

Učinak fermentacije kvascima *Lachancea thermotolerans* i *Torulaspora delbrueckii* na kemijski sastav vina 'Malvazija istarska'

Marinov, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:204:352790>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Učinak fermentacije kvascima *Lachancea thermotolerans* i *Torulaspora delbrueckii* na kemijski sastav vina 'Malvazija istarska'

DIPLOMSKI RAD

Luka Marinov

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Hortikultura – Vinogradarstvo i vinarstvo

Učinak fermentacije kvascima *Lachancea thermotolerans* i *Torulaspora delbrueckii* na kemijski sastav vina 'Malvazija'

DIPLOMSKI RAD

Luka Marinov

Mentor:

doc.dr.sc. Ana-Marija Jagatić Korenika

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Luka Marinov**, JMBAG 0177044600, rođen 03.04.1995. u Splitu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

UČINAK FERMENTACIJE KVASCIMA *LACHANCEA THERMOTELERANS* I *TORULASPORA DELBRUECKII* NA KEMIJSKI SASTAV VINA 'MALVAZIJA'

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Luka Marinov**, JMBAG 0177044600, naslova

UČINAK FERMENTACIJE KVASCIMA *LACHANCEA THERMOTELERANS* I *TORULASPORA DELBRUECKII* NA KEMIJSKI SASTAV VINA 'MALVAZIJA'

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. doc.dr.sc. Ana-Marija Jagatić Korenika, mentor

2. prof.dr.sc. Ana Jeromel, član

3. prof.dr.sc. Sanja Sikora, član

Zahvala

Ovime zahvaljujem svim profesorima Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo na poticanju interesa i pruženom znanju, svojoj obitelji na podršci tokom studija te enologu Milanu Budinskom na prenesenom znanju i posvećenom vremenu tokom mog boravka u Agrolaguni.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Cilj istraživanja | 2 |
| 2. Pregled literature | 3 |
| 2.1. Ne- <i>Saccharomyces</i> kvasci | 3 |
| 2.2. Sekvencionalna inokulacija | 6 |
| 2.3. Malvazija istarska..... | 6 |
| 2.4. Organske kiseline | 8 |
| 2.5. Arome | 11 |
| 3. Materijali i metode | 18 |
| 3.1. Agrolaguna d.d. Poreč | 18 |
| 3.2. Prerada grožđa..... | 18 |
| 3.3. Proizvodnja vina..... | 19 |
| 3.4. Osnovna analiza vina..... | 20 |
| 3.5. ‘Pinking test’ | 21 |
| 3.6. Analiza pojedinačnih aromatskih spojeva | 21 |
| 3.7. Senzorna analiza..... | 22 |
| 3.8. Statistička analiza | 22 |
| 4. Rezultati i rasprava | 23 |
| 4.1. Alkoholna fermentacija | 23 |
| 4.2. Ukupna kiselost i hlapljive kiseline..... | 24 |
| 4.3. ‘Pinking’ test..... | 24 |
| 4.4. Aromatski profil vina | 25 |
| 4.5. Senzorna analiza..... | 29 |
| 5. Zaključak..... | 31 |

| | |
|--------------------|----|
| 6. Literatura..... | 32 |
| 7. Životopis..... | 35 |

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Luka Marinov**, naslova

Učinak fermentacije kvascima *Lachancea thermotolerans* i *Torulospora delbrueckii* na kemijski sastav vina 'Malvazija istarska'

Suočavajući se sa sve drastičnijim klimatskim promjenama traže se nove metode u tehnologiji proizvodnje vina posebice bijelih, kako bi se očuvale primarne arome te postigla ravnoteža alkohola i kiselina. Kao potencijalno rješenje nudi se primjena ne-*Saccharomyces* kvasaca čiji se metabolizam razlikuje od *Saccharomyces* kvasaca. U ovom istraživanju analiziran je utjecaj sekvencionalne inokulacije *Torulospora delbrueckii* i *Lachancea thermotolerans* sa *Saccharomyces* kvascem na vino 'Malvazija istarska'. Malvazija istarska je druga najrasprostranjenija bijela sorta u Hrvatskoj, a time i jedna od gospodarski najvažnijih sorti. Istraživanje je obuhvatilo inokulacije mošta s ne-*Saccharomyces* kvascima, a 48 h kasnije i sa sojem *S. cerevisiae* QA23 i fermentaciju isključivo sa *S. cerevisiae* QA23. Ne-*Saccharomyces* kvasci su utjecali na smanjenje koncentracije etanola, posebice *T. delbrueckii* koji u ko-kulturi s *S. cerevisiae* nije bio sposoban fermentirati značajnu količinu fruktoze, a *L. thermotolerans* pretvorboom šećera u mliječnu kiselinu. Iako su uočene razlike unutar aromatskog profila, ni jedan ne-*Saccharomyces* soj nije značajno utjecao na ukupnu aromu vina. Bez obzira što je miris, boja i intenzitet boje najbolje ocijenjen u uzorku proizvedenim sa sojem *S. cerevisiae*, prvo mjesto metodom redoslijeda pripalo je Malvaziji *T. delbrueckii* koju je većina ocjenjivača odabrala kao najbolje vino.

Ključne riječi: Ne-*Saccharomyces*, 'Malvazija istarska', *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*

Summary

Of the master's thesis – student **Luka Marinov**, entitled

Effect of fermentation with *Lachancea thermotolerans* and *Torulospora delbrueckii* on chemical composition of 'Malvasia istriana' wine

As we face drastic climate change, new methods are being sought in the technology of wine production, especially in production of white wines, in order to preserve the primary aromas and achieve the desired balance of alcohols and acids. As a potential solution the use of non-*Saccharomyces* yeasts whose metabolism differs from *Saccharomyces* yeasts is suggested. In this study the influence of sequential inoculation with *Torulospora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* on 'Malvasia istriana' wine was studied and analyzed. 'Malvasia istriana' is the second most widespread white grape variety in Croatia and thus one of the most economically important varieties. The study included inoculations of must with non-*Saccharomyces* yeasts, and 48 h later with *S. cerevisiae* QA23 strain and fermentation exclusively with *S. cerevisiae* QA23. Non-*saccharomyces* yeasts contributed to lower ethanol concentration, especially *T. delbrueckii* which in co-culture with *S. cerevisiae* was not able to ferment a significant amount of fructose and *L. thermotolerans* by converting sugar to lactic acid. Although differences within the aromatic profile were observed, none of the non-*Saccharomyces* strains significantly affected the overall wine aroma. Although the aroma, color and color intensity were best evaluated in the sample produced with the *S. cerevisiae* strain, the first place by the ranking method went to Malvasia *T. delbrueckii*, which was chosen as the best wine by most evaluators.

Keywords: Non-*Saccharomyces*, 'Malvasia istriana' *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*

1. UVOD

Vino je produkt kompleksne biološke i biokemijske interakcije između grožđa i mikroorganizama (gljivice, kvasci, mliječno kisele i octene bakterije) te mikovirusa i bakteriofaga koji utječu na njih (Fleet 2003.). Cijeli proces počinje u vinogradu, nastavlja se kroz fermentaciju i dozrijevanje te se zaključuje punjenjem (Jolly et al. 2006.).

S obzirom da kvasci provode alkoholnu fermentaciju imaju najvažniju ulogu među mikroorganizmima. Doprinosе okusu i kvaliteti vina produkcijom metabolita tokom rasta i autolizom staničnih stjenki. Kvasci koji su prisutni tokom fermentacije potječu s grožđa i iz vinograda, opreme koja se koristi u podrumu i vanjskih izvora kao što su selekcionirane kulture koje se dodaju za kontroliranu fermentaciju (Jolly et al. 2006.).

Zbog sve češćih problema u vinogradarskoj-vinarskoj proizvodnji nastalih uslijed klimatskih promjena, traže se nova rješenja za korekciju visokih koncentracija šećera, niske ukupne kiselosti i za očuvanje primarnih aroma. Kao moguće rješenje problema, neki od trenutno aktualnih enoloških protokola uključuju primjenu ne-*Saccharomyces* kvasaca za provođenje alkoholne fermentacije. Krajnji učinak spomenutih kvasaca može biti niža koncentracija alkohola, viša ukupna kiselost te kompleksniji aromatski profil vina. Promjene navedenih parametara mogu rezultirati harmoničnijim senzornim profilom vina, što je posebno važno u proizvodnji svježih bijelih vina.

Kvaliteta vina se evaluira kombinacijom senzornih (boja, aroma, *mouthfeel*) i kemijskih analiza (pigmenti, aromatski profil, okusne molekule) (Loira et al. 2014.). Ne-*Saccharomyces* kvasci imaju neke određene enološke karakteristike koje su odsutne u *Saccharomyces* vrsta, koje mogu imati dodatan utjecaj na analitički i senzorni profil vina (Gobbi et al. 2013a). Poboljšavaju boju vina formiranjem piroantocijana tokom fermentacije izlučivanjem piruvične kiseline i acetaldehida koji služe kao prekursori vitisina A i B (Loira et al. 2014.) te njihov rad utječe na redukciju pH i poboljšanje ukupne kiselosti što također doprinosi kvaliteti boje vina. Aromatski profil se poboljšava proizvodnjom estera i ostalih aromatskih komponenti, (Fleet 2003) kao što je 2-feniletanol (cvjetne arome), etil laktat i izoamil acetat (voćne arome). Također ne-*Saccharomyces* kvasci djeluju na poboljšanje tijela, težine i punoće vina otpuštanjem polisaharida iz staničnih stjenki i proizvodnjom glicerola (Loira et al. 2014.).

Međutim, kad se nekonvencionalni kvasci koriste se sami, dolazi do pojave problema s završetkom fermentacije (Escribano-Viana et al. 2018.). Korištenje odabranih miješanih 'starter' kultura od određenih ne-*Saccharomyces* u kombinaciji sa *S. cerevisiae* se pokazao kao jedan od načina kako bi se izbjegle zaostale fermentacije i poboljšale različite karakteristike uključene u kvalitetu konačnog proizvoda (Escribano-Viana et al. 2018.).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak sekvencionalne inokulacije kvasaca *Lachancea thermotolerans* i *Torulaspota delbrueckii* sa *S.cerevisae* na osnovne fizikalno-kemijske parametre, koncentraciju pojedinačnih organskih kiselina i aromatskih spojeva u vinu 'Malvazija istarska' u usporedbi sa vinom dobivenim isključivo sa *S. cerevisiae*.

2. Pregled literature

2.1. Ne-*Saccharomyces* kvasci

Ne-*Saccharomyces* kvasci kao i *Saccharomyces* vrste sudjeluju u alkoholnoj fermentaciji, metabolički su aktivni, utječu na smjer fermentacije i njihovi metaboliti utječu na kvalitetu i karakter vina. Upravo zbog toga njihov je doprinos alkoholnoj fermentaciji opširno proučavan. U prošlosti, često su se smatrali isključivo izvorom mikrobiološkog kvarenja uslijed spontanih, nekontroliranih fermentacija koje bi rezultirale prekidanjem fermentacije ili povišenim koncentracijama octene kiseline i drugim nepoželjnim svojstvima, no znanstvena istraživanja i selekcije spomenutih sojeva dokazala su upravo suprotno, navodeći da imaju pozitivan utjecaj. Uloga ne-*Saccharomyces* kvasaca u alkoholnoj fermentaciji pridobiva sve više pažnje mikrobiologa diljem vinskih zemalja Staroga i Novoga svijeta. Neke od vrsta koje su proučavane u vinarskoj proizvodnji su: *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniospora*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulospora*, *Brettanomyces*, *Saccharomycodes*, *Pichia* i *Williopsis* (Jolly et al. 2006.). Unatoč svom pozitivnom utjecaju na vino većina ne-*Saccharomyces* kvasaca ne može provesti fermentaciju „do kraja“, stoga je potrebno provoditi koinokulacije ili sekvencionalne inokulacije s određenim sojem *Saccharomyces* kvasca da bi postigli željenu koncentraciju alkohola. Iako pozitivan utjecaj ne-*Saccharomyces* kvasaca na cjelokupnu kvalitetu vina potiče na daljnja istraživanja njihovog enološkog potencijala, trenutno znanje na tu temu je daleko od zadovoljavajućeg (Azzolini et al. 2015.). Unatoč svojim zanimljivim svojstvima neki kvasci nisu još dostupni na tržištu kao što su *Candida zempelina*, *Candida stellata*, *Kloeckera apiculata*, *Hanseniopsis vineae*, *Hanseniospora uvarum*, *Kazachstania aerobia* i *Schizosaccharomyces japonicus* (Benito 2018.a).

2.1.1. *Torulospora delbrueckii*

T. delbrueckii tipičan je primjer prirodne flore na površini grožđa isto kao i *S. cerevisiae* koji mogu biti pronađeni u većini vinskih regija (van Breda et al. 2013.). Ova vrsta kvasaca je jedna od najviše korištenih ne-*Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji vina, ali i kruha (Velázquez et al. 2019.). Međutim puno više se zna o fiziologiji, genetici i biološkim svojstvima *Saccharomyces* kvasaca, što ostavlja velik prostor za istraživanja. Za razliku od *S. cerevisiae*, znanje o heterogenosti soja unutar jedne ne-*Saccharomyces* vrste, kao što je *T. delbrueckii*, te utjecaju specifičnosti te vrste na aromu vina i dalje je ograničeno (Azzolini et al. 2015.).

