

BAZI TÜRK KIRMIZI ŞARAPLARININ AMİNO ASİT İÇERİKLERİ

AMİNO ACİD CONTENT OF SOME TURKISH RED WINES

R. Ertan ANLI

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

ÖZET: Bu çalışmada ülkemizde kaliteli kırmızı şarap üretiminde kullanılan Boğazkere, Öküzgözü ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinden 1998 ve 1999 yıllarında üretilen kırmızı şarapların RP-HPLC ve spektrofotometri teknikleri yardımıyla amino asit profilleri çıkarılmış ve örnekler birbirleriyle amino asit içerikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Elde olunan sonuçlar, çeşit, yıl ve yöre farklılıklarının amino asit içeriği üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

ABSTRACT: In this research amino acid content of quality varietal Turkish red wines such as Boğazkere, Öküzgözü and Kalecik karası from the 1998 and 1999 harvested period were determined by using RP-HPLC and spectrofluorometric techniques. According to the results were obtained, the years of production the area of vineyards and the role of grapes varieties are significantly important on the amino acids profiles.

GİRİŞ

Amino asitlerin şarap biliminde önemi bakteri ve mayaların rol aldığı nitrojen asimilasyonunun temel ürünleri olmalarından ibaret olmamaktadır. Üzüm sırasında amino asitler maya beslenmesinde rol almakta ve alkol fermentasyonu sırasında mayaların yenilenmeleri için nitrojen kaynağı olarak kullanılmaktadır (HERNADEZ ORTE, ve ark. 1997). Fermentasyon gidişi üzerinde asimile olabir nitrojenin, dolayısıyla amino asitlerin maya gelişimindeki önemleri büyüktür. Toplam amino asit düzeyi şaraplarda stabilite oranı üzerinde ve fermentasyonun gidişinde etkili olabilmektedir (OUGH, 1988). Fermentasyon sırasında amino asitler bir seri reaksiyonla dönüşüme uğrayarak yüksek alkoller, aldehytleri, esterleri ve ketonik asitleri oluştururlar. Bu gibi bileşenlerin ön maddeleri olduklarından şarabın duyuşal nitelikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptirler (MARC, ve ark. 1989). Ancak, bazı serbest amino asitler duyuşal özellikler üzerinde olumlu bir etkiye sahipken, bazıları negatif bir etki gösterirler (JUHASZ, ve TÖRLEY 1985). Şarapların amino asit içeriği, şarapların özelliklerini belirlemede yani karakterizasyonunda da öneme sahiptir. Üzüm çeşidi, yıl ve bölge farklılığı amino asit profili üzerinde etkili olan temel faktörlerdir (HERNADEZ ORTE, ve ark.1997).

Şaraplarda amino asit miktarını irdelerken azotlu madde miktarı üzerinde de durmak gerekir. Zira başlangıç noktası azotlu maddelerdir. Şıra ve şaraplarda azotlu madde miktarı çok değişik düzeylerde olabilmektedir. Yapılan çalışmalarla aynı bağ üzümlerinden elde olunan şıralarda bulunabilecek azot miktarının yıldan yıla önemli değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir. Azot; bitkiler tarafından nitrat veya amonyum tuzu formunda absorbe edilmektedir. Nitrat formu enzimatik yolla indirgenerek, amino asitlerin biosentezinin kökenini oluşturacak amonyum katyonunu verir. Bu duum detoksifikasyon olarak da nitelenir (CORDONNIER, 1966). Yağışlı geçen yıllarda ve düşük olgunlukta, asimile edilebilir azot miktarının (formol varlığında toplam titre edilebilir azot olarak), yağışsız ve ileri olgunlukta üzümlerine kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir. Yine, karasal iklimte sahip bölge bağlarından elde olunan üzümlerde azot miktarının ılıman iklimlere sahip bölgelere göre daha fazla olduğu görülmektedir (SPONHOLZ, 1991).

Toplam azot üzerinde etkili olan 4 temel faktör vardır: Toprağın yapısı, üzüm çeşidi ve anaç, azotlu gübe kullanımı ve üzümün sağlam olup olmadığı.

Şıra ve şaraplarda toplam azot farklı kısımlardan oluşmaktadır: amino asitler, amonyum tuzları peptidler, proteinler vb. (FEUILLAT, 1994).

Amino asitler üzerine yapılan ilk çalışmalarda üzüm şirasının bitkisel kökenli 20 kadar amino asit içerdiğini ve amino asit düzeyinin toplam azot içinde %20-30 kadar bir paya sahip olduğunu göstermiştir. Amino asitler içinde en yüksek düzeyde bulunanlar miktarları çeşide ve toprak koşullarına bağlı olarak değişebilen arjinin ve prolindir (POUX ve OURNAC, 1970). Diğer yandan amino asitler ve miktarları anaca ve çeşide bağlı olarak önemli farklılıklar göstermektedir. Örneğin, Amerikan anaçlarından *Vitis labrusca* K-alanin bakımından *Vitis vinifera*'ya kıyasla çok zengindir. Buna karşın *Vitis vinifera*'da hidoksiptrolin fazladır. Yine *Vitis vinifera* üzerine aşılanmış Chardonnay çeşidinde prolidin, Aligoté çeşidinde ise arjinin daha fazla bulunmuştur (FEUILLAT, 1974).

LEPEDATU ve TANASE (1967) kırmızı şarapların fermentasyonu sırasında başlangıçta amino asit düzeyinin yüksek fermentasyonun hızlandığı aşamada ise amino asit miktarında azalma görüldüğünü ve tortunun ayrılması ile yeniden artış olduğunu saptamışlardır.

