	CD	11.82	D	5.93	F
VV423	affinity	15.53	F	3.80	D	1.57	E	0.25	I	0.00		0.31	K	9.76	FG	3.89	J
VV423	Vin13	20.81	B	3.96	D	3.47	B	3.80	D	0.00		3.30	C	13.87	C	7.48	E
VV434	affinity	18.18	CDE	37.67	B	3.41	B	3.52	DE	0.00		2.13	EF	10.40	EF	8.19	D
VV434	Vin13	15.15	FG	2.22	D	2.66	C	6.77	A	0.00		5.42	A	18.19	B	6.12	F
VV438	affinity	18.87	CD	2.12	D	1.11	FG	3.28	E	0.00		1.77	FG	8.28	HI	5.12	G
VV438	Vin13	18.42	CD	0.34	D	0.93	GH	4.34	C	0.00		2.79	D	10.33	F	2.34	L
VV479	affinity	17.67	DE	0.86	D	0.82	GH	2.33	G	0.00		1.00	HI	6.13	J	3.97	J
VV479	Vin13	12.61	HI	1.05	D	0.61	H	2.34	G	0.00		1.39	GH	7.30	IJ	4.64	H
VV482	affinity	19.01	CD	28.78	C	2.63	C	0.14	I	0.00		0.84	IJ	13.90	C	9.98	A
VV482	Vin13	18.66	CD	3.79	D	3.11	B	4.31	C	0.00		3.96	B	14.97	C	8.63	C
VV483	affinity	13.93	GH	2.25	D	1.37	EF	3.11	EF	0.00		2.50	DE	11.56	DE	4.41	HI
VV483	Vin13	14.65	FG	1.58	D	1.64	E	2.52	G	0.00		1.99	F	8.82	GH	4.20	IJ
VV486	affinity	17.85	CDE	1.50	D	0.88	GH	1.72	H	0.00		0.42	JK	4.90	K	3.12	K
VV486	Vin13	15.37	F	2.07	D	2.11	D	2.60	G	0.00		2.20	EF	9.80	FG	7.46	E

Prilog 1.6 Interakcija klon\*kvasac za aminokiselinski profil vina u 2012. godini

2012	Kvasac	Glu		Asp		Cys		Ser		His		Gly		Thr		Arg	
VV360	affinity	17.74	A	15.30	A	31.75	A	3.91	C	19.87	AB	5.64	F	5.83	A	42.62	A
VV360	Vin13	8.80	CD	14.04	B	26.92	BC	4.84	B	17.36	CD	5.79	EF	1.91	E	13.23	D
VV406	affinity	5.16	EF	5.53	G	17.36	FG	1.63	FG	13.92	EF	2.23	K	1.79	EF	8.59	GH
VV406	Vin13	4.80	F	7.34	EF	18.63	EF	1.42	GH	20.75	A	7.18	C	0.69	J	9.73	FGH
VV423	affinity	4.58	F	4.24	H	21.78	D	1.24	HI	11.54	FGH	4.52	GH	1.58	EFG	15.99	C
VV423	Vin13	9.76	BCD	11.09	C	19.82	DE	1.32	H	12.15	FGH	8.26	B	1.34	GH	12.91	DE
VV434	affinity	10.94	B	11.74	C	27.89	B	1.89	F	13.35	EFG	3.56	I	3.14	B	21.55	B
VV434	Vin13	9.93	BC	13.43	B	24.80	C	2.63	D	7.15	I	1.93	K	2.76	C	16.42	C
VV438	affinity	8.43	D	8.10	DE	14.46	H	1.81	F	10.73	H	4.66	GH	3.28	B	11.18	DEF
VV438	Vin13	6.49	E	11.23	C	21.22	D	1.88	F	18.08	BC	9.98	A	1.84	EF	10.47	EFG
VV479	affinity	2.25	H	2.14	I	15.66	GH	1.81	F	7.98	I	2.89	J	1.04	HIJ	5.65	IJ
VV479	Vin13	2.15	H	2.08	I	13.52	H	2.30	E	5.72	I	6.25	DE	0.96	IJ	7.56	HI
VV482	affinity	4.32	FG	3.43	H	18.02	EFG	7.62	A	11.17	GH	4.63	GH	2.32	D	5.61	IJ
VV482	Vin13	9.19	CD	8.73	D	20.15	DE	3.85	C	20.68	A	1.24	L	1.81	EF	13.42	D
VV483	affinity	3.03	GH	3.77	H	17.98	EFG	1.17	HI	11.81	FGH	4.17	H	1.53	FG	4.38	J
VV483	Vin13	4.31	FG	7.42	EF	17.90	EFG	2.78	D	14.84	E	8.58	B	1.24	GHI	9.64	FGH
VV486	affinity	6.47	E	6.75	F	22.00	D	1.28	HI	15.20	DE	4.94	G	2.37	D	9.21	FGH
VV486	Vin13	4.82	F	5.69	G	17.10	FG	1.03	I	3.28	J	6.63	D	2.62	CD	8.22	GH



