

Praćenje fermentacije domaćeg bijelog vina Iločkog vinogorja

Inkret, Ines

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:594887>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ines Inkret

6259/BT

Praćenje fermentacije domaćeg bijelog vina
Iločkog vinogorja
ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnološki aspekti proizvodnje vina

Mentor: dr. sc. Vesna Zechner - Krpan, red.prof.

Zagreb, 2015

Sveučilište u Zagrebu**Prehrambeno-biotehnološki fakultet****Preddiplomski studij Biotehnologija****Zavod za biokemijsko inženjerstvo****Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva**

Praćenje fermentacije domaćeg bijelog vina Iločkog vinogorja

Ines Inkret, 6259/BT

Sažetak: Cilj završnog rada bio je proizvesti bijelo vino od sorti Graševina bijela i Rajnski rizling bijeli, pri čemu je korišteno grožđe s područja Iločkog vinogorja. Nakon vinifikacije u privatnoj obiteljskoj vinariji Kočet provedena je kemijska analiza proizvedenog domaćeg vina u laboratoriju Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta. Određeni su osnovni parametri kakvoće: šećer, ukupne i hlapljive kiseline, slobodni, vezani i ukupni sumpor, alkohol, glicerol te jabučna, vinska, mliječna i limunska kiselina. Laboratorijske metode koje su pritom bile korištene su: RS-metoda za određivanje šećera, neutralizacija s NaOH za ukupne kiseline, polumikro postupak za hlapljive kiseline, titracija s NaOH za određivanje slobodnog i vezanog sumpora, kemijska i denzitometrijska metoda za određivanje alkohola, enzimsko određivanje glicerola te papirna kromatografija za određivanje jabučne, vinske, mliječne i limunske kiseline. Rezultati analiziranog domaćeg bijelog vina su u skladu s vrijednostima Pravilnika o vinu iz 1996. godine.

Ključne riječi: Graševina, Ilok, kemijska analiza, proizvodnja bijelih vina, Rizling

Rad sadrži: 35 stranica, 14 slika, 3 tablice, 14 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Dr. sc. Vesna Zechner-Krpan, red. prof.

Rad predan: rujna, 2015.

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Monitoring the fermentation of local white wine from vineyards of Ilok

Ines Inkret, 6259/BT

Abstract: The aim of final work was to produce white wine from Graševina and Rizling varieties in private family winery Kočet. Used grapes were from Ilok wine region. After production, various chemical procedures were applied in order to analyze produced domestic wine at the Faculty of Food Technology and Biotechnology. So, basic wine quality parameters such as: sugar, total and evaporative acidity, free, bounded and total sulfur, alcohol, glycerol and malic, tartaric, lactic and citric acid were determined. Laboratory methods that were used are: RS - method for determination of sugars, neutralization with sodium hydroxide for total acidity, halfmicro procedure for the determination of evaporative acidity, titration with NaOH for the determination of free and bound sulfur, chemical and densitometric method for determination of alcohol, enzymatic determination of glycerol and paper chromatography for the determination of malic, tartaric, lactic and citric acid. The results of analyzed domestic white wine were in accordance with the Croatian wine regulations from year 1996.

Keywords: chemical analysis, Graševina, Ilok, Rizling, white wine production

Thesis contains: 35 pages, 14 figures, 3 tables, 14 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Vesna Zechner-Krpan, Full Prof.

Thesis delivered: September, 2015.

Sadržaj	str.
1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Vino	2
2.2. Vinska sorta Graševina bijela	3
2.3. Vinska sorta Rajnski rizling bijeli	4
2.4. Iločko vinogorje	5
2.5. Proizvodnja bijelih vina	7
2.5.1. Muljanje i runjenje	7
2.5.2. Cijedenje i prešanje	7
2.5.3. Sumporenje i bistrenje mošta.....	8
2.5.4. Alkoholno vrenje.....	9
2.5.4.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.5.4.2. Burno vrenje.....	10
2.5.4.3. Tiho vrenje i jabučno – mliječna fermentacija.....	11
2.5.5. Bistrenje i filtracija vina	12
2.5.6. Stabilizacija i dozrijevanje vina	13
3. Eksperimentalni dio.....	14
3.1. Materijali, aparature i metode	14
3.1.1. Materijali	14
3.1.2. Aparature.....	14
3.1.3. Metode.....	15
3.1.3.1. Određivanje koncentracije šećera RS-metodom.....	15
3.1.3.2. Određivanje ukupnih kiselina u vinu	16
3.1.3.3. Određivanje hlapljivih kiselina po polumikro postupku	17
3.1.3.4. Određivanje sumpora	18
3.1.3.4.1. Određivanje slobodnog sumpora (20 min bez grijanja)	18
3.1.3.4.2. Određivanje vezanog sumpornog dioksida	19
3.1.3.4.3. Određivanje ukupnog sumpora	19

3.1.3.5. Određivanje alkohola kemijskom metodom.....	20
3.1.3.6. Određivanje alkohola denzitometrijski	21
3.1.3.7. Enzimsko određivanje glicerola.....	22
3.1.3.8. Određivanje jabučne, vinske, mliječne i limunske kiseline papirnom kromatografijom	25
4. Rezultati.....	27
4.1. Dnevnik fermentacije i dozrijevanja vina	27
4.2. Kemijska analiza domaćeg bijelog vina	29
4.3. Papirna kromatografija	30
5. Rasprava	31
6. Zaključci	34
7. Literatura.....	35

1. Uvod

Jedan od najstarijih i najvažnijih proizvoda tradicionalne biotehnologije je vino, čija je proizvodnja karakteristična i posebice značajna za područje Republike Hrvatske. Povoljni geografski položaj i umjerena klima glavni su razlozi za dugu tradiciju proizvodnje vina i uzgoja plemenite vinove loze *Vitis vinifera* na ovom podneblju, koja je započela još u 6. stoljeću. S vremenom su tradicionalne metode vinifikacije proučavane, testirane i potom zamjenjivane novijim i modernijim metodama i postupcima, sve u svrhu optimizacije postupka proizvodnje vina i dobivanja konačnog proizvoda bolje kvalitete.