KLIEWER (1968) şıra ve şaraplardaki serbest amino asit miktarının çeşide, anaca, verime, yıldan yıla değişen iklim koşullarının etkili olmuştur. OUGH ve BELL (1980) ise bağ topraklarının azotlu gübreler bakımından zenginleştirilmesinin amino asit miktarı üzerinde etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Şıra ve şaraplarda amino asit saptanmasına ilişkin çalışmalar çok eski dönemlere kadar uzanmaktadır (LAFON-LAFOURCADE ve PEYNAUD, 1959; JAULMES ve ark., 1963, 1964). Aminoasitlerin belirlenmesi yolunda yeni teknikler kullanılmaya başlanmıştır. VILLETAZ (1984) proteaz etkisinin serbest amino asit miktarını artırıcı etki yaptığını, diğer yandan kırmızı şaraplara uygulanan maserasyonun tanen miktarını artırdığı, bunun da çökeltme ile proteinlerin çökeltmesi sonucu serbest amino asit miktarında azalmaya neden olduğunu belirtmiştir.

Amino asitler üzerine yapılan bir değer çalışmada ise Şampanya bölgesinde Chardonnay çeşidinden üretilen 1983 ürünü 10, 1984 ürünü 65 örnek, Bourgogne bölgesinde Pinot noir üzüm çeşidinden üretilen 1984 ürünü 27 ve 1983 ürünü 9 ve Pinot meunier çeşidinden üretilen 1984 yılı 41 ve 1983 yılı 8 örnekte amino asit tayini yapılmış ve yıllara göre amino asit içeriğinin önemli ölçüde değiştiği saptanmıştır. Araştırmacının dikkat çekici yönü ise; her üç çeşit için olgunluğun daha ileri olduğu 1983 yılı örneklerinde amino asit miktarının az, buna karşın olgunluğun daha geri olduğu 1984 yılı örneklerinde ise amino asit içeriğinin zengin olduğunun belirlenmesidir. Aynı çalışmada çeşitler arasındaki amino asit profilinin önemli farklılıklar gösterdiği ortaya konulmuştur. Örneğin arjinin amino asidi her iki Pinot çeşidi için %22'nin üzerine çıkarken, Chardonnay çeşidinde %13'ün altında kalmıştır (MILLERY ve ark., 1986).

HUANG ve OUGH (1991) yaptıkları çalışmada Kaliforniya bölgesinde üretilen Sauvignon blanc, Charonnay ve Cabernet sauvignon üzüm çeşitlerini ve şıralarını ele almışlar; prolidin/arjinin oranının istatistiksel olarak %95'lik güven sınırları içinde genetik farklılığa bağlı olarak farklı değerler gösterdiğini belirlemişlerdir. Buna karşın; Merlot, Pinot noir ve Zinfandel çeşitlerinde bu düzeyde bir farklılık görülmediğini saptamışlardır.

SAUVAGE ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada 1988, 1989 ve 1990 kampanyası ürünü 21 üzüm çeşidinin temel kimyasal bileşimlerini saptamışlar ve aspartik asit ile glutamik asit, ve de K-alanin ile 3-amino-bütirat arasına bir doğrusal bir ilişki olduğunu belirlemişlerdir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada materyal olarak kullanılan Öküzgözü ve Boğazkere örnekleri 1998 ve 1999 hasatında sırasıyla Elazığ ve Diyarbakır bölgesinden gelmiş ve Doluca Şarapçılık tarafından 25 g/hL düzeyinde kuru aktif maya kültürü (*S.cerevisiae-Gist-Brocades*) kullanılarak üretilmiştir. Kalecik karası ile Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü şarap işletmesine üretilmiştir. Kalecik karası şaraplarının üretiminde Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü stok kültürlerinden elde edilen *S. cerevisiae Narince-3* şarap mayası %2 oranında kullanılmıştır. Şarap analizlerinin tümü Fransa/Bordeaux Üniversitesi Şarap Bilim Fakültesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Amino asit analizleri HPLC yardımıyla TRICARD ve SALAGOITY (1986), MARC ve ark. (1989)'un ve daha sonra MARCE ve ark. (1989) tarafından uygulanan metoda göre gerçekleştirilmiştir. Kullanılan metodükükürlü amino asitlerin saptanması bakımından önemlidir. BERTRAND (1998) tarafından geliştirilmiştir. Uygulamada OPA (ortofitaldehit) miktarı orijinal metoda göre C solüsyonunda yaklaşık 3 kat artırılmıştır.

Metodun prensibi:

Metodun prensibine göre ilk aşamada kükürtlü amino asitlerin iodoasetik asit ile reaksiyona sokulmaktadır. Oluşan kükürtlü bileşenler ve monosüstitie (primer amin) fonksiyonuna sahip diğer amino asitler sülfanil etanol varlığında OPA ile reaksiyona girmektedir. Böylece floresens yapıda oluşan bileşenler HPLC ile ayrılmakta ve spektrofotometre ile belirlenmektedir.

