

# Određivanje glicerola u vinima iz kontinentalne Hrvatske

---

**Crnčić, Ivana**

**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:204:586098>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-11**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



# **Određivanje glicerola u vinima iz kontinentalne Hrvatske**

DIPLOMSKI RAD

Ivana Crnčić

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Hortikultura  
Vinogradarstvo i vinarstvo

# **Određivanje glicerola u vinima iz kontinentalne Hrvatske**

DIPLOMSKI RAD

Ivana Crnčić

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, **Ivana Crnčić**, JMBAG 0178091166, rođena 26.08.1993. u Varaždinu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

### **Određivanje glicerola u vinima iz kontinentalne Hrvatske**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica 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 upoznata odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studentice*



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



## IZVJEŠĆE

### O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Ivane Crnčić**, JMBAG 0178091166, naslova

#### **Određivanje glicerola u vinima iz kontinentalne Hrvatske**

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. doc.dr.sc. Željko Andabaka, član

\_\_\_\_\_

## **Zahvala**

Ovime se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Ana-Mariji Jagatić Korenika na ukazanoj pomoći oko izrade ovog diplomskog rada. Hvala i profesorima Agronomskog fakulteta na prenesenom znanju. Najviše zahvaljujem svojim roditeljima i svima onima koji su na bilo koji način pomogli oko moga školovanja.

## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. Uvod.....  | 1  |
| 1.1 Cilj rada.....  | 2  |
| 2. Glicerol.....  | 3  |
| 2.1. Proizvodnja i povećanje koncentracije glicerola.....                 | 3  |
| 2.2. Utjecaj malokatične fermentacije na glicerol u crnim vinima.....     | 5  |
| 3. Metode određivanja glicerola.....                                      | 6  |
| 3.1. Kemijsko određivanje.....  | 7  |
| 3.2. Enzimatsko određivanje.....  | 7  |
| 3.3. Određivanje plinskom kromatografijom.....                            | 8  |
| 3.4. Autentičnost vina.....   | 8  |
| 4. Praktični dio.....   | 9  |
| 4.1. Određivanje glicerola enzimatskom metodom.....                       | 10 |
| 4.2. Usporedba rezultata analize glicerola u predikatnim vinima 2018..... | 14 |
| 5. Zaključak.....   | 18 |
| 6. Popis literature.....  | 19 |

## Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ivana Crnčić**, naslova

### **Određivanje glicerola u vinima iz kontinentalne Hrvatske**

Glicerol je nehlapljivi nusproizvod alkoholne fermentacije. Prisutan je u suhim i poluslatkim vinima u koncentracijama od 5 g/L do 14 g/L. Crna vina imaju više koncentracije glicerola u odnosu na bijela, i to od 6.8 g/L do 10.5 g/L, dok predikatna vina sadrže najviše koncentracije glicerola, do 25 g/L. Glicerol je vrlo važan u sastavu kvalitetnih vina samim time što doprinosi viskoznosti odnosno punoći, što je uzrokovalo i zloupotrebu njegovog utjecaja, nelegalnim dodavanjem industrijskog glicerola u vino. Danas postoje razne metode analize vina kojima se dokazuje patvorenje vina dodatkom raznih spojeva za poboljšanje njegove kvalitete. Metode za dokazivanje prisutnosti i koncentracije glicerola mogu biti enzimatske, kemijske i instrumentalne (GC- plinska kromatografija). U uzorcima vina iz kontinentalne Hrvatske analiziranih enzimatskom metodom dobivene koncentracije za predikatna vina kreću se u rasponu od 5.7 g/L do 34.1 g/L dok su prosječne vrijednosti ispitanih uzoraka u Republici Hrvatskoj za 2018. godinu 12.4 g/L.

**Ključne riječi:** enzimatska metoda, glicerol, mirna vina, predikatna vina



## Summary

Of the master's thesis-student, **Ivana Crnčić** entitled

### **Glycerol analysis in wines from continental Croatia**

Glycerol is a nonvolatile compound of alcoholic fermentation. It is present in dry table wines in a concentration from 5 g/L to 14 g/L. In comparison to white wines, red wines have higher concentrations of glycerol, from 6.8 g/L to 10.5 g/L. Predicate wines contain the highest concentration of glycerol up to 25 g/L. Glycerol is very important for the production of high quality wines by giving the wine viscosity or fullness, which was often abused through illegal addition of industrial glycerol to wine. Today there are various methods of wine analysis, to prove the adulteration of wine by the addition of various compounds to improve its quality. Methods for proving glycerol concentration content can be enzymatic, chemical or instrumental (GC- gas chromatography). According to the wine samples that were analyzed by the enzymatic method, it can be seen that the concentration in predicate wines ranges from 5.7 g/L to 34.1 g/L, while the average values in the Croatian wines from 2018 are 12.4 g/L.

**Keywords:** enzymatic method, glycerol, predicate wines, still wines

## 1. Uvod

Glicerol je važan nusproizvod alkoholne fermentacije i jedan od glavnih sastojaka vina. Istraživanja u modernoj enologiji snažno su usmjerena na poboljšanje kakvoće vina, njegovih senzornih i okusnih svojstava. Vino je složena matrica koja se sastoji od nekoliko stotina sastojaka, za koje se smatra da djeluju na potpuno nelinearni način na aromu i okus vina (Voilley i sur. 1991., Lambrechts i sur. 2000.). Zbog toga je doprinos većine pojedinih sastojaka kakvoći vina teško procijeniti.

U metabolizmu kvasaca glicerol ima važnu ulogu u osnovnim staničnim procesima, posebno održavanju unutarstanične NADH/NAD<sup>+</sup> ravnoteže u uvjetima male opskrbljenosti kisikom (Oura, 1977., Costenoble i sur. 2000.), te djelujući kao kompatibilno otapalo za osmoregluaciju tijekom hiperosmotskog stresa (Blomberg i Adler 1992., Nevoigt i Stahl 1997., Scanes i sur. 1998.).

Mišljenje vinara i same vinarske industrije je kako glicerol doprinosi kakvoći vina, a nekoliko je istraživanja i dokazalo tu percepciju (Rankine i Bridson, 1971., Eustace i Thornton, 1987., Omori i sur. 1995., Ciani i Ferraro 1968.). Kada je prisutan u koncentracijama višim od granice percepcije okusa od 5.2 g/L ne doprinosi slatkoći u vinu, već osjetu punoće (Hinreimer i sur. 1955.). Glicerol poboljšava ukupnu ravnotežu između sadržaja alkohola, kiselosti, astringentnosti i slatkoće, pa se smatra da pridonosi zaobljenosti i glatkoći na nepcu (Hickinbothman i Ryan 1948.). Zajedno sa šećerima, fenolima, mliječnom kiselinom i ostalim sastojcima, glicerol čini uobičajeni sastav vina (Ribéreau-Gayon i sur. 2000.).

Do danas nije utvrđena čvrsta povezanost između glicerola i dodatne kakvoće vina zbog nedovoljnog broja podataka. Na temelju raširene percepcije da se kakvoća vina može poboljšati povećanjem razine glicerola, provode se i određeni postupci kojima bi se to postiglo. Oni uključuju manipulaciju fermentacijskim uvjetima (Radler i Schütz 1982., Gardner i sur. 1993.), selekcije novih sojeva kvasaca (Eustace i Thornton 1987., Rainieri i sur. 1999, Prior i sur. 1999.), upotrebu ne-*Saccharomyces* kvasaca kao fermentacijskih startera (Ciani i Ferraro 1998.) i upotrebu ugljičnog dioksida tijekom glikolize vinskog kvasca primjenom rekombiniranih DNA tehnika (Michnik i sur. 1997., Remize i sur. 1999., De Lopes i sur. 2000.). Međutim, utjecaj veće koncentracije glicerola na senzorno ocjenjivanje eksperimentalnih vina prijavljen je samo u malom broju istraživanja, te su često bila ocjenjena lošije od kontrolnih vina (Prior i sur. 2000, De Barros Lopes i sur. 2000.).