Pravilnikom o vinu područje Republike Hrvatske podjeljeno je na 2 vinogradarske regije, s time da sam se odlučila za proizvodnju i praćenje postupka fermentacije domaćeg vina proizvedenog iz grožđa porijeklom iz regije kontinentalne Hrvatske (iz vinogradarske zone C1 koja obuhvaća područje Slavonije i Podunavlja). Bijele sorte karakteristične za tu vinogradarsku zonu su Graševina bijela, Pinot bijeli, Chardonnay bijeli, Traminac mirisavi, Sauvignon bijeli i Rajnski rizling bijeli, od kojih sam izabrala dvije sorte za proizvodnju vina; Graševinu i Rizling. Grožđe korišteno za vinifikaciju je porijeklom iz okolice Iloka, čije je vinogorje poznato po odličnoj kvaliteti grožđa i vrhunskim vinima, zahvaljujući plodnom tlu i idealnoj klimi za uzgoj vinove loze. Prije same fermentacije grožđe navedenih dviju sorti je sljubljeno (kupažirano), kako bi se unaprijed osigurala zadovoljavajuća kvaliteta vina, s obzirom na to da je godina 2014. bila vrlo kišna i vinogradarski nepovoljna za sazrijevanje grožđa.

Cilj ovog rada je opis procesa vinifikacije, što uključuje postavljanje procesa, detaljno praćenje svake faze fermentacije i dozrijevanja vina u privatnoj obiteljskoj vinariji Kočet te kemijska analiza dobivenog vina u laboratoriju Prehrambeno – biotehnoškog fakulteta, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, kako bi mu se odredili osnovni parametri kakvoće. Na temelju dobivenih rezultata analize mogu se donijeti zaključci o izboru i kvaliteti grožđa, provedenom procesu fermentacije, postupku dozrijevanja vina i najvažnije, zadovoljava li ovo domaće vino kriterije propisane Pravilnikom.

2. Teorijski dio

1.1. Vino

Zakon o vinu iz 1996. godine (ZOV, NN 96/2003) propisuje da se vinom naziva poljoprivredno prehrambeni proizvod dobiven alkoholnom fermentacijom mošta ili masulja od svježeg ili prosušenog grožđa plemenite vinove loze *Vitis vinifera L.* ili njenih križanaca s drugim vrstama roda *Vitis* namijenjenih proizvodnji vina ili drugih proizvoda od grožđa i vina, s tim da je u soku takva grožđa sadržaj šećera najmanje 64°Oechsle (što odgovara količini od 133 g/L). Vina se u užem smislu riječi dijele na mirna, pjenušava, biser i gazirana, a specijalna vina se dijele na desertna, aromatizirana i likerska. Mirna vina se razvrstavaju u suha, polusuha, poluslatka i slatka, a pjenušava, biser i gazirana u vrlo suha, suha, polusuha, poluslatka i slatka (na temelju sadržaja neprevrelog šećera). Ovisno o raznim parametrima poput kakvoće grožđa, uroda po hektaru, zrelosti, načina prerade, korisnog učinka (randmana), sadržaja prirodnog etanola te organoleptičkim (senzornim) svojstvima, mirna vina se razvrstavaju u stolna bez oznake zemljopisnog podrijetla, stolna s oznakom kontroliranog zemljopisnog podrijetla (k.z.p.), kvalitetna s oznakom k.z.p., vrhunska s oznakom k.z.p. i ograničenog vinorodnog područja, vrhunska s k.z.p. i ograničenih specifičnih vinorodnih područja, te predikatna vina s k.z.p. Predikatna vina mogu biti: vina kasne berbe, izborne berbe, izborne berbe bobica, izborne berbe prosušenih bobica i ledeno vino. Po boji vina djelimo na bijela, ružičasta (koja mogu nositi još i oznaku rosé i opolo) i crna (koja se mogu označavati i kao crvena). Kemijski sastav vina, kao i grožđa i mošta iz kojeg se ono proizvodi, raznovrstan je i složen, pa nije moguće pouzdano utvrditi broj svih sastojaka. Broj kemijskih spojeva u vinu poznatog sastava veći je od 600, a broj onih kemijskih spojeva što vinu daju aromu procijenjen je na više od 3000. O kemijskom sastavu vina ovisi njegova kakvoća, pa se zbog toga neki sastojci (npr. etanol i šećer) obvezno označuju na naljepnici, neki se stalno nadziru radi očuvanja zdravstvene ispravnosti, a neki se povremeno ispituju radi zaštite potrošača od mogućih zlorababa. Kakvoća se vina, uz odgovarajuća objektivna mjerenja fizikalnih veličina, procjenjuje i subjektivno (kušanjem, degustacijom, ocjenjivanjem boje, bistroće, mirisa i okusa). Taj posao obavljaju degustatori (Anonimus 1).

2.2. Vinska sorta Graševina bijela

Graševina je u vinogradarskom sortimentu Republike Hrvatske (RH) zacijelo najzastupljenija vinska sorta bijeloga grožđa (Slika 1). Pravilnikom o vinu (NN 159/04.) uvrštena je među preporučene kultivare u svim podregijama regije Kontinentalna Hrvatska, zbog toga što kontinentalna Hrvatska ima klimu sličnu Francuskoj iz koje sorta potječe.