Materyal:

- HPLC HP 1050
- Otomatik örnek verici HP 1050
- Gradient sisteme uygun pompa sistemi HP 1050
- JASCO spektrofotometrik detektör (821 FP model)
- Ekstikasyon dalga boyu: 356 nm
- Emisyon dalga boyu: 456 nm
- HP Chemstation veri değerlendirme

Reaktifler:

- Borat tamponu: 6.2 g H₃BO₃ 800 ml suda çözündürüldü, pH 9.5'a NaOH (4M) ile ayarlandı ve çift distile mikrofiltre (MQ) su ile litreye tamamlandı.
- A reaktifi (iç standart): 2-sülfaniletanol ve sodyum tetrafenil borat ile hazırlandı. 3 ml solusyon her iki iç standarttan (homoserin ve norvalin) 10 mg/L düzeyinde içecek şekilde hazırlandı.
- B reaktifi: iodoasetik asit (IDA) ile hazırlandı. 3.5 g IDA 50 ml borat tamponunda çözündürüldü ve 4M NaOH ile pH 5.5'a ayarlandı ve borat tamponu ile 100 ml'e tamamlandı. Buzdolabında en fazla 1 ay sakandı.
- C reaktifi : o-fitaldehit ve 2-sülfaniletanol ile hazırlandı. 750 mg(OPA) ve 5 ml metanol 50 ml borat tamponu içinde çözündürüldü. Daha onra 0.5 ml 2-sülfaniletanol ilave edildi. Reaktif azot altında alüminyum kağıt sarılı koyu renk şişede saklanılmalıdır (maksimum 2 hafta).

Kolon debisi: 0.6 ml/mn (analiz süresince sabit)

Basınç: 120 bar (yaklaşık)

Gradient elüsyon:

t(mm)	0	2	5	15	40	50	70	80	100	110	115	120	123	125
%B	5	10	10	15	25	40	40	41	43	60	80	50	0	0

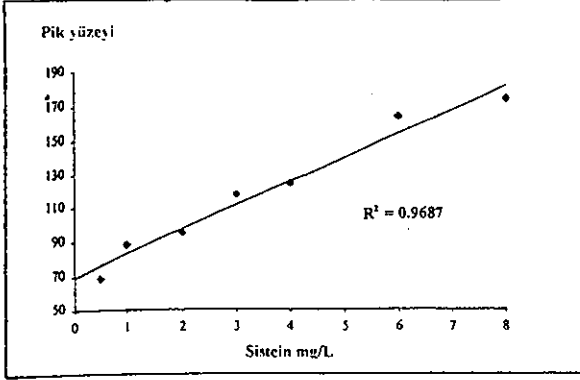
Analiz süresi: 125 dakika

İnjeksiyon: 10 :1

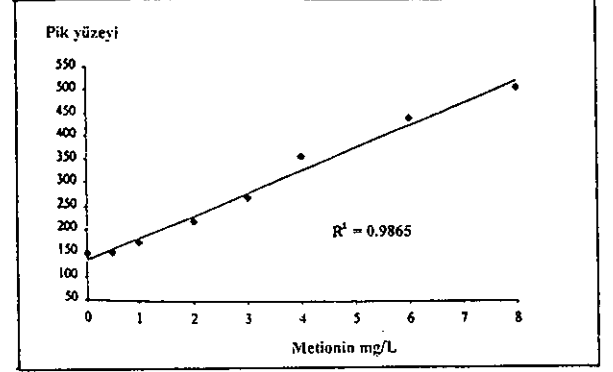
Kullanılan kimyasallar ve solvanların hazırlanışı: 1- Na₂HPO₄ (disodyum hidrojenfosfat) 2- Propionik asit 3- asetonitril 4- Dimetilsülfoksit 5-Metanol

Metodun uygulanışı: 2: 1 örnek alınır-enjektör 1 no'lu tüpte yıkanır- 5: 1 A reaktii alınır- injektör 1 no'lu tüpte yıkanır - 5: 1 B reaktifi alınır - enjektör 1 no'lu tüpte yıkanır - 12 : 1 karıştırılır - 2 dakika beklenir - 5 :1 C reaktifi alınır- enjektör 1 no'lu tüpte yıkanır - 17: 1 karıştırılır - 2.5 dakika beklenir - 17: 1 karıştırılır-2.5 dakika bekletilir - enjekte edilir.

Metodun Linearitesi: Metodun lineritesi sistein ve metionin ilavesi ile kontrol edilmiş, düşük konsantrasyonda bile linearite sağlanmıştır. Çizelge 1 ve Çizelge 2'de metodun linearitesi ve tekrarlanabilirliği gösterilmiştir.