Smatra se da ima dobre fermentativne sposobnosti u usporedbi s ostalim ne-*Saccharomyces* kvascima (Velázquez et al. 2019.). Fermentativne sposobnosti mu omogućuju stvaranje 7.6 do 9.0 vol.% etanola (Loira et al. 2014.). *T. delbrueckii* se može koristiti za optimizaciju nekih vinskih parametara s obzirom na uobičajenu fermentaciju sa *S. cerevisiae* kao što je niža koncentracija octene kiseline i etanola, povišen sadržaj glicerola, veće otpuštanje manoproteina i polisaharida, poboljšava malolaktičnu fermentaciju, povisuje udio određenih

aromatskih komponenata (voćni esteri, laktoni, tioli i terpeni) i smanjuje neželjene aromatske komponente (viši alkoholi) (Ramírez i Velázquez 2018.). Zbog svoje niske produkcije octene kiseline, ovaj ne-*Saccharomyces* kvasac se preporuča za fermentaciju mošta dobivenog od grožđa s visokom koncentracijom šećera (Azzolini et al. 2015.).

T. delbrueckii nije sposoban dovršiti fermentaciju do kraja ili ima poteškoće u dominaciji u prisutnošću divljeg ili inokuliranog *S. cerevisiae* kvasca (Velázquez et al. 2019.) te je jedan od zahtjevnijih vrsta prema količini YAN-a. Potpuna dominacija i fermentacija je uočena samo kod nekih *T. delbrueckii* „killer“ sojeva u laboratorijskim uvjetima (Velázquez et al. 2019.). *T. delbrueckii* pokazuje slabiji rast u striktno anaerobnim uvjetima uz manji fermentacijski vigor nego što ima *S. cerevisiae* pod uobičajenim fermentativnim uvjetima (Ramírez i Velázquez 2018.). To je vrlo važan čimbenik u proizvodnji vina koje se uobičajeno proizvodi u striktno anaerobnim uvjetima za bijela i pjenušava vina ili uz minimalnu prisutnost kisika kod crnih vina (Ramírez i Velázquez 2018.). S obzirom da je *T. delbrueckii* manje otporan na više koncentracije etanola, fermentacija se usporava i povećava se broj mrtvih stanica nakon burne fermentacije (Ramírez i Velázquez 2018.). Neka istraživanja ističu važnost međuvrsne heterogenosti unutar ne-*Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji vina (van Breda et al. 2013.). Danas dok postoji oko 200 komercijalnih *S. cerevisiae* sojeva dostupnih diljem svijeta, (van Breda et al. 2013.) dok postoji samo 5 komercijalno dostupnih sojeva *T. delbrueckii* (Benito 2018.b).

Stanice *Torulospora*-e uglavnom imaju sferični (*torulu*) ili elipsoidni oblik, a veličina stanice je nešto manja nego kod *S. cerevisiae* (Ramírez i Velázquez 2018.). Zbog male veličine stanice dugo je smatrano da ima haploidne stanice, međutim odnedavno se smatra da bi stanice *T. delbrueckii* mogle biti diploidne i homotalične, a mala veličina stanice se objašnjava manjim brojem kromosoma u diploidnoj fazi (16) za razliku od *S. cerevisiae* koja ima 32 kromosoma (Ramírez i Velázquez 2018.). Razmnožava se aseksualno pupanjem (mitoza), a seksualne generacije se mogu pojaviti preko askusa koji sadrži 4 askospore (Benito 2018.b). Askus se formira heterogamskom konjugacijom između stanice i pupa ili konjugacijom dviju neovisnih stanica (Ramírez i Velázquez 2018.).

Trenutno je definirano 6 *Torulaspora* genoma : *T. delbrueckii*, *Torulaspora globosa*, *Torulaspora franciscae*, *Torulaspora microellipsoides*, *Torulaspora maleeae* and *Torulaspora pretoriensis* (van Breda et al. 2013.).

2.1.2. *Lachancea thermotolerans*

L. thermotolerans, prije poznata pod nazivom *Kluyveromyces thermotolerans*, izuzetna je vrsta, visokog biotehnološkog potencijala te jedna od malobrojnih komercijalno dostupnih ne-*Saccharomyces* kvasaca (Hranilovic et al. 2017.). Zauzima niz prirodnih i antropoloških staništa, uključujući insekte, biljke, tlo i hortikulture kulture, posebice grožđe i vino (Hranilovic et al. 2017.). Tijekom posljednjeg desetljeća njegova uloga u vinarstvu postaje sve veća zbog poboljšanja kvalitete i isticanja aroma i složenosti vina (Gobbi et al. 2013.b).

Sposobnost *L. thermotolerans* da djeluje kao biološki zakiseljivač stvorila je velik interes u vinarskoj industriji posebice zbog klimatskih promjena i promjena u vinogradarskim i vinarskim praksama što je rezultiralo u promjeni trenda prema korekciji ukupne kiselosti vina (Gobbi et al. 2013.b). Njegova primjena posebice je korisna u toplijim klimatima koji su zahvaćeni klimatskim promjenama, pH je smanjen na prirodan način tijekom fermentacije te smanjuje potrebu dodatka vinske kiseline (Morata et al. 2018). Mliječna kiselina nije uobičajen produkt metaboličke aktivnosti kvasaca, što je velika biotehnološka prednost ovog kvasca (Hranilovic et al. 2017.). Proizvedena mliječna kiselina potječe iz šećera što smanjuje alkoholnu jakost, pogotovo kod sojeva sklonih proizvodnji viših koncentracija mliječne kiseline (Morata et al. 2018.). Druge pozitivne kemijske i senzorne promjene uključuju niži sadržaj etanola, što je sve traženije na tržištu, poboljšani okus i „mouthfeel“, inokulacije mogu rezultirati isticanjem cvjetnih i tropskih aroma te zaokruženošću bijelih i crnih vina (Jolly et al. 2006.). U do sada provedenim istraživanjima kombinirane fermentacije s *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae* pokazale su interesantne rezultate sa smanjenjem pH i hlapljive kiselosti, poboljšanjem ukupne kiselosti, te povišenjem glicerola i 2-feniletanola (Gobbi et al. 2013.b). Neki sojevi *L. thermotolerans* imaju izraženu izvanstaničnu enzimatsku aktivnost s utjecajem na aromu vina i ekstrakciju fenola: esteraze, β -glukozidaze, pektinaze, celulaze, glukanaze (Morata et al. 2018.). Umjerene je fermentativne snage s tolerancijom na etanol u koncentracijama 5 – 9 %, ima nešto veće zahtjeve prema dostupnosti kisika nego *S. cerevisiae* (Morata et al. 2018.).

Može preživjeti nekoliko dana u prisutnosti 9 vol.% alkohola te pokazuje dobru vitalnost iako *S. cerevisiae* dominira u fermentaciji (Morata et al. 2018.). *L. thermotolerans* je sposoban fermentirati glukozu i saharozu, zahtjevnost prema dostupnim dušičnim hranjivima je slična kao i kod *S. cerevisiae* (minimum 200 mg/L YAN) (Morata et al. 2018.). Upotreba ovog kvasca u sekvencionalnim ili miješanim fermentacijama ima tendenciju usporavanja fermentacije zbog poteškoća s fermentacijom fruktoze (Morata et al. 2018.).

Morfološki se gotovo ne razlikuje od *S. cerevisiae*, stanice su nešto manje (Benito 2018.a), sferičnog ili elipsoidnog oblika, može biti pronađen kao zasebna stanica ili u malim skupinama (Morata et al. 2018.). Telemorfni je kvasac, seksualno se razmnožava formiranjem askospora (1–4), a aseksualno se razmnožava multilateralim pupanjem (Morata et al. 2018.). *L. thermotolerans* potječe iz iste potporodice (*Saccharomycetoidae*) kao i *S. cerevisiae*, međutim rodovi su se razišli u procesu protoplodije odnosno dupljanja cijelog genoma i kao takav nudi dodatan model za proučavanje evolucije kvasaca (Hranilovic et al. 2017.).

Rod *Lachancea* dijeli se na 11 genoma: *L. cidri*, *L. dasiensis*, *L. fantastica*, *L. fermentati*, *L. kluyveri*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersi*, *L. mirantina*, *L. nothofagi*, *L. quebecensis* i *L. walti* (Hranilovic et al. 2017.).

2.2. Sekvencionalna inokulacija

Sekvencionalna inokulacija oponaša prirodnu i spontanu fermentaciju (Loira et al. 2014.). U prirodnim fermentacijama vrste s nižim fermentativnim mogućnostima su obično aktivne u inicijalnim fazama, dok se *S. cerevisiae* obično razvija i fermentira šećere u fazama kada je koncentracija alkohola toliko visoka da inhibira rast starter kultura (Loira et al. 2014.). Veća otpornost *Saccharomyces* kvasaca na više koncentracije alkohola i pH rezultira dominacijom nad ne-*Saccharomyces* kvascima. Da bi se izrazio utjecaj na organoleptiku vina, prvo se provodi inokulacija s ne-*Saccharomyces* kvascima, a zatim inokulacija *Saccharomyces* sojem. Sekvencionalna inokulacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* povisuju koncentracije glicerola, smanjuju hlapljive kiseline te utječe pozitivno na perlanje baznog vina u proizvodnji pjenušavih vina (Velázquez et al. 2019.). Miješana inokulacija mošta s *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* preferirana je nad inokulacijom samo s *T. delbrueckii* (Velázquez et al. 2019.).

2.3. Malvazija istarska

Malvazija istarska treća je gospodarski važna vinska sorta u Hrvatskoj, neutvrđenog je porijekla, ali smatra se autohtonom istarskom sortom. Poznata je i pod nazivima 'Malvazija', 'Malvazija bijela', 'Malvasia istriana', 'Malvasia', 'Istarska Malvazija', 'Istrian Malvasia', 'Malvasia d'Istria', 'Malvasia bianca' (Maletić et al. 2015.). Uzgaja se najviše u podregiji Hrvatska Istra, gdje je vodeća sorta po proizvodnji te u podregiji Hrvatsko primorje (Maletić et al. 2015.).

Bujnoga je rasta, pogotovo u uvjetima dubokih i plodnih tala s većom dostupnošću vode, s vegetacijom započinje kasno, a dozrijeva u III. razdoblju (Maletić et al. 2015.). Cvijet je morfološki i funkcionalno dvospolan, a grozd je srednje veličine, koničan te srednje je zbijen. Odrasli list je pentagonalan do okruglast, nešto izraženije širine u odnosu na duljinu, nejednoličan, velik i obično trodijelan (Maletić et al. 2015.).

Daje visoku kakvoću grožđa i vina, kad bobice dozriju okruglastog su oblika, srednje su veličine, zelenkasto-žute boje, a na osunčanoj strani zlatno-žute s jasno izraženom pupčanom točkom (Maletić et al. 2015.). Kožica je tanka i čvrsta, a meso sočno. Rodnost je uglavnom redovita, ali zna imati problema s osipanjem zbog osjetljivosti cvjetova na kišu i hladno vrijeme. Udio alkohola u vinu uobičajeno iznosi od 12 do 14 vol.%, dok se ukupna kiselost obično kreće od 5.0 do 6.5 g/L (Maletić et al. 2015.)



Slika 1. Malvazija istarska

Jako dobro uspijeva na crvenici i flišnim terenima, ali najbolje rezultate, posebice u kvaliteti vina, daje na brdovitim flišnim položajima južne i jugozapadne ekspozicije (Maletić et al. 2015.). Zbog visoke bujnosti ne odgovaraju joj duboka, plodna i vlažna tla u zatvorenim, slabo prozračnim položajima budući da se u takvim uvjetima mogu javljati problemi s oplodnjom, a i kakvoća grožđa može biti nezadovoljavajuća (Maletić et al. 2015.).

Tablica 1. Površina i broj trsova vodećeg sortimenta u Hrvatskoj na dan 31.12.2019.

| Sorta | Površina (ha) | Broj trsova (ha) |
|--------------------|---------------|------------------|
| Graševina | 4 563.62 | 21 169 712 |
| Malvazija istarska | 1 643.23 | 6 860 042 |
| Plavac mali | 1 473.95 | 11 910 716 |

Izvor: Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju (2019).

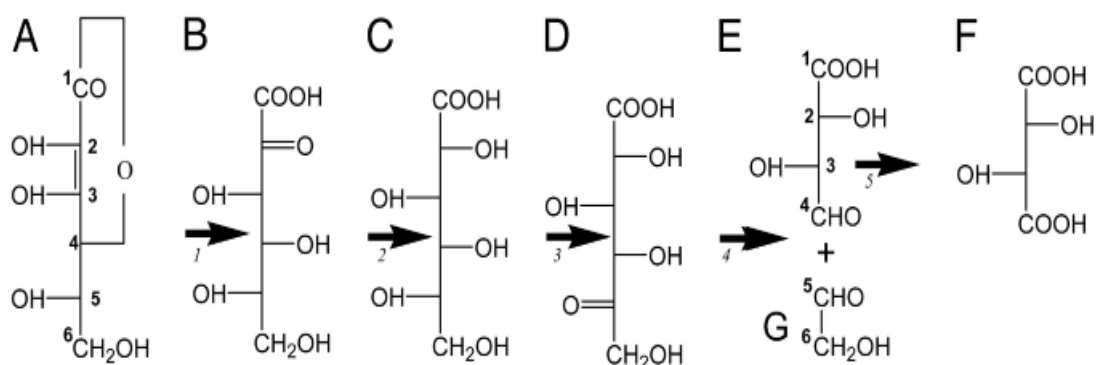
Po površini zauzima drugo mjesto među sortama. Prema podacima Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju iz 2019. godine ukupna površina pod vinogradima u Republici Hrvatskoj iznosila je 19 022.09 ha, od toga 1 643.23 ha zasađeno je sortom 'Malvazija istarska'.