Slika 1. Grozd sorte Graševina bijela

<http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=Datoteka:Grassevina.jpg>

Kvaliteta sorte Graševina varira, ovisno o kraju, pa je primjerice u istočnim vinogradarskim područjima Hrvatske (npr. Podunavlje) njen mošt u prosjeku za 2 i više % bogatiji šećerom i s nešto manjim ukupnim kiselinama, dok je u zapadnim vinogorjima taj odnos obrnut. Vina Graševine se stoga u sastavu čak i znatnije razlikuju, ovisno o podrijetlu, ali im je zajednička prepoznatljiva ugodna aroma, zelenkastožuta boja i svjež i skladan (harmoničan) okus. U Hrvatskoj je Graševina najviše šticeño vino. Kao što je u ZOV-u propisano, vina proizvedena iz grožđa ovog kultivara (ovisno o kakvoći prerađenog grožđa, urodu po ha, stupnju zrelosti grožđa, načinu preradbe i njege, korisnom učinku-randmanu, količini prirodnog alkohola i drugih sastojaka te organoleptičkim svojstvima) razvrstana su u kvalitetne kategorije (stolna bez oznake zemljopisnog podrijetla i stolna s k.z.p., kvalitetna s k.z.p. i vrhunska vina s k.z.p.). U svim kontinentalnim vinogradarskim podregijama proizvode se kvalitetne Graševine s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom. Najveći broj kvalitetnih vina Graševine proizvodi se u podregiji Slavonija, upola manji u podregijama Plešivica i

Zagorje-Međimurje, zatim redom u podregiji Prigorje-Bilogora, Moslavina i na kraju u Podunavlju. Najveći broj vrhunskih Graševina dolazi iz podregije Slavonija (vinogorja Kutjevo, Slavonski Brod, Đakovo, te Daruvar). Prije agresije na RH štice su kao vrhunske (tada označavane kao čuvane) Graševine iz podregije Podunavlje (vinogorje Erdut, Srijem-Ilok i Pajzoš te vinogorje Baranja), no zbog ratnih zbivanja one su se prestale proizvoditi. Neka su se od tih vina, nakon mirne reintegracije tog dijela RH, ponovno pojavila na tržištu. I za stolno vino s oznakom zaštićenog podrijetla najviše proizvođača je registrirano u podregiji Slavonija, a manje u ostalih pet podregija (Zagorje-Međimurje, Moslavina i Plešivica i Prigorje-Bilogora). U podregiji Podunavlje za sada se ne štiti ni jedno vino Graševine iz kategorije stolno vino s oznakom k.z.p. (Anonimus 2).

2.3. Vinska sorta Rajnski rizling bijeli

Rajnski rizling najpoznatija je i najcjenjenija bijela vinska sorta sjevernih vinorodnih područja (Slika 2). Vjeruje se da sorta dolazi iz doline Rajne u Njemačkoj, iako Austrijanci sortu nazivaju svojom, jer je 1301. godine u okolici Wachaua postojao vinograd zvan Ritzling. Vino Rajnski rizling je svjetložute do slamnatožute boje, profinjene arome i bukea, skladna puna i svježja okusa. U Hrvatskoj se (u skladu Pravilnika o Nacionalnoj listi priznatih kultivara) uzgoj ove sorte preporuča se u svim podregijama kontinentalne Hrvatske (Podunavlje, Slavonija, Moslavina, Prigorje-Bilogora, Plešivica, Pokuplje i Zagorje-Međimurje). S tih podregija na tržište stižu vrhunska i kvalitetna vina Rajnskog rizlinga s oznakom kontroliranog zemljopisnog podrijetla. Vrhunska vina Rajnskog rizlinga proizvode se u vinogorjima Kutjevo, Feričanci, Plešivica-Okić i Međimurje. Broj zaštićenih vina kvalitetne kategorije od istog kultivara višestruko je veći, dok je broj vina Rajnskog rizlinga iz kvalitetne kategorije stolno vino upola manji. Podregija Podunavlje je zbog poznatih ratnih stradanja bila duže vrijeme bez mogućnosti nastavka proizvodnje svih kategorija vina, pa tako i Rajnskog rizlinga, ali je ta proizvodnja nakon mirne reintegracije ponovo obnovljena (Anonimus 3).



Slika 2. Grozd sorte Rajnski rizling bijeli

<http://www.loznicijepovi.hr/images/proizvodi/rajnski%20rizling.jpg>

Boja ovog vina je zelenkasto-žuta, koja starenjem prelazi u zlatno-žutu. Karakteristike sorte su naglašena kiselost, punoća i elegantna aroma te plemeniti, diskretni miris. Vino od Rajnskog rizlinga je puno, zaokruženo, sa značajnim mirisom i aromom i ima dugi životni vijek. Starenjem njegova vrijednost u pravilu raste. Rajnski rizling je i dobra podloga plemenitoj plijesni, koja se razvija na već zrelim bobicama, što daje osnovu za odlična suha, ali i slatka vina s prirodnim neprovrelim šećerom (Anonimus 4).

2.4. Iločko vinogorje

Područje Iloka pripada srijemskom vinogorju, odnosno podregiji Podunavlje, regije Kontinentalna Hrvatska. Povijest vinogradarstva u Iloku izuzetno je duga s neprekinutom tradicijom od gotovo 1800 godina, i to od kako su Rimljani posadili prve čokote na srijemskim obroncima Fruške Gore koji se valovito spuštaju prema Dunavu. «Srijemsko vino je tako ugodno, da bi isto, ili slično njemu na cijeloj zemlji bilo teško naći», zabilježio je još u 15.st. knjižničar kralja Matije Korvina. A da je tako svjedoči prošlost i sadašnjost, jer od Ilira i Rimljana pa sve do danas, vinogradarstvo i vinarstvo su konstanta u životu stanovništva iločkog kraja. Izuzetni mikroklimatski uvjeti i reljef kojim dominiraju blagi obronci Fruške gore bili su podloga, a rad ljudi i njihovo znanje pokretači današnje bogate vinarske proizvodne baštine (Slika 3). Rimski car Probus (276.-282.) je prvi uočio i isticao prednosti