Çizelge 1. Şaraba ilave edilen farklı sistein dozlarında linearite



Çizelge 2. Şaraba ilave edilen farklı metionin dozlarında linearite

Çizelge 3. Amino Asitler için Tekrarlanılabilirlik ve Linearite

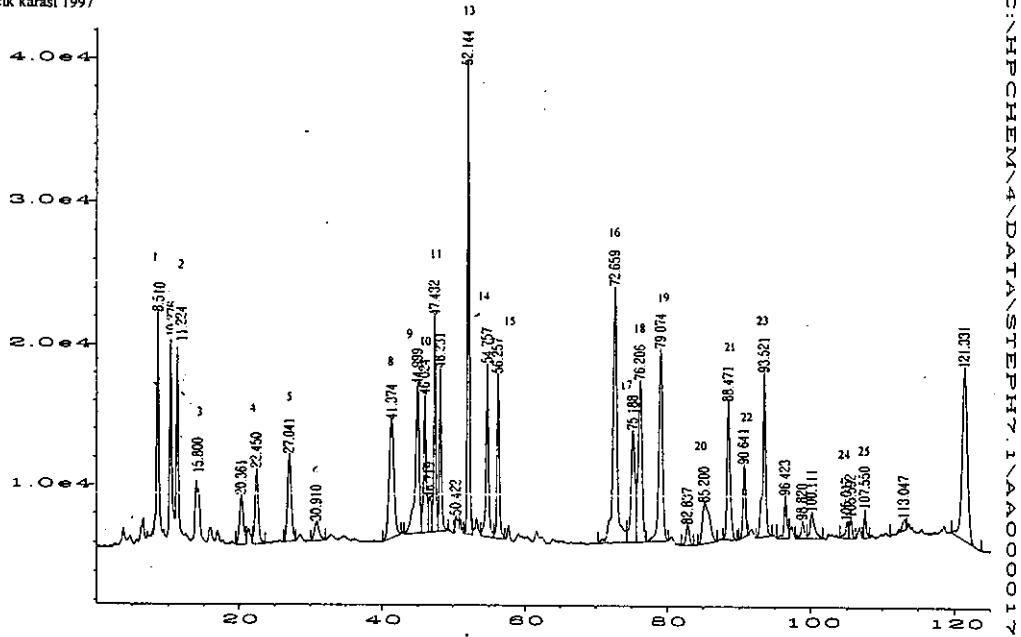
Amino asit	Var katsayısı (%)	Linearite
Aspartik asit	3	0.982
Glutamik asit	3	0.983
Asparajin	6	0.984
Serin	2	0.985
Histidin	4	0.993
Glutamin	10	0.981
Glisin	1	0.981
Treonin	3	0.982
Arjinin	7	0.981
Alanin	9	0.982
G.aminobütirik a.	7	0.982
Tirozin	8	0.977
Etanolamin	3	0.977
Metionin	9	0.99
Triptofan	3	0.984
Fenilalanin	9	0.984
İzolösin	4	0.981
Lösin	5	0.978

Çizelge 4. 1997 ve 1998 Üretimi Şarap Örneklerinde Saptanan Amino Asit Miktarları (mg/L)

Amino asit (mg/L)	Kalecik K. 1997	Kalecik K. 1998	Öküzgözü 1997	Öküzgözü 1998	Boğazkere 1997	Boğazkere 1998
Aspartik asit (1)	9.03	11.48	12.43	12.51	11.33	12.49
Glutamik asit (2)	8.45	10.97	13.48	16.29	18.48	17.29
Sistein (3)	2.48	2.28	2.50	1.50	2.45	1.98
Aspartam (4)	2.97	3.10	1.87	2.13	3.27	2.87
Serin (5)	4.16	3.97	4.56	4.72	4.34	5.01
Glutamin (6)	1.12	-	1.23	1.44	1.06	1.73
Histidin (7)	-	-	-	-	-	-
Glisin (9)	11.48	11.19	13.4	14.50	11.07	14.12
Treonin (10)	8.78	8.72	9.04	8.10	6.82	9.73
Arjinin (12)	11.23	9.5	10.8	11.23	9.87	9.56
Alanin (13)	10.74	14.43	16.8	14.02	15.43	13.89
Gama amino but a (14)	4.14	4.53	5.7	5.76	4.78	7.94
Tirozin (15)	4.37	5.06	4.97	4.77	4.87	4.65
Etanolamin (16)	12.13	15.83	16.15	17.32	13.05	18.06
Valin (17)	3.50	3.61	4.28	4.05	3.87	5.01
Metionin (18)	3.34	3.84	3.98	4.07	3.17	5.95
Triptofan (20)	0.81	0.68	0.66	0.71	1.16	1.34
Fenilalanin (21)	5.29	5.62	6.14	6.24	5.38	5.97
İzolösin (22)	2.47	2.89	3.48	3.04	2.98	3.73
Lösin (23)	2.98	3.39	4.50	4.63	3.47	5.38
Ornitin (24)	7.49	8.39	13.36	15.18	6.12	15.13
Lisin (25)	16.82	17.73	20.03	19.78	23.6	16.82

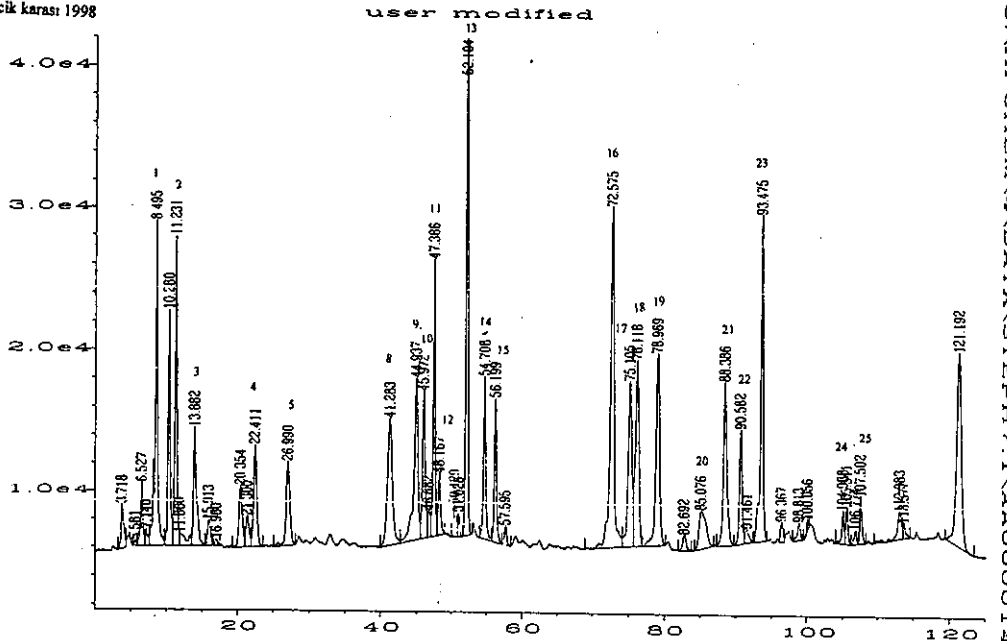
Çizelge 5. 1997-1998 Ürünü Kalecik Karası, Öküzgözü Boğazkere Şaraplarında HPLC ile Amino Asitlerin Belirlenmesi

