

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Valentina Rožić

7558/BT

**UTJECAJ BISTRENJA BENTONITOM NA SASTAV I
KVALITETU BIJELOG VINA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnološki aspekti proizvodnje vina

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

Zagreb, srpanj 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

UTJECAJ BISTRENJA BENTONITOM NA SASTAV I KVALITETU BIJELOG VINA

Valentina Rožić, 0058212332

Sažetak: Zamućenje bijelog vina nastaje zbog narušene proteinske stabilnosti vina, a sprječava se bistrenjem bentonitom, koji je najčešće korišteno bistrilo zbog prednosti stabilizacije vina djelovanjem na proteine. Najnestabilniji proteini bijelih vina su TL-proteini, hitinaze i β -glukanaze, koji stvaraju zamućenje i u malim koncentracijama, a na bentonit se vežu elektrostatskom adsorpcijom i talože. Bistrenje bentonitom može dovesti do gubitaka vina te indirektnog uklanjanja poželjnih spojeva koji čine sortnu i fermentativnu aromu vina. Bentonit se može dodati u različitim fazama fermentacije, međutim, ustanovljeno je da je najučinkovitije bistrenje vina pred kraj fermentacije gdje je potrebna količina bentonita manja u odnosu na druge faze fermentacije te se stvara manje taloga. Također, natrijev bentonit ima veću moć adsorpcije proteina u odnosu na njegov aktivirani oblik, iako aktivirani natrijev bentonit daje manje taloga. Bentonit se primjenjuje šaržno uz njegovo prirodno taloženje, međutim, istražuju se nove metode kontinuiranog *in-line* doziranja bentonita kojim se smanjuje gubitak vina.

Ključne riječi: bentonit, bijelo vino, bistrenje, proteini

Rad sadrži: 24 stranica, 7 slika, 1 tablica, 50 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. *Vesna Zechner-Krpan*

Datum predaje: 10. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

INFLUENCE OF BENTONITE FINING ON THE COMPOSITION AND QUALITY OF WHITE WINE

Valentina Rožić, 0058212332

Abstract: Turbidity of white wine occurs due to disrupted protein stability of wine, and is prevented by clarification with bentonite, which is the most commonly used clarifier due to the benefits of stabilizing wine by acting on proteins. The most unstable proteins of white wines are TL-proteins, chitinases and β -glucanases, which create turbidity even in small concentrations, and bind to bentonite by electrostatic adsorption with precipitation. Bentonite clarification can lead to wine losses and indirect removal of desirable compounds that make up the varietal and fermentative aroma of wine. Bentonite can be added at different stages of fermentation, however, it was found that the most efficient clarification of wine is before the end of fermentation where the required amount of bentonite is lower, compared to the other stages of fermentation and less sediment is formed. Also, sodium bentonite has a higher protein adsorption power compared to its activated form, although activated sodium bentonite yields less sediment. Bentonite is applied batch-wise with its natural precipitation, however, new methods of continuous *in-line* dosing of bentonite to reduce wine loss are being investigated.

Keywords: bentonite, fining, proteins, white wine

Thesis contains: 24 pages, 7 figures, 1 table, 50 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. *Vesna Zechner-Krpan*, Full professor

Delivery date: June 10th 2020

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Bentonit - struktura i svojstva	2
3. Proteini u vinu	4
4. Spojevi arome u vinu	5
4.1. Spojevi sorte arome	5
4.2. Spojevi fermentativne arome	6
5. Djelovanje bentonita na sastojke mošta i vina	7
5.1. Utjecaj bentonita na proteine	8
5.2. Utjecaj bentonita na spojeve arome	10
6. Strategije bistrenja bentonitom	12
6.1. Bistrenje bentonitom u različitim fazama vinifikacije	13
6.2. Bistrenje različitim bentonitima	14
6.3. Različiti načini primjene bentonita	16
7. Zaključak	18
8. Popis literature	19

1. Uvod

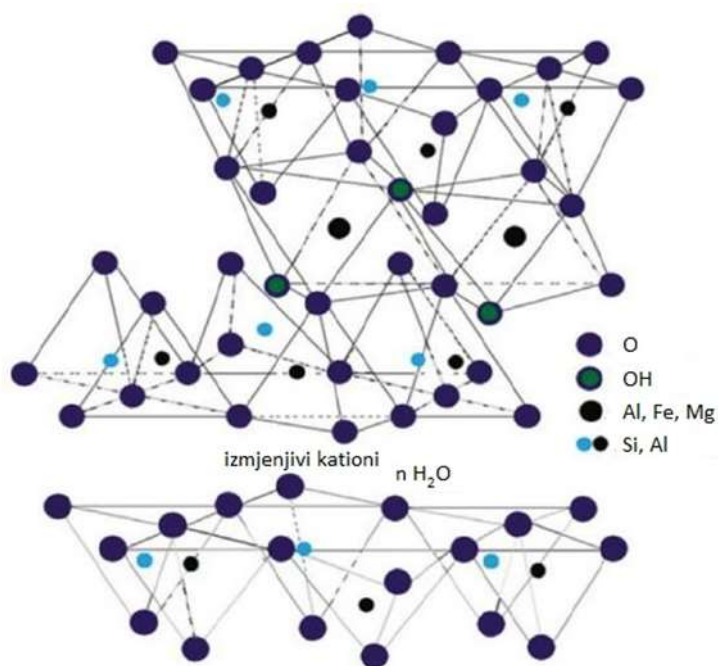
Proizvodnja vina dugotrajan je proces koji uključuje različite tehnike, varijable i tretmane kojima se oblikuje konačni proizvod. Okusna, aromatična i vizualna svojstva te ukupni dojam vina nastoje se održati na najboljoj mogućoj razini. Neka od tih svojstava usko su povezana s proteinima u vinu koji utječu na stabilnost bijelih vina tijekom skladištenja (Waters i sur., 2005).

Bistroća vina, osobito bijelih vina, vrlo je važna većini potrošača. Zamućenje u bijelom vinu vizualno je nepoželjno, a može se pojaviti uslijed neprikladnih uvjeta skladištenja i transporta. Nužno je spriječiti pojavu zamućenja, jer se zamućeno vino ne može plasirati na tržište (Pocock i sur., 2011). Prije punjenje vina u boce, potrebno je osigurati njegovu stabilnost. Stabilno bijelo vino je bistro i nema vidljivog taloga pri punjenju, transportu niti skladištenju (Van Sluyter i sur., 2015). Uobičajeni razlozi pojavi zamućenja i taloga su narušavanje mikrobiološke, tartaratne i proteinske stabilnosti (Ribereau-Gayon i sur., 2006). No, proteinsko zamućenje jedno je od ključnih nestabilnosti u proizvodnji bijelih vina (Pocock i sur., 2011).

Bistrenje je proces dodavanja tvari koje izazivaju precipitaciju čestica u otopini i potiču njihovo taloženje. Bistrenje bentonitom provodi se dodavanjem bentonita u mošt i/ili vino s ciljem smanjenja udjela (nestabilnih) proteina, a čime se smanjuje i mogućnost pojavljivanja zamućenja u vinu (Lira i sur., 2015; Waters i sur., 2005). Sredstva za bistrenje mogu djelovati nepredvidivo i rezultirati prebistrenjem, stvaranjem prekomjerne količine taloga i gubitkom kvalitete vina (Sanborn i sur., 2010). Tako i primjena bentonita ima negativne strane, npr. značajni su gubici volumena vina (3-10%) zbog slabog taloženja, a osim toga bentonit nije selektivan/specifičan i može ukloniti proteine koji inače doprinose poželjnim svojstvima vina te poželjne tvari arome, okusa i boje (Waters i sur., 2005), osobito ako se prekomjerno upotrebljava. Uklanjanje navedenih nedostataka standardne primjene bentonita od velikog je interesa za proizvođače te predstavlja veliki izazov znanstvenicima i stručnjacima koji nastoje pronaći djelotvornija alternativna bistrila ili razviti protokole s manjim potrebama za bentonitom. Unatoč svim potencijalnim negativnim stranama, bentonit je još uvijek najčešće korišteno sredstvo za bistrenje (Lira i sur., 2014; 2015) i najučinkovitije za stabilizaciju vina djelovanjem na proteine (Chagas i sur., 2012). Učinkovitost, jednostavnost primjene i niži troškovi povezani s njegovom primjenom, glavne su prednosti bentonita zbog kojih je vrlo često u upotrebi (Waters i sur., 2005).