Vezano uz instrumentalna mjerenja doprinosa viskoznosti vina, ocjenjivači su izvijestili da je za percepciju potrebna minimalna vrijednost od 25.8 g/L (Noble i Bursick 1984.). Utjecaj koncentracije etanola na povećanje viskoznosti autori nisu uzeli u obzir, obzirom na činjenicu da glicerol u suhim vinima zauzima samo 7 do 10 % udjela za razliku od etanola (Rankine i Bridson 1971.).

Utjecaj glicerola na percipiranu viskoznost vjerojatno je zanemariv. Treba imati na umu da su pragovi samo statistički određene krajnje točke na koje mogu utjecati različiti čimbenici koji uzrokuju fluktuacije (Trant i Pangborn 1983.). Stoga će predviđanja o graničnim vrijednostima koncentracije glicerola potrebne za optimalni percipirani doprinos senzornim svojstvima vina biti otvorena za raspravu i trebala bi se ponovno testirati u redovitim intervalima.

### 1.1. Cilj rada

Cilja rada je utvrditi koncentracije glicerola u različitim tipovima mirnih vina, redovnih berbi i različitih kategorija predikatnih vina. Uz rezultate analiza, obradit će se i rezultati analize glicerola u predikatnim vinima kontinentalne Hrvatske za 2018. pri Centru za vinogradarstvo i vinarstvo, HAPIH.

## 2. Glicerol

Glicerol (prema grč. γλυκερός: sladak + [alkoh]ol) (stariji naziv glicerol),  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ , najjednostavniji je trovalentni alkohol, sirupasta tekućina slatkasta okusa (s vrelištem pri 290 °C) (Hrvatska enciklopedija, 2020.). Može se dobiti fermentacijom šećera ili sintetski iz propilena, a čisti glicerol dobiva se destilacijom u vakuumu. Neizravno doprinosi kakvoći vina te je jedan od glavnih nusproizvoda alkoholne fermentacije nakon etanola i ugljičnog dioksida. Glicerol je nehlapljiva tvar bez aromatičnih svojstava, ali značajno pridonosi kakvoći vina povećavajući slatkoću i punoću (Ribereau-Gayon i sur. 1972).

Prisutan je u suhim i poluslatkim vinima u koncentraciji od 5 g/L do 14 g/L, u odnosu na bijela vina crvena imaju veće koncentracije glicerola i to od 6.82 g/L do 10.49 g/L (Nieuwoudth 2002.), te bortritizirana vina sadrže najveće koncentracije glicerola do 25 g/L (Rankine i Bridson 1971, Ough i sur. 1972.).

Kvasac ima najveći utjecaj na proizvodnju glicerola, na što utječe mnogo drugih čimbenika (Scanes i sur. 1998.). A čimbenici koji utječu na količinu glicerola proizvedenog tijekom fermentacije su: sorta grožđa, stupanj zrelosti, temperatura fermentacije, koncentracija  $\text{SO}_2$ , pH vinove loze, sastav dušika, prozračivanje te soju kvasaca (Jackson, 1994).

### 2.1. Proizvodnja i povećanje sadržaja glicerola

Sojevi kvasca daju karakteristične količine glicerola, a mogu biti veliki i mali proizvođači (Beckwith 1935., Hickinbotham i Ryan 1948., Keilhofer i Wurdig 1961., Rankine i Bridson 1971.). Sposobnost različitih sojeva kvasca da proizvode različite količine glicerola pod identičnim uvjetima može biti povezan s aktivnošću od enzima glicerol-3-fosfat dehidrogenaze, koji katalizira pretvorbu dihidroksiaceton fosfata u glicerol-3-fosfat (Radler i Schutz 1982.).

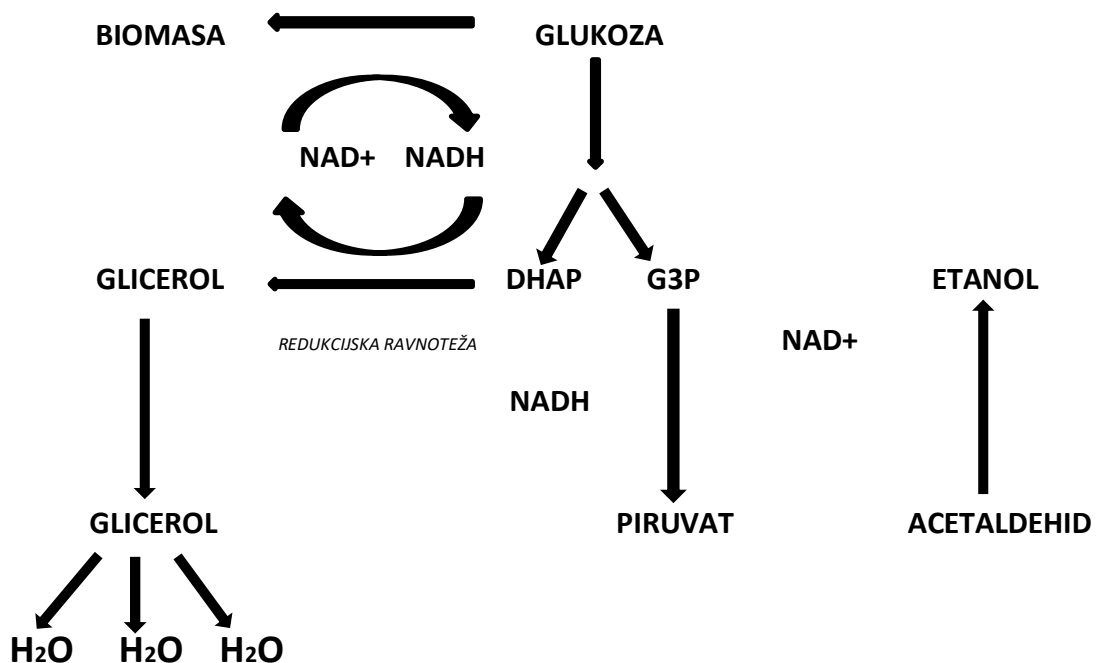
Dakle tijekom fermentacije šećera u moštu kvasac sintetizira etanol i ugljikov dioksid. Osim njih, nastaju i drugi razni nusproizvodi, od čega najviše glicerola. Glukoza se pretvara u dihidroksiaceton. Proizvodnja glicerola ima dvije važne funkcije za kvasce: regulira osmotski pritisak i održava oksidacijsko-redukcijsku ravnotežu. Kad se kvasac nalazi u hiperosmotskom mediju, kao što je grožđe sa visokim sadržajem šećera, voda brzo prelazi iz stanice u izvanstanični medij (Dequin 2014.).

Proizvodnja glicerola omogućava kvascima da uravnoteže osmotski pritisak između unutrašnjeg i vanjskog staničnog prostora. Sinteza glicerola dovodi do oksidacije NADH u  $\text{NAD}^+$  koji održava ravnotežu unutarstanične oksidacije odnosno redukcije. Stvaranjem

biomase i ostalih nusproizvoda stvara se višak NADH, koji se u nedostatku kisika ne može ponovno oksidirati mitohondrijskim disanjem. Budući da je alkoholna fermentacija glukoze sama po sebi neutralan proces (Dequin 2014.).

Nastali NADH ne može se ponovno oksidirati tijekom stvaranja etanola. Stoga je sinteza glicerola ono što omogućava NAD(H) homeostazu koju treba zadržati, a time jamče funkcioniranje brojnih metaboličkih reakcija pomoću ovog kofaktora (Dequin 2014).