koje ovaj kraj ima za uzgoj vinove loze, te uveo nove, kvalitetnije sorte podrijetlom iz Grčke. Nakon oslobođenja od Turaka, kneževska obitelj Odescalchi obnovom dvorca nadograđuje, proširuje i modernizira podrumarstvo i vinogradarstvo te sam vinski podrum koji je prvotno građen u 15.st. Ovi napredni talijanski plemići u 17.st. donose u Ilok između ostalog i sorte Traminac te Zeleni silvanac i podižu nove nasade. Danas je iločki Traminac prema rječima struke ponajbolji u Hrvatskoj i šire, čemu u prilog govori činjenica da je poslužen na svečanosti krunidbe engleske kraljice Elizabete II., a i prije toga je bio uvršten među vina koja se poslužuju na engleskom kraljevskom dvoru. Pored Traminca tu su i Graševina, Rajnski rizling, Chardonnay, Pinot, Frankovka, Cabernet sauvignon, Merlot i brojne druge sorte. U drugoj polovici 20. stoljeća vinogradarstvo, voćarstvo i vinarstvo većim dijelom su bili predmet aktivnosti zadruga, kada se podižu prvi i najveći plantažni nasadi vinograda na prostorima bivše države. Nakon povratka Iločana iz progonstva 1998 g., obnovom, privatizacijom i društvenom reorganizacijom sve je veći broj manjih, privatnih vinogradara i vinara. Podignuto je oko 600 hektara novih nasada, te je sada pod vinogradima oko 1700 hektara zemlje koja trenutno broji oko 300 vinogradara i 17 vinarija (Anonimus 5).



Slika 3. Iločko vinogorje

<http://www.agroklub.com/upload/slike/ilo%C4%8Dko-vinogorje.jpg>

2.5. PROIZVODNJA BIJELIH VINA

Prilikom proizvodnje bijelih vina potrebna je iznimna pažljivost i stručnost, jer bijela vina su za razliku od crnih podložnija procesu oksidacije, tako da i najmanja nepoželjna promjena može nepovratno negativno utjecati na kvalitetu proizvedenog vina. Redoslijed tehnoloških postupaka u vinifikaciji bijelih vina razlikuje se od onih u proizvodnji crnih vina i naveden je u nastavku.

2.5.1. Muljanje i runjenje

Prerada grožđa započinje muljanjem. Obavlja se na strojevima runjača – muljača gdje se bobica odvaja od peteljke runjenjem u bubnju s rupicama, a zatim se na valjcima mulja (gnječi) bobica tako da se dobiva smjesa soka i krutih dijelova bobice (sjemenka i kožica) koja se naziva masulj. Muljanjem se grožđe gnječi kako bi se iz njega oslobodio groždani sok (mošt) i započelo izrazito važno međudjelovanje mošta i kožica. U ovoj fazi bitno je izbjeći ekstremno kidanje ili drobljenje bobica, jer to može rezultirati brzim oslobađanjem prekomjerno gorkih i oštih tanina iz kožica i sjemenki (Law, 2006.).

2.5.2. Cijeđenje i prešanje

Cijeđenje je faza u preradi grožđa koja nastupa nakon muljanja, gdje prirodnom gravitacijom dolazi do oslobađanja groždanog soka. Mošt koji smo dobili iz ocjeđivača naziva se samotok i daje vino znatno bolje kvalitete od vina dobivenog prešanjem. U tijeku prerade grožđa 40 – 70 % mošta dobijemo postupcima muljanja i cijeđenja, a preostali sok u masulju oslobađa se prešanjem. Postoje preše različite izvedbe; mehaničke, hidraulične ili pneumatske. U principu prešanje bi trebalo obaviti pod manjim pritiskom, kako bismo dobili veću kvalitetu mošta (Muštović, 1985.).

Mošt se najvećim dijelom sastoji od vode (75 do 80 %), šećera (glukoza i fruktoza) i kiselina (vinska, limunska, jabučna, jantarna itd.). Ostali sastojci prisutni u vinu su: dušične tvari, mineralne tvari, tvari boje, tvari arome i vitamini (Zoričić, 1996.).

2.5.3. Sumporenje i bistrenje mošta

Nakon prešanja mošt se sumpori kako bi se ubrzalo taloženje nečistoća (čestica zemlje, plijesni, sitnih ostataka lišća, sredstava za prskanje vinove loze itd.). Koriste se pomoćna enološka sredstva poput Sumpovina (Slika 4.a) i Pyrovina (Slika 4.b) u skladu sa uputama proizvođača, kako bi se osigurala potrebna koncentracija SO₂ u moštu.



a) Sumpovin



b) Pyrovin

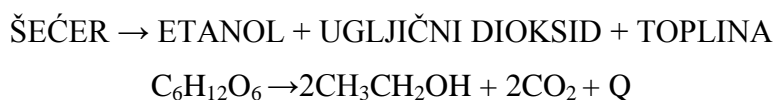
Slika 4. Sredstva za sumporenje

Primarna uloga sumpornog dioksida je da sprječava rad štetnih bakterija i kvasaca, ali usput pospješuje i proces taloženja, jer koagulira koloide koji se tada lakše i brže talože. Osim toga, sumporov dioksid djeluje antioksidacijski (jer ne dopušta prijenos kisika na pojedine sastojke masulja, mošta i vina posredstvom katalizatora enzima) te kao antiseptik jer na određeno vrijeme odgađa početak alkoholne fermentacije. Sumpor i njegovi spojevi su našli najširu primjenu u proizvodnji vina. Bez primjene sumpor (IV) oksida za vrenje mošta, masulja i u tijeku njege vina nemoguće je proizvesti zdravo vino i sačuvati vrhunsku kakvoću (Muštović, 1985.). Sumpor se u procesu vinifikacije najčešće koristi u obliku kalijevog metabisulfita (K₂S₂O₅). Ukoliko se nestručno primjenjuje i dodaje u prevelikoj količini može nepovoljno djelovati na okus i kvalitetu vina pa čak i na ljudsko zdravlje (u krvi veže kisik i vitamin B1). Da bi taloženje bilo efikasno, pored sumporenja potrebno je sniziti i temperaturu

mošta koja bi trebala iznositi od 6 – 10 °C, te na vrijeme provesti pretakanje kako bi se izbjegle neželjene promjene na moštu. Ovakav vid prirodnog taloženja uglavnom se primjenjuje u malim i srednjim vinarijama, dok se kod velikih proizvođača proces pročišćavanja vina može ubrzati strojevima kao što su centrifuge, filteri, flotatori ili kombinacija spontanog taloženja i strojeva (Muštović, 1985.).