2. Bentonit - struktura i svojstva

Bentonit, alumosilikatna glina, dioktaedarski smektit, pripada skupini slojevitih silikata ili filosilikata. Tetraedar od kisikovih atoma sa silicijevim atomom u središtu, osnovna je strukturna jedinica silikata. Dio silicijevih atoma može biti zamijenjen nekim drugim atomima, najčešće aluminijevima pa se takvi silikati nazivaju alumosilikatima. Tetraedri se preko zajedničkoga kisikovog atoma mogu međusobno povezivati na različite načine, pri čemu stvaraju strukturno i kemijski raznovrsne spojeve. Prema načinu povezivanja $[\text{SiO}_4]$ -tetraedara silikati se dijele u šest skupina. Kod filosilikata tetraedri su u ravnini povezani u sloj i sa susjednim tetraedrima dijele tri kisikova atoma. Bentonit je uglavnom sastavljen od minerala montmorilonita, sastava $(\text{Na}, \text{Ca})_{0,33}(\text{Al}, \text{Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$ (Anonimus 1, 2020). Ima 2:1 strukturu tetraedarskih i oktaedarskih slojeva tako da je između dva tetraedarska sloja jedan oktaedarski sloj (Slika 1; Ismajli i sur., 2015).



Slika 1. Prikaz strukture montmorilonita (Ismajli i sur., 2015)

Svojstva površine minerala gline ovise o kemijskom sastavu, površinskim atomima, količini i vrsti naboja te vrsti izmjenjivih kationa. Naboj kisikovih atoma ovisi o razlici elektronegativnosti između kisika i atoma s kojima je vezan. Što je veća razlika njihove elektronegativnosti, veći je ionski karakter veze. U smektitu je planarna površina negativno

nabijena. Hidrofobnost i hidrofilnost površine pod utjecajem su atoma metala vezanih na kisik. Kada nema izomorfne supstitucije, Si-O veze prevladavaju u tetraedarskom sloju, a Al-O veze u oktaedarskom sloju i površina je hidrofobna. Kada dolazi do supstitucije trovalentnih kationa sa Si^{4+} u tetraedrima i dvovalentnih kationa s Al^{3+} u oktaedrima, javlja se hidrofilnost i prisutni su izmjenjivi kationi. Negativni naboj, koji proizlazi iz izomorfni supstitucija, balansiran je prisutnim izmjenjivim kationima (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} i K^+) u prostoru između slojeva i na vanjskim površinama čestica gline te se može otpuštati u medij (npr. vino) (Lambri i sur., 2016).

Od svih glina, smektitni imaju najveću moć bubrenja. Molekule vode koje se okupljaju oko izmjenjivih kationa, povezuju se s glinom vodikovim vezama, dipolnim privlačenjem i van der Waalsovima interakcijama te proširuju prostor između slojeva. Ekspanzija ili bubrenje ovisi o prisutnim kationima, ionskoj jakosti medija i drugim faktorima. Molekule vode negativnim se dijelom dipola okreću prema kationu i pritom oslabljuju elektrostatske interakcije s nabijenim slojem čime se povećava razdvajanje između dva sloja. Kationi s površine mogu se zamijeniti kationima u okolnom mediju. Smektit može nabubriti tako da održi svoju strukturu ili se struktura raspada i slojevi razdvoje. Natrijev i kalcijev bentonit različiti su prema mogućnosti bubrenja. Natrijev bentonit jače bubri od kalcijevog i češće dolazi do raspada strukture. Količina Na^+ potrebnog za kompenziranje negativnog naboja površine dvostruko je veća od potrebne količine Ca^{2+} jer Na^+ ima dvostruko manji naboj od Ca^{2+} . Na temelju ionskog polumjera hidratiziranih kationa, broj molekula vode koje se mogu umetnuti u prostor između slojeva tijekom močenja veći je u prisustvu Na^+ nego u prisustvu Ca^{2+} . Strukturu mogu sačinjavati i terminalne OH skupine koje nose naboj ovisan o vrsti metalnog iona za koji su vezane i pH vrijednosti medija.

Da bi bili optimalnih karakteristika za primjenu u određene svrhe, bentoniti se podvrgavaju mineralnoj aktivaciji ili organskoj modifikaciji. U procesu mineralne aktivacije, vlažan mulj zagrijava se na $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u prisutnosti Na_2CO_3 pri čemu se Ca^{2+} ioni talože u obliku CaCO_3 te se međuslojni i površinski Ca^{2+} zamjenjuju s Na^+ ionima. Tako se povećava moć bubrenja i poboljšava adsorpcija proteina iz vina. Alkalna aktivacija magnezijem također omogućuje značajne promjene viskoznosti, pH, kapaciteta izmjene kationa i strukture. Organska modifikacija kiselinama (HCl i H_2SO_4) provodi se na bentonitima koji svoju primjenu nalaze u uklanjanju teških metala i organskih spojeva (fenola) iz vode (Lambri i sur., 2016).

3. Proteini u vinu

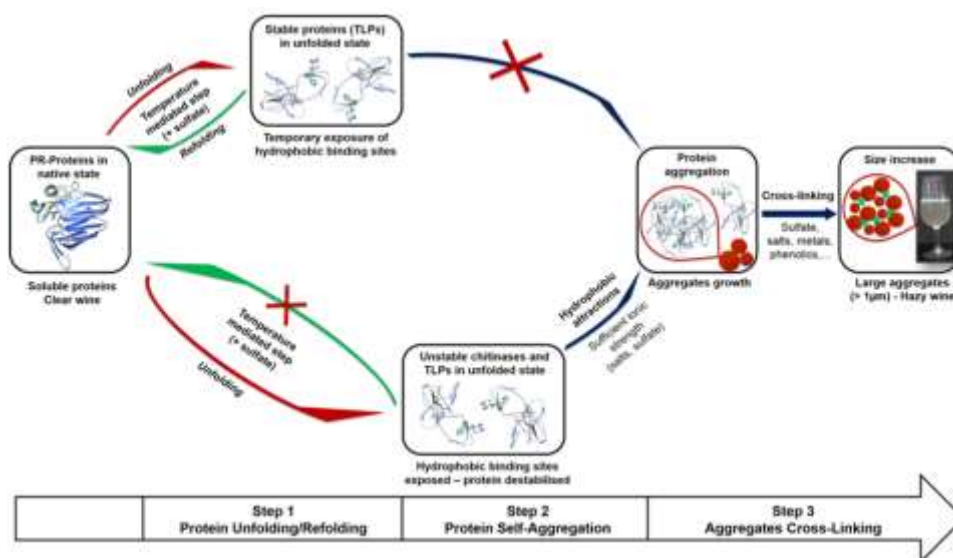
Proteinski sastav razlikuje se od vina do vina jer ovisi o više faktora - karakteristikama berbe, sorti grožđa, tretmanima prije i poslije fermentacije. Proteini su najvažnija frakcija koloida mošta i vina jer imaju glavnu ulogu u nastanku zamućenja, a pretpostavlja se da i neki drugi faktori utječu na stvaranje zamućenja - sulfati, ionska jakost, fenolni spojevi, organske kiseline, pH vrijednost (Waters i sur., 2005).

Taumatinu slični proteini (thaumatin-like proteins, TL proteini), neke hitinaze te manje istraživane β -glukanaze - proteini povezani s patogenezom grožđa - najnestabilniji su proteini bijelih vina (Sauvage i sur., 2010). Uz njih se još spominju i lipid transfer proteini, ali ne i kao značajni u pojavi zamućenja. Proteini patogeneze stalno nastaju tijekom sazrijevanja grožđa i mogu biti prisutni u visokim koncentracijama neovisno o izloženosti patogenima (Pocock i sur., 2000).

Proteinima najodgovornijima za nastanak zamućenja smatraju se TL proteini, koji čine veći dio ukupnih proteina u vinu i grožđanom soku (Vincenzi i sur., 2011). Uz njih su odgovorne i najzastupljenije hitinaze (Pocock i sur., 2000; Marangon i sur., 2011; Vincenzi i sur., 2011). Te su grupe proteina molekulske mase manje od 35 kDa, kompaktne globularne strukture (Marangon i sur., 2014), pozitivno su nabijene pri pH vrijednosti vina i podnose uvjete niskog pH u grožđanom soku i vinu (Waters i sur., 2005). Stabilni su tijekom vinifikacije jer su otporni na proteolizu i kisele pH uvjete, ali tijekom vremena i u uvjetima povišene temperature mogu denaturirati i stvarati netopljive agregate koji raspršuju svjetlost i vino čine zamućenim (Slika 2) te precipitirati tvoreći neprivlačan talog (Van Sluyter i sur., 2015).