Kalecik karası 1997

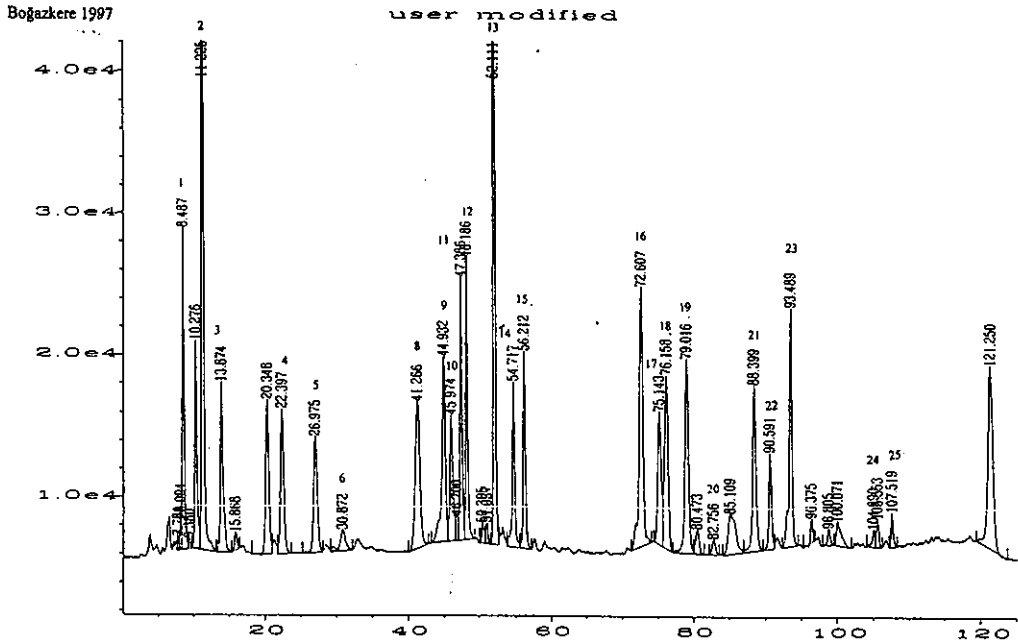


1-Aspartik asit 2-Glutamik asit 3-Sistein 4-Aspartam 5-Serin 6-Glutamin 7-Histidin 8-İç standart 9-Glisin 10-Treonin 11-Arjinin 12-Treonin 13-Alanin 14-Gama Amino büt. a. 15-Tirozin 16-Etanolamin 17-Valin 18-Metionin 19-İç standart (2) 20-Triptofan 21-Fenil alanin 22-Izofosin 23-Lösin 24-Omitin 25-Lisin

Kalecik karası 1998

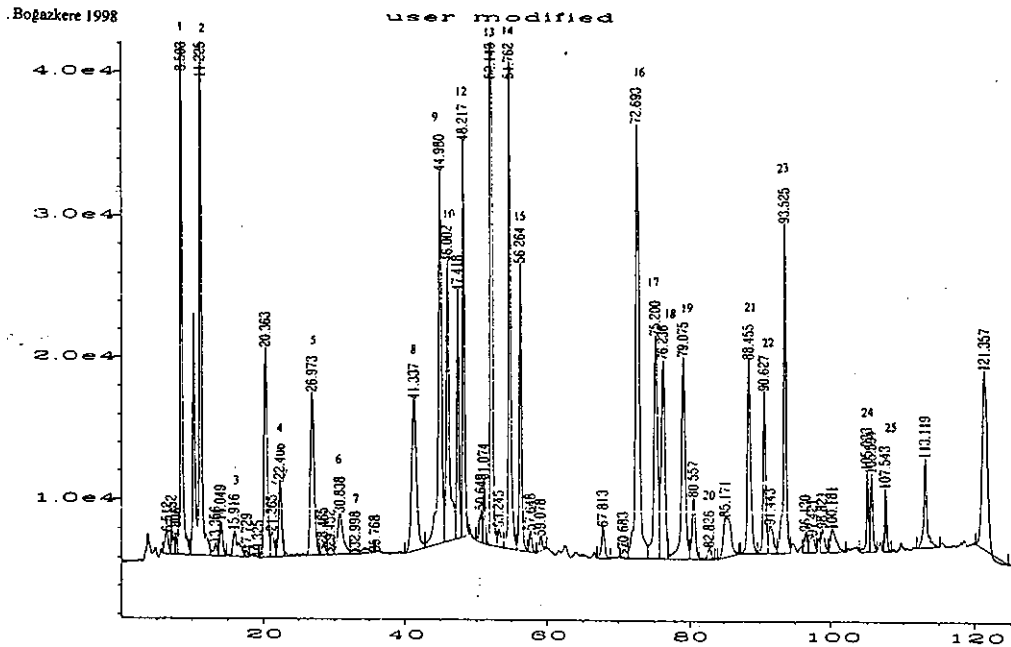


1-Aspartik asit 2-Glutamik asit 3-Sistein 4-Aspartam 5-Serin 6-Glutamin 7-Histidin 8-İç standart 9-Glisin 10-Treonin 11-Arjinin 12-Treonin 13-Alanin 14-Gama Amino büt. a. 15-Tirozin 16-Etanolamin 17-Valin 18-Metionin 19-İç standart (2) 20-Triptofan 21-Fenil alanin 22-Izofosin 23-Lösin 24-Omitin 25-Lisin