2.4. Organske kiseline

U grožđu, moštu i vinu približno 90% organskih kiselina čine vinska i jabučna kiselina, a u manjoj mjeri limunska, jantarna, mliječna, 2-ketoglutarina, octena, glikolna, glukonska, glukuronska i druge kiseline. Utječu na okus vina, stabilnost, boju i pH. Njihova koncentracija mijenja se tijekom razvoja bobice i dozrijevanja grožđa, a osim o kultivaru, uvelike ovisi o položaju vinograda, stupnju zrelosti grožđa, vremenskim uvjetima tijekom dozrijevanja grožđa (godištu) te protjecanju alkoholne fermentacije (Jeromel et al. 2007.). Od početka formiranja bobice do šare koncentracija kiselina raste, a od trenutka šare kada bobica počinje koristiti jabučnu kiselinu kao izvor energije kiselost počinje padati. Odnos između vinske i jabučne kiseline značajno varira vezano uz kultivar, a u periodu berbe većina sorata sadrži više vinske nego jabučne kiseline (Jeromel et al. 2007.). Za razliku od jabučne kiseline, koncentracija vinske kiseline ne smanjuje se značajno tijekom dozrijevanja, međutim opadanje koncentracije ukupnih kiselina tijekom dozrijevanja nastaje uslijed razrjeđivanja grožđanoga soka, zatim uslijed aktivacije razgradnje organskih kiselina, inhibicije sinteze istih te zbog prijelaza kiselina u šećere (Jeromel et al. 2007.). Kiselost vina često prikriva ili naglašava percepciju drugih okusa vina, obično prikriva slatkoću, dok će percepcija astringentnosti biti naglašena kada se podudara s niskim pH vrijednostima (Volschenk et al. 2006.). U proizvodnji vina kiseline doprinose učinkovitosti SO₂ za zaštitu vina od kvarenja, a također štiti vino od nepoželjnih mikroorganizama zbog nemogućnosti većine da prežive u uvjetima niskog pH.

2.4.1. L-vinska kiselina

L-vinska kiselina je iznimno važna u procesu proizvodnje vina zbog svoje ključne uloge u održavanju boje i kemijske stabilnosti vina. Topiva je u alkoholu i vodi, nefermentabilna i u grožđu glavna kiselina uz jabučnu, koja doprinosi okusu, „*mouthfeel*-u“ te potencijalu starenja. Nalazi se u svim zelenim dijelovima vinove loze. Nastaje putem sinteze preko pentoza fosfatnog ciklusa iz askorbinske kiseline tijekom rasta bobice, a stvara se u mladim organima (bobica i mlado lišće). Okus bobice, senzorna svojstva i potencijal starenja vina su direktno povezani s koncentracijom L-vinske kiseline prisutnoj u bobi te s količinom dodane kiseline tokom vinifikacije (DeBolt et al. 2006.). Razine L-vinske kiseline doprinose senzornim svojstvima koja su važna za okus stolnog grožđa, ali još važnije, daju osnovu za pH koji je presudan u proizvodnji vina (DeBolt et al. 2006.).



Slika 2. Put sinteze L-vinske kiseline iz askorbinske kiseline

Izvor: DeBolt et al. (2006)

Pretežito je locirana u središnjem dijelu bobice, a u punoj zrelosti se najvećim dijelom nalazi u vezanom obliku (tartarati). Smatra se relativno jakom organskom kiselinom i najviše utječe na pH vina jer najjače disocira odnosno otpušta H^+ ione (3 puta više od jabučne). Na disocijaciju vinske kiseline pH ima velik utjecaj. Kalij vezanjem na vinsku kiselinu stvara sol K-bitartarat, koja je slabo topiva u vodi i alkoholu i čini vino nestabilnim, a uslijed nastanka alkohola sve se više taloži te stvara vinski kamen. Pri pH 3.6 se L-vinska kiselina najbolje disocira u bitartaratni ion prilikom čega dolazi do pospješeneog taloženja vinskog kamena.

Na područjima toplih klimata često se provode dokiseljavanja s vinskom kiselinom koja se dodaje prije fermentacije u mošt ili masulj. Dokiseljavanje se može provoditi i nakon fermentacije tokom blendiranja i starenja vina, kod takvih dodataka u kasnijim fazama povišena kiselost će biti mnogo izraženija. Dodatak prije fermentacije smanjuje rizik porasta pH iznad granice gdje SO_2 gubi svoj utjecaj.

2.4.2. L-jabučna kiselina

Kao i L-vinska kiselina nije fermentabilna ali je dobro topiva u vodi i alkoholu, značajno doprinosi senzornim svojstvima vina i utječe na pH no znatno manje nego L-vinska kiselina. L-jabučna kiselina nastaje kao produkt glikolize i Krebsovog ciklusa (Volschenk et al. 2006.) u lišću gdje se kao jaki metabolit razgrađuje na vodu i CO_2 te služi kao energetski material za respiracijske procese u bobi. U bobi koncentracija raste prema centru. Obično je prisutna u količini od 15 do 25 g/L u fazi rasta, a nakon šare se počinje smanjivati te u punoj zrelosti pada do 3 do 5 g/L. Iako se vinska kiselina često nalazi u višim koncentracijama od L-jabučne kiseline i jača je, njena koncentracija je relativno konstantna za razliku od L-jabučne kiseline čija fluktuirajuća koncentracija vinarima obično stvara probleme (Volschenk et al. 2006.). S obzirom da pred kraj dozrijevanja raspoloživost šećera sve manja zbog razgradnje klorofila, bobica je prisiljena prebaciti svoj metabolizam disanja s šećera na L-jabučnu kiselinu (Volschenk et al. 2006.), nakon čega koncentracija počinje ubrzano opadati.

Brzina razgradnje L-jabučne kiseline znatno je sporija u hladnim klimatima što rezultira „nezrelim“ grožđem prilikom berbe, koje sadrži visok sadržaj kiselina i nizak pH (Volschenk

et al. 2006.) od kojeg se dobivaju neharmonična i grubog okusa vina. Prekomjerne količine utječu na izraženu kiselost vina te okus podsjeća na nezrele zelene jabuke. U vinu je razgrađuju mliječno kisele bakterije u mliječnu kiselinu i CO₂ što je pogodno za biološko otkiseljavanje, a kvasci u etanol i CO₂. U toplijim krajevima javlja se problem nedostatka L-jabučne kiseline za vrijeme berbe, što se često mora nadoknađivati dokiseljavanjem u procesu vinifikacije. Otpuštanje pohranjenih organskih kiselina, posebno L-jabučne kiseline i L-vinske kiseline tijekom prerade odgovorno je za hidrolizu nehlapljivih aromatičnih spojeva poput monoterpenkih glikozida, nekih fenolnih spojeva, C13-norizoprenoida, benzilnog alkohola i 2-feniletanola iz bobica (Volschenk et al. 2006.). Ovakve aromatske komponente su ključne za razvoj zdravog vina s kompleksnim senzornim profilom tijekom vinifikacije.

2.4.3. Limunska kiselina

Limunska kiselina je slaba organska kiselina, a u grožđu i vinu se nalazi u malim količinama od 0.2 do 0.7 g/L. Nastaje kao međuprodukt Krebsovog ciklusa. Citrat sintaza katalizira reakciju oksaloacetata s acetil CoA, čime nastaje citrat. Prema pravilniku o vinu Republike Hrvatske maksimalna dozvoljena količina je 1.0 g/L, a nešto veće koncentracije se mogu pronaći u vinu napravljenom od grožđa zaraženog *Botrytis*-om. Neki vinari u toplijim krajevima koriste limunsku kiselinu za dokiseljavanje i upotpunjavanje okusa, međutim nedostatak limunske kiseline je njena mikrobiološka nestabilnost. S obzirom da bakterije koriste limunsku kiselinu u svom metabolizmu, može doći do rasta i razvoja neželjenih mikroorganizama, zbog toga je češća upotreba vinske kiseline za dokiseljavanje. Višak željeza u vinu potencira stvaranje bijelog taloga s fosfatnim ionima, a ovaj se problem može riješiti dodatkom limunske kiseline koja tvori kompleks limunske kiseline s Fe³⁺ (Hakim 2018.).

2.4.4. Jantarna kiselina

Zdravo grožđe sadržava jantarnu kiselinu u tragovima, a nešto veće koncentracije se mogu javiti u bobama zaraženim *Botrytis*-om ili kod *Vitis rotundifolia*. U gotovim vinima se nalazi u nešto većim koncentracijama (1.0–3.0 g/L) jer nastaje tijekom alkoholne fermentacije. Prosječan sadržaj u crnim vinima je oko 1.2 g/L, a u bijelima 0.6 g/L (Coulter et al. 2004.). Kvasci formiraju jantarnu kiselinu iz šećera ili aminokiselina što je uvjetovano uvjetima rasta i dostupnošću dušičnih hraniva. Glavni faktori koji utječu na sintezu su soj kvasaca, temperatura, pH, dušična hraniva, vitamini, SO₂, koncentracija šećera te sorta i berba. Povećanjem temperature i pH dolazi do sve veće sinteze, a s obzirom da je slaba kiselina ne utječe znatno na pH, no utječe na ukupnu kiselost i okus vina.

2.5. Arome

Aroma ili „bouquet“ vina formirana je od više stotina aromatskih komponenata koje su hlapljivi spojevi. Ne doprinose sve arome jednakom mjerom aromatskom profilu vina. Njihov doprinos će ovisiti o koncentraciji i njihovom mirisnom pragu detekcije koji se definira kao najniža koncentracija određenog spoja pri kojoj se može prepoznati njegov miris. „Aroma value“ ili vrijednost arome je koeficijent koji nam omogućuje procjenu doprinosa neke arome vinu, a to je omjer koncentracije analita u uzorku i njegovog praga detekcije. U nekim slučajevima i spojevi s malom vrijednošću arome mogu promijeniti percepciju drugih hlapljivih spojeva jer mogu djelovati sinergistički ili antagonistički. Aromatski profil vina je pod utjecajem brojnih čimbenika: okolina (tlo, klima), sorta, dozrelost, uvjeti fermentacije (pH, temperatura, vrsta kvasca), biološki faktori (soj kvasca), proizvodni proces vina i starenje (Rapp 1988). Za proizvodnju vina s naglašenim aromama poželjnije su niske temperature alkoholne fermentacije, međutim hladne fermentacije imaju visoku opasnost od zastoja i spore fermentacije. Uz hladnu fermentaciju neki vinari provode krio-maceraciju da bi istaknuli sortni karakter bijelih vina. U vinogradarskoj praksi najčešće se provodi maceracija na temperaturi od 20 do 25 °C, a krio-maceracija na 5-8 °C (Radeka et al. 2008.). Ovaj proces doprinosi dobivanju balansiranih, zaokruženih vina s jakim tijelom, iako ovaj pojačani efekt može dovesti do promjene tipičnosti sorte i uzrokovati pojavu teških i grubih aroma (Peinado et al. 2004.). Više koncentracije spojeva koji se odnose na svježje i voćne arome su pronađene pri temperaturi od 15°C, dok su više koncentracije spojeva vezane za cvjetne aromatske spojeve nađene na temperaturi od 28°C (Jakobović et al., n.d.).

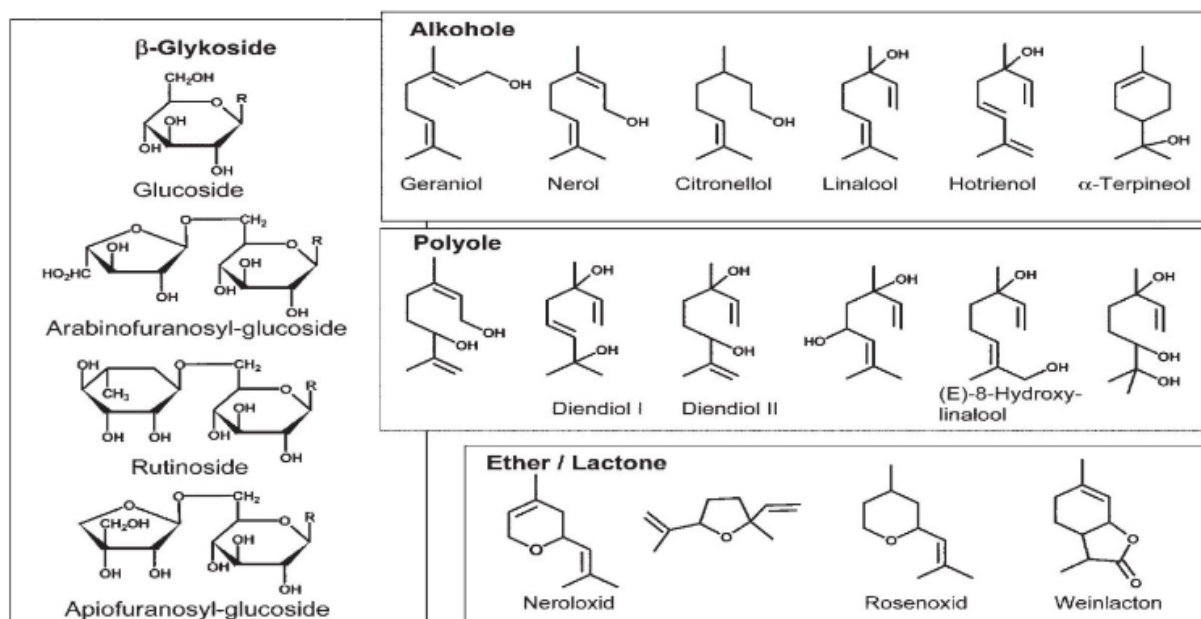
Tvari arome potječu od spojeva koji nastaju u bobi tijekom dozrijevanja (primarne arome), sekundarnih metabolita koji nastaju mikrobiološkom aktivnošću iz dušičnih spojeva, masnih kiselina, šećera i cinaminske kiseline (sekundarne arome) te od spojeva nastalih kemijskim promjenama povezanim s oksidacijskim procesima tokom starenja i dozrijevanja u vinskom posuđu pogotovo u drvenim bačvama gdje se tijekom starenja otpušta niz aromatičnih tvari povezanih s drvom u vinu (tercijarne arome). Monoterpeni, norizenoprenoidi, alifati, fenilpropanoidi, metokspirazini te hlapljivi sumporni spojevi su aromatski spojevi koji nastaju u bobi tijekom dozrijevanja. Hlapljivi spojevi ekstrahirani iz drveta uglavnom su furfuralni spojevi, poput gvajakola, hrastovog ili viski-laktona, vanilina ili siringaldehida (Belda et al. 2017.). Osim drva u procesu starenja, sastavu vina mogu pridonijeti i neki spojevi dobiveni radom i razgradnjom staničnih stijenki mikroorganizama, poput polisaharida, slobodnih aminokiselina i peptida. Ovi ekstrahirani spojevi potječu iz mrtvih stanica kvasaca i bakterija (talog) koje u procesu autolize oslobađaju neke aktivne enzime koji tijekom starenja kontinuirano mijenjaju okus vina (Belda et al. 2017.).