Suprotno tome, glikoproteini velike molekulske mase porijeklom iz kvasca i grožđa pokazuju stabilizirajući učinak u bijelim vinima i smatraju se faktorima zaštite od zamućenja (Waters i sur., 2005). Manoproteini mogu biti u interakciji sa spojevima arome i tako utjecati na profil aroma konačnog proizvoda (Chalier i sur., 2007).

Proteinska stabilnost nije u dobroj korelaciji s ukupnom koncentracijom proteina jer se pojedinačni proteini različito ponašaju (Hsu i sur., 1987). Nestabilni proteini mogu se taložiti i stvarati zamućenje čak i kad su prisutni u malim koncentracijama (Waters i sur., 1991). Potencijal zamućenja zapravo ovisi o sastavu proteina na početku vinifikacije, odnosno omjeru nestabilnih proteina i proteina koji djeluju stabilizirajuće (Vincenzi i sur., 2011).



Slika 2. Prikaz mehanizma razmatanja i agregiranja toplinski nestabilnih proteina u vinu (Van Sluyter i sur., 2015)

4. Spojevi arome u vinu

Aroma vina razvija se nizom različitih procesa koji uključuju metaboličke reakcije u grožđu ovisne o sorti, tipu tla, klimatskim uvjetima i vinogradarskim postupcima, biokemijske fenomene (oksidacija, hidroliza) prije fermentacije potaknute ekstrakcijom soka i maceracijom, fermentativni metabolizam mikroorganizama odgovornih za alkoholnu i malolaktičku fermentaciju te kemijske i enzimске reakcije nakon fermentacije, tijekom dozrijevanja vina u bačvi i boci. Na aromu vina koje dozrijeva u drvenoj bačvi, utječu i mirisni spojevi koje otpušta (hrastova) bačva. Najveću ulogu u određivanju kvalitete i karaktera vina s obzirom na podrijetlo imaju spojevi iz grožđa. Oni su odgovorni za sortnu aromu vina, međutim, spojevi arome vina mogu se razlikovati od slobodnih spojeva arome grožđa (Ribereau-Gayon i sur., 2006).

4.1. Spojevi sortne arome

Aroma grožđa razvija se tijekom rasta bobica i bitno doprinosi okusu i svojstvima vina, osobito kod aromatičnih sorti. Mošt i vino aromatičnih sorti (npr. Muškati) imaju sličan sastav

spojeva arome, dok su moštovi mnogih manje aromatičnih sorti gotovo bez mirisa, ali njihova vina su karakterističnih aroma (npr. Merlot, Cabernet sauvignon, Chardonnay, različite Pinot sorte i dr.). U vinarstvu je, stoga, važan koncept prekursora spojeva sortne arome, bezmirisnih spojeva iz kojih nastaju spojevi sortne arome. Pojam sortne arome ne znači da svaka sorta ima specifičan sadržaj hlapljivih spojeva – isti mirisni spojevi i njihovi prekursori nalaze se u moštovima i vinima više sorti grožđa pa čak i kod drugih biljnih vrsta. Aromatska posebnost vina različitih sorti rezultat je beskonačnih kombinacija kvalitativnog sastava i koncentracija spojeva (Ribereau-Gayon i sur., 2006).

Terpeni, jedna od glavnih skupina spojeva sortne arome, prisutni su u slobodnom obliku i (uglavnom) kao glikozilirani bezmirisni prekursori. Odgovorni su za karakterističnu aromu grožđa i vina sorte Muškat, a u manjim koncentracijama ima ih i u drugim, manje aromatičnim sortama. Sortnoj aromi doprinose i norizoprenoidi koji nastaju kemijskom ili enzimskom razgradnjom karotenoida u grožđu i također se javljaju u obliku glikoziliranih prekursora. Promjenjive koncentracije C-13 norizoprenoida, kao što je β -damaskenon, mogu pojačati voćne note, čak i u nižim koncentracijama, i odgovorni su za aromu vina Cabernet sauvignon i drugih sorti koje nisu poznate po cvjetnim notama. Rijetko se u ovoj skupini nalaze i metokspirazini i sumporni spojevi s tiolnim funkcionalnim skupinama. Metokspirazini se vezuju uz zelene i biljne arome Cabernet sauvignona, Sauvignon blanca, Cabernet franca i Merlot noira, a prisutni su u slobodnom obliku u grožđu. Tioli su osobito karakteristični za Sauvignon blanc sortu i u obliku su S-cistein konjugata (Ribereau-Gayon i sur., 2006).

4.2. Spojevi fermentativne arome

Kompleksnost arome jako se povećava tijekom alkoholne fermentacije kada dolazi do sinteze važnih hlapljivih spojeva i otpuštanja prekursora nekih spojeva sortne arome (Swiegers i sur., 2005). Koji se hlapljivi spojevi sintetiziraju i u kojoj količini, ovisi o mnogim faktorima, npr. o sadržaju dušika u moštu, temperaturi fermentacije i soju kvasca. To su spojevi u širokom rasponu polarnosti, topljivosti i hlapljivosti. Najvažniji hlapljivi spojevi koje sintetiziraju vinski kvasci uključuju više alkohole, srednjelančane i dugolančane masne kiseline, acetatne estere, etil estere i aldehide (Molina i sur., 2007).

Glavni viši alkoholi su 1-propanol, izobutanol, amilni alkohol, izoamilni alkohol, 2-feniletanol. Nastaju metabolizmom ugljikohidrata ili transformacijom odgovarajućih aminokiselina (Ribereau-Gayon i sur., 2006).

Kvasci proizvode malu količinu octene kiseline, ali ona ukazuje i na bakterijsku aktivnost u vinu i njegovo kvarenje, baš kao i propionska i maslačna kiselina. Octena kiselina je dominirajuća sastavnica hlapljive kiselosti vina. Za ukupnu aromu vina važne su srednjelančane masne kiseline (npr. kapronska, kaprilna i kaprinska kiselina) koje su međuprodukti biosinteze dugolančanih masnih kiselina (Jackson, 2008).

Acetatni esteri viših alkohola (npr. 2-metilpropil acetat, 3-metilbutil acetat, heksil acetat i 2-feniletil acetat) i etilni esteri masnih kiselina (npr. etil kaproat i etil kaprilat) odgovorni su za voćnu aromu vina. Osim esterifikacijom pomoću enzima tijekom fermentacije, mogu nastati i kemijskom esterifikacijom tijekom dozrijevanja vina.

Acetaldehid je najvažniji od karbonilnih spojeva u koje se još ubrajaju aldehidi i ketoni (Ribereau-Gayon i sur., 2006).

5. Djelovanje bentonita na sastojke mošta i vina

Osnovna namjena primjene bentonita u vinarstvu je dobivanje proteinski stabilnih vina, tj. uklanjanje proteina koji bi kasnije u određenim uvjetima mogli dovesti do pojave zamućenja (Slika 3; Van Sluyter i sur., 2015). Međutim, osim proteina, bentonitom se mogu ukloniti i fenolni spojevi (Salazar i sur., 2006) te spojevi arome (Lira i sur., 2015). Njihovo uklanjanje može biti neizravno, uslijed interakcije s proteinima, ili izravno, adsorpcijom na površinu bentonita (Lambri i sur., 2010).