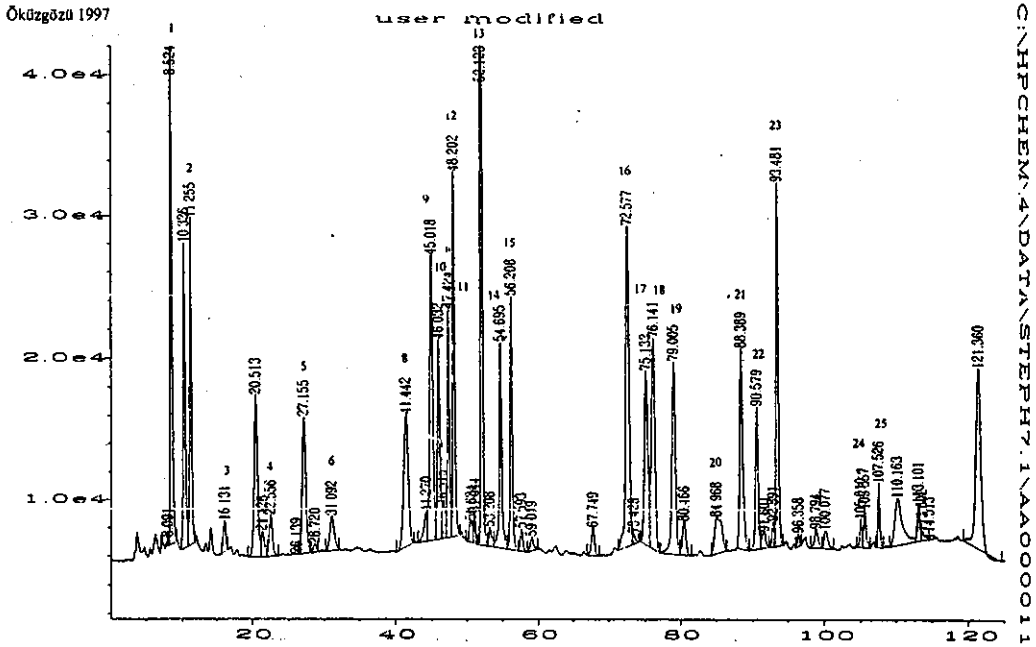
1- Aspartik asit-1 Aspartik asit 2- Glutamik asit 3- Sistein 4- Aspartam 5- Serin 6- Glutamin 7-Histidin 8-İç standart 9- Glisin 10- Treonin 11- Arjinin 12- Treonin 13- Alanin 14- Gama Amino büt. a. 15- Tirozin 16- Etanolamin 17- Valin 18- Metionin 19- İç standart (2) 20- Triptofan 21- Fenil alanin 22- İzolöfin 23-Lösin 24- Omitin 25- Lysin

C:\NPPCHEM\4\DATA\STEPH7.1\AA000013.D

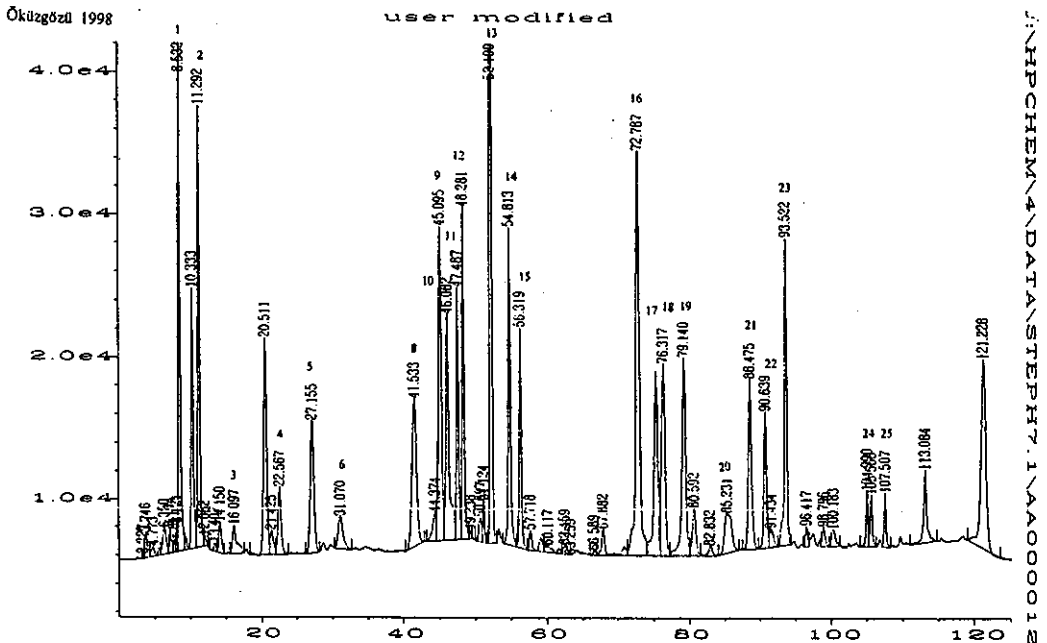


1- Aspartik asit 2- Glutamik asit 3- Sistein 4- Aspartam 5- Serin 6- Glutamin 7-Histidin 8-İç standart 9- Glisin 10- Treonin 11- Arjinin 12- Treonin 13- Alanin 14- Gama Amino büt. a. 15- Tirozin 16- Etanolamin 17- Valin 18- Metionin 19- İç standart (2) 20- Triptofan 21- Fenil alanin 22- İzolösin 23-Lösin 24- Omitin 25- Lysin