Senzorni profil vina formira se grupiranjem aroma sa sličnim deskriptorima u skupine. Grupiranje omogućava povezivanje kvantitativnih informacija dobivenih kemijskom analizom s osjetilnom percepcijom, s ciljem da se dobije aromatski profil vina koji je jednostavniji i temelji se na objektivnijim kriterijima za razliku od postojećih alternativa (Peinado et al. 2004.).

Zbog složenosti arome vina, koja sadrži ogromnu kemijsku raznolikost, istraživanje cjelokupne hlapljive frakcije vina zahtijeva upotrebu višestrukih, složenih i skupih kromatografsko-spektrometrijskih analiza (Belda et al. 2017.).

2.5.1. Terpeni

Terpeni su skupina kemijskih spojeva koji kao osnovnu građevnu jedinicu imaju izopren (C5). Dijele se prema broju ugljikovih atoma u molekuli: hemiterpen – C5, monoterpen – C10, seskviterpen – C15, diterpen – C20. Smatraju se jednim od najvažnijih grupa primarnih aroma posebice monoterpeni koji su nosioci cvjetnih mirisa koji podsjećaju na ruže, pelargonije, cvijet citrusa, ljiljane i ljubičice. Monoterpeni se nalaze u bobama za vrijeme zretanja no njihova se koncentracija smanjuje do šare, nakon čega se ponovno počinju nakupljati. U vinu i grožđu su najzastupljeniji monoterpeni koji se mogu nalaziti u slobodnom ili vezanom odnosno glikoziliranom obliku (najviše koncentracije); nalazimo još monoterpenke alkohole (linalol, geraniol), aldehide (linalil, geranial), kiseline (linalolska kiselina, geraniolska kiselina), estere ("ružin" oksid i nerol oksid) (Lengyel 2012) i polihidroksilne monoterpene koji nastaju oksidacijom monoterpenkih alkohola. Slobodni monoterpeni alkoholi koje najčešće nalazimo u grožđu i moštu su citronelol, linalol, geraniol, nerol i α -terpineol.



Slika 3. Slobodni i vezani monoterpeni

Izvor: Lengyel (2012).

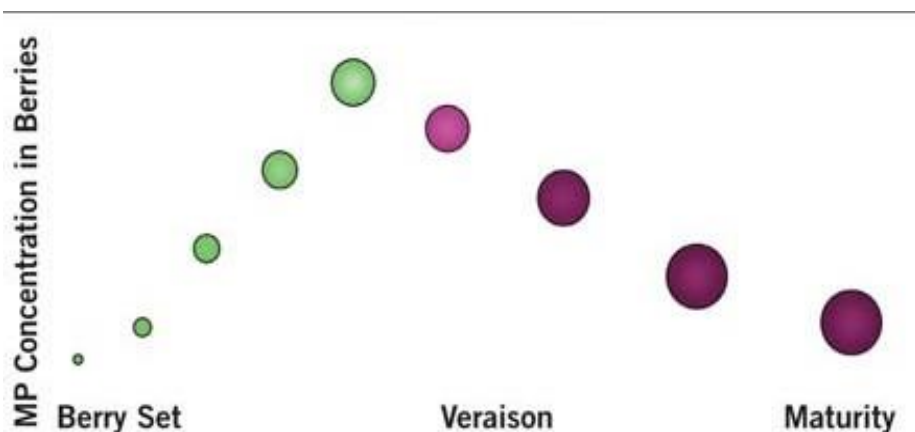
Muškatne sorte odlikuju se naglašenim monoterpenkim alkoholima (Jackson 2008). Posebno su odgovorni za karakterističan okus grožđa, mošta i muškatnih vina, ali mogu se pronaći i u aromatičnim ne-muškatnim sortama (Lengyel 2012.). Distribucija monoterpenkih alkohola nije podjednaka za sve spojeve jer se nerol i geraniol pretežito nalaze u kožici, a dok

linalol nalazimo posvuda u bobi. Crne sorte obično ne sadrže velike količine terpena, a kod nekih se može pronaći u tragovima.

2.5.2. Metokspirazini

Metokspirazini (3-alkil-2-metokspirazini) su dušični heterociklički spojevi koji sadrže metoksi i alkilnu skupinu. Nalaze se u brojnom voću i povrću. Najčešće pojavljivani oblici u grožđu i vinima su 3-izobutil-2-metokspirazin (IBMP), 3-sec-butil-2-metokspirazin (SBMP), 3-izopropil-2-metokspirazin (IPMP). IBMP je najzastupljeniji metokspirazin u bobi, oji je posebice osjetljiv na svjetlost i temperaturu (Lacey et al. 1991.). Koncentracija metokspirazina u zasjenjenom grožđu Cabernet Sauvignona može biti i do 2.5 puta veća nego u grožđu koje raste na suncu (Jackson 2008.). Vina dobivena od grožđa Cabernet Sauvignona, Sauvignon Blanca, Cabernet Franca i Merlota su prepoznatljiva po karakterističnim aromama opisivanim kao vegetativne, herbalne, travnate i zelene arome (Lacey et al. 1991.). U grožđu se nalaze u vrlo niskim koncentracijama i do nekoliko ng/L, međutim vrlo su niskog praga detekcije. Kada se nalaze u niskim koncentracijama doprinose svježem karakteru vina, dok se u visokim koncentracijama smatraju nepoželjnim aromama (nezrelost, aroma graška). Visoke koncentracije u grožđu tokom berbe se često povezuju s nezrelošću što negativno utječe na kvalitetu vina (Belancic i Agosin 2007.).

Sinteza se odvija u bazalnim listovima, počinje tijekom cvatnje i njegove koncentracije rastu do zatvaranja grozda ili nekoliko tjedana prije šare, a koncentracija počinje opadati tijekom dozrijevanja. Uglavnom se nalazi u kožici i sjemenci, a u mesu ga nema. Na sintezu utječe sorta, stupanj zrelosti grožđa temperatura tijekom dozrijevanja, izloženost grožđa svjetlosti te ampelotehnički zahvati posebice defolijacija pred berbu.



Slika 4. Koncentracija metokspirazina u bobi tijekom dozrijevanja

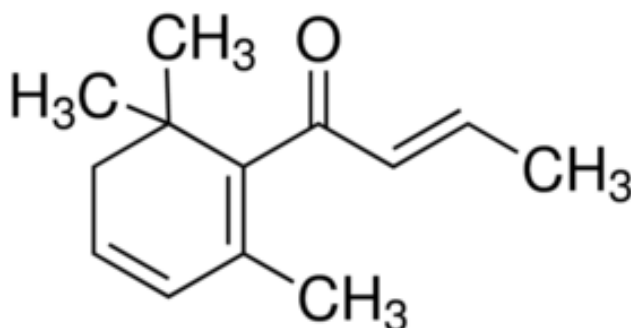
Izvor: Scheiner et al. (2009).

U samoj proizvodnji vina prevelike koncentracije mogu se izbjeći odvajanjem prešavinskih frakcija. Za uklanjanje povišenih razina IBMP koristi se metoda s magnetskim polimerima, pripremljenim na isti način kao i obični polimeri, ali s inkorporacijom nano čestica

željeznog oksida koji služe kao magnetski supstrat (Liang et al. 2018). Otkriveno je da magnetski polimeri mogu ukloniti više od 40% IBMP-a prisutnog za deset minuta (Liang et al. 2018.). Za uklanjanje se koristi i aktivni ugljen, silikon i polilaktična kiselina (PLA).

2.5.3. Norizoprenoidi

Norizoprenoidi nastaju kao rezultat oksidacijske razgradnje karotenoida (karoten, leutin, neoksantin, violaksantin) koji su derivati terpena (Lengyel 2012.) te mogu imati različiti broj ugljikovih atoma. U grožđu i vinu su najzastupljeniji C13-norizoprenoidi. Građeni su od ugljikovog prstena, a razlikuju se po mjestu gdje se nalazi kisikova skupina, a postoje strukture i bez kisikove skupine. Po strukturi se dijele na: megastigmane, ne-oksidirane megastigmane (TPB) i ne-megastigmane (TDN). Oksigenirani C13-norizoprenoidi spadaju pod megastigmane koji sadrže benzenski prsten supstituiran na položajima 1, 5 i 6 te nezasićeni alifatski lanac s četiri atoma ugljika koji je vezan na položaju 6 benzenskog prstena. Do oksidacija može doći na različitim ugljikovim atomima unutar molekule stoga postoji više oblika C13-norizoprenoida koji su nositelji zasebnih aroma. Glavni predstavnici C13-norizoprenoida su β -damascenon, β -ionon, 1-(2,3,6-trimetilfenil)buta-1,3 dien (TPB), 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN) i vitispiran. β -damascenon je nositelj cvjetnih i voćnih aroma, s niskim pragom detekcije, β -ionon podsjeća na ljubičicu, dok TDN daje negativnu aromu na kerozin (Lengyel 2012.). 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN) je posebne važnosti zbog svoje povezanosti s amromama i okusom kerozina, koji se gotovo isključivo javlja u vinu Rajnskog Rieslinga tokom starenja (Marais et al. 1992.). Uglavnom se nalaze u kožici bobice, stoga su koncentracije u crnim vinima znatno veće.

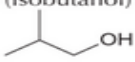
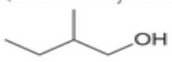
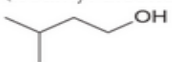
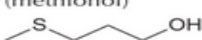
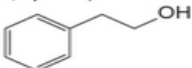


Slika 5. Strukturna građa β -damascenona

Izvor: www.sigmaaldrich.com

2.5.4. Viši alkoholi

Hlapljivi alkoholi s dva ili više C atoma nazivaju se višim alkoholima. Ovi spojevi nastaju kao sporedni produkt metabolizma kvasca te su učestali kod svih alkoholnih pića (Waterhouse et al. 2016.). U više alkohole se ne ubrajaju spojevi kao što su glicerol, hlapivi fenoli, šećerni alkoholi i monoterpenski alkoholi. Nisu jako reaktivni u uvjetima kakvi su u vinu, iako je alkoholna skupina slabi nukleofil pri uobičajenom pH vina (Waterhouse et al. 2016.). S obzirom da se viši alkoholi formiraju tijekom fermentacije kao dio osnovnog dušičnog metabolizma kvasaca, njihova produkcija će ovisiti o uvjetima fermentacije i dostupnosti dušičnih hranjiva. Nakon fermentacije viši alkoholi su se pokazali stabilnim tijekom skladištenja te nije uočena značajna promjena u koncentracijama izoamilnog, izobutilnog alkohola i 2-feniletanola (Waterhouse et al. 2016.). Izolirani viši alkoholi nemaju poželjan miris i arome s iznimkom 2-feniletanola.

| Name/structure | Related amino acid | Typical range (mg/L) | Threshold in model wine (mg/L)[2] | Odor descriptor |
|---|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------|
| 2-Methyl-1-propanol (isobutanol)  | Valine | 25–87 ^a | 40 | Solvent |
| 2-Methyl-1-butanol (active amyl alcohol) ^{c,d}  | Isoleucine | 16–31 ^b | 1.2 [3] ^e | Solvent, fusel |
| 3-Methyl-1-butanol (isoamyl alcohol) ^c  | Leucine | 84–333 ^b | 30 | Solvent, fusel |
| 3-Methylsulfanyl-1-propanol (methionol)  | Methionine | 0.16–2.4 ^a | 1 | Boiled potato |
| 2-Phenylethanol (β-phenylethanol)  | Phenylalanine | 40–153 ^a | 14 | Rose, honey |

Slika 6. Karakteristike viših alkohola nastalih fermentacijom

Izvor: Waterhouse et al. (2016)

Imaju blag učinak na vinski karakter svih vina te je malo vjerojatno da će imati važan utjecaj na miris (Waterhouse et al. 2016.). Njihova važnija uloga je da koriste kao supstrati za formiranje spojeva jačih i ugodnijih mirisa (acetatni esteri, aldehidi) Najvažnije reakcije u kojima sudjeluju viši alkoholi su esterifikacija i oksidacija. Za tvorbu estera se spajaju s karboksilnim kiselinama, a može se odvijati i neenzimatski tijekom skladištenja. U procesima oksidacije djeluju kao supstrat za oksidaciju gdje tvore odgovarajuće aldehide, od kojih većina doprinosi „oksidativnim“ mirisima. Mogu nastajati kataboličkim putem – deaminacijom aminokisline (Ehrlichov put) te anaboličkim putem gdje je glavni prekursor glukoza tj put glikolize.

U samom grožđu dolazi do sinteze C6 alkohola koji nastaju tijekom dozrijevanja bobice enzimatskom oksidacijom masnih kiselina. Prvi korak je sinteza C6 aldehida, a prekursori su

nezasićene masne kiseline (linoleinska, linolinska). Nosioци su vegetalnih i zelenih mirisa koji su specifično izraženi kod ne-aromatičnog grožđa. U bobi se najveće koncentracije nalaze oko šare te se prema berbi smanjuju. Njihovo nastajanje mogu potencirati mehanička oštećenja kao što su muljanje, runjenje i prešanje. Primarni C6 spojevi koji ostaju oko ili poviše praga detekcije nakon fermentacije su 1-heksanol i *cis*-3-heksenol (Waterhouse et al. 2016.).