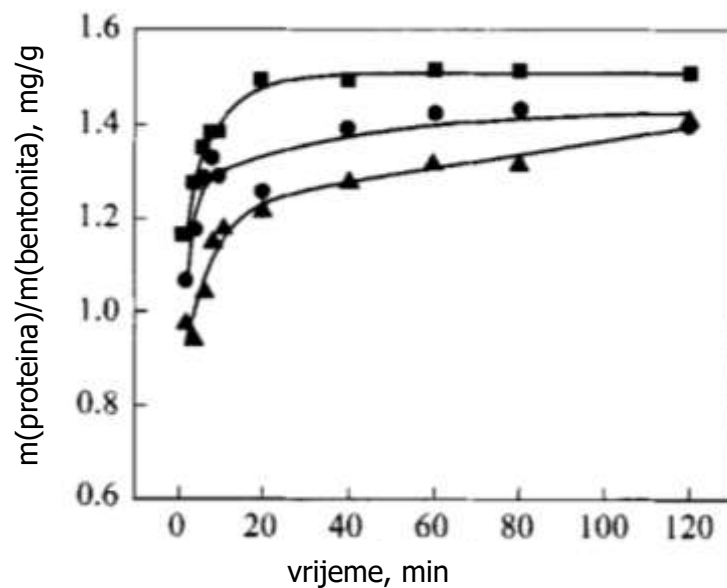
Slika 3. Bijelo vino izbistreno bentonitom (lijevo) i netretirano zamućeno vino (desno)
(Van Sluyter i sur., 2015)

5.1. Utjecaj bentonita na proteine

Proteinska stabilnost u proizvodnji vina gotovo uvijek se postiže dodavanjem bentonita, na koji se elektrostatski adsorbiraju proteini (Pocock i sur., 2011) te uklanjaju iz vina precipitacijom (Van Sluyter i sur., 2015). Bentonit ima ograničeni kapacitet za vezanje proteina, a na njega utječu fizikalna svojstva bentonita, temperatura, pH vrijednost i sadržaj etanola u mediju.

Pri nižim temperaturama dolazi do promjena konformacije proteina pa je povećana adsorpcija vjerojatnija pri višim temperaturama (Blade i Boulton, 1988; Sun i sur., 2007). Na Slici 4. prikazan je utjecaj vremena kontakta s bentonitom i temperature na količinu adsorbiranog proteina.

Trajanje kontakta s bentonitom važno je za učinkovito bistrenje. Uobičajena praksa je dulje vrijeme kontakta vina i bentonita (nekoliko dana) (Ribéreau-Gayon i sur., 2006), međutim, u literaturi se kao optimalan kontaktni period spominje i kraće vrijeme jer se već nakon nekoliko minuta kontakta postiže maksimum adsorpcije (Slika 4; Sun i sur., 2007), neovisno o temperaturi provedbe bistrenja (Blade i Boulton, 1988; Sun i sur., 2007).



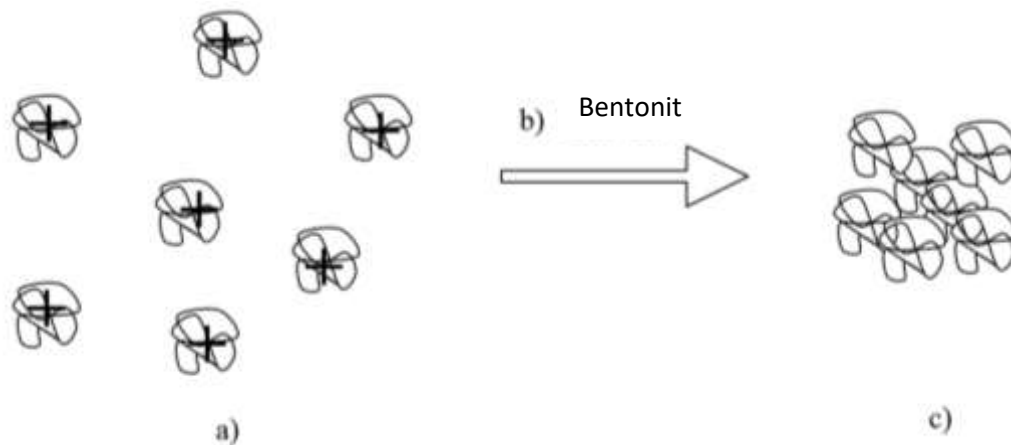
Slika 4. Utjecaj vremena kontakta s bentonitom i temperature na količinu adsorbiranog proteina (■-20 °C, ●-10 °C, ▲-5 °C) (Sun i sur., 2007)

Veću važnost ima pH vrijednost medija, jer utječe na naboj proteina i učinkovitost izmjene kationa na bentonitu (Sun i sur., 2007; Lambri i sur., 2012a; Dordoni i sur., 2015). Pri pH vrijednosti koja odgovara izoelektričnoj točki proteina, ukupan naboj proteina jednak je nuli i protein je najmanje topljiv. Vino ima pH vrijednost koja je blizu izoelektrične točke većine frakcija proteina u njemu (Tablica 1; Anelli, 1977). Kada je pH vrijednost vina niža od izoelektrične točke proteina, ukupan naboj proteina je pozitivan (Zoecklin, 1988). Pri pH vrijednostima svojstvenim vinima, površina bentonita negativno je nabijena te je omogućena adsorpcija proteina pozitivnih neto naboja (Slika 5; Sanborn i sur., 2010) i time njihovo uklanjanje iz vina (Lira i sur., 2015).

Udio etanola u vinu utječe na adsorpcijski kapacitet time što molekule etanola mogu zamijeniti molekule vode između slojeva bentonita i uzrokovati jače bubrenje. Jače bubrenje trebalo bi povećati broj izmjenjivih kationa rezultirajući povećanjem adsorpcijskog kapaciteta. Koncentracija etanola iznad 10% u modelnoj otopini vina znatno povećava adsorpcijski kapacitet (Blade i Boulton, 1988). Međutim, razdvajanje slojeva bentonita molekulama etanola ide do određene granice i moguća je adsorpcija samo onih proteina koji su dovoljno mali da uđu u strukturu bentonita (Achaerandio i sur., 2001).

Tablica 1. Zastupljenost proteina u nekim bijelim vinskim sortama prema vrijednostima njihovih izoelektričnih točaka (Anelli, 1977).

sorta	izoelektrična točka (pH)	udio proteina (%)
Malvazija istarska	2,5	18
	2,8	11
	3,1	4
	4,6	30
	6,5	13
	7,1	5
	8,3	9
	8,7	10
Bijeli rizling	3,6	19
	3,9	53
	6,7	17
	7,1	11



Slika 5. Elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenih proteina (a) i negativno nabijenog bentonita (b) rezultira neutralnim kompleksom (c) i njegovim taloženjem (Sanborn i sur., 2010)

Kapacitet izmjene kationa (CEC), indeks bubrenja (SI) i specifična površina (SSA) u direktnoj su vezi s učinkovitošću bentonita u uklanjanju proteina (Sun i sur., 2007).

Optimalno djelovanje bentonita uključuje uklanjanje toplinski nestabilnih proteina i odgovornih za koloidno zamućenje. Bentonit značajno utječe na hitinaze, β -glukanaze i neke izooblike TL proteina, ali su potrebne veće količine bentonita da bi se uklonile mnogo stabilnije invertaze (Sauvage i sur., 2010).

Općenito, moštovi i vina s visokim sadržajem proteina trebaju relativno velike količine bentonita da bi postigli proteinsku stabilnost, u usporedbi sa moštovima i vinima s manje proteina, iako veza između potreba za bentonitom i koncentracije proteina nije strogo linearna (Mesquita i sur., 2001). Ukupan sadržaj proteina koristan je podatak, ali ne daje nam informaciju o riziku pojave zamućenja. Za to su važniji podaci o vrsti proteina i njihovim relativnim koncentracijama (Lambri i sur., 2012a).

5.2. Utjecaj bentonita na spojeve arome

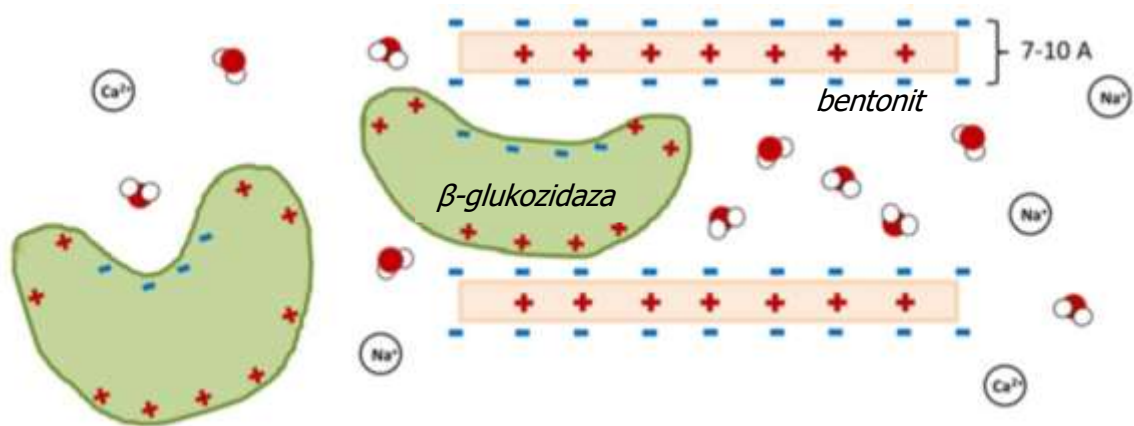
Proteinska stabilnost i prisustvo intenzivnih poželjnih aroma dva su važna uvjeta koja moraju ispunjavati aromatična bijela vina (Puig-Deu i sur., 1999). Hlapljive tvari odgovorne za aromu konačnog vina nastaju tijekom fermentacije, iz spojeva iz grožđa (slobodni spojevi arome i prekursori arome) te tijekom sazrijevanja vina.