Ova uloga glicerola od vitalne je važnosti za vrijeme fermentacije. Dakle kad bismo zaustavili formaciju glicerola, stanica ne bi mogla preživjeti u nedostatku kisika (Slika1.), (Dequin 2014.).



Slika 1. Sinteza glicerola *Saccharomyces cerevisiae* kvascima

Izvor: Dequin S.

Unazad nekoliko godina postoje dva načina koji se koriste za povećanje koncentracije glicerola. Jedan od načina je koristiti različite vrste *Saccharomyces* kvasaca (*S. uvarum*, *S. kudriavzevii* i *S. parcaoxus*) ili hibride (*S. cerevisiae* x *S. uvarum* i *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*), koji zajedno daju više glicerola od samog *Saccharomyces cerevisiae* pri niskoj temperaturi (Gonzales i sur. 2007., Arroyo-Lopez i sur. 2010., Gamero i sur. 2013., Oliveira i sur. 2014., Pérez-Torrado i sur. 2015.).

Povećanje proizvodnje glicerola u fermentaciji vina na niskim temperaturama iznimno je važno za poboljšanje kakvoće vina. Na povećanje koncentracije glicerola utječe dakle vrsta kvasaca i temperatura. Više glicerola proizvedeno je temperaturi od 25 °C nego 13 °C (Yu- Ting Gao i sur. 2019.)

Fermentacija na niskim temperaturama (10–15 °C) uvelike se primjenjuje najčešće zbog poboljšanje svojstava okusa i mirisa (Garcia-Rios i sur. 2017). Optimalna temperatura rasta za *Saccharomyces cerevisiae* je 25 °C, dok je 13 °C restriktivna temperatura koja može dovesti do usporavanja ili prekida fermentacije (Bisson 1999.).

Drugi način je genomikrotehnička tehnologija koja koristi *S. cerevisiae* za proizvodnju veće koncentracije glicerola s većom ekspresijom gena GPD1 (Michnick i sur. 1997.). No poznato je da *S. cerevisiae* i dalje igra glavnu ulogu u proizvodnji vina, te da ostali genetski modificirani kvasci nisu toliko prihvaćeni u vinarskoj industriji.

Količina proizvedenog glicerola varira ovisno o vrsti korištenog kvasca, sadržaju šećera te sorti grožđa. Zabilježeno je da se razlikuje ovisno o dostupnom izvoru dušika, odnosno dušični sastav ovisi o prirodi aminokiselina koje se koriste kao izvor dušika. U moštu s nedostatkom dušika pokazalo se da dodavanje složenih hranjivih sastojaka, može povećati razinu glicerola od 0.5 do 1.5 g/L, ovisno soju kvasca (Trioli 1996.). Nekoliko istraživanja pokazalo je da je došlo do povećanja temperature kod veće proizvodnje glicerola (Rankine i Bridson 1971., Ough i sur. 1972., Gardner i sur. 1993.).

Da bi potpuno shvatili ulogu kvasca u proizvodnji vina, potrebno je znati taksonomski identitet svake vrste koja pridonosi fermentaciji, kinetiku njenog rasta, biokemijska svojstva kvasaca i kemijske promjene koje oni izazivaju. Također, važni su i utjecaji vinifikacijskih čimbenika na kinetiku rasta i kemijske promjene tijekom vinifikacije. Izvor kvasaca odgovornih za alkoholnu fermentaciju može biti površina grožđa, površina opreme vinarije ili starter-kultura koja se dodaje moštu (Fleet i Heard 1993.).

## 2.2. Utjecaj malolaktične fermentacije na glicerol kod crnih vina

Razgradnja glicerola tijekom malolaktične fermentacije pod utjecajem je šećera, pH vrijednosti, te sojeva bakterije mliječne kiseline koji su uključeni u fermentaciju (Popa i sur. 2004.). Karakteristika malolaktične fermentacije koja se opaža u crvenim i bijelim vinima je poboljšanje okusa vina. Bakterije mliječne kiseline, posebno *Lactobacillus* mogu metabolizirati glicerol u potpunosti ili djelomično (Dittrich 1987.).

U istraživanju koje su proveli Dittrich i sur. (1980.) uspoređeno je 8 vina s i bez malolaktične fermentacije, utvrdili su da je 6 vina podvrgnuto malolaktičnoj fermentaciji pokazalo pad koncentracije glicerola, što se odnosi na vino inokulirano *Lactobacillus plantarum* koji se koristi za provođenje malolaktične fermentacije. U sličnim istraživanjima na

vinima proizvedenim u kontroliranim uvjetima, korištenjem *Leuconstoc eenos* nije primijećena nikakva promjena u sadržaju glicerola u vinima (Henick-Kling i sur. 1994.) i Nielsen i Richelieu 1999.).

Razgradnja glicerola događa se tijekom malaktične fermentacije, posebno u vinima gdje se fermentacija odvija spontano i nekontrolirano. Koncentracija glicerola u vinima fermentiranim malokaktičnom fermentacijom značajno je pod utjecajem mikroflore, ali ovisi i o vrijednosti pH, koncentraciji fermentiranog šećera, temperaturi. Razgradnja glicerola tijekom malolaktične fermentacije štetno djeluje na kakvoću vina, posebice zbog metaboličnih produkata koji dovode do gorčine u vinu (Popescu-Mitroi i sur. 2014.).

Fermentacija u kontroliranim uvjetima, te brzina razgradnje glicerola znatno je niža (manja od 50 %), vina evoluiraju normalno bez rizika od bolesti i oštećenja, a i malolaktičnim bakterijama daju manje mogućnosti za razgradnju glicerola (Popescu-Mitroi i sur. 2014.).

### **3. Metode određivanja glicerola u vinu**

Kao što je već navedeno, glicerol je vrlo važan za proizvodnju kvalitetnih vina. Samim time što vinu daje viskoznost odnosno punoću, neki vinari ipak zloupotrebljavaju njegov utjecaj. Dodavanjem industrijskog glicerola u vino, često se pokušavalo prekriti određene nedostatke.

Danas postoje različite metode analize vina, kako bi se analizirao i dokazao sastav, pa tako i patvorenje vina dodatkom raznih spojeva za poboljšanje njegove kvalitete. Važno pitanje u smislu zaštite potrošača predstavlja autentičnost vina, a temelji se na identifikaciji i eliminaciji prijevara na tržištu. Ulaskom u Europsku uniju Republika Hrvatska sukladno članku 88., stavka 1., Uredbe Komisije 555/2008 (EZ) preuzela je obvezu proizvodnje 30 autentičnih vina, s ciljem nadogradnje postojeće banke podataka vina Europske unije s hrvatskim vinima.

Kako bi se autentičnost dokazala, koriste se razne sofisticirane metode koje se temelje na parametrima karakterističnim za podrijetlo, koje ne podliježu promjenama tijekom prerade te se na nikakav način ne mogu mijenjati.

Izotopni omjer specifično vezanog deuterija (D/H) etanola određuje se tehnikom nuklearne magnetske rezonance ( $^2\text{H}$ -SNIF-NMR). A izotopni omjeri C/C etanola i O/O vode određuju se masnom spektrometrijom (IRMS). Dakle, u Europskoj uniji navedene metode su službene i služe za dokazivanje patvorenja vina dodatkom šećera i vode.

Za dokazivanje autentičnosti osim izotopnih tehnika koriste se i kromatografske tehnike kao što je plinska (GC-FID, GC-MS) i tekućinska visoke učinkovitosti (HPLC). Ovim tehnikama može se odrediti nehlapljivi i hlapljivi spojevi grožđa i vina, koji nam mogu poslužiti za dokazivanje sorte, geografskog podrijetla vina i godine berbe, patvorenje vina dodatkom glicerola, aroma i drugih spojeva koji su zabranjeni u proizvodnji vina.