2.5.5. Esteri

Imaju znatno veći utjecaj na aromu u odnosu na više alkohole, a dvije glavne skupine su acetatni esteri i etil esteri. Dio estera nastaje enzimatskim putem tijekom fermentacije ili neenzimatski tijekom dozrijevanja ili skladištenja. S obzirom na ravnotežu u vinu koncentracija estera se može mijenjati odnosno povećavati i smanjivati tokom dozrijevanja i skladištenja, a ovisit će o početnoj koncentraciji kiseline, estera i alkohola jer su esterifikacija i hidroliza reverzibilne reakcije. Udio estera u vinima se povećava tijekom fermentacije u slučaju upotrebe soja kvasaca s većom sposobnošću stvaranja estera i anaerobnih uvjeta, budući da je sinteza estera masnih kiselina u stanicama kvasca povećana u anaerobnim uvjetima uz prikladan sadržaj šećera u moštu, što se više proizvodi etilnog alkohola više estera nastaje (Shinohara i Watanabe, 1981). Esteri s dugim ugljikovodičnim lancima će brže postizati ravnotežu odnosno hidrolizirati, a povišena temperatura također ubrzava hidrolizu.

Sinteza etil estera je pod utjecajem slobodnih masnih kiselina srednjeg lanca te nije pod utjecajem enzimatske aktivnosti; stoga je sinteza usko vezana uz sintezu i metabolizam masnih kiselina. Viša razina nezasićenih masnih kiselina u fermentaciji uzrokuje smanjenje sinteze etil estera (Saerens et al. 2008.). Upravo zbog neenzimatske sinteze njihova koncentracija se tijekom dozrijevanja može povećavati. Anaerobni uvjeti, niže temperature i bistrenje mošta potencira stvaranje etil estera, no takvi uvjeti nisu povoljni za razvoj kvasaca te može doći do zastoja u fermentaciji.

Acetatni esteri nastaju iz viših alkohola koji služe za enzimatsku reakciju sa acetyl-CoA. S obzirom da nastaju enzimatskom reakcijom njihove koncentracije će varirati s obzirom na vrstu i soj kvasaca. Aeracija i visoke temperature u fermentaciji negativno utječu na sadržaj acetata. Sadržaj acetatnih estera se ubrzano smanjuje pri višim temperaturama (iznad 20 ° C), dok se esteri masnih kiselina postupno smanjuju, a pri nižim temperaturama (ispod 10 ° C) hlapljivi esteri smanjuju su se vrlo sporo (Shinohara i Watanabe 1981.). Etil acetat je najzastupljeniji ester koji se najčešće nalazi u koncentracijama od 50-100 mg/L. U količini većoj od 150 mg/L uzrokuje miris laka za nokte koji negativno utječe na vino. Povećan sadržaj etil acetata je najčešće vezan uz aktivnost octenih bakterija.

2.5.6. Tioli

Tioli su sumporni spojevi koji su građeni od sulfhidrilne odnosno tiolne skupine (-SH) vezane na C atom ujedno su i najzastupljeniji sumporni spojevi u moštu i vinu. Često su ovakvi spojevi odgovorni za mnoge mane vina iako su mnogi od njih nositelji voćnih aroma. Ovakvi pozitivni kemijski spojevi su nositelji arome kupina, grejpa, guave i drugog egzotičnog voća

(Lengyel 2012.). Smatraju se jednim od najosjetljivijih stavnica arome vina, a na njih utječe cijeli tehnološki proces od uzgoja, vinifikacije do skladištenja.

Sortni tioli posebice 4-merkaptio-4-metilpentan-2-on (4MMP), 3-merkaptioheksil acetat (3MHA) i 3-merkaptioheksan-1-ol (3MH), su identificirani kao ključne molekule mladih vina što je dokazano u mnogih sorata (Roland et al. 2011.). Navedeni spojevi imaju vrlo bitnu ulogu u aromi vina proizvedenih od grožđa zaraženog *Botrytisom*. 4MMP je identificiran među sortama: Sauvignon Blanc, Scheurebe, Maccabeo, Gewurztraminer, Riesling, Muscat, Colombard, Petit Manseng i u Tokay vinima (Roland et al. 2011.). 3MH i 3MHA se smatraju većim ubikvistima za razliku od 4MMP jer su identificirani u širem rasponu sorata: Sauvignon Blanc, Petit i Gros Manseng, Semillion, Verdejo, Koshu te i u nekim crnim kao što su Grenache, Merlot, Cabernet Sauvignon (Roland et al. 2011.). Potječu izravno iz grožđa gdje se nalaze kao nehlapivi konjugati glutationa ili cisteina, a otpuštaju se tokom alkoholne fermentacije iz bezmirisnih spojeva koji se nalaze u grožđu i vinu djelovanjem kvasaca i bakterija, te iz reakcija koje se odvijaju tokom skladištenja. Tijekom skladištenja dolazi do hidrolize 3-MHA (ester) u 3-MH (alkohol) i gubitka arome. Ostali fermentativni sumporni spojevi kao ugljikov-disulfid, etantioi i dietil-disulfid daju karakterističan miris „reduktivnog“ vina, a neželjene fermentativne arome se uklanjaju dodatkom Cu^{2+} koji taloži netopive sulfide.

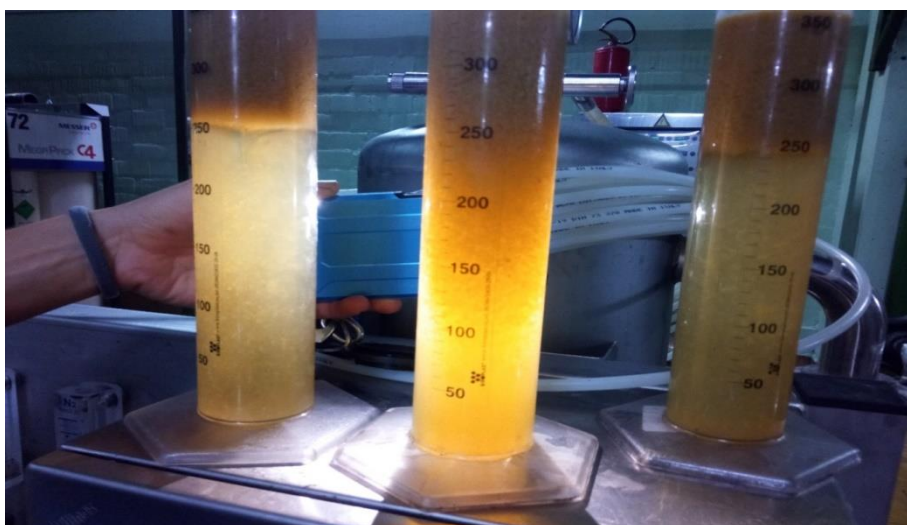
3. Materijali i metode

3.1. Agrolaguna d.d. Poreč

Istraživanje je provedeno u 2019. godini u vinskom podrumu i vinogradima Agrolagune D.D u Poreču. Grožđe 'Malvazije istarske' ručno je brano 16.09.2019. iz vinograda „Devići“ na tablama T4/5/6 na kojim je primjenjivana uobičajena ampelotehnika i agrotehnika. Trsovi su sađeni na tipičnoj istarskoj crvenici, a uzgojni oblik je Royat kordonac. Tijekom početnih mjeseci vegetacije bilo je izrazito oblačno što se očitovalo blago odgođenom berbom, ali su temperaturni uvjeti bili zadovoljavajući. Srednja vegetacijska temperatura iznosila je 18.9 °C, a srednja godišnja 14.8 °C. Najviše padalina je bilo u studenom, 320.3 mm, a najmanje u ožujku 23.4 mm. Ukupna količina padalina u vegetacijskom periodu bila je 739.4 mm, a tokom cijele godine 1 498.0 mm.

3.2. Prerada grožđa

Grožđe je ručno brano i dopremljeno traktorom s prikolicom do podruma Agrolagune. Prilikom runjenja i muljanja postupno je dodavano 1.2 L/t 5 %-tne otopine SO₂ te 0.8 L/t askorbinske kiseline pripremljene u otopini s vodom u omjeru 1:10. Tokom punjenja pneumatske preše masulj je provođen kroz izmjenjivač topline prilikom čega je hlađen na 18°C. U procesu punjenja preše dodavano je 3 g/hL enzima Zimaclar Flot (Enologica Vason) za olakšano prešanje i flotaciju. Gruba prešavinska frakcija je odvojena. Nakon prešanja u cjednicu je dodano 1 g/hL glutaciona koji ima izraženu antioksidativnu sposobnost te doprinosi očuvanju aromatskog profila bijelih vina. Po pravilniku OIV-a dozvoljeno je do 20 mg/L u moštu ili vinu. Mošt iz cjednice je prepumpnan u tank zapremnine 100 000 L i flotiran s upotrebom želatine i inertnog dušičnog plina (NTU 60-100).



Slika 7. Proces flotacije

3.3. Proizvodnja vina

Nakon flotacije mošt je odvojen u osam inoks bačvica zapremnine 30 L, u svaku bačvicu napunjeno je 15-16 L mošta sljedećih vrijednosti pri 23 °C: °Kl, 21; pH, 3.49; ukupne kiseline, 5.4 g/L; jabučna kiselina, 1.8 g/L; YAN, 168; ukupni SO₂, 39 mg/L. Za alkoholnu fermentaciju korištene su tri različite vrste kvasaca. Kvasci su dozirani po preporuci proizvođača u količini od 25 g/hL te rehidrirani u deset puta većoj količini tople vode s malo mošta prije inokulacije. Za kontrolnu alkoholnu fermentaciju korišten je komercijalni *S. cerevisiae* soj QA 23 (Lalvin) s kojim su inokulirane dvije bačvice te označene s 1 S.c. i 2 S.c.. Čista kultura *T. delbruecki* soja TD 291 (Biodiva) inokulirana je u iduće tri bačvice koje su označene s 3 T.d., 4 T.d. i 5 T.d., a inokulacija posljednjih bačvica provedena je s vrstom *L. thermotolerans* soja E 491 (Concerto), oznaka 6 L.t., 7 L.t. i 8 L.t. Odmah nakon inokulacije dodano je organsko dušično hranjivo Fermplus Tropical (AEB) u dozi od 30 g/hL za početnu ishranu, rast i razvoj kvasaca. Idući dan kada je alkoholna fermentacija započela dodano je 10 g DAP-a (21/53/0) u svaku bačvicu, a 19.08. dodano je 10 g vinske kiseline po bačvici u svrhu snižavanja pH vrijednosti.



Slika 8. Bačvice s vrelnjačama nakon inokulacije

Nakon 48h provodi se sekvencionalna inokulacija s rehidriranim sojem *S. cerevisiae* QA 23 u količini propisanoj od strane proizvođača (25 g/hL), u bačvicama gdje je fermentacija počela s *ne-Saccharomyces* kvascima. Provedena je hladna fermentacija zbog očuvanja aromatskog profila stoga su bačvice premještene u predsoblje hladne komore na temperaturu od 11.4 °C.

20.09. zbog pojave redukcijских mirisa iz bačvica 3 T.d., 4 T.d., 6 L.t., 7 L.t. i 8 L.t. dodano je 4.5 g DAP-a u svaku bačvicu, već 24 h nakon dolazi do nestanka nepoželjnih reduktivnih mirisa.

Alkoholna fermentacija je završena 04.10. nakon koje je proveden „pinking“ test vizualno i UV-VIS spektrofotometrom za svaki uzorak. Vina su otočena s taloga u staklene posude zapremnine 5 L u koje je dodano 20 g/hL (1 g/5L) PVPP-a za sprječavanje pojave ružičastih tonova te 6 g/hL (0.3 g/5L) kalijevog metabisulfitu za mikrobiološku stabilnost. Da bi se poboljšala autoliza kvašćevih staničnih stjenki dodano je 1 g/hL (0.05 g/5L) Mannozy-m-a (Enologica Vason), odnosno enzimskog preparata na bazi β -glukanaze. U svrhu očuvanja prirodnih tanina od oksidacije dodano je 1 g/hL (0.05 g/5L) sakrificijalnih tanina TiPremium (Enologica Vason). Nakon svih tretmana staklene posude su stavljene u hladnu komoru na temperaturu od 4 do 8 °C na odležavanje na finom talogu. 28.10. izvršen je pretok s taloga, a dan kasnije sulfitiran s 5 mL Sumpovina.



Slika 9: Odležavanje u hladnoj komori

3.4. Osnovna analiza vina

Za kemijsku analizu vina i mošta u fermentaciji korišten je uređaj FOSS WineScan SO2 na bazi FTIR spektrometrije. Analizirani su šećeri, ukupne kiseline, pH, etanol, jabučna kiselina, hlapljive kiseline, gustoća, mliječna kiselina te koncentracija glukoze i fruktoze. Alkoholne fermentacije su praćene analizom koncentracije šećera te je 04.10. u svim vinima koncentracija šećera bila 2 g/L ili manje osim u bačvicama gdje je fermentacija započeta s *T. delbrueckii* u kojima je bila malo iznad 4 g/L.

3.5. 'Pinking test'

Mana vina nazvana „pinking“ kod bijelih vina rezultira obojenjem i precipitacijom polifenola male molekularne mase, dajući bijelom vinu ružičaste nijanse. Vino 'Malvazije istarske' jedno je od podložnijih „pinkingu“ odnosno pojavi ružičastih tonova. Iako se problem „pinkinga“ pojavljivao i u prošlosti, današnja upotreba „moderne“ tehnologije u kojoj se koristi inertni plin, niže temperature tokom fermentacije i reduktivni uvjeti, potencira pojavu „pinkinga“.