C:\NPPCHEM\4\DATA\STEPH7.1\AA000013.D



1- Aspartik asit 2- Glutamik asit 3- Sistein 4- Aspartam 5- Serin 6- Glutamin 7-Histidin 8-İç standart 9- Glisin 10- Treonin 11- Arjinin 12- Treonin 13- Alanin 14- Gama Amino büt. a. 15- Tirozin 16- Etanolamin 17- Valin 18- Metionin 19- İç standart (2) 20- Triptofan 21- Fenil alanin 22- İzolösin 23- Lösin 24- Omizin 25- Lizin



1- Aspartik asit 2- Glutamik asit 3- Sistein 4- Aspartam 5- Serin 6- Glutamin 7-Histidin 8-İç standart 9- Glisin 10- Treonin 11- Arjinin 12- Treonin 13- Alanin 14- Gama Amino büt. a. 15- Tirozin 16- Etanolamin 17- Valin 18- Metionin 19- İç standart (2) 20- Triptofan 21- Fenil alanin 22- İzolösin 23- Lösin 24- Omizin 25- Lizin

TARTIŞMA ve SONUÇ

Şarap örneklerinde saptanan amino asit miktarları Çizelge 1'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Kalecik karası örneklerinde saptanan amino asit miktarı her iki yıl da, birlikte değerlendirildiğinde Öküzgözü ve Boğazkere şaraplarına göre daha düşük düzeyde bulunmuştur. Her üç şarabın üretiminde aynı maya suşları kullanıldığına göre buradaki farklılığın çeşit, toprak ve iklim şartlarına bağlı olduğu sonucuna varılabilir (Çizelge 4)

Hesaplamalarda kullanılan formüller:

$$K1 = \text{İç standart alanı (e2)/ pik alanı} \times 1. \text{ pik kons (9.04)}$$

$$C (\text{konsantrasyon}) = \text{Pik yüzeyi/İç stand. yüzeyi} \times K1 \text{ mg/L}$$

Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, Öküzgözü, Boğazkere ve Kalecik Karası şaraplarında aranan amino asitlerin tümünün saptandığı, ancak miktarlarının gerek çeşide, gerekse yıla bağlı olarak bazı farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Kalecik karası üzüm çeşidinin 1997 ve 1998 yılı verilerine göre; diğer iki çeşit şarabına göre daha düşük düzeyde amino asit içerdiği görülmekte, ancak 1998 yılı değerlerinin 1997 yılı değerlerine göre birçok amino asit bakımından önemli ölçüde yüksek olduğu görülmektedir. Örneğin, bu artış aspartik asit için %27, glutamik asit için %29.8 ve lösin için %13.7 düzeyindedir. Öküzgözü ve Boğazkere çeşitleri amino asit profilleri bakımından kendi içlerinde bazı önemli benzerlikler göstermiş olsalar da, miktar bakımından farklı bir profil çizmektedirler. Yine de tüm şaraplarda oransal olarak hem çeşit hem de yıl olarak önemli paralellikler göstermektedir. Amino asitler miktarları yönünden irdelendiğinde, alanin, aspartik asit, glutamik asit, etanolamin ve lösin'in tüm şaraplarda belli bir düzeyin üzerinde olduğu görülmektedir. Araştırmada şaraplarda amino asit düzeylerinin çeşide, toprak ve iklim koşullarına, üretim prosesine bağlı olarak değişim gösterdiği belirlenmiştir. MARTIN ve ark. (1980), JUASH ve TÖRLEY (1985), yaptıkları çalışmada şaraplarda amino asit düzeyi üzerinde fermentasyonda kullanılan maya suşu ve asimile olabilir nitrojen varlığının önemini belirlemişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada ise aynı bağlarda yetişen farklı üzüm çeşitlerinde amino asit profilinin, özellikle bazı amino asitlerde yıldan yıla değişim gösterdiği saptanmıştır (VASCONCELOS, A.M.P. ve ark., 1985).

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesine, HPLC analizlerinde laboratuvar olanaklarından ve değerli bilgilerinden yararlandığım Bordeaux Üniversitesi Şarap Bilim Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. A. Bertrand'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