2.5.4. Alkoholno vrenje

Prvi znanstveni podaci o alkoholnoj fermentaciji potječu od Louisa Pasteura prije oko 140 godina, kad je Pasteur prvi dokazao da su kvasci odgovorni za alkoholnu fermentaciju mošta u proizvodnji vina. Fermentacija i proizvodnja vina složeni je biokemijski proces u kojem sudjeluje veći broj mikrobnih vrsta, najviše kvasaca, mliječnih i octenih bakterija, a ponekad nekih vrsta bakterija iz rodova *Bacillus*, *Clostridium* i *Streptomyces*. Neke vrste imaju pozitivan, a neke negativan učinak na tijek fermentacije i zato je neophodno shvaćanje tog osnovnog procesa u vinarstvu (Grba, 2010.).



2.5.4.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* koristi energiju iz šećera prisutnih u moštu putem respiracije i fermentacije. Respiracijom kvasac razlaže šećer u prisutnosti kisika i to koristi prilikom svog razmnožavanja. Pri fermentaciji koja se odvija bez prisutnosti kisika kvasac za svoje potrebe koristi samo kisik iz šećera prilikom njegovog razlaganja. Faza disanja nastupa uglavnom prije i u početku alkoholne fermentacije, a značajna je za razmnožavanje kvasaca, dok faza fermentacije bez prisutnosti kisika nastupa kasnije tj. kad su se kvasci namnožili, a mošt i posuda u kojoj se odvija vrenje su prezasićeni ugljičnim dioksidom, uslijed čega su stvoreni anaerobni uvjeti za kvasce. U takvim uvjetima, kvasci da bi si osigurali uvjete za život moraju razlagati mnogo veće količine šećera. Reakcije respiracije i fermentacije se smjenjuju u ovisnosti o prisutnosti kisika tj. uvjeta pod kojima se odvija vinifikacija (Muštović, 1985.).

Uvaferm CM je komercijalni pripravak kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kojeg su selekcionirali Sveučilište Davis i Lallemand (Slika 5). Uvaferm CM-a karakteriziraju snažan početak vrenja, ravnomjerno završno vrenje, dobra tolerancija temperature, dobar kapacitet vrenja (6,8 g šećera/L daje 1 vol. % alkohola), osrednje pjenjenje te činjenica da ne stvara sumoprovodnik ni hlapljive kiseline. Fermaid E je kompleksna hrana za kvasce koja sadrži stanične stjenke kvasca (hranu potrebnu za razmnožavanje), kako bi se alkoholna fermentacija odvijala što efikasnije, posebno kada je dušik ispod optimalne razine. Korištenje adekvatne hrane za kvasac sprječava presporu fermentaciju i zastoje iste. Najčešći uzroci zastoja fermentacije su: temperaturni stres, slaba adaptacija populacije kvasca, visoki alkohol, nedostatak hrane i faktora neophodnih za preživljavanje kvasca (Anonimus 6).



Slika 5. Uvaferm CM

2.5.4.2. Burno vrenje

Burnim vrenjem nazivamo fazu alkoholne fermentacije koja traje 5 – 6 dana u vinifikatoru (Slika 6) te predstavlja razdoblje s najintenzivnijom pretvorbom šećera u etanol i CO₂ koji izlazeći izaziva turbulentna kretanja mošta. Kako bi se ostvarilo zadovoljavajuće burno vrenje potrebno je izabrati vrstu kvasca koja imaju visoku sposobnost previranja šećera iz grožđa u alkohol. Ukoliko koncentracija prirodno prisutnih mikroorganizama u moštu nije dovoljna za uspješnu provedbu vrenja, potrebno je inokulirati mošt selekcioniranim vinskim kvascima. U proizvodnji vina, piva i jakih alkoholnih pića danas se upotrebljavaju sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Njegovo svojstvo visoke fermentacijske aktivnosti i dobro

U ovoj fazi započinje odvijanje procesa malolaktične fermentacije. U procesu biološkog smanjenja kiselosti vina, mliječno – kisele bakterije metaboliziraju jabučnu kiselinu u mliječnu kiselinu i CO₂, čime se postiže deacidifikacija i mikrobiološka stabilizacija vina, a dolazi i do modifikacije okusa vina (jabučna kiselina oštrijeg okusa prelazi u mliječnu kiselinu blažeg okusa). Spontane bakterije dospjele iz grožđa (*Oenococcus oeni*, *Lactobacillus* i *Pediococcus*) prisutne u vinu nakon alkoholnog vrenja provode malolaktičnu fermentaciju. One neće u svim uvjetima provesti jabučno – mliječno vrenje, posebno ne u teškim uvjetima kada je pH vrijedost manja od 3,2, količina alkohola veća od 13 vol. %, ukupni SO₂ veći od 30 mg/L i temperatura vrenja 16 °C (Boulton, 1996.).

2.5.5. Bistrenje i filtracija vina

Prilikom bistrenja vinu dodajemo bistrilo u prikladnom obliku (organsko, mineralno ili sintetski proizvedeno), kako bi se fizikalno – kemijskim ili mehaničkim djelovanjem potpomognulo izdvajanje nestabilnih tvari vina. Od organskih sredstava široko je rasprostranjena uporaba želatine i tanina, ali i bjelanjka jajeta, albumina, kazeina itd. Od mineralnih bistrila najčešće se koristi bentonit, silicijev dioksid i soli silicijeve kiseline. Najveći broj bistrila djeluje na elektrostatičkom principu (električni naboj nekih tvari vina i električni naboj bistrila utječu na to hoće li doći do njihove koagulacije, flokulacije i precipitacije). Bistrilo mora biti drugog naboja (pozitivnog ili negativnog) u odnosu na čestice mutnoće koje su u vinu uglavnom pozitivnog naboja. Sredstvo za bistrenje treba biti takvo da njegov talog poslije koagulacije bude veće specifične težine od one koju ima vino koje želimo bistrirati. Uspjeh kod bistrenja vina bilo kojim sredstvom u velikoj je mjeri pod utjecajem kiselosti vina na način da se vina sa višim pH vrijednostima lakše bistre (Sokolić, 2004).