### 3.1. Kemijsko određivanje

Kemijska metoda koja se najviše koristi je kolorimetrijska metoda prema Rebelienu. Kolorimetrijske metode se baziraju se na kemijskoj reakciji proteina s različitim reagensima pri čemu se razvija karakteristično obojenje otopine. Intenzitet razvijene boje je u određenom opsegu proporcionalan koncentraciji proteina, a najpreciznija su mjerenja u središnjem dijelu područja proporcionalnosti.

Na točnost mjerenja mogu utjecati i druge molekule koje su prisutne u otopini proteina (puferi, soli, itd.), a na rezultate mjerenja utječe i vrsta proteina tako da različiti proteini jednake koncentracije mogu pokazivati različite vrijednosti apsorbancije. Stoga je od iznimne važnosti da se za izradu baždarnog dijagrama, ukoliko je to moguće, koristi protein čiju koncentraciju kasnije želimo određivati u uzorcima, odnosno, ako to nije moguće, protein koji daje najslabije vrijednosti apsorbancije. Osim toga slijepa proba mora sadržavati sve komponente koje sadrži i uzorak u kojem mjerimo koncentraciju proteina kako bi se eliminirao njihov utjecaj na vrijednosti apsorbancije.

### 3.2. Enzimatsko određivanje

Glicerol se fosforilira pomoću adenzin-5'-trifosfata (ATP) u L-glicerol-3-fosfat reakcijom koju katalizira glicerokinaza. Adenzin-5'-difosfat (ADP) koji nastaje u reakciji ponovo se konvertira u ATP uz nastajanje piruvata. U reakciji s ADP još sudjeluje fosfoenolpiruvat (PEP), a katalizirana je enzimom piruvat kinaza (PK).

Djelovanjem enzima Laktat dehidrogenaze (L-LDH), piruvat se reducira u L-laktat pomoću reduciranog nikotinamidadenin dinukleotida (NADH) uz nastajanje NAD<sup>+</sup>. Pri 340 nm mjeri se smanjenje apsorbancije zbog potrošnje NADH. Nastali NAD<sup>+</sup> je u stehiometrijskom odnosu s količinom glicerola u uzorku.

Ova je metoda specifična za glicerol. Linearna je u rasponu 0.8-35 µg glicerola u uzorku. Pri provođenju analize dopuštene su razlike apsorbancije dvaju istovjetnih uzoraka koje iznose 0.005-0.010, što odgovara koncentraciji glicerola od otprilike 0.086-0.171 mg/L u analiziranom uzorku. Ukoliko su uzorci razrijeđeni, koncentracija dobivena analizom razrijeđenog uzorka množi se faktorom razrjeđenja F.



Uzorci bijelih i crnih vina analiziraju se bez ikakve posebne pripreme, osim razrjeđenja 1:20, pa prema tome faktor razrjeđenja F iznosi 20. Ukoliko je konverzija glicerola završena za otprilike 5 minuta, može se zaključiti da nije bilo interferencija. Ovo se može dalje provjeriti dodavanjem glicerola u kivetu nakon završetka reakcije (oko 20 µg u 0.1 mL), što treba dovesti do značajnog povećanja apsorbancije.

Standard glicerola analizira se samo kad postoji sumnja u točnost spektrofotometra, ili kad se sumnja u inhibiciju zbog nekog sastojka uzorka. Određivanje glicerola u uzorcima bijelih i crnih vina može se provesti bez prethodne obrade uzorka pa se uzorak samo razrjeđuje i to obično u omjeru 1:20 te se uzima 0.1 ml uzorka. Mjeriti prema zraku (bez kivete u spektrofotometru) ili prema vodi. Konačni volumen u kiveti iznosi 2.34 mL. Očitati prema zraku (bez kivete na putu svjetla) ili prema vodi.

Za određivanje glicerola korišten je komercijalno dostupan enzimski kit K-GCROL (Megazyme, Irska) koji sadrži reagense potrebne za 70 analiza i spektrofotometar Varian Cary 3 UV/VIS Spectrophotometer, SAD

### 3.3. Određivanje plinskom kromatografijom

Plinska kromatografija je metoda koja se koristi za separaciju organskih spojeva. Bazira se na distribuciji smjese komponenata između dvije faze. Komponente se kreću kroz kolonu pomoću plina nosioca. Plinovi dušik, helij i vodik koriste se kao nosioci, a odabir među njima ovisi o vrsti detektora koji se koristi i specifičnosti primjene. Odvojene komponente izlaze iz kolone različitim brzinama ovisno o afinitetu komponentama prema stacionarnoj fazi.

Detektirane komponente se elektronički prikazuju na registratorskom pisaču u obliku pikova. Vrijeme izlaska svake pojedine komponente iz kolone karakteristično je za komponentu, a površina pika je proporcionalna njenom udjelu.

#### 3.3.1. Autentičnost vina

Europska industrija proizvodnje vina od ogromnog je gospodarskog i kulturnog značaja, a europska vina prepoznata su kao najbolja na svijetu. Nažalost, postojali su slučajevi lažnog povećavanja kakvoće ili količine vina. Laboratorij BEVABS daje presudan doprinos naporima o dokazivanju autentičnosti. Velika većina proizvođača je poštena, no postoji i manjina koja dodaje šećer od trske ili repe radi povećanja koncentracije alkohola tijekom fermentacije.

Sredinom osamdesetih u Austriji uhvaćeni su proizvođači koji su stavljali dietilen glikol u vino kako bi poboljšali tijelo i slatkoću vina. Nijedan potrošač nije imao zdravstvenih posljedica,

no to je ozbiljno poljuljalo povjerenje potrošača prema vinarskoj industriji. Da bi se smanjila prevara, vina se moraju ispitati na autentičnost.

Europski ured za vino, alkohol i alkoholna pića (BEVABS), specijalizirani laboratorij zajedničkog istraživačkog centra Europske komisije upravo to čini. Postoje nacionalni laboratoriji instituta za analizu vina, a njihovi rezultati moraju biti unakrsno testirani. Naoružani rezultatima, analitičari BEVABS-a i ovlaštenih laboratorija država članica Europske unije mogu provjeriti baze podataka s poznatih autentičnih proizvoda kako bi utvrdili je li uzorak vina u skladu s oznakom na boci. BEVABS uz pomoć mreže specijaliziranih državnih laboratorija redovito prikupljaju i analiziraju uzorke iz različitih vinogradarskih regija.

Baze podataka dostupne su nacionalnim laboratorijima za kontrolu i sadrže preko 80 parametara za svako vino, koji uključuju geografsko podrijetlo, godinu proizvodnje, sortu grožđa, postupak proizvodnje vina, kemijsku analizu, sastav tla i vremenske uvjete za 12000 izvornih vina.

## 4. Praktični dio

### 4.1. Određivanje glicerola enzimatskom metodom

Glicerol se analizira u vinu jer je pokazatelj njegove kakvoće. Kao što je već navedeno, više čimbenika utječe na koncentraciju glicerola u vinu. Sadržaj glicerola u suhim vinima je 5-14 g/L, koncentracije glicerola kod crvenih vina kreću se u rasponu od 6.82 g/L – 10.49 g/L (Nieuwoudth 2002.). Osim ako je grožđe bilo zaraženo *Botrytis cinerea* tada njegova koncentracija može sadržavati preko 25 g/L (Rakine i Bridson 1971., Ough i sur. 1972.).