Za potrebe testa iz svake bačvice uzet je uzorak od 10 mL koji je filtriran kroz filter papir, a filtrirano vino napunjeno je u piknometre zapremnine od 50 mL. U svaki piknometar dodano je 0.25 mL vodikovog peroksida (0.3 %) te su stavljeni u autoklav na 60 °C na 30 minuta da se ubrzaju vizualne promjene. Uz vizualni pregled provedena je i analiza svih uzoraka UV-VIS spektrofotometrom. Destilirana voda s reagensom (0.3% H₂O₂) je stavljena u kivetu kao kontrola te je svaki uzorak očitana na valnim duljinama od 440, 500 i 580 nm. Vina s „pinking“ potencijalom imaju absorbancu veću od 5 mAU pri mjerenju s valnim duljinama od 440, 500 i 580 nm. Absorbanca (mAU) je izračunata uz pomoć formule $|500 \text{ nm}| \times (3 \times |580 \text{ nm}| + 4 \times |440 \text{ nm}|) / 7 \times 1000$.

3.6. Analiza pojedinačnih aromatskih spojeva

Moderne tehnike kao što je plinska kromatografija omogućuju olakšano identificiranje i kvantificiranje aromatskih komponenata. Plinska kromatografija je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje kemijskih komponenata iz uzorka te detekciju i količinu izdvojenih komponenata. Da bi analiza bila uspješna komponente moraju biti hlapljive i termički stabilne da se ne razgrade u procesu analize. Arome su analizirane u laboratoriju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. U svim vinima provedena je analiza pojedinačnih aromatskih spojeva primjenom instrumentalne metode plinske kromatografije (GC-MS). Ekstrakcija iz vina provedena je primjenom ekstrakcije na čvrstoj fazi s LiChrolut EN kolonicama (500 mg, 3 mL, Darmstadt, Njemačka). Prije nanošenja uzorka kolonica je kondicionirana s 3 mL diklormetana, metanola i 13 %-tne vodene otopine etanola. Po završetku kondicioniranja, naneseo je 50 mL uzorka vina. Prolaskom uzorka kroz kolonicu ostavljena je da se suši na zraku 30 min, a potom je provedeno ispiranje analita s 1 mL diklormetana. Dobiveni ekstrakt prenesen je u posudicu za uzorak i analiziran primjenom metode GC-MS. Za potrebe analize GC-MS korištena je kolona ZB-WAX 60 glasnik zaštite bilja 63 godine dimenzija 60 m x 0.25 mm i.d. x 0.50 μm (Phenomenex, SAD). Analiza je provedena na vezanom sustavu GC-MS (plinski kromatograf Agilent Technology 6890, spektrometar masa Agilent 5973N). Ostali parametri analize bili su istovjetni onima opisanima u radu Lopez et al. (2002.).

3.7. Senzorna analiza

Pokusna vina ocjenilo je pet certificiranih ocjenjivača vina. Senzorna analiza provedena je na Agronomskom fakultetu u Zagrebu u prostoru Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo. Vina su evaluirana opisnom metodom te metodom redoslijeda. Ocjenjivačima su predstavljena tri uzorka, prvo je predstavljen kontrolni uzorak fermentiran s čistom kulturom *S. cerevisiae*, a zatim uzorci gdje je provedena sekvencionalna inokulacija s *T. delbrueckii* te s *L. thermotolerans*. Korištena je deskriptivna metoda u kojoj je boja opisana kroz nijansu i kakvoću na skali od 1 (neizraženo) do 5 (vrlo izraženo). Miris je opisan kroz šest mirisnih nota (cvjetne, voćne, prosušeno voće, orašasto voće, biljne, začinsko bilje) uz ostale mirise (tost, med, vosak, maslac) na skali od 1 do 5, a kod okusa definirana je kakvoća, kiselost, gorčina, astringencija, tijelo, harmoničnost i „*aftertaste*“ te ukupni dojam također ocjenom od 1 do 5.

3.8. Statistička analiza

U svim uzorcima provedena je statistička obrada podataka koja je uključila analizu varijance (ANOVA) pri čemu se srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički razlikuju uz $p < 0.05$.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Alkoholna fermentacija

Vinima fermentiranim s čistom kulturom *S. cerevisiae* (1 S.c., 2 S.c.) i u ko-kulturi s *L. thermotolerans* (6 L.t., 7 L.t., 8 L.t.) bilo je potrebno 17 dana do kraja fermentacije, u isto vrijeme fermentacija s ko-kulturom *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* je završila s < 2 g/L reduktivnih šećera. Iz mjerenih parametara u Tablici 2. vidi se da su sekvencionalno inokulirana vina s *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* (3 T.d., 4 T.d., 5 T.d.) imala više koncentracije šećera, a najveća razlika je u koncentraciji fruktoze koja nije metabolizirana u etanol tijekom fermentacije. Fermentacija s ne-*Saccharomyces* kvascima rezultirala je nižom koncentracijom etanola (0.2-0.9 vol.%) što se posebice ističe kod T.d. uzoraka zbog ne fermentirane fruktoze. Kod vina fermentiranim s *L. thermotolerans* ističe se nastanak mliječne kiseline metaboličkom razgradnjom šećera.

Tablica 2. Rezultati osnovne analize vina FOSS Wine Scan uređajem

| Parametri | 1 S.c. | 2 S.c. | 3 T.d. | 4 T.d. | 5 T.d. | 6 L.t. | 7 L.t. | 8 L.t. |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Reducirajući šećeri (g/L) | 1.9 | 1.6 | 4.6 | 5.5 | 5.4 | 1.8 | 2.0 | 2.1 |
| Ukupna kiselost (g/L) | 5.2 | 5.2 | 5.4 | 5.4 | 5.2 | 5.4 | 5.4 | 5.7 |
| pH | 3.37 | 3.35 | 3.35 | 3.35 | 3.33 | 3.32 | 3.31 | 3.32 |
| Etanol (vol.%) | 13.3 | 13.4 | 12.9 | 12.5 | 12.5 | 13.2 | 13.1 | 12.7 |
| Jabučna kiselina (g/L) | 1.3 | 1.2 | 1.2 | 1.3 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| Hlapljive kiseline (g/L) | 0.41 | 0.39 | 0.37 | 0.39 | 0.36 | 0.33 | 0.35 | 0.36 |
| Gustoća (g/cm ³) | 0.9917 | 0.9914 | 0.9950 | 0.9953 | 0.9936 | 0.9918 | 0.9918 | 0.9922 |
| Mliječna kiselina (g/L) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 0.6 | 0.9 |
| Glukoza (g/L) | 0.8 | 0.6 | 1.1 | 1.1 | 1.2 | 0.7 | 0.8 | 0.8 |
| Fruktoza (g/L) | 1.1 | 1.0 | 3.5 | 4.4 | 4.2 | 1.1 | 1.2 | 1.3 |

4.2. Ukupna kiselost i hlapljive kiseline

Prema dobivenim rezultatima analiza rezultata utvrđeno je da *T. delbrueckii* i *L. thermotolerans* nisu značajno utjecali na promjenu ukupne kiselosti u usporedbi s kontrolnim uzorcima, međutim u uzorcima fermentiranim s *L. thermotolerans* u ko-kulturi s *S. cerevisae* uočena je blago snižena pH vrijednost (0.4-0.6). Nešto nižu koncentraciju hlapljivih kiselina imala su vina dobivena sekvencionalnom inokulacijom s *L. thermotolerans* i *S. cerevisae*, a koncentracije jabučne kiseline značajno se nisu razlikovale među uzorcima (1.2-1.3 g/L). Mliječna kiselina uočena je jedino kod L.t. uzoraka u količini od 0.6 do 0.9 g/L što je razlog malog smanjenja koncentracije etanola.

4.3. 'Pinking' test

Tablica 3. prikazuje rezultate izračuna absorbance. Iz rezultata se vidi da su sva vina bila podložna „pinkingu“ s obzirom da je kad svih uzoraka absorbancia bila veća od 5 mAU. Vina fermentirana s ne-*Saccharomyces* kvascima imala su znatno veću absorbancu u usporedbi s vinom fermentiranim isključivo s *S. cerevisae*, posebice T.d. uzorci koji su imali i do 1100 % veću absorbancu.

Tablica 3. Rezultati mjerenja spektrofotometrom pri 440, 500 i 580 nm

| Uzorak | 440 nm | 500 nm | 580 nm | $\frac{ 500 \text{ nm} \times (3 \times 580 \text{ nm} + 4 \times 440 \text{ nm})}{7 \times 1000}$ |
|------------------------------|---------|--------|--------|---|
| 1 S.c. | 0.717 | 0.612 | 0.404 | 332 |
| 2 S.c. | 0.648 | 0.546 | 0.356 | 263 |
| 3 T.d. | 1.667 | 1.552 | 1.367 | 2323 |
| 4 T.d. | 1.830 | 1.708 | 1.514 | 2824 |
| 5 T.d. | 1.869 | 1.760 | 1.564 | 2987 |
| 6 L.t. | 1.250 | 1.144 | 0.986 | 1253 |
| 7 L.t. | 1.498 | 1.393 | 1.210 | 1857 |
| 8 L.t. | 1.345 | 1.249 | 1.067 | 1480 |
| Kontrola destilirana voda | – 0.025 | 0.020 | 0.017 | |

4.4. Aromatski profil vina

Da bi se utvrdio utjecaj ne-*Saccharomyces* kvasaca na aromatski profil Malvazije istarske, plinskom kromatografijom analizirani su aldehidi, viši alkoholi, hlapljivi fenoli, terpeni, norizoprenoidi, laktoni, esteri i masne kiseline. Zbog usporedbe utjecaja, promatrane su najznačajnije promjene spojeva koji se signifikatno razlikuju i prelaze prag detekcije. Od aldehidnih spojeva jedina značajna razlika uočena je kod koncentracija 2-heptenala, međutim to nije imalo izrazit utjecaj na vino s obzirom da su sve vrijednosti manje od njegovog mirisnog praga detekcije (27.5 µg/L) (Odournet, n.d.). Od viših alkohola istaknut je značajno viša koncentracija izoamilnog alkohola kod Malvazije S.c. (9.5 mg/L) iako ni njegova koncentracija ne prelazi mirisni prag detekcije koji iznosi 30 mg/L (Gómez-Míguez et al. 2007.). Kod svih vina istaknuta je viša koncentracija 4-vinilgvajakola kojeg karakteriziraju začinski mirisi (klinčić, curry), iako među uzorcima nema signifikantne razlike, a u svim uzorcima koncentracije prelaze mirisni prag detekcije od 33 µg/L (Gómez-Míguez et al. 2007.). Uočen je značajan utjecaj *Saccharomyces* kvasaca na sastav terpena posebice na *cis*-linalool (cvjetni), citronelol (citrus, cvjetni) i hotrineol (cvjetni, voćni), vina fermentirana s ne-*Saccharomyces* kvascima imala su signifikantno manje koncentracije navedenih spojeva, iako su i u kontrolnom uzorku ispod praga detekcije. Značajna razlika među laktonima uočena je kod koncentracije gama-dekalaktona koji se očituje voćnim mirisom (breskva) međutim njegova koncentracija u svim vinima ne prelazi prag detekcije (386 µg/L) (Gómez-Míguez et al. 2007.). Analizom estera utvrđeno je da je Malvazija T.d. imala signifikantno manju koncentraciju 2-feniletil acetata iako ni kod jednog uzorka nije prelazila prag detekcije, također se Malvazija T.d. značajno istaknula s većom koncentracijom etil butanoata (ananas), međutim kod svih uzoraka je poviše mirisnog praga detekcije od 20 µg/L (Gómez-Míguez et al. 2007.). Koncentracija izoamil acetata (banana) kod svih uzoraka je prelazila mirisni prag detekcije (30 µg/L) (Gómez-Míguez et al. 2007.), a kod vina fermentiranih s ne-*Saccharomyces* kvascima uočene su nešto niže koncentracije. U sadržaju masnih kiselina nije bilo značajnih razlika osim u koncentraciji butanske kiseline koja je signifikantno manja kod Malvazije T.d., a u svim uzorcima prelazi mirisni prag detekcije (173 µg/L) (Gómez-Míguez et al. 2007.). Među ostalim alkoholima razlika je uočena u sadržaju 3-etoksi-1-propanola posebice kod Malvazije T.d. koja ima značajno manje koncentracije nasuprot kontrolnog uzorka, no ne prelazi mirisni prag detekcije (10 mg/L) (Irwin 1992.) u niti jednom uzorku. Ne-*Saccharomyces* kvasci su utjecali i na promjenu koncentracije 4-metil-pentanola iako u niti jednom uzorku nije prijeđen mirisni prag detekcije (1 mg/L) (Zea et al. 2001.).