- BUTEAU, C., DUITSCHAVER, C.L. an ASHTON, G.C. 1984. A study of biogenesis of amines in a Willard noir wine. *Am. J. Oenol. Vitic.* 35 (4), 228-236.
- BERTRAND, A. 1998. HPLC ile amino asit saptanması. Laboratuvar föyü (Basılmamış)
- CABANIS, J.C., 1984. Histamine et sa toxicité Feuillet vert O.I.V. No: 787
- CANTAGREL, R. SYMONDS, P. and CARLES, J. 1982. Composition en acides aminés du mouts en fonction du cépage et la technologie et son influence sur la qualité du vin. *Sciences des Aliments*, 2, 109-142.
- CASOLI, A. and COLAGRANDE, O., 1982. Use of high-performance liquid chromatography for determination of amino acids in sparkling wines. *Am. j. Enol. Vitic.*, 33(3), 135-139.
- CORDONNIER, 1966. Etude des protéines et des substances azotées. Rapport français. *Bull OIV*, 39: 1475-1489.
- DAVİD, M.H., 1984. Dosage des amines biogenes et des acides aminés dans les vins par chromatographie liquide a haute performance. Diplome Universitaire de Technologie, Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II.
- FLANZY, C., POUX, C., 1965. Note sur la teneur en acides aminés du mout de raisin et du vin en fonction des conditions de l'année. *An. Technol. Agric.*, 14: 87-91.
- FEUILLAT, 1974. Contribution a l'étude des composés azotés dans les mouts de raisin et dans les vins. These de Doctorat e Sciences, Université de Dijon.
- JUHASZ, O. and TÖRLEY D. 1985. Effect of free amino acids on the grape on the development of organoleptic properties of wine. *Acta Aliment* 14 (2): 101-112.

- KLIEWER, W.M. 1970. Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. *J. Food. Sci.*, 35, 17-21.
- KLUBA, R.M., MATTICK, R.L. and HACKLER, L.R. 1978. Changes in concentration of free and total amino acids of several native American grape cultivars during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 29(3). 181-186.
- LAFON-LAFOURCADE, S. and GUIMBERTEAU, G. 1962. Evolutions des aminoacides au cours de la maturation du raisin. *Vitis*, 3: 130-135.
- LEPEDATU, J.C. and TANASE, I., 1967. Recherches sur l'évolution de la teneur en glucides et en acides aminés dans la première phase de la vinification. *Ann. Technol. Agric.*, 16(4), 321-331.
- LHUGUENOT, J.C., UDE, L., DYMARSKI, E. and BARON, C., 1979. Analyses des acides libres dans les vins et dans les mouts des raisins en cours de fermentation alcoolique par chromatographie en gaz liquide. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 72 (775), 275-286.
- HERNANDEZ ORTE, P., GUTART, A. and JUAN, C. 1997. Amino acid determination in musts and wines by HPLC after derivatization with phenylisothiocyanate. *Am J. Enol. Vitic.*, vol. 48, No. 2p: 229-235.
- HUANG, Z, OUGH, C.S. Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42: 261-267.
- KLIEWER, W.M. 1968. Changes in the concentration of free amino acids in grape berries during maturation. *Am J. Enol. Vitic.* 36: 65-76.
- MARC, R.M., CALLUL, M., GUASCH, J. and BORRULL, F. 1989. Determination of free amino acids in wine by HPLC using precolumn derivatization with PITC. *Am. J. Enol. Vitic.* 40 (3): 194-198.
- MARCE, R.M., CALLUL, M., GUASCH, J.; BORRULL, F. 1989. Determination of free amino acids in wine by HPLC using precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40, no: 3
- MARTIN, P.A., SUAREZ, C., POLO, C., CABUZEDO, M.D., DABRIO, M.V. 1980. Analisis de 19 aminoacidos por HPLC. *anal. Bromatol.* 32(3) 289-294.
- MILLERY, A., DUTEURTRE, B., BONDAILLE, J.P., MAUJEAN, A., 1986. Différenciation des trois cépages champenois à partir de l'analyse des acides aminés libres des mouts des récoltes 1983 et 1984. *Rev. Fr. Oenol.* 103: 32-50.
- OUGH, C.S. 1988. Acids and amino acids in grapes and wines. In: *Modern Methods of Plant Analysis. New Series. Vol. 6. Wine Analysis*, p: 92-146, H.F. Linskens and J.F. Jackson (Eds). Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- OUGH and BELL, A.A. 1980. Effect of nitrogen fertilization of grapevines on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. *Am. j. Enol. Vitic.*, 31 (2), 122-123.
- POUX et OURNAC, A., 1970. Acides aminés libres et polypeptides du vin. *Ann. Technol. Agric.* 19: 217-237.
- SAUVAGE, F.X., NICOLE, M.Z., VERRIES C., SARRIS, J., PRADAL, M., ROBIN, J.P. 1993. Acides aminés libres, et quelques activités enzymatiques de mouts de raisins murs. *Analyses statistiques de l'effet variétal. Sci Aliments*, 13: 443-462.
- SAUVAGE, F.X., ROMIO, C.G. SARRIS, J., PRADAL M. ROBIN, J.P., FLNZY, C. 1991. Evolution de quelques activités enzymatiques au cours de la maturation de raisin. Influence d'un stress hypoxique après la vendange. *Rev. Fr. Oenol.* 132: 14-20.
- SPONHOLZ, W.R. 1991. Nitrogen compounds in grapes, Must and Wine. *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grape and Wine* ASEV ed TRICARD, C.H. AN SALAGOITY, 1986 *Oenologie: séparation de acides aminés en CHLP après dérivatation avec FMOC. Chimie Mag* 44: 93-94.
- TRICARD, C.H. and SALAGOITY, M. 1986. *Oenologie: séparation des acides aminés en CLHP après dérivatation avec FMOC. chimie Mag.* 44: 93-94
- TUSSEAU, D., BENOIT, C. VALADE, M. 1989. Etude de l'évolution de acides aminés au cours de la maturation. *Actualités Oenologique.* p:
- VASCONCELES, A.M.P., et H.CHAVES des NEVES 1985. Aminoacidos livres e aminoacidos totais como potenciais parametros de caracterização enológica. *Ciencia Tec. Vitic* 4 (2), 41-56.