Filtracija je postupak odstranjivanja nečistoća iz vina zadržavanjem čestica na filtracijskom sloju kroz koji prolazi vino. Do pročišćavanja zadržavanjem dolazi kada su pore filtra manje od čestica, pa se one zadržavaju na površini i u unutrašnjosti filtra. Čestice koje se zadržavaju na filtru su veličine 50 - 200 μm i uglavnom su to dijelovi groždane pulpe, kvaščeve stanice i bitartarati kristali (Boulton, 1996.). Najčešće korišteno filtracijsko sredstvo korišteno za filtraciju vina je dijatomejska zemlja, koja se naplavljuje na filter u nekoliko slojeva. Takvi naplavni filteri se upotrebljavaju za filtraciju vina s većim замуćenjem. Osim filtera sa nasutim slojem u proizvodnji vina se koriste i filteri sa ulošcima i membranski filteri, pogotovo u srednjim i većim vinarijama.

2.5.6. Stabilizacija i dozrijevanje vina

Cilj stabilizacije vina je spriječiti mutnoću i taloženje pojedinih sastojaka vina koje mogu uzrokovati dušične tvari, bjelančevine, polifenoli, mikroflora, kiseline i soli kiselina. Najvažniji uzročnici fizikalne nestabilnosti vina su kalcijevi tartarati i kalijevi bitartarati. Kako bi se pospješilo njihovo taloženje, vino se izlaže niskim temperaturama od -4 do -6 °C tijekom 5 – 7 dana, ovisno o količini alkohola i ukupnog ekstrakta vina. Biološku nestabilnost vina mogu uzrokovati mikroorganizmi, kao što su kvasci i bakterije koje možemo preventivno ukloniti iz vina pravilnom primjenom sumporova (IV) oksida kod prerade grožđa i taloženja. (Zoričić, 1996.)

Termolabilne bjelančevine nestabilnost vina uzrokuju promjenom temperature. Njihovo uklanjanje iz vina provodi se bentonitom jer ima vrlo veliku sposobnost apsorpcije bjelančevina. Polifenoli u vinu postoje kao tvari boje antocijani i tanini, a podložni su oksidaciji, pa time dolazi do nestabilnosti vina koja se očituje u promjeni boje od svijetložute do smeđe. Tu pojavu zovemo posmeđivanje vina, a sprječavamo ju upotrebom sumporova (IV) oksida. (Sokolić, 2004.)

Vina su nakon vrenja mutna, bez arome, neskladna i uglavnom mirišu na kvasac. Prilikom dozrijevanja vina se bistre i dolazi do razvijanja tercijarne arome vina zbog međusobnog usklađivanja svih tvari koje su tijekom vrenja proizvedene u vinu. Vino u dobro zatvorenim tankovima od nerđajućeg čelika nije u kontaktu sa zrakom pa ono u njima vrlo sporo dozrijeva. Dozrijevanjem se vino poboljšava do određene granice kada ono postigne optimum kvalitete, nakon čega vino stari i kvaliteta mu se smanjuje.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali, aparature i metode

3.1.1. Materijali

- 0,1 M NaOH
- 0,01 M NaOH
- 25 % H_3PO_4
- 30 %-tni KI
- 26 %-tna H_2SO_4
- 1 %-tni škrob
- 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- 1 %-tna glukoza
- Standard za papirnu kromatografiju (po 3 g/L jabučne, vinske, mliječne i limunske kiseline)
- Octena kiselina
- n-butanol
- Fehling I (69,3 g/L $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)
- Fehling II (346 g/L K,Na-tartarata)
- Destilirana voda
- Indikatori: -fenolftalein

-bromfenol-plavi se otopi u etanolu uz dodatak 1 M NaOH

3.1.2. Aparature

- Laboratorijska aparatura za određivanje šećera
- Laboratorijska aparatura za određivanje alkohola
- Laboratorijska aparatura za određivanje sumpora
- Laboratorijska aparatura za određivanje hlapljivih kiselina
- Laboratorijska aparatura za određivanje ukupnih kiselina
- Laboratorijska aparatura za određivanje jabučne, mliječne, vinske i limunske kiseline
- Kit K-GCROL (Megazyme) za enzimsko određivanje glicerola

- ENO - VIN komplet (Jurana d.o.o.) za kemijsko određivanje ukupnih kiselina i slobodnog SO₂
- pH metar

3.1.3. Metode

3.1.3.1. Određivanje koncentracije šećera RS-metodom

(Određivanje reducirajućih supstanci)

Postupak:

Vino: 2 mL vina uz dodatak 23 mL destilirane vode se uzme za uzorak. Doda se 10 mL otopine A (Fehling 1) i 10 mL otopine (Fehling II). Kuha se točno 2 minute u tikvici s okruglim dnom od 250 mL uz povratno hladilo, zatim se ohladi pod vodom i doda 10 mL otopine C (30 %-tni KI) i 10 mL otopine D (26 %-tne H₂SO₄). Sve se dobro izmiješa i doda 2 mL škroba (1 %-tna otopina) te titrira s 0,1 M Na₂S₂O₃ do prelaza tamno smeđe boje u boju puti koja se treba zadržati 1 minutu.

GLUKOZA TEST (kontrola): uzme se 5 mL 1 %-tne glukoze i 20 mL destilirane vode (ukupan volumen 25 mL) i ponovi gore opisani postupak.

SLIJEPA PROBA: uzme se 25 mL destilirane vode i ponovi gore opisani postupak.