Bentonit ima mali utjecaj na smanjenje koncentracije terpena, ali uklanja etil estere i masne kiseline (Vincenzi i sur., 2015). Bistrija smanjuju koncentraciju spojeva arome kao što su etil esteri, acetati i alkoholi u vinima različitih sorti (Moio i sur., 2004). Većina spojeva fermentativne arome indirektno se uklanja bentonitom kroz deproteinizaciju. Neki hidrofilni mirisni spojevi arome vežu se na površinu proteina slabim vodikovim vezama, a hidrofobniji spojevi arome mogu se vezati za mjesta jačeg afiniteta prema hidrofobnim tvarima u unutrašnjosti proteinske molekule, dok se samo neke molekule mirisnih spojeva direktno adsorbiraju na bentonit (Lambri i sur., 2010).

Bentonit se uobičajeno dodaje u vino, ali može se dodati i grožđanom soku da bi se ubrzalo njegovo bistrenje i potpomoglo taloženje suspendiranih čestica (Puig-Deu i sur., 1999). Primjena bentonita može utjecati na sastav mošta. Bistrenje mošta prije početka alkoholne fermentacije može poboljšati senzorska svojstva rezultirajućih bijelih vina (Armada i Falqué, 2007). Uklanjanje čvrstih dijelova grožđa od mošta potiče proizvodnju etil estera i acetata te ograničava otpuštanje viših alkohola tijekom alkoholne fermentacije, a čime se povećava kvaliteta arome vina (Puig-Deu i sur., 1999). Koloidne čestice ipak moraju biti prisutne u određenoj količini, jer doprinose strukturi i punoći, fiksiranju spojeva arome i primjerice, stvaranju mjehurića u pjenušavim vinima zbog površinski aktivnog djelovanja (Achaerandio i sur., 2001). Nedovoljna izbistrenost mošta rezultirat će prisustvom biljnih aroma u vinu, a prebistrenost može usporiti ili čak zaustaviti fermentaciju (Armada i Falqué, 2007).

Učinak tretmana bentonitom na spojeve arome bijelih vina bitno ovisi o kemijskim svojstvima i početnim koncentracijama hlapljivih spojeva te količini i vrsti proteina u vinu (Lambri i sur., 2010). Pri nižim primijenjenim koncentracijama bentonita (20 g/hL) koncentracije većine spojeva arome nisu narušene.

Dodavanje bentonita narušava aromu vina zbog adsorpcije spojeva, te čak i utječe na njihovo nastajanje tijekom fermentacije. Uz mogući gubitak hlapljivih spojeva zbog adsorpcije na bentonit, učinak na proizvodnju tih spojeva mogao bi biti povezan i s promjenama sadržaja dušika i drugih nutrijenata u moštu i vinu (Lira i sur., 2015). Bentonit može djelovati kao adsorbens aroma (Vincenzi i sur., 2015), ali i kao inhibitor aktivnosti enzima β -glukozidaze (Jaeckels i sur., 2015) koji je odgovoran za cijepanje glikozidnih veza tijekom fermentacije i oslobađanje hlapljivih sastojaka arome. β -Glukozidaza će se svojom pozitivno nabijenom površinom i velikom strukturnom fleksibilnošću adsorbirati između negativno nabijenih slojeva bentonita, dok negativni naboji smješteni u utoru enzima neće spriječiti adsorpciju na bentonit (Slika 6; Jaeckels i sur., 2015).



Slika 6. Interakcije između β -glukozidaze i bentonita (Jaeckels i sur., 2015)

U modelnoj otopini, prisutnost ukupnih i pročišćenih proteina (TL proteini i hitinaze) i bentonita utječe na povećanje gubitka estera masnih kiselina duljih ugljikovih lanaca - etil oktanoata i etil dekanata (Vincenzi i sur., 2015). Prema tome, pretpostavlja se da bi hidrofobnost mogla biti pokretačka sila uključena u interakcije spojeva arome s bentonitom i proteinima.

Bentoniti manje SSA vrijednosti i veće gustoće naboja po jedinici površine (CDSU) s većinom su mirisnih spojeva arome primarno u interakciji putem fizikalnih mehanizama. Suprotno tome, na glini veće SSA vrijednosti i niže CDSU vrijednosti adsorpcija je jača, vjerojatno zbog postojanja kemijske interakcije, osobito kada se radi o etil esterima. Za mirisne spojeve fermentativne arome, razlike u jačini i kapacitetu adsorpcije uglavnom su ovisne o svojstvima bentonita, a ne i o svojstvima tvari. U fazi kada spojevi koje proizvode kvasci postanu važna frakcija makromolekula vina, koloidi koji mogu vezati spojeve arome održavaju se u suspenziji. U tom slučaju, manje je vjerojatno da će se mirisne tvari direktno adsorbirati na bentonit (Lambri i sur., 2010).

6. Strategije bistrenja bentonitom

Alternativni tretmani bistrenja, koji ne uključuju bentonit, manje su ili više učinkoviti, ali još uvijek su u fazi istraživanja ili nisu u primjeni u vinarskoj industriji zbog određenih nedostataka, najčešće nepraktičnosti i/ili ekonomske neisplativosti. Bistrenje bentonitom se može provesti u gotovo bilo kojoj fazi proizvodnje vina. Dostupne informacije još uvijek su

nepotpune i proizvođačima vina nisu dovoljna pomoć u donošenju odluke o tipu bentonita koji bi trebali i mogli koristiti te o najboljem načinu njegove primjene.

6.1. Bistrenje bentonitom u različitim fazama vinifikacije

Prema nekim autorima, bistrenje groždanog soka bentonitom može smanjiti ukupnu potrebnu dozu bentonita u usporedbi s uobičajenim bistrenjem i tako umanjiti gubitke u količini vina (Lambri i sur., 2012b). Međutim, u većini istraživanja koja su uključivala bistrenje groždanog soka prije fermentacije uočen je negativan učinak na količinu kvascu dostupnog dušika, na koncentraciju sastojaka sorte i fermentativne arome te na senzorsku kvalitetu vina (Lambri i sur., 2012b).

Alternativan pristup, koji je u skladu s trenutno važećom regulativom te se pokazao obećavajućim i relativno lako primjenjivim, je bistrenje mošta tijekom fermentacije. Mogućnost smanjenja ukupne doze bentonita, te poboljšanje kvalitete vina bistrenjem mošta tijekom fermentacije (u odnosu na standardno bistrenje vina nakon fermentacije) je uočena još u osamdesetim godinama prošlog stoljeća (Ewart i sur., 1980). Međutim, od tada pa do danas objavljeno je svega nekoliko radova na tu temu s utvrđenim manje ili više pozitivnim učincima (Pocock i sur., 2011; Lira i sur., 2014; 2015). Uglavnom su uočeni vrlo slabo istraženi popratni učinci na senzorski važne aktivne kemijske sastojke, a time i na senzorsku kvalitetu vina (Lira i sur., 2014; 2015). Kao pozitivan primjer ističe se rad Lire i suradnika (2015) u kojem je postignuto čak 50%-tno smanjenje potrebne doze bentonita u odnosu na standardno bistrenje, uz određena poboljšanja u pogledu pojedinih parametara kemijskog sastava i senzorske kvalitete vina kultivara Albariño. Isti autori utvrdili su značajan utjecaj trenutka primjene bentonita tijekom fermentacije, s najboljim rezultatima nakon tretmana u sredini ili pred sam kraj fermentacije.