Tablica 4. Sadržaj aromatskih spojeva

| Spojevi (g/L) | Deskriptor | SC | TD | LT |
|----------------------------------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|
| ALDEHIDI | | | | |
| 2.4-heksadienal | | 1.7 a | 1.6 a | 1.6 a |
| 2.4-heptadienal (z.z) | | 1.0 a | 0.9 a | 0.9 a |
| 2.4-nonadienal | | 0.3 a | 0.1 c | 0.3 b |
| 2-heptenal | | 0.3 ab | 0.2 b | 0.6 a |
| 2-oktenal | | 1158.4 a | 1101.5 a | 1111.3 a |
| Benzacetaldehid | | 3.8 a | 3.5 a | 2.2 a |
| Benzaldehid | | 12.8 a | 13.4 a | 10.1 a |
| Dekanal | | 1.2 a | 1.4 a | 1.1 a |
| Furfural | bademi, kvasac | 1.9 a | 2.5 a | 1.6 a |
| Heksanal | | 3.2 a | 3.3 a | 3.5 a |
| Nonanal | zeleni, travnati | 2.6 a | 2.4 a | 2.1 a |
| Σ | | 1187.4 a | 1130.7 a | 1135.3 a |
| VIŠI ALKOHOLI | | | | |
| 1-butanol | kemijski | 134.3 a | 90.5 b | 89.4 b |
| 1-dekanol | voćni, cvjetni, slatkasti | 7.1 a | 7.4 a | 7.7 a |
| 1-heptanol | masni | 3.5 a | 2.4 a | 3.3 a |
| 1-heksanol | travnati, masni | 2158.5 a | 1708.4 b | 2065.4 a |
| 1-oktanol | | 22.6 a | 17.1 b | 19.8 ab |
| 1-nonanol | | 1.3 a | 0.9 a | 0.9 a |
| 2-heptanol | voćni, biljni | 0.8 a | 0.7 a | 0.8 a |
| 2-heksen-1-ol. Trans | biljni, zeleni | 15.2 a | 13.8 a | 13.3 a |
| 2-metil-1-butanol | začinski, paljeni | 25303.3 a | 21587.1 b | 20281.4 b |
| 3-nonen-1-ol. Cis | | 16.0 a | 16.8 a | 14.2 a |
| 2-penten-1-ol | | 1.5 b | 4.6 a | 5.1 a |
| 3-heksen-1-ol. Cis | travnati, zeleni | 103.6 a | 86.1 b | 82.1 b |
| 3-heksen-1-ol. Trans | trava, groždice | 61.5 a | 56.7 a | 56.8 a |
| 3-oktanol | | 0.4 a | 0.3 ab | 0.2 b |
| Isoamilni alkohol | kemijski, lak za nokte | 9350.1 a | 3135.0 b | 2620.7 b |
| Isobutanol | kemijski, lak za nokte | 2104.4 c | 2601.3 a | 2407.1 b |
| Feniletil alkohol | cvjetni, ruže, med | 3312.0 a | 2979.3 a | 2546.5 b |
| Σ | | 42596.2 a | 32308.6 b | 30214.8 b |
| HLAPLJIVI FENOLNI SPOJEVI | | | | |
| 4-vinilgvajakol | začini, klinčić, curry | 186.2 b | 230.7 a | 248.1 a |
| 4-vinilfenol | fenolni, medicinalan | 81.2 b | 85.7 a | 97.4 a |
| Eugenol | cimet, klinčić | 0.8 a | 0.9 a | 0.7 b |
| Gvajakol | dim | 0.3 a | 0.3 a | 0.3 a |
| Homovanilil alkohol | | 23.4 a | 25.3 a | 21.3 b |
| Vanilin | vanilija | 14.2 a | 12.8 b | 9.6 c |
| Σ | | 306.1 b | 355.6 a | 377.4 a |
| TERPENI | | | | |
| 1,8-terpin | | 1.1 a | 0.7 b | 0.5 b |
| 6,7-dihidro-7-hidroksilinalol | | 7.5 a | 7.4 a | 6.3 a |
| 8-hidroksilinalol | | 20.4 a | 22.6 a | 21.0 a |
| Alfa-terpineol | cvjetni, slatki | 9.6 a | 8.6 a | 8.5 a |
| Beta-farnesen | | 2.9 a | 3.1 a | 3.0 a |
| Cis-linalol oksid. Fur. | cvjetni | 1.1 a | 0.5 b | 0.5 b |
| Citronelol | cvjetni, ruže | 14.8 a | 8.2 b | 8.0 b |
| Dihidroaktinidiolide | | 0.8 a | 1.0 a | 0.9 a |
| Farnesol | | 22.4 a | 15.0 c | 18.0 b |
| Geraniol | citrusi | 11.6 a | 11.2 a | 11.6 a |

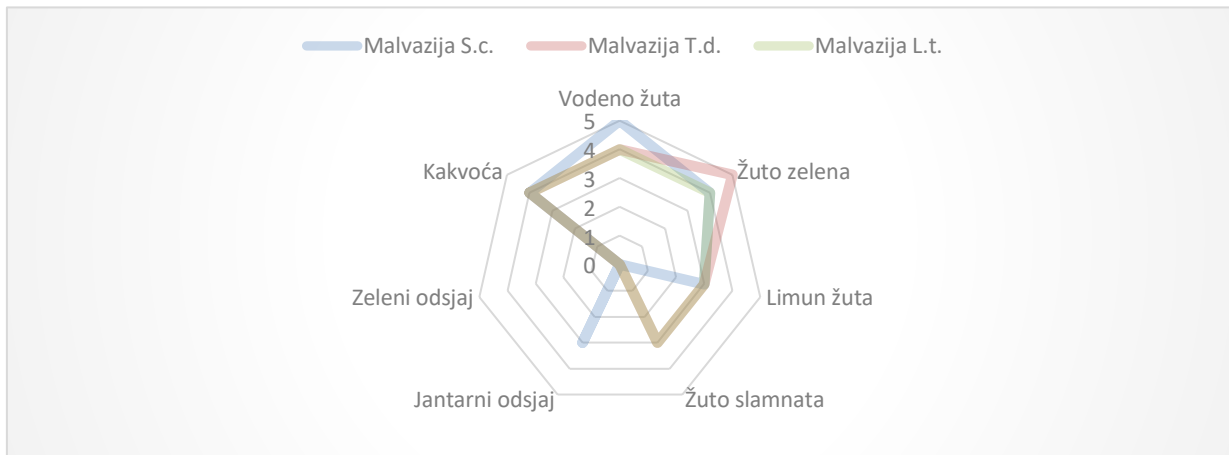
| | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Geranil acetat | dim, slatki, medicinalni | 3.2 a | 3.1 a | 3.2 a |
| Hotrienol | svježi, cvjetni, voćni | 16.1 a | 7.7 b | 6.9 b |
| Linalool | citrusi, cvjetni, slatki | 52.0 a | 48.2 a | 45.0 a |
| Linalool oksid piran | cvjetni | 3.9 b | 4.4 ab | 4.6 a |
| Neral | | 3.0 b | 9.0 a | 3.7 b |
| Nerolična kiselina | | 3.1 a | 2.7 b | 2.9 ab |
| Nerol | ruže, voćni, cvjetni | 3.2 a | 2.8 a | 2.2 a |
| Nerolidol | ruže, jabuke, zeleni, masni, drveni | 0.9 a | 0.7 a | 0.8 a |
| Terpendiol i | | 0.9 a | 0.3 b | 1.0 a |
| Terpendiol ii | | 38.3 a | 37.5 a | 33.2 b |
| Terpinen-4-ol | | 17.2 a | 2.1 b | 0.9 b |
| Tetrahidrolinalol | | 3.7 a | 5.0 a | 2.3 a |
| 2,6-dimetil-3,7-oktadien-2,6-diol | | 10.0 a | 8.6 a | 8.6 a |
| 2,6-dimetil-7-okten-2,6-diol | | 7.0 a | 5.9 ab | 4.5 b |
| Σ | | 254.8 a | 216.2 ab | 197.9 b |
| NORISOPRENOIDI | | | | |
| Alfa-ionon | | 0.2 a | 0.2 a | 0.2 a |
| Beta-ionon | ljubica, cvjetni, slatki | 0.1 a | 0.1 a | 0.0 b |
| Beta-damaskenon | slatki, voćni, cvjetni, med | 6.1 b | 6.6 a | 6.0 b |
| TDN | petrol, kerosin | 0.4 a | 0.3 ab | 0.2 b |
| Σ | | 6.8 ab | 7.1 a | 6.4 b |
| LAKTONI | | | | |
| Delta-dekalakton | | 3.6 a | 3.5 a | 3.4 a |
| Gama-butirolakton | kokos, karamela | 346.9 a | 408.6 a | 404.0 a |
| Gama-dekalakton | breskva, voćni | 1.2 c | 2.8 b | 9.6 a |
| Gama-heksalakton | | 2.5 ab | 2.9 a | 2.3 b |
| Gama-nonalakton | kokos, breskva | 13.9 ab | 16.6 a | 12.0 b |
| Gama-oktalakton | | 0.8 a | 0.9 a | 1.0 a |
| Gama-undekalakton | marelica, breskva | 0.4 a | 0.4 a | 0.4 a |
| Σ | | 369.4 b | 435.6 a | 432.6 a |
| ESTERI | | | | |
| 2-feniletil acetat | ruža, med, duhan | 27.2 a | 25.5 a | 10.1 b |
| Dietil sukcinat | prezrelo, dozrelo | 125.9 ab | 151.6 a | 103.9 b |
| Dimetil malat | | 35.2 a | 33.8 a | 32.3 a |
| Etil butanoat | ananas, jabuka | 722.0 b | 853.4 a | 736.3 b |
| Etil decanoat | cvjetni | 485.6 a | 389.6 a | 452.2 a |
| Etil furoat | ljepilo, boja | 6.2 a | 5.4 a | 5.3 a |
| Etil heksadekanoat | | 1593.0 a | 1827.9 a | 1542.1 a |
| Etil laktat | maslac | 426.3 a | 483.4 a | 449.4 a |
| Etil linoleat | | 0.1 a | 0.5 a | 0.5 a |
| Etil oktanoat | slatki, cvjetni, voćni, kruška | 2011.5 a | 1911.5 a | 1934.6 a |
| Metil vanilat | | 14.9 a | 13.3 a | 12.4 a |
| Etil-2-hidroksi-3-metilbutanoat | | 0.8 a | 1.3 a | 0.9 a |
| Etil-3-hidroksibutanoat | grožđe, voćni, karamela, prženo | 31.7 a | 25.0 b | 17.7 c |
| Etil-3-hidroksiheksanoat | guma | 5.7 a | 5.7 a | 4.4 a |
| Etil-3-metilbutanoat | voćni, ananas | 5.7 a | 3.4 a | 2.6 a |
| Heksil acetat | | 310.0 a | 201.0 b | 171.8 b |
| Isoamil acetat | banana | 6782.1 a | 5436.5 b | 4512.8 b |
| Isobutil acetat | jabuka, banana | 170.8 a | 160.6 a | 131.4 a |
| Metil heksadekanoat | | 2.5 b | 3.0 ab | 3.4 a |
| Metil heksanoat | | 6.0 a | 7.0 a | 5.5 a |
| Metil ester geranijske kiseline | | 3.2 a | 3.8 a | 3.2 a |
| Σ | | 12766.4 a | 11543.0 a | 10132.7 a |
| MASNE KISELINE | | | | |
| 2-metilpropionična kiselina | | 496.2 b | 1093.8 a | 553.4 b |

| | | | | |
|-------------------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|
| Butanska kiselina | balzamični, masni | 1086.3 a | 512.8 b | 1121.1 a |
| Dekanska kiselina | balzamični, kremasti | 2765.5 a | 2393.0 a | 2579.0 a |
| Heptanska kiselina | slatkasti | 5.6 a | 6.9 a | 6.7 a |
| Heksanska kiselina | kremasti, masni | 3965.5 a | 4316.6 a | 3994.5 a |
| Isovalerijanska kiselina | slatki, balzamični | 3.7 a | 5.2 a | 4.7 a |
| Oktanska kiselina | balzamični, masni | 5094.1 a | 4994.7 a | 4955.0 a |
| Propanoična kiselina | balzamični, masni | 44.9 a | 3.5 c | 24.3 b |
| Σ | | 13461.8 a | 13326.5 c | 13238.7 b |
| OSTALI SPOJEVI | | | | |
| 2,5-heksadion | | 0.3 b | 0.5 ab | 1.0 a |
| 2,7-oktanedion | | 5.3 a | 4.2 a | 3.9 a |
| 2h-piran-2,6(3h)-dion | | 102.3 a | 98.0 a | 89.0 a |
| 3-okten-2-on | | 2.4 a | 2.3 a | 1.7 b |
| 4-hidroksi-4-metil-2-pentanon | | 1.4 b | 4.8 a | 1.3 b |
| 4-metil--2-penten-2-on | | 19.2 a | 1.5 c | 14.0 b |
| 5-etil-4-metil-3-heptanon | | 1.7 b | 14.9 a | 1.6 b |
| Acetoin | maslac, kremasti | 9.7 a | 8.8 a | 5.3 b |
| Dihidro-2-metil-3(2h)-furanon | | 1.5 a | 1.3 a | 0.9 a |
| Σ | | 143.8 a | 136.2 a | 118.7 b |
| OSTALI ALKOHOLI | | | | |
| 1.4-butandiol | | 0.3 ab | 0.4 a | 0.1 b |
| 2-etil-1-heksanol | | 1.2 a | 0.8 b | 0.4 c |
| 3-etoksi-1-propanol | prezrela kruška | 115.0 a | 74.2 b | 21.7 c |
| 4-metil-1-pentanol | badem, prženo | 17.0 a | 13.0 b | 13.5 b |
| Benzilalkohol | dimljeno, prženo | 10.4 a | 10.5 a | 8.0 a |
| 2.3-butanediol | maslac, kremast | 0.5 b | 1.2 ab | 2.3 a |
| Σ | | 144.4 a | 100.0 ab | 46.0 b |

Različita slova (a,b,c) u redu predstavljaju signifikantnu razliku između uzoraka ($p < 0.05$)

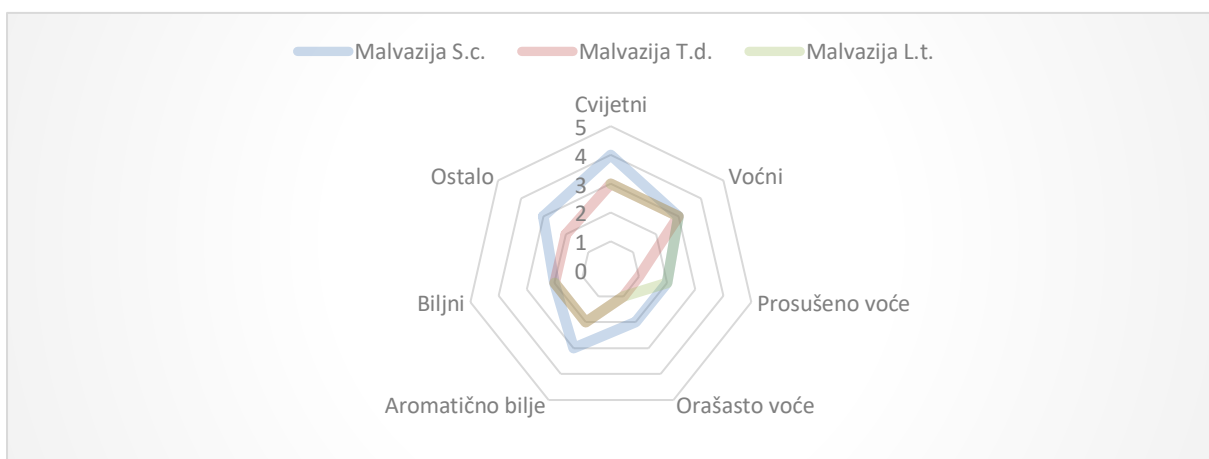
4.5. Senzorna analiza

Prosjeck ocjena opisne metode (boja, miris, okus) prikazan je u Grafu 1, a metoda redoslijeda u Tablici 5. u kojoj je broj 1 najbolje vino u nizu. Boja svih uzoraka bila je slične kakvoće i nijanse. U uzorku Malvazije S.c. vodeno žuta nijansa je nešto intenzivnija nego kod Malvazije T.d. i L.t. gdje su izraženije žuto zelene nijanse (Graf 1.).