Praktični dio ovog rada bio je određivanje količine glicerola u mirnim vinima. Analizirano je 13 uzoraka vina enzimatskom metodom. Analizirana vina su od različitih sorata grožđa, iz različitih godina proizvodnje, te različitih ZOI-a kontinentalne Hrvatske.

Uzorci su najprije razrijeđeni vodom, u omjeru 1:20, dakle faktor razrjeđenja bio je  $F=20$  (Slika 2.)



Slika 2. Razrjeđivanje uzoraka vina destiliranom vodom



Slika 3. Razrijeđeni uzorci vina

Nakon razrijeđivanja destiliranom vodom, započinje primjena enzimatske metode opisane u Tablici 1. Postupak za svaki uzorak treba dobro pratiti kako bi nam na kraju očitavanje rezultata bilo ispravno. Metoda je vrlo precizna i brza. Bitno je vrlo pažljivo pratiti postupak enzimatske metode.

Postupak određivanja glicerola :

Valna dužina: 340 nm

Kiveta: širina 1 cm

Temperatura: oko 25 °C

Volumen uzorka (0.1 – 2 mL) koji sadrži 0.8 - 35 µg L-jabučne kiseline

Tablica 1. Postupak određivanja glicerola enzimatskom metodom

| PIPETIRATI U KIVETU                     | SLIJEPA PROBA | UZORAK   |
|---|---------------|----------|
| Destilirana voda (temperature oko 25°C) | 2.00 mL       | 1.90 m/L |
| Uzorak                                  | -             | 100 µL   |
| Pufer                                   | 0.20 m/L      | 200 µL   |
| Otopina 2 (NADH/ATP/PEP/Tris HCl)       | 0.10 m/L      | 100 µL   |
| Suspenzija 3 (PK/L-LDH)                 | 0.02 m/L      | 20 µL    |

Zatvoriti parafilnom i promješati( nježno okretati kivevu).

Nakon otprilike 4 minute očitati apsorciju A1. Kada završi reakcija koja se odvija kada se doda suspenzija 3.(PK/L-LDH).

Dodati suspenziju 4(GK):

---

Suspenzija 4 (L-MDH)

0.02 m/L

0.02 m/L

---

Promiješati (zatvoriti parafilomom i nježno okretati kivetu)

Očitati apsorbanciju A2 na kraju reakcije (oko 5 minuta). Ako se reakcija nije zaustavila nakon 5 minuta onda nastavite apsorbanciju u intervalima od 2 minute sve dok se apsorbancija ne ustali

---

Sadržaj kita za određivanje glicerola (Slika 3.):

- Bočica 1: Tris/HCl pufer (20 mL, 1 M, pH 7,4) i magnezijev klorid (30 mM M), uz natrijev azid (0,02 % w/v) kao konzervans. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 2 : 14 tableta koje sadrže NADH, ATP i PEP. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C. Maksimalna trajnost ovih tableta postiže se čuvanjem u zabrtvljenom kontejneru u prisutnosti siilkagela pri 4 °C ili pri -20 °C.
- Bočica 3: sadrži 1,5 mL suspenzije piruvat kinaze (600 U/mL) i L-laktat dehidrogenaze (550 U/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 4: Suspenzija glicerokinaze (1,5 mL, 85 U/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 5: standard glicerola (5 mL otopine, 0,20 mg/mL) uz natrijev azid (0,02 % w/v) kao konzervans. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C. Standard glicerola analizira se samo kad postoji sumnja u točnost spektrofotometra ali kad se sumnja u inhibiciju zbog nekog sastojka uzorka.



Slika 3. Kit za određivanje koncentracije glicerola

## Izračun koncentracije glicerola

Nakon što su uzorci pripremljeni na način opisan u tablici, rezultati su očitani na spektrofotometru te uvršteni u formulu za izračun.

Odnosno razliku apsorbancija ( $A_1 - A_2$ ) za slijepu probu i za uzorak. Potom se razlika apsorbancije za slijepu probu oduzima od razlike apsorbancija za uzorak tako da se dobije koncentracija glicerola.

Formula za izračun:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \cdot \Delta A_{\text{glicerol}}$$

gdje je:

c – koncentracija glicerola (g/L)

V – konačni volumen (mL) = 2.34 mL

MW – molarna masa glicerola (g/mol) = 92,01

$\epsilon$  – ekstinkcijski koeficijent NADH pri 340 nM = 6300 (l mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>)

d- put svjetlosti (1 cm)

v- volumen uzorka (mL) = 0.1 mL

$$c = 0.3421 \times \Delta A_{\text{glicerol}}$$

Ako je uzorak bio razrijeđen, rezultat treba množiti s faktorom razrjeđenja (za razrjeđenje 1:20 množi se faktorom 20).

Tablica 2. Uzorci analizirani enzimatskom metodom i koncentracije glicerola (g/L)

| UZORAK                       | A      | A      | Razrjeđenje | Abs glicerol | Glicerol (g/L) |
|------------------------------|--------|--------|-------------|--------------|----------------|
| Graševina Kutjevo 2016.      | 1.0570 | 0.1690 | 20          | 0.8630       | 5.90           |
| Graševina Grozdanović 2017.  | 1.0350 | 0.2130 | 20          | 0.8010       | 5.48           |
| Graševina Perak 2017.        | 1.0740 | 0.1850 | 20          | 0.8640       | 5.91           |
| Graševina Papak Radosh 2017. | 1.0200 | 0.1050 | 20          | 0.8900       | 6.09           |
| Graševina Miraz 2016.        | 1.0160 | 0.6590 | 20          | 0.9220       | 6.31           |
| Graševina Nežić 2018.        | 1.0230 | 0.680  | 20          | 0.9300       | 6.36           |

|  |        |        |     |        |       |
|--|--------|--------|-----|--------|-------|
| Vidal 2015. (kasna berba)                    | 1.7220 | 1.4980 | 20  | 0.1950 | 6.67  |
| Traminac Enjingi 2009. (izborna berba)       | 1.7280 | 1.3840 | 100 | 0.3150 | 10.78 |
| Traminac Iločki podrumi 2016. (kasna berba)  | 1.7140 | 1.3400 | 100 | 0.3450 | 11.80 |
| Graševina Jakobović 2012. (izborna berba)    | 1.0130 | 0.5560 | 100 | 0.4320 | 14.78 |
| Tokaj 2015. (slatko)                         | 1.7290 | 1.2800 | 100 | 0.4200 | 14.37 |
| Traminac Iločki podrumi 2012. (ledena berba) | 1.7170 | 1.1330 | 100 | 0.5550 | 18.97 |

$$C = \frac{2,34 \times 92,1}{6300 \times 1 \times 0,1} = \Delta \text{glicerol} \times R$$

$$\text{glicerol} = 0.3421 \times \Delta A \text{ glicerol} \times R$$

$$\Delta A \text{ glicerol} = \Delta A \text{ blank} - \Delta A \text{ uzorak}$$

Primjer.

$$\text{Glicerol} = 0.3421 \times 0.8630 \times 20 = 5.90$$

Iz rezultata jasno vidimo kako vina kasne, izborne ili ledene berbe sadrže znatno više koncentracije glicerola. Najveću koncentraciju glicerola imao je Traminac ledena berbe iz 2012., 18.99 g/L, a najmanje Graševina iz 2016. s 5.90 g/L. Vina Graševine redovne berbe se razlikuju, ali je razlika zanemariva, to se može pripisati zoni uzgoja ili čimbenicima koji su utjecali na proizvodnju te godine. Vina redovnih berbi imala su najniže koncentracije glicerola (prosječna vrijednost bila je 6 g/L), zatim slijedi vino od sorte Vidal iz Kanade koje je kao kasna berba imalo 6.67 g/L glicerola. Viša koncentracija glicerola zabilježena je kod vina kasne i izborne berbe što je u skladu s čimbenicima koji utječu na koncentraciju glicerola.