IZRAČUNAVANJE KONCENTRACIJE ŠEĆERA:

$$RS = 50 \cdot (a-b) / (a-c) \cdot d$$

RS = reducirajuće supstance (g/l)

a = mL 0,1 M Na₂S₂O₃ utrošeni za slijepu probu

b = mL 0,1 M Na₂S₂O₃ utrošeni za uzorak

c = mL 0,1 M Na₂S₂O₃ utrošeni za kontrolu (glukoza test)

d = mL uzorka uzeti za analizu

3.1.3.2. Određivanje ukupnih kiselina u vinu

a) Laboratorijsko određivanje ukupnih kiselina

Princip određivanja ukupnih kiselina:

Sve slobodne organske i anorganske kiseline i njihove kisele soli te druge kisele tvari neutraliziraju se otopinom natrijevog hidroksida, iz čijeg se utroška računa količina ukupnih kiselina. Ukupna kiselost izražava se kao vinska kiselina u g/L.

Kako se natrijev hidroksid troši na neutralizaciju svih spomenutih kiselina, količina ukupnih kiselina mora se izraziti u jednoj od kiselina koje se nalaze u moštu. Obzirom da je u moštu najvažnija vinska kiselina, u većini zemalja se preko nje izražava količina ukupnih kiselina. U nekim zemljama, npr. Francuskoj, ukupne kiseline izražavaju se kao sumporna.

Postupak:

Prije analize potrebno je baždariti pH metar. Nakon toga trbušastom pipetom uzeti 25 mL vina i staviti u čašu od 100 mL te odrediti pH.

Vino se zagrije do vrenja da se ukloni CO₂, a zatim se dobro ohladi i pristupi titraciji s 0,1 M NaOH uz pH – metar. NaOH se dodaje sve do pH 7.

$$y = V \cdot 0,3 \cdot f$$

γ = masena koncentracija ukupnih kiselina, izraženih kao vinska kiselina [g/L]

V = volumen otopine natrij hidroksida koncentracije 0,1 mol/L [mL]

f = faktor otopine natrij hidroksida koncentracije 0,1 mol/L (f = 1,0000)

1 mL NaOH koncentracije 0,1 mol/L odgovara 0,3 g/L vinske kiseline.

b) Određivanje ukupnih kiselina pomoću ENO - VIN kompleta (Slika 7.a)

Komplet se sastoji od epruvete, pipete i VINI 1 reagensa (1 %-tni NaOH). Uzorak vina ulijemo u epruvetu do označene 0 na skali. Reagens VINI 1 dodajemo u epruvetu uz pomoć kapaljke. Svaki put kad dodamo reagens u epruvetu palcem začepimo otvor epruvete, nagnemo je i dobro protresemo, kako bi se uzorak vina i reagens izmješali. U početku titracije

boja će biti žuto – zelena. Mjerenje je završeno kada se sadržaj epruvete oboji u plavu boju (Slika 7.b). Rezultat očitamo na skali (jedinica je g/L).



Slika 7.

a) ENO – VIN komplet

b) Rezultat mjerenja ukupnih kiselina

3.1.3.3. Određivanje hlapljivih kiselina po polumikro postupku

Princip određivanja hlapljivih kiselina:

Hlapljive kiseline određuju se tako da se destilacijom vina prevode u destilat, a zatim neutraliziraju otopinom natrijevog hidroksida, na temelju čijeg utroška se izračuna količina hlapljivih kiselina. Octena kiselina isparava teže od alkohola i vode, pa se destilacija provodi u struji vodene pare, čime se omogućava da cjelokupna količina octene kiseline pređe u destilat.

Postupak:

Za određivanje hlapljivih kiselina uzima se trbušastom pipetom 5 mL uzorka, stavi se u tikvicu kruškastog oblika i doda se 1 mL 25 % H_3PO_4 . Pri tome treba paziti da površina vode u Erlenmayer tikvici za proizvodnju pare bude uvijek iznad nivoa tekućine u kruškastoj

tikvici. Za vrenje vode u Erlenmayer tikvici treba ubaciti nekoliko komadića porozne gline ili staklene kuglice. Od probe treba predestilirati 60 mL, a dobiveni destilat zagrijati do početka vrenja i titrirati uz fenolftalein s 0,1 M natrij hidroksidom.

Izračunavanje:

$$y = V \cdot 1,2$$

γ = masena koncentracija hlapljivih kiselina, izraženih kao octena kiselina [g/L]

V = volumen otopine natrij hidroksida koncentracije 0,1 mol/L [mL]

1 mL NaOH koncentracije 0,1 mol/L odgovara 1,2 g/L octene kiseline.

3.1.3.4. Određivanje sumpora

(uobičajena metoda)

3.1.3.4.1. Određivanje slobodnog sumpora (20 minuta bez grijanja)

a) Laboratorijsko određivanje slobodnog SO₂

U tikvicu za kuhanje otpipetira se preko lijevka 10 mL vina koje analiziramo i 5 mL fosforne kiseline (w = 25 %). U manju, apsorpcionu tikvicu treba dodati već pripremljeni reagens tako da nivo bude do proširenog grla apsorpcijske tikvice. Obavezno otvoriti vodu koja struji kroz hladilo te vodu u vakuum sisaljci do pojave mjehurića u menzuri na jednoj strani i u tikvicama aparature. Nakon 20 minuta skinuti tikvicu s reagensom i titrirati s 0,01 M NaOH. Utrošene mL 0,01 M NaOH treba pomnožiti s 32 da bi se dobili mg slobodnog SO₂ u 1 litri vina.

b) Određivanje slobodnog SO₂ pomoću ENO - VIN kompleta (Slika 7.a)

Komplet se sastoji od epruvete, pipete i ENO - VIN 1 reagensa. Uzorak vina ulijemo u epruvetu do označene 0 na skali. Reagens ENO – VIN 1 dodajemo u epruvetu uz pomoć kapaljke. Svaki put kad dodamo reagens u epruvetu palcem začepimo otvor epruvete, nagnemo je i dobro protresemo, kako bi se uzorak vina i reagens izmješali. Mjerenje je

završeno kada se sadržaj epruvete oboji u ljubičasto - plavu boju koja je postojana bar 10 sekundi (Slika 7). Rezultat očitamo na skali (jedinica je mg/L).