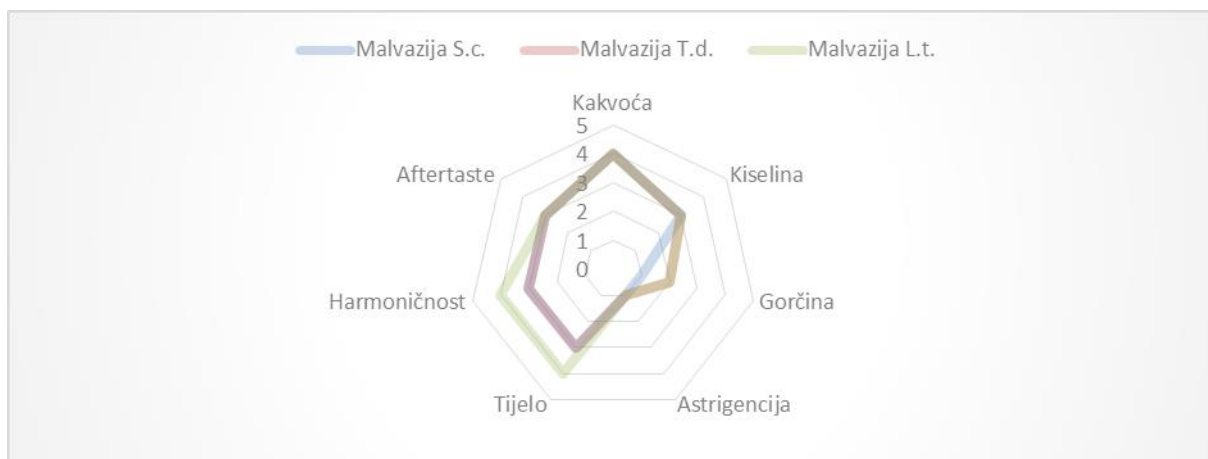


Graf 1. Prosjeck ocjena za boju vina

Iz Grafa 2. vidi se da su ocjenjivači osjetili intenzivniji cvjetni miris i miris začinskog bilja u vinu fermentiranom s čistom kulturom *S. cerevisiae*, a Malvazija L.t. se očitovala intenzivniji voćnim mirisima. Malvazija L.t. se pokazala harmoničnijom i boljeg tijela nego preostali uzorci. (Graf 3.) Rezultati metode redoslijeda prikazani su u Tablici 5. gdje se vidi da je većina ocjenjivača odabralo Malvaziju T.d. kao najbolje vino, a kao drugo najbolje vino odabrana je Malvazija L.t., bez obzira što su mirisi i boja kod vina Malvazija S.c. bili intenzivniji i bolje ocijenjeni prilikom evaluacije opisnom metodom.



Graf 2. Prosjeck ocjena za svojstvo mirisa



Graf 3. Prosjek ocjena svojstva okusa

Tablica 5. Rezultati metode redosljeda

| Ocjenjivač | Malv. S.c. | Malv. T.d. | Malv. L.t. |
|------------|------------|------------|------------|
| I | 3. | 1. | 2. |
| II | 2. | 1. | 3. |
| III | 3. | 1. | 2. |
| IV | 1. | 3. | 2. |
| V | 2. | 3. | 1. |

5. Zaključak

Na temelju provedenog istraživanja u proizvodnji vina 'Malvazija istarska' može se zaključiti da su ne-*Saccharomyces* kvasci očekivano utjecali na promjenu koncentracija etanola, a značajna promjena ukupne kiselosti nije uočena. *T. delbrueckii* zbog izrazite glukofilnosti nije fermentirao znatne količine fruktoze (3.5-4.4 g/L) zbog čega jedino vino Malv T.d. ne spada u kategoriju suho vino, što ukazuje na bolje fermentativne sposobnosti ostalih sojeva i kombinacija u pokusu. Potvrđena je proizvodnja mliječne kiseline od strane *L. thermotolerans* što je imalo utjecaj na smanjenje pH vrijednosti. Sva vina imala su visok potencijal „pinkinga“ što dokazuje osjetljivost sorte na reakciju proantocijanidina s kisikom što zahtjeva preventivni tretman s PVPP-om ili prozračivanje tijekom fermentacije. Rezultati aromatskog profila ukazuju na razlike među tretmanima, međutim značajna razlika ide u korist vina proizvedenog klasičnim *S. cerevisae* kvascem. Kad su u pitanju grupe aromatskih spojeva ne-*Saccharomyces* kvasci su utjecali na višu koncentraciju laktone i hlapljivih fenola, te norisoprenoida kod vina Malv T.d. Rezultati senzorne analize metodom redoslijeda nas dovode do zaključka da su ne-*Saccharomyces* kvasci pozitivno utjecali na ukupni dojam čineći vina kompleksnijim i drugačijim od vina dobivenog fermentacijom samo sa *S. cerevisae* sojem. Da bi se dodatno utvrdio efekt ne-*Saccharomyces* kvasaca na kemijski sastav i senzorna svojstva vina potrebno je provesti fermentacije u uvjetima koji više odgovaraju rastu i razvoju određene vrste. Istraživanja je potrebno nastaviti i provesti na industrijskoj razini u većim tankovima s mogućnošću kontrole uvjeta gdje bi rezultati bili pouzdaniji.

6. Literatura

1. Azzolini M., Tosi E., Lorenzini M., Finato F., Zapparoli G. (2015). Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31:277–293.
2. Belancic A., Agosin E. (2007). Methoxypyrazines in Grapes and Wines of *Vitis vinifera* cv. Carmenere American Journal of Enology and Viticulture. 58(4):462-469.
3. Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Moreno-Arribas, M. (2017). Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules.* 22(2):189.
4. Benito, S. (2018a). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 6775–6790.
5. Benito, S. (2018b). *The impact of Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3081–3094.
6. Coulter A.D., Godden P.W., Pretorius I.S. (2004). Succinic acid. *Wine Industry Journal.* 19(6): 16 -25.
7. DeBolt, S., Cook, D.R., Ford, C.M. (2006). L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 5608–5613.
8. Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-Saccharomyces/Saccharomyces yeasts. *Food Res. Int.* 112, 17–24.
9. Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22.
10. Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2013a). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281.
11. Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2013b). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281.
12. Gómez-Míguez, M.J., Cacho, J.F., Ferreira, V., Vicario, I.M., Heredia, F.J. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Food Chem.* 100, 1464–1473.
13. Hakim, S. (2018). Citric Acid [WWW Document]. *Vitic. Enol.* URL <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/methods-and-techniques/common-chemical-reagents/citric-acid> (pristup 21. kolovoz 2020).
14. How Viticultural Factors Affect Methoxypyrazines [WWW Document], n.d. . *Wines Vines Anal.* URL <https://winesvinesanalytics.com/features/68769> (pristup 19. kolovoz 2020).
15. Hranilovic, A., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Jiranek, V., Albertin, W. (2017). The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. *PloS One* 12, e0184652.

16. Irwin, A.J. (1992). 3-Ethoxy-1-Propanol: A Strain- and Species-Dependent Yeast Metabolite. *J. Inst. Brew.* 98, 427–431.
17. Jackson, R.S. (2008). *Wine Science: Principles and Applications*. Academic Press.
18. Jakobović, S., Jakobović, M., Hrvojčec, H., Horvat, N. (2015). Utjecaj temperature fermentacije na aromatski profil vina Rizling rajnski *Proceedings . 50th Croatian and 10th International Symposium on Agriculture . Opatija . Croatia.* 544–548.
19. Jeromec, A., Herjavec, S., Kozina, B., Maslov, L., Bešić, M. (2007). Sastav organskih kiselina u grožđu, moštu i vinu klonova Chardonnay. *Poljoprivreda* 13, 35–40.
20. Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 15–39.
21. Lacey, M.J., Allen, M.S., Harris, R.L., Brown, W.V. (1991). Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 103–108.
22. Lengyel, E. (2012). Primary aromatic character of wines. *Food Technol.* 16(1):3-18.
23. Liang, C., Jeffery, D.W., Taylor, D.K. (2018). Preparation of Magnetic Polymers for the Elimination of 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine from Wine. *Molecules* 23, 1140.
24. Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M.A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., Suárez-Lepe, J.A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 915–922.
25. Lopez, R., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatogr A*, 966(1- 2),167-77.
26. Maletić, E., Pejić, I., Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Stupić, D., Andabaka, Ž., Marković, Z., Šimon, S., Žulj Mihaljević, M. (2015). *Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze*.
27. Marais, J., Van Wyk, C.J., Rapp, A. (1992). Effect of sunlight and shade on norisoprenoid levels in maturing Weisser Riesling and Chenin blanc grapes and Weisser Riesling wines. *S. Afr. Enol. Vitic.*,13(1):23-32.
28. Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M.A., González, C., Suárez Lepe, J.A. (2018). *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology. *Fermentation* 4, 53.
29. Odournet, S. by, n.d. *Odour Threshold Shop | Odour Threshold Shop by SENSENET [WWW Document]. Odour Threshold Shop. URL <https://www.odourthreshold.com/> (pristupljeno 9. srpanj.2020).*
30. Peinado, R.A., Moreno, J., Bueno, J.E., Moreno, J.A., Mauricio, J.C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chem.* 84, 585–590.
31. 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 Technol. Biotechnol.* 46, 86–92.
32. Ramírez, M., Velázquez, R. (2018). The Yeast *Torulaspora delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking. *Fermentation* 4, 94.

33. Rapp, A. (1988). Wine aroma substances from gas chromatographic analysis, in: *Wine Analysis*. Springer. 29–66.
34. Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Cavelier, F. (2011). Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. *Chem. Rev.* 111, 7355–7376.
35. Saerens, S.M.G., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R. (2008). Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 454–461.
36. Scheiner J.J., Sacks G.L., Vanden Heuvel J.E. (2009). How Viticultural Factors Affect Methoxypyrazines. *Wines & Vines*, 11. <https://winesvinesanalytics.com/features/article/68769/How-Viticultural-Factors-Affect-Methoxypyrazines> (pristupljeno 19. kolovoz 2020).
37. Shinohara, T., Watanabe, M. (1981). Effects of Fermentation Conditions and Aging Temperature on Volatile Ester Contents in Wine. *Agric. Biol. Chem.* 45, 2645–2651.
38. The occurrence of succinic acid in wines - Wineland [WWW Document], n.d. URL <https://www.wineland.co.za/the-occurrence-of-succinic-acid-in-wines/> (pristupljeno 16. kolovoz 2020).
39. van Breda, V., Jolly, N., van Wyk, J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.* 163, 80–88.
40. Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M.L., Ramírez, M. (2019). Using *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts in the elaboration of base wine and traditional sparkling wine. *Int. J. Food Microbiol.* 289, 134–144.
41. Volschenk, H., Van Vuuren, H.J.J., Viljoen-Bloom, M. (2006). Malic acid in wine: origin, function and metabolism during vinification. *South African Journal for Enology and Viticulture* 27(2):123-136.
42. Waterhouse, A.L., Sacks, G.L., Jeffery, D.W. (2016). *Understanding Wine Chemistry*. John Wiley & Sons.
43. Zea, L., Moyano, L., Moreno, J., Cortes, B., Medina, M. (2001). Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. *Food Chem.* 75, 79–84.

7. Životopis

Luka Marinov rođen 03.04.1995. pohađao je matematičku gimnaziju u Splitu, a nakon srednje škole polaže Cambrige C1 ispit. 2015. godine upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu preddiplomski studij Hortikultura, a 2018. godine upisuje diplomski studij Hortikultura – Vinogradarstvo i Vinarstvo. Od druge godine preddiplomskog studija uključen je u aktivnosti Ampelografske grupe koja djeluje u sklopu Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo. Obaveznu stručnu praksu obavlja 2019. u vinariji Agrolaguna D.D. u Poreču gdje provodi svoje istraživanje za diplomski rad. Od kraja siječnja do sredine travnja 2020. godine odlazi u Južnoafričku Republiku raditi kao radnik u podrumu za „Strandveld“ vinariju gdje se upoznaje s tehnologijom proizvodnje vina u vinarijama malih kapaciteta. Tijekom kolovoza i rujna 2020. ponovno se zapošljava u vinariji Agrolaguna D.D. kao sezonski radnik u podrumu.