## 4.2. Analiza rezultata koncentracije glicerola u predikatnim vinima 2018.

Tablica 3. Rezultati analize glicerola u predikatnim vinima kontinentalne Hrvatske iz 2018.

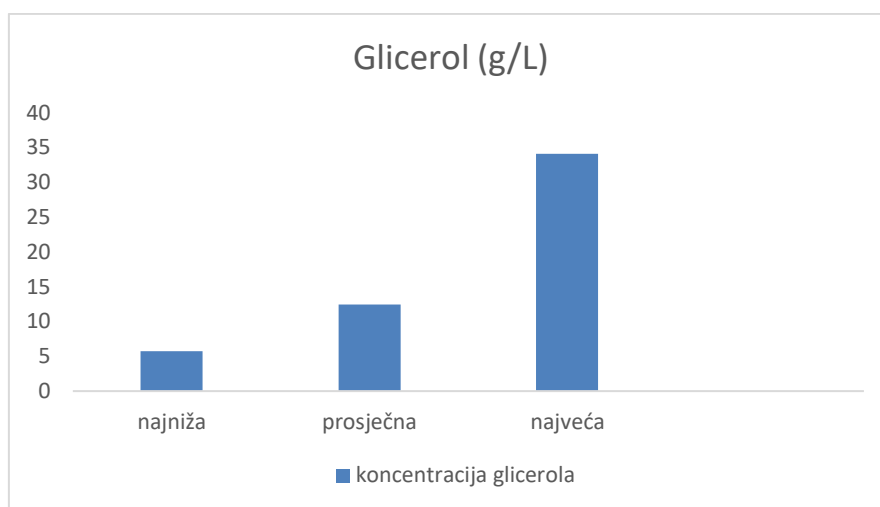
| Sorta i kategorija vina         | ZOI               | Glicerol (g/L) |
|---------------------------------|-------------------|----------------|
| Graševina (kasna berba)         | ZAGORJE-MEĐIMURJE | 5.7            |
| Graševina (kasna berba)         | SLAVONIJA         | 6.1            |
| Graševina (kasna berba)         | SLAVONIJA         | 6.2            |
| Škrlet (kasna berba)            | MOSLAVINA         | 7.0            |
| Graševina (kasna berba)         | SLAVONIJA         | 7.3            |
| Pinot sivi (kasna berba)        | SLAVONIJA         | 7.5            |
| Traminac (izborna berba)        | PLEŠIVICA         | 8.6            |
| Graševina (izborna berba)       | ZAGORJE-MEĐIMURJE | 9.0            |
| Merlot (kasna berba)            | SLAVONIJA         | 9.0            |
| Traminac (izborna berba)        | HRV.PODUNAVLJE    | 9.1            |
| Pinot crni (kasna berba)        | -                 | 9.4            |
| Zweigelt (kasna berba)          | SLAVONIJA         | 9.7            |
| Traminac (kasna berba)          | PLEŠIVICA         | 10.5           |
| Graševina (izborna berba)       | HRV.PODUNAVLJE    | 10.7           |
| Rajnski rizling (izborna berba) | ZAGORJE-MEĐIMURJE | 10.8           |
| Graševina (kasna berba)         | HRV.PODUNAVLJE    | 11.6           |
| Graševina (kasna berba)         | SLAVONIJA         | 12.7           |
| Muškat žuti (ledena berba)      | PRIGORJE BILOGORA | 12.8           |
| Manzoni bijeli (izborna berba)  | ZAGORJE-MEĐIMURJE | 12.8           |
| Traminac (izborna berba)        | HRV.PODUNAVLJE    | 13.2           |
| Traminac (izborna berba)        | ZAGORJE-MEĐIMURJE | 14.3           |
| Traminac (izborna berba)        | HRV.PODUNAVLJE    | 15.3           |
| Graševina (izborna berba)       | HRV.PODUNAVLJE    | 17.3           |
| Rajnski rizling (izborna berba) | HRV.PODUNAVLJE    | 18.6           |
| Traminac (izborna berba)        | HRV.PODUNAVLJE    | 23.6           |
| Graševina (izborna berba)       | SLAVONIJA         | 24.1           |
| Silvanac zeleni (izborna berba) | SLAVONIJA         | 24.6           |
| Traminac (ledena berba)         | HRV.PODUNAVLJE    | 34.1           |

Izvor: Centar za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo, HAPIH, 2019.

U tablici 3. prezentirane su vrijednosti koncentracije glicerola u 28 uzoraka predikatnih vina analiziranih enzimatskom metodom, u okviru redovne analize za potrebe puštanja vina u promet u 2018. g. pri Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu (HAPIH). Najviše je bilo uzoraka sorte Graševina (10), zatim Traminac (8) koje su ujedno i najčešće sorte za proizvodnju predikatnih vina u RH. Vina su iz različitih vinogorja cijele kontinentalne Hrvatske. Iz podataka se može vidjeti raspon koncentracija od 5.7 do 34.1 g/L glicerola u predikatnim vinima iz RH. Najniže koncentracije zabilježene su u vinima kasnih berbi (prosječno 8.55 g/L), zatim slijede vina izborne berbe s prosječno 15.14 g/L. Najviša koncentracija zabilježena je u vinu ledene berbe, gotovo dvostruko viša u odnosu na Traminac ledene berbe u našim analizama. Prosječna vrijednost za ledena vina, bila je 23.45 g/L. Sve dobivene vrijednosti u skladu su s



literaturnim podacima o glicerolu pri čemu se uvijek navodi kako njegova koncentracija raste u vinima predikatnih berbi, uz višu koncentraciju šećera i infekciju *Botrytisom*.



Graf 1. Koncentracije glicerola (g/L) u predikatnim vinima na tržištu RH 2018. g.

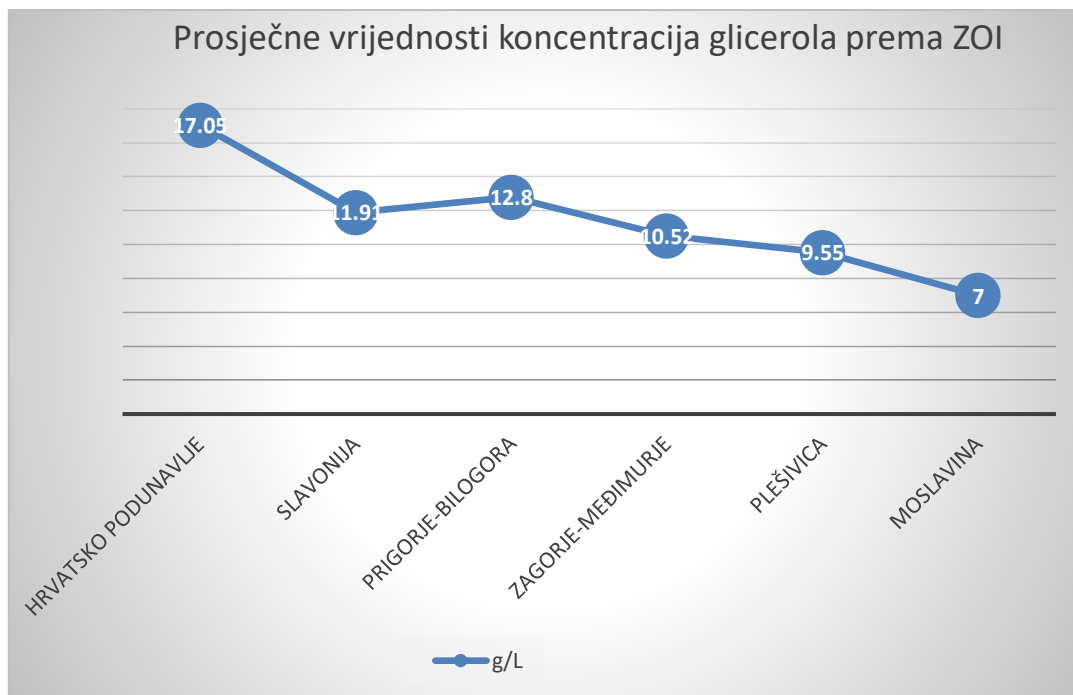
Prosječne vrijednosti koncentracija glicerola za svaki ZOI (zaštićena oznaka izvornosti) prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Prosječne vrijednosti koncentracije glicerola (g/L) u predikatnim vinima prema ZOI, za 2018.