Unatoč obećavajućim rezultatima, učinak bistrenja bentonitom tijekom fermentacije na proteinsku stabilnost (potrebnu dozu bentonita) i sadržaj različitih ključnih kemijskih i senzorskih parametara općenito je izrazito slabo proučen.

Novije istraživanje na Sauvignon blanc vinima (Vela i sur., 2017) ukazuje na opravdanost primjene bentonita nakon fermentacije. Bentonit značajno negativno utječe na koncentraciju tiola, ključnih spojeva sorte arome tih vina, ali manje nego kada se primijeni na samom početku fermentacije. U toj fazi primjene, za postizanje proteinske stabilnosti vina, bila potrebna manja doza bentonita.

6.2. Bistrenje različitim bentonitima

Osim trenutka primjene bentonita, i vrsta primijenjenog bentonita može utjecati na razinu uklanjanja proteina, pa time i na stabilizaciju vina, te na količinu proizvedenog taloga i aromatski profil finalnog vina.

Na Sauvignon blanc sorti istraživana je primjena dva tipa bentonita tijekom fermentacije, natrijevog i aktiviranog natrijevog bentonita (Salazar i sur., 2017). Prema količini bentonita potrebnog za postizanje proteinske stabilnosti groždanog soka, pokazalo se da natrijev bentonit može vezati značajno više proteina grožđa nego aktivirani natrijev bentonit. Kontrolnim vinima je za postizanje stabilnosti bila potrebna manja doza bentonita nego groždanom soku, bez obzira o kojem tipu bentonita se radilo, iz čega se zaključuje da se značajno smanjuje potreba za bentonitom kada ga se primjenjuje nakon fermentacije u odnosu na primjenu prije fermentacije, što je potvrda ranijih istraživanja drugih autora (Van Sluyter i sur., 2015; Muhlack i sur., 2016). Iako postoje male razlike, vina tretirana natrijevim bentonitom i aktiviranim natrijevim bentonitom u različito vrijeme, slična su po određenim fizikalno-kemijskim svojstvima (koncentracija slobodnog SO₂, koncentracija neprevrelog šećera, pH vrijednost, ukupna kiselost i hlapljiva kiselost, volumni postotak etanola, koncentracija ukupnih proteina, zamućenost nakon toplinskog testa izražena u NTU jedinicama). Sličnost njihovih fizikalno-kemijskih svojstava pokazuje da tretmani nisu negativno utjecali na alkoholnu fermentaciju i u skladu je s rezultatima objavljenim za Muscat, Macabeo i Albariño vina tretirana i netretirana bentonitom (Lambri i sur., 2010; Lira i sur., 2014; 2015).

Bistrena vina sadržavala su malo proteina i zanemarivu količinu proteina koji se smatraju odgovornima za nastanak zamućenja. Najviše je uklonjenih proteina molekulske masa 20-25 kDa, što uključuje grupe proteina odgovornih za zamućenje - hitinaze i TL proteine (Marangon i sur., 2011). U usporedbi s kontrolnim vinom, utjecaj bentonita očituje se u značajnom smanjenju koncentracije proteina te povećanju proteinske stabilnosti. Nema značajne razlike u smanjenju ukupnih proteina kada se primijene različiti bentoniti, ali ima razlike u tome koji se proteini više uklone, što je vidljivo analizom gel-elektroforezom i usporedbom proteinskih vrpca. Bistrenjem groždanog soka natrijevim bentonitom uklonjeno je više proteina niže molekulske mase nego aktiviranim natrijevim bentonitom. Kada se dodaje u groždani sok, učinkovitiji je natrijev bentonit, nego aktivirani natrijev bentonit, jer vrpca proteina molekulske mase 20-25 kDa potpuno nestane u prvom slučaju, a u drugom se samo smanji njezin

intenzitet. Bolje uklanjanje proteina primjenom natrijevog bentonita može se pripisati prevladavanjem natrijevih kationa u strukturi tog tipa bentonita (Rosch i sur., 2015).

U Sauvignon blanc vinu identificirani su proteini poput vakuolne invertaze, β -glukanaze, dvije hitinaze i mnogo TL proteina kao najznačajnijih u nebistrenim vinima. Proteinski sastav Sauvignon blanc vina slaže se s tipičnim proteinskim profilima nekoliko sorti vina objavljenim u drugim radovima (Sauvage i sur., 2010; Lambri i sur., 2012b; Jaeckels i sur., 2015; Rosch i sur., 2015) te ukazuje da je natrijev bentonit dodan u groždani sok učinkovit pri uklanjanju proteina odgovornih za замуćenje (hitinaza i TL proteina). Aktivirani natrijev bentonit općenito je manje učinkovit u uklanjanju proteina iz soka, bez obzira o kojoj grupi proteina se radilo.

Kod vina koja nisu bistrena, s talogom se izgubilo 1,25% volumena. Neočekivan rezultat je da su vina dobivena tretmanima s bentonitom imala značajno više taloga nego kontrolno vino, međutim, s kasnijom primjenom bentonita, volumen taloga je sve manji. Primjenom aktiviranog natrijevog bentonita dolazi do stvaranja značajno manje taloga (40% manje) nego primjenom natrijevog bentonita. Najbolji se rezultati postižu kasnijim dodatkom aktiviranog natrijevog bentonita, pri čemu nastaje samo 1,25% taloga, jednako kao i kada se vino ne bistri. Volumen vina u talogu nakon fermentacije, uz učinkovitost proteinske stabilizacije, ključni je faktor u donošenju odluke o načinu stabilizacije pa bi se prema ovim rezultatima prednost trebala dati aktiviranom natrijevom bentonitu.

Različitost učinaka natrijevog bentonita i aktiviranog natrijevog bentonita na sastav hlapljivih tvari ovisi i o dozi i o trenutku primjene. Vina dobivena tretmanima aktiviranim natrijevim bentonitom prije fermentacije imala su sličan ili veći sadržaj hlapljivih spojeva nego vina dobivena tretmanima natrijevim bentonitom. Bentonit dodan u toj fazi može iz mošta ukloniti nutrijente potrebne kvascu za proizvodnju hlapljivih spojeva u fermentaciji pa ih kvasac proizvodi manje (Rosch i sur., 2015). Kada se bentonit dodaje tijekom fermentacije, situacija je suprotna, većinom je više hlapljivih spojeva u vinima dobivenim tretmanima natrijevim bentonitom, osim kod ranijeg dodavanja standardne doze (doza potrebna za postizanje stabilnosti kada se bentonit dodaje groždanom soku). Sveukupno gledano, pokazalo se da je više hlapljivih spojeva u vinima dobivenim uz bistrenje natrijevim bentonitom, što se tumači na dva načina: aktivirani natrijev bentonit može direktno ukloniti više novoformiranih hlapljivih spojeva u usporedbi s natrijevim bentonitom (Lambri i sur., 2013) ili vezna mjesta aktiviranog natrijevog bentonita mogu ometati metabolizam kvasca (npr. snižavajući količinu kvascu dostupnih masnih kiselina) i tako indirektno biti uzrok manjoj produkciji fermentacijskih spojeva, za razliku od natrijevog bentonita (Weiss i Bisson, 2002).

Prema rezultatima proteinske stabilizacije, u ovom slučaju najbolji bi trenutak provođenja bistrenja bio kasnije tijekom fermentacije. Podaci relativnih koncentracija nekih hlapljivih

spojeva ne idu u prilog kasnijoj primjeni bentonita u fermentaciji jer ih se ukloni više i to je još izražajnije primjenom aktiviranog natrijevog bentonita, ali nije zanemarivo primjenom natrijevog bentonita. Kada je bentonit primijenjen u kasnijoj fazi fermentacije, u usporedbi s primjenom prije fermentacije, svi analizirani hlapljivi spojevi u nižim su koncentracijama u finalnom vinu, međutim, koncentracije spojeva arome slične su ili više nego u kontrolnim vinima, a isto se uočilo i u istraživanjima s Macabeo i Albariño sortama (Lira i sur., 2013; Lira i sur., 2014).