Prilog 1.6 Interakcija klon\*kvasac za aminokiselinski profil vina u 2012. godini

2012	Kvasac	Ala		Tyr		Val		Met		Phe		Ile		Leu		Lys	
VV360	affinity	18.44	AB	4.17	C	2.44	B	1.14	F	0.00		6.53	A	24.77	A	6.32	B
VV360	Vin13	16.19	CD	0.03	E	2.14	B	0.29	G	1.48		0.05	I	12.32	E	4.63	D
VV406	affinity	15.90	CDE	0.57	DE	0.59	D	1.12	F	0.00		0.41	G	8.89	G	2.25	G
VV406	Vin13	10.91	GH	0.98	CDE	1.21	C	1.17	F	2.28		0.03	I	6.97	I	4.21	E
VV423	affinity	10.39	H	0.47	DE	0.00	F	2.30	CD	0.00		0.80	F	5.55	J	4.27	DE
VV423	Vin13	17.51	BC	0.00	E	0.00	F	0.05	G	1.09		0.05	I	7.84	H	3.34	F
VV434	affinity	18.42	AB	2.12	CDE	0.76	CD	5.43	A	0.00		0.37	GH	15.25	CD	1.40	H
VV434	Vin13	17.34	BC	16.13	A	2.46	B	0.43	G	5.80		1.79	D	15.81	BC	5.90	C
VV438	affinity	11.75	GH	1.37	CDE	0.54	DE	5.67	A	0.00		2.86	B	12.60	E	6.71	B
VV438	Vin13	15.01	DE	2.35	CDE	2.63	B	1.39	EF	4.07		1.12	E	10.52	F	3.08	F
VV479	affinity	17.21	BC	0.00	E	0.00	F	1.34	F	0.00		0.00	I	2.67	L	4.57	DE
VV479	Vin13	11.62	GH	0.00	E	0.00	F	0.00	G	0.00		0.00	I	2.95	L	1.33	H
VV482	affinity	11.01	GH	0.82	DE	0.00	F	0.43	G	0.00		0.88	EF	16.00	B	9.82	A
VV482	Vin13	14.18	EF	3.53	CD	4.09	A	2.83	C	3.76		2.24	C	14.95	D	9.94	A
VV483	affinity	19.80	A	0.00	E	0.00	F	2.03	DE	0.00		0.16	HI	4.30	K	4.59	DE
VV483	Vin13	12.84	FG	0.00	E	1.26	C	1.33	F	1.22		0.00	I	7.90	H	2.17	G
VV486	affinity	14.00	EF	0.00	E	0.03	EF	1.12	F	0.00		0.34	GH	9.08	G	3.00	F
VV486	Vin13	11.70	GH	10.75	B	0.28	DEF	4.09	B	2.63		0.00	I	7.44	HI	1.96	G