| ZOI                 | Broj uzoraka | Prosječna vrijednost koncentracije glicerola (g/L) |
|---------------------|--------------|--|
| Hrvatsko Podunavlje | 9            | 17.05  |
| Slavonija           | 9            | 11.91  |
| Zagorje-Međimurje   | 5            | 10.52  |
| Plešivica           | 2            | 9.55   |
| Moslavina           | 1            | 7.0  |
| Prigorje- Bilogora  | 1            | 12.8   |

Izvor: Centar za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo, HAPIH, 2019.

Iz Tablice 4. može se vidjeti da predikatna vina iz Hrvatskog Podunavlja i Slavonije imaju najviše prosječne koncentracije glicerola. Slijede Prigorje-Bilogora te Zagorje-Međimurje. Obzirom na mali broj uzoraka iz Moslavine i Prigorje-Bilogora, ne može se govoriti o prosječnim vrijednostima.



Graf 2. Grafički prikaz prosječnih vrijednosti glicerola u predikatnim vinima iz 2018. prema ZOI

## 5. Zaključak

Glicerol je, kao što i istraživanja pokazuju, vrlo važan čimbenik sastava i kakvoće vina. Njegov pozitivan učinak na kakvoću vina svojevremeno su predstavljala i veliki izazov u vinarskoj industriji zbog nedozvoljenog dodavanja sintetičkog glicerola u vino. Suvremeno vinarstvo stoga ima mehanizme za otkrivanje autentičnosti vina zahvaljujući različitim analizama i laboratorijima, te umreženom sustavu kontrole.

Uz različite metode analize glicerola, enzimatska metoda je jedna od vrlo praktičnih i brzih metoda te je primijenjena u dobivanju rezultata u ovom radu. Provedene analize i rezultati dobiveni od strane HAPIH-a ukazuju na pravilnosti u rastu koncentracije glicerola od minimalnih u vinima redovne berbe bez obzira na sortu, godinu i vinogorje, do viših u predikatnim vinima, pri čemu je raspon vrijednosti za 2018. g. u RH bio od 5.7 g/L u vinu kasne berbe do 34.1 g/L u vinu ledene berbe.

## 6. Literatura

1. Arroyo-López N.F., Pérez Torrado R., Querol A., Barrio E. (2010.). Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from exhibited by *Saccharomyces cerevisiae* and their hybrid. *Food Microbiology*. 27(5): 628-637.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20510781/> Pristupljeno 15.7.2020.
2. Beckwith A.R. (1935.). Pure cultured yeasts. *J. Dep. Agric. Aust.* 38: 858-867.  
[https://www.researchgate.net/publication/237193329\\_Selective\\_hybridization\\_of\\_wine\\_yeast\\_for\\_higher\\_yields\\_of\\_glycerol](https://www.researchgate.net/publication/237193329_Selective_hybridization_of_wine_yeast_for_higher_yields_of_glycerol) Pristupljeno 15.8.2020.
3. Berg H.W., Filipello F., Hinreiner E., Webb A.D. (1955.). Evaluation of thresholds and minimum differences concentrations for various constituents of wines. I. Water solutions of pure substances. *Food Technology*. 9:23-26.  
<http://hilgardia.ucanr.edu/Abstract/?a=hilg.v28n18p477> Pristupljeno 16.7.2020.
4. Bisson L.F. (1999.). Stuck and sluggish fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 50:107-119.  
[https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkozje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1850287](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkozje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1850287)> Pristupljeno 25.7.2020.
5. Blomberg A., Adler L. (1992.). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171: 1087-1092  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC209705/> Pristupljeno 1.7.2020.
6. Ciani M., Ferraro L. (1998.). Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccaromyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85: 247-254.  
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1046/j.1365-2672.1998.00485.x> Pristupljeno 25.7.2020.
7. Dittrich H.H. (1987.). *Mikrobiologie des Weines. Handbuck der Lebensmiitteltechnologie*. 2nd Edition, Stuttgart.  
<http://infinity.wecabrio.com/3800169894-mikrobiologie-des-weines-handbuch-der-lebensmitte.pdf> Pristupljeno 28.7.2020.
8. Dittrich H.H., Sponholz W.R., Wunsch B., Wiplefr M. (1980.). Zur Veränderung des Wines durch den bakteriellen. Saurebbau Wein *Win.* 35: 421-428.

<https://core.ac.uk/download/pdf/234583279.pdf> Pristupljeno 18.7.2020.

9. Fleet G.H., Heard, G.M. (1993.). Yeasts: Growth during fermentation. In: Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers: Chur, Switzerland. 27–54.  
<http://home.uevora.pt/~jmsilva/FCT/FCT2010/Fleet%202003.pdf> Pristupljeno 28.7.2020.
10. Gamero A., Tronchoni J., Querol A., Belloch C. (2013.). Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 114: 1405-1414.  
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.12126>  
Pristupljeno 28.7.2020.
11. Garcia-Rios E., Morard M., Parts L., Liti G., Guillamón J.M. (2017.). The genetic architecture of low-temperature adaptation in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 18:159.  
<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3572-2>  
Pristupljeno 15.7.2020.
12. Gardner N., Rodrigue N., Champagne C.P. (1993.). Combined effects of sulfites, temperature, and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2022-2028.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182230/> Pristupljeno 16.7.2020.
13. González S.S., Climent M.A., Barrio E., Querol A. (2007.). Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *International Journal of Food Microbiology*. 116:11-18.  
<https://europepmc.org/article/med/17346840> Pristupljeno 28.5.2020.
14. Henick-Kling T., Acree T.E. Krieger S.A. Laurent M.H., Edinger W.D. (1994.). Modificazioni del gusto indotte dalla fermentazione malolattica. 4:41-47.  
<http://sfs.wsu.edu/personnel/faculty-staff/henick-kling-more/> Pristupljeno 15.6.2020.
15. Hickenbotham A.R., Ryan V.J. (1948.). Glycerol in wine. *Aust. Chem. Inst. J. Proc.* 15: 89-100.
16. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2020).  
<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=22276> Pristupljeno 2.8.2020.

17. Kielhófer E., Wurdig G. (1961.). Bildung von Glycerin und 2-3-Butylenglykol bei der Weingarung. 114: 376-39.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hlca.19430260619>  
 Pristupljeno 15.7.2020.
  
18. Lambrechts M.G., Pretorius I.S. (2000.). Yeast and its importance to wine aroma - A Review. S. Afr. Enol. Vitic. 21: 97-129.  
[https://www.researchgate.net/publication/303000350\\_Yeast\\_and\\_its\\_importance\\_to\\_wine\\_aroma](https://www.researchgate.net/publication/303000350_Yeast_and_its_importance_to_wine_aroma) Pristupljeno 20.7.2020.
  
19. Michnick S., Roustan J.L., Remize F., Barre P., Dequin S. (1997.). Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase yeast. 13: 783-793.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9234667/> Pristupljeno 18.7.2020.
  