Primjena aktiviranog natrijevog bentonita tijekom fermentacije rezultirala je vinima s višim sadržajem proteina, višom koncentracijom hlapljivih tvari i manjom količinom taloga u usporedbi s primjenom natrijevog bentonita, osobito kada se radilo o primjeni u kasnijoj fazi fermentacije. Minimalna doza primijenjena u ovom istraživanju (za 0,2 g/L manja od one potrebne za stabilizaciju groždanog soka) mogla bi se smatrati dovoljnom za proteinsku stabilizaciju Sauvignon blanc vina tijekom fermentacije, s niskim učinkom na spojeve arome i količinu nastalog taloga primjenom natrijevog ili aktiviranog natrijevog bentonita.

Usporedbom djelovanja različitih aktiviranih natrijevih bentonita (Dordoni i sur., 2015), pokazalo se da su njihove razlike očitije pri višim pH vrijednostima nego pri nižim. Svi su učinkoviti u uklanjanju proteina male molekulske mase bez obzira na pH medija u rasponu vrijednosti tipičnih za vina. Proteine velikih i srednjih molekulskih masa manje uklanjaju, pri čemu značajan utjecaj imaju svojstva gline i pH vrijednost. Smanjenja vakuolarne invertaze i jedne frakcije TL proteina (VVTL1), čime se povećava toplinska stabilnost vina, inducirana su djelovanjem bentonita pH vrijednosti manje od 10. Na takve bentonite kiseliji pH ima manji negativni učinak. Bentonit s najnižim sadržajem kalcija najmanje je učinkovit u uklanjanju vakuolarne invertaze, VVTL1 frakcije TL proteina i glikoproteina (YGP1). Također je utvrđeno i da se uklanjanje fenolnih spojeva događa indirektno uklanjanjem proteina i pod utjecajem je pH vrijednosti.

6.3. Različiti načini primjene bentonita

Dodavanje bentonita šaržno uobičajen je postupak u proizvodnji vina za uklanjanje toplinski nestabilnih proteina u bijelom vinu (Van Sluyter i sur., 2015). Bentonit se dodaje u jednom obroku i pušta ga se da se prirodno istaloži djelovanjem sile gravitacije (Slika 7; Anonimus 2, 2020). Međutim, osim što može negativno utjecati na kvalitetu vina, s talogom bentonita gubi se i značajna količina vina. To vino ne mora biti izgubljeno, ali njegov povrat

nikada nije potpun i metode kojima se ono izdvaja izlažu vino nepoželjnim, oksidativnim uvjetima. Gubici dostižu milijardu dolara godišnje (Van Sluyter i sur., 2015). Najčešće se bentonit dodaje po završetku alkoholne fermentacije, nakon određivanja doze potrebne za postizanje proteinske stabilnosti, međutim, neki proizvođači provode tretman u dvije faze, pri čemu prvu dozu dodaju tijekom fermentacije, a konačnu po završetku fermentacije. Takav postupak može smanjiti ukupnu potrebnu dozu bentonita za postizanje stabilnosti u odnosu na potrebnu dozu pri jednokratnom bistrenju i može ublažiti negativne učinke primjene bentonita (Lira i sur., 2013).



Slika 7. Bentonit u prahu (Anonimus 2, 2020)

Jedna od strategija za minimiziranje gubitaka vina je poboljšanje kontakta bentonita i vina te poboljšanje uklanjanja čestica taloga (Nordestgaard i sur., 2007). U ovom istraživanju primijenjen je kontinuirani proces bistrenja. Vino turbulentno struji kroz cijev u koju se kontinuirano dozira suspenzija bentonita. U zoni kontakta vina i bentonita dolazi do adsorpcije proteina, a bentonit se potom kontinuiranim centrifugiranjem odjeljuje od vina (Nordestgaard i sur., 2007). Bistrenje *in-line* doziranjem pokazalo se učinkovito u uklanjanju proteina te se, s obzirom na utjecaj na senzorska svojstva vina, ne razlikuje od tradicionalnog procesa bistrenja (Muhlack i sur., 2006). Međutim, centrifugiranjem se ne postiže potpuno izdvajanje bentonita iz vina, već u vinu zaostaje do 30% bentonita koji se opet taloži i stvara gubitke. U novije vrijeme istražuje se mogućnost poboljšanja izdvajanja bentonita centrifugiranjem izvođenjem doziranja bentonita i njegovog uklanjanja istovremeno s centrifugiranjem pa čestice bentonita mogu s drugim prisutnim čvrstim česticama stvarati agregate i tako se lakše izdvojiti. Primjenom te strategije nakon završetka alkoholne fermentacije Muhlack i Colby (2018) postigli su 84%-tno smanjenje količine zaostalog bentonita u bistrenom vinu. Prema njihovim

proračunima ovakvim načinom bistrenja, troškovi povezani s gubicima vina uslijed primjene bentonita mogli bi se smanjiti do 82.5% što bi značajno doprinijelo uštedama u proizvodnji.

7. Zaključak

Optimiranje bistrenja bentonitom s ciljem umanjenja gubitaka vina pri odvajanju taloga i očuvanja kvalitete vina, od velikog je interesa za vinarsku industriju. Alternativne strategije bistrenja bentonitom pokazuju obećavajuće rezultate, ali još uvijek nisu dovoljno istražene. Najnovija istraživanja s *in-line* doziranjem bentonita bave se mogućnošću smanjenja gubitaka vina i povezanih troškova, dok se gotovo uopće ne dotiču utjecaja na kvalitetu vina s kemijskog ili senzorskog aspekta. Utjecaj bistrenja tijekom fermentacije na proteinsku stabilnost (potrebnu dozu bentonita) i sadržaj različitih ključnih kemijskih i senzorskih parametara slabo je proučavan. Svega nekoliko publikacija bavilo se utjecajem takvih tretmana na spojeve arome i to uglavnom na osnovne tzv. slobodne hlapljive spojeve. Do danas uopće nije istražen utjecaj primjene bentonita na koncentracije važnih glikozidno vezanih spojeva arome, iako se mogu pretpostaviti različite interakcije ovisno o uvjetima primjene i s obzirom da bentonit može djelovati kao adsorbens arome, ali i kao inhibitor aktivnosti enzima β -glukozidaze. Utjecaj primjene bentonita na pojedinačne fenole u vinu do danas nije istražen. S obzirom na inhibitornu aktivnost bentonita prema enzimima, pretpostavlja se je da bi njegova primjena tijekom fermentacije značajno utjecala na konačne koncentracije esterificiranih i slobodnih hidroksicimetnih kiselina i ostalih važnih fenola djelovanjem na polifenol-oksidaze. Ne manje važno, dosadašnja istraživanja bistrenja bentonitom u fermentaciji uglavnom su se odnosila na nedorađena vina, dok njihova učinkovitost i popratni učinci u odnosu na standardnu primjenu nisu provjeravani u finaliziranim, proteinski stabilnim vinima. Osim utjecaja trenutka primjene bentonita, do danas nije istražen utjecaj različitih uvjeta za koje se u vinarskoj praksi potvrdilo da mogu utjecati na djelotvornost bentonita, a čijim bi se variranjem mogla optimizirati njegova primjena tijekom fermentacije, kao što su npr., doza i način pripreve te način dodavanja bentonita, kombinirani utjecaj dodatka bentonita i komercijalno dostupnih tanina s deklariranom reaktivnosti prema proteinima te utjecaj temperature mošta tijekom bistrenja.

Još je mnogo mjesta za napredak u istraživanjima strategija bistrenja bijelih vina bentonitom da bi se približilo potpunijem rasvjetljavanju popratnih učinaka na kvalitetu vina. Stručnjaci i znanstvenici i dalje su u potrazi za najboljim načinima njegove primjene u smislu

ostvarenja ušteda te poboljšanja ili barem očuvanja kvalitete vine pri postizanju proteinske stabilnosti.

8. Popis literature

Achaerandio, I., Pachova, V., Güell, C., López, F. (2001). Protein adsorption by bentonite in a white wine model solution: effect of protein molecular weight and ethanol concentration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 122–126.

Anelli, G. (1977). The proteins of must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 200-203.

Anonimus 1 (2020) Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, pristupljeno 6. 5. 2020. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=41822>>.

Anonimus 2 (2020) MoreWine! Absolutely Everything for Wine-Making. <https://morewinemaking.com/products/bentonite.html>), pristupljeno 25. 5. 2020.

Armada, L., Falqué, E. (2007). Repercussion of the clarification treatment agents before the alcoholic fermentation on volatile composition of white wines. *European Food Research and Technology*, 225, 553 – 558.