20. Moreno J., Peinado R. (2012.). *Enological Chemistry*. Academic Press, USA.  
<https://www.elsevier.com/books/enological-chemistry/moreno/978-0-12-388438-1> Pristupljeno 15.5.2020.
  
21. Nielsen J.C., Richelieu M. (1999.). Control of flavour development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 740-745.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91089/> Pristupljeno 18.7.2020
  
22. Nieuwoudt H.H., Prior B.A., Pretorius I.S., Bauer F.F. (2002.). Glycerol in South African Table Wines. An Assessment of its Relationship to Wine Quality. *South African Journal of Enology & Viticulture.* 23(1): 22-30.  
<https://www.journals.ac.za/index.php/sajev/article/view/2151> Pristupljeno 10.7.2020.
  
23. Noble A.C., Bursick G.F. (1984.). The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture.* 35: 110-112.
  
24. Olivera B.M., Barrio E., Querol A., Pérez Torrado R. (2014.). Enhance denzymatic activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from the cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii*. *Plos One* 9(1): e87290.  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087290>  
 Pristupljeno 20.7.2020.

25. Omori T., Ogavwa K., Shimoda M. (1995.). Breeding of high-glycerol producing Schochu yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with acquired salt tolerance. *J. Ferment. Bioengin.* 79: 560-565.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0922338X9590819L>  
Pristupljeno 18.7.2020.
26. Oura E. (1977.). Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry.* 12:19-21.  
[https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1170254](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1170254) Pristupljeno 22.7.2020
27. Pérez-Torrado, R., González, S.S., Combina, M., Barrio, E., Querol, A. (2015.). Molecular and enological characterization of a natural *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* hybrid. *International Journal of Food Microbiology.* 80: 101-110.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25867085/> Pristupljeno 15.7.2020.
28. Popa A., Popa D., Dragomir F. (2004.). *Microbiologie oenologică*, Editura Universitaria Craiova. 142-193.  
<https://scholar.google.com/scholar?cluster=11482238141933014877&hl=en&oi=scholar> Pristupljeno 15.8.2020.
29. Popescu- Mitroi I., Radu G.D., Stoica F. (2014.). The study of glycerol metabolism in the malolactic fermentation of red wines. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(1):9019-9027.  
<https://www.rombio.eu/vol19nr1/12%20lucr%2017%20Popescu-Mitroi%20rec%205.9.2013%20ac%2004.12.pdf> Pristupljeno 15.6.2020.
30. Prior B.A., Baccari C., Mortimer R.K. (1999.). Selective breeding of *Saccharomyces cerevisiae* to increase glycerol levels in wine. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 33: 57-65.  
[https://www.researchgate.net/publication/279696965\\_Selective\\_breeding\\_of\\_Saccharomyces\\_Cerevisiae\\_to\\_increase\\_glycerol\\_levels\\_in\\_wine](https://www.researchgate.net/publication/279696965_Selective_breeding_of_Saccharomyces_Cerevisiae_to_increase_glycerol_levels_in_wine) Pristupljeno 20.6.2020.
31. Radler F., Schutz H. (1982.). Glycerol production in various strains of *Saccharomyces*. *American Journal of Enology and Viticulture.* 33: 36-40.  
<https://www.ajevonline.org/content/33/1/36> Pristupljeno 22.7.2020.
32. Rankine B.C., Bridson D.A. (1971.). Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *American Journal of Enology and Viticulture.* 22: 6-12.

[https://www.researchgate.net/publication/280765129\\_Yeast\\_and\\_bacterial\\_modulation\\_of\\_wine\\_aroma\\_and\\_flavour](https://www.researchgate.net/publication/280765129_Yeast_and_bacterial_modulation_of_wine_aroma_and_flavour) Pristupljeno 20.6.2020.

33. Ribéreau-Gayon J., Dubourdieu D.B., Lonvaud A. (2000.). *The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*. Vol. II. John Wiley and Sons, New York, Toronto.  
[https://gtu.ge/AgroLib/%5BProfessor\\_Pascal\\_RibereauGayon,\\_Denis\\_Dubourdieu\(BookZZ.org\).pdf](https://gtu.ge/AgroLib/%5BProfessor_Pascal_RibereauGayon,_Denis_Dubourdieu(BookZZ.org).pdf) Pristupljeno 18.7.2020.
34. Scanes K.T., Hohmann S., Prior B.A. (1998.). Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 19: 17-23.  
<https://core.ac.uk/download/pdf/188225173.pdf> Pristupljeno 18.7.2020.
35. Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A., Pretorius I.S. (2005.). Yeast and bacterial modulation of Wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 11(2):139-173.  
[https://www.researchgate.net/publication/280765129\\_Yeast\\_and\\_bacterial\\_modulation\\_of\\_wine\\_aroma\\_and\\_flavour](https://www.researchgate.net/publication/280765129_Yeast_and_bacterial_modulation_of_wine_aroma_and_flavour) Pristupljeno 20.7.2020.
36. Šehović Đ., Petravić V., Marić V. (2004.). Glycerol and Wine Industry, Glicerol Determination in Grape Must and Wine. *Kemija u industriji : časopis kemičara i tehnologa Hrvatske*, 53(11): 505-516.  
<https://www.bib.irb.hr/198656> Pristupljeno 30.6.2020.
37. Thornton R.J., Eustace R. (2011.). Selective hybridization of wine yeast for higher yields of glycerol. *Canadian Journal of Microbiology.* 33(2): 112-117.  
<https://www.semanticscholar.org/paper/Selective-hybridization-of-wine-yeasts-for-higher-Eustace-Thornton/182eeb77a00cf2bc00de16930dc506b716dab94d> Pristupljeno 20.7.2020.
38. Trant A.S., Pangborn, R.M. (1983.). Discrimination, intensity, and hedonic responses to color, aroma, viscosity, and sweetness of beverages. *Lebensm-Wiss u-Tech.* 16: 147-152.  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-2123-5\\_5](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-2123-5_5) Pristupljeno 15.5.2020.
39. Voilley A., Beghin V., Charpentier C., Peyron, D. (1991.). Interactions between aroma substances and macromolecules in a model wine. 24: 469-472.  
<https://eurekamag.com/research/007/473/007473979.php> Pristupljeno 16.7.2020.



40. Waterhouse A.L., Sachs G. L., Jeffery D. W. (2016.). *Understanding Wine Chemistry*. Wiley, USA.  
<https://www.wiley.com/en-us/Understanding+Wine+Chemistry-p-9781118627808>  
Pristupljeno 15.5.2020.
  
41. Gao Y., Zhang Y., Wen X., Song X., Meng D., Li B., Wang M., Tao Y., Zhao H., Guan W., Du G. (2018.). The glycerol and ethanol production kinetics in low-temperature wine fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *International Journal of Food Science & Technology*. 54(1): 102-110.  
<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.13910> Pristupljeno 30.6.2020.

## Životopis

Ivana Maček rođena je 26. kolovoza 1993. godine u Varaždinu. Odgovorna je i ambiciozna osoba. Kroz daljnje obrazovanje htjela bi usavršiti znanje u poljoprivrednoj struci. Srednju školu upisala je 2008. godine u Svetome Ivanu Zelini te stekla srednju stručnu spremu: Poljoprivredni tehničar-opći. 2012. godine upisuje Agronomski fakultet u Zagrebu, smjer Biljne znanosti. Diplomski studij upisuje 2017. godine na Agronomskom fakultetu smjer: Hortikultura, Vinogradarstvo i vinarstvo. Nema radnog iskustva, osim onog koje je stekla na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu.

Posebna znanja i vještine:

- znanje svjetskih jezika : engleski
- poznavanje rada na računalu MS office (Word, Excel, Access, Internet)
- položen vozački ispit B kategorije