Blade, W. H., Boulton, R. (1988). Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 193–199.

Chagas, R., Monteiro, S., Ferreira, R. B. (2012). Assessment of potential effects of common fining agents used for white wine protein stabilization. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 574-578.

Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T., Gunata, Z. (2007). Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chemistry*, 100, 22-30.

Dordoni, R., Colangelo, D., Giribaldi, M., Giuffrida, M. G., De Faveri, D. M., Lambri, M. (2015). Effect of bentonite characteristics on wine proteins, polyphenols, and metals under conditions of different pH. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66, 518-530.

Ewart, A. J. W., Phipps, G. J., Iland, P. G. (1980). Bentonite additions to wine: before, during or after fermentation? *Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 196, 46–47.

Hsu, J. C., Heatherbell, D. A., Flores, J. H., Watson, B. T. (1987). Heat unstable proteins in grape juice and wine. II. Characterization and removal by ultrafiltration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 17-22.

Ismadji, S., Soetaredjo, F., Ayucitra, A. (2015). Natural clay minerals as environmental cleaning agents. *Journal of Clay Materials for Environmental Remedation*, 8, 5-37.

Jackson, R. S. (2008). *Wine science: Principles and applications* (3rd ed.). Cambridge (MA), USA: Academic Press - Elsevier.

Jaeckels, N., Tenzer, S., Rosch, A., Scholten, G., Decker, H., Fronk, P. (2015). β -Glucosidase removal due to bentonite fining during winemaking. *European Food Research and Technology*, 241, 253–262.

Lambri, M., Dordoni, R., Silva, S., De Faveri, D. M. (2010). Effect of bentonite fining on odor-active compounds in two different white wine styles. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 225-233.

Lambri, M., Dordoni, R., Giribaldi, M., Violeta, M. R., Giuffrida, M. G. (2012a). Heat-unstable protein removal by different bentonite labels in white wines. *LWT – Food Science and Technology*, 46, 460–467

Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., De Faveri, D. M. (2012b). Comparing the impact of bentonite addition for both must clarification and wine fining on the chemical profile of wine from Chambave Muscat grapes. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1–12.

Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., De Faveri, D. M. (2013). Odor-active compound adsorption onto bentonite in a model white wine solution. *Chemical Engineering Transactions (CET)*, 32, 1741–1746.

Lambri, M., Colangelo, D., Dordoni, R., Torchio, F., De Faveri, D. M. (2016). Innovations in the Use of Bentonite in Oenology: Interactions with Grape and Wine Proteins, Colloids, Polyphenols and Aroma Compounds. U A. Morata (ur.) Grape and Wine Biotechnology (str. 381-400). London, UK: IntechOpen.

Lira, E., Salazar, F. N., Vincenzi, S., Curioni, S., López, F. (2013). Effect of bentonite fining during fermentation on protein content in Macabeu wines: comparison of pilot and industrial scale experiments. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 47(3), 221-226.

Lira, E., Salazar, F. N., Rodríguez-Bencomo, J. J., Vincenzi, S., Curioni, A., López, F. (2014). Effect of using bentonite during fermentation on protein stabilisation and sensory properties of white wine. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 1070–1078.

Lira, E., Rodríguez-Bencomo, J. J., Salazar, F. N., Orriols, I., Fornos, D., López, F. (2015). Impact of Bentonite Additions during Vinification on Protein Stability and Volatile Compounds of Albariño Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 3004–3011.

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Neilson, K. A., Chan, C., Haynes, P. A., Waters, E. J., Falconer, R. J. (2011). Roles of grape thaumatin like protein and chitinase in white wine haze formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 733–740.

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Waters, E. J., Menz, R. I. (2014). Structure of haze forming proteins in white wines: *Vitis vinifera* thaumatin-like proteins. *PLoS One*, 9, No. e113757.

Mesquita, P. R., Picarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., Ferreira, R. B. (2001). Effect of wine composition on protein stability. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(4), 324-330.

Moio, L., Ugliano, M., Gambuti, A., Genovese, A., Piombino, P. (2004). Influence of clarification treatment on concentrations of selected free varietal aroma compounds and glycoconjugates in falanghina (*Vitis vinifera* L.) must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 7-12.

Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., Agostin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 675–687.

Muhlack, R., Nordestgaard, S., Waters, E. J., O'NEILL, B. K., Lim, A., & Colby, C. B. (2006). In-line dosing for bentonite fining of wine or juice: Contact time, clarification, product recovery and sensory effects. *Australian Journal of grape and wine research*, 12(3), 221-234.

Muhlack, R. A., O'Neill, B. K., Waters, E. J., Colby, C. B. (2016). Optimal conditions for controlling haze-forming wine protein with bentonite treatment: investigation of matrix effects and interactions using factorial design. *Food and Bioprocess Technology*, 9(6), 936-943.

Muhlack, R. A., Colby, C. B. (2018). Reduced product loss associated with inline bentonite treatment of white wine by simultaneous centrifugation with yeast lees. *Food and Bioprocess Technology*, 108, 51-57.

Nordestgaard, S., Chuan, Y. P., O'Neill, B., Waters, E. J., Deans, L., Policki, P., Colby, C. (2007). In-line dosing of white wine for bentonite fining with centrifugal clarification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 283-285.

Pocock, K. F., Hayasaka, Y., McCarthy, M. G., Waters, E. J. (2000). Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1637–1643.

Pocock, K. F., Salazar, F. N., Waters, E. J. (2011). The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 280–284.

Puig-Deu, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., Torre-Boronat, M.C. (1999). Quality of base and sparkling wines as influenced by the type of fining agent added pre-fermentation. *Food Chemistry*, 66, 35–42.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology: The chemistry of wine stabilization and treatments*, Vol. 2 (2nd ed.). Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons, Inc.

Rosch, A., Scholten, G., Decker, H., Fronk, P. (2015). Influence of bentonite fining on protein composition in wine. *European Food Research and Technology*, 241, 253-262.

Salazar, F. N., Achaerandio, I., Labbé, M. A., Gell, C., Lopez, F. (2006). Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: Physicochemical and wine sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9955-9958.

Salazar, F. N., Marangon, M., Labbé, M., Lira, E., Rodríguez-Bencomo, J. J., López, F. (2017). Comparative study of sodium bentonite and sodium-activated bentonite fining during white wine fermentation: its effect on protein content, protein stability, lees volume, and volatile compounds. *European Food Research and Technology*, 243 (11), 2043-2054.

Sanborn, M., Edwards, C. G., Ross, C. F. (2010). Impact of fining on chemical and sensory properties of Washington state chardonnay and gewürztraminer wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 31-41.

Sauvage, F. X., Bach, B., Moutounet, M., Vernhet, A. (2010). Proteins in white wines: thermosensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry*, 118, 26–34.

Sun, X., Li, C., Wu, Z., Xu, X., Ren, L., Zhao, H. (2007). Adsorption of protein from model wine solution by different bentonites. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15, 632–638.

Swiegers, J. H., Bartowksy, 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, 127–138.

Van Sluyter, S. C., McRae, J. M., Falconer, R. J., Smith, P. A., Bacic, A., Waters, E. J., Marangon, M. (2015). Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (16), 4020–4030.

Vela, E., Hernández-Orte, P., Castro, E., Ferreira, V., Lopez, R. (2017). Effect of Bentonite Fining on Polyfunctional Mercaptans and Other Volatile Compounds in Sauvignon blanc Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68, 30–38.

Vincenzi, S., Marangon, M., Tolin, S., Curioni, A. (2011). Protein evolution during the early stages of white winemaking and its relations with wine stability. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 20-27.

Vincenzi, S., Panighel, A., Gazzola, D., Flamini, R., Curioni, A. (2015). Study of combined effect of proteins and bentonite fining on the wine aroma loss. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 2314–2320.

Waters, E. J., Wallace, W., Williams, P. J. (1991). Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 101, 365-369

Waters, E. J., Alexander, G., Muhlack, R., Colby, C., O'Neill, P. K., Hoi, P. B., Jones, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 215–225.

Weiss, C., Bisson, L. F. (2002). Effect of bentonite treatment of grape juice on yeast fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 28-36.

Zoecklin, B. (1988). Bentonite fining of juice and wine. Virginia Cooperative Extension Service (USA): Publication 463-014.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Valentina Rožić

Valentina Rožić