3.1.3.4.2. Određivanje vezanog sumpornog dioksida

Vino koje je nakon određivanja slobodnog sumpora ostalo u tikvici za kuhanje ostaje i dalje u toj tikvici. Mijenja se reagens u maloj apsorpcionoj tikvici, a zatim se pod tikvicu za kuhanje stavi plamenik sa što manjim plamenom, pa se grije se uz lagano vrenje točno 10 minuta. Utrošene mL 0,01 M NaOH pomnožimo s 32 i dobijemo mg vezanog SO₂ u 1 litri vina.

3.1.3.4.3. Određivanje ukupnog sumpora

Ukupni SO₂ dobije se zbrajanjem vrijednosti slobodnog i vezanog SO₂.

Priprema indikatora u otopini H₂O₂

U 100 mL destilirane vode dodati 2 mL vodikovog peroksida i indikatora po potrebi do prljavo sivoplave boje (2-3 mL).

INDIKATOR: Smjesa otopine A i B (100 mL A + 15 mL B)

OTOPINA A: 0,03 g metilnog crvenila u 100 mL 96 % alkohola

OTOPINA B: 0,1 g metilnog plavila u 100 mL destilirane vode

Otopine A i B mogu se koristiti dulje vrijeme, a otopina peroksida mora svaki dan biti svježja. Ukoliko je indikator ljubičaste boje, reakcija je kisela i treba ga neutralizirati lužinom, a ako je zelene boje, reakcija je lužnata i treba ga neutralizirati kloridnom kiselinom. Ovo se provodi tako da se reagens promiješa staklenim štapićem uronjenim u kiselinu odnosno lužinu.

3.1.3.5. Određivanje alkohola kemijskom metodom

Postupak:

Vino se razrijedi u odnosu 1:10, tako da se u odmjernu tikvicu od 50 mL stavi 5 mL vina i dopuni destiliranom vodom do oznake. U postupak se uzima 5 mL ovako razrijeđenog vina koje se stavi u tikvicu za destilaciju od 50 mL, doda još 5-6 mL destilirane vode i sadržaj neutralizira s 0,1 M NaOH uz univerzalni indikator.

U Erlenmayerovu tikvicu od 100 mL, u koju će se hvatati destilat, stavi se točno 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 mL koncentrirane H₂SO₄. Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmayerovu tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija treba biti polagana i postepena i traje dok se sadržaj u tikvici za destilaciju ne smanji na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao).

Po završetku destilacije lula se ispere iznutra s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmayerovu tikvicu u koju se hvatao destilat. Sadržaj Erlenmayerove tikvice se promućka, začepi gumenim čepom i ostavi stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola.

Tijekom oksidacije alkohola utroši se jedan dio bikromata, dok drugi ostane u suvišku. Zatim se sadržaj kvantitativno prebaci u Erlenmayerovu tikvicu od 500 mL (isperemo tikvicu), doda se oko 200 mL destilirane vode radi razrijeđenja i 10 mL 20 %-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) i ostavi začepljeno 5 minuta. Tada dolazi do oksido-redukcijskog procesa preostalog kalijevog bikromata i KI: krom se iz šesterovalentnog reducira u trovalentni, a jod iz KI se oksidira u elementarni jod, zbog čega otopina dobije tamniju boju. Pritom se elementarni jod oslobađa u količini ekvivalentnoj kalijevom bikromatu. Titrira se 0,1 M otopinom natrijevog tiosulfata, pri čemu dolazi do oksidoredukcije između joda i natrijevog tiosulfata, u kojoj se jod reducira, a tiosulfat oksidira. Kad boja postane svijetlija doda se 5 mL 1%-tne otopine škroba i titracija nastavi do pojave tirkizno-zelene boje. Prijelaz boje je vrlo jasan i nastaje čim nestanu posljednje količine joda.

IZRAČUNAVANJE KOLIČINE ALKOHOLA:

$$\text{Alkohol (vol \%)} = \left(10 - \frac{a}{6,9}\right) \times 2$$

a = utrošak 0,1 M otopine Na₂S₂O₃

3.1.3.6. Određivanje alkohola denzitometrijski

Princip:

Količina alkohola u vinu odredi se pomoću piknometra, na osnovi specifične težine destilata. To je tzv. denzitometrijska metoda.

1. Određivanje specifične težine vina

Piknometar se ispere 2-3 puta s malo vina koje se ispituje. Pomoću specijalnog lijevka napuni se tako da nivo bude iznad oznake na grliću. Temperira se se u vodenoj kupelji pri 20 °C / 20 minuta, a zatim se višak vina iznad oznake odstrani pomoću filter papira. Piknometar se dobro obriše i važe da bi se dobila masa pinometra s vinom. Specifična težina vina odredi se na slijedeći način:

$$\gamma = (A - B) / C$$

A - masa piknometra s vinom (destilatom ili ostatkom od destilacije)

B - masa praznog piknometra

C - vodena vrijednost piknometra

Vrijednosti B i C potrebne za računanje određene su ranije za svaki pojedini piknometar.

2. Određivanje količine alkohola u vinu

Nakon određivanja specifične težine, vino se iz piknometra prenese u tikvicu za destilaciju od 250 mL. Važno je pritom isprati piknometar 2-3 puta s nekoliko mililitara hladne destilirane vode i to sve prelići u tikvicu za destilaciju. Prilikom destilacije, destilat se hvata u isti piknometar preko specijalnog lijevka, koji služi za punjenje piknometra. U piknometar se ulije malo destilirane vode tako da je vrh lijevka uronjen u nju. Destilacija traje dok se piknometar ne napuni destilatom do $\frac{3}{4}$ njegovog volumena. Tada se piknometar napuni destiliranom vodom do ispod oznake i stavi u vodenu kupelj na 20 °C / 20 minuta, a zatim nadopuni do oznake destiliranom vodom, obriše i važe. Specifična težina destilata izračunava se kao pod 1.

Specifična težina destilata je uvijek manja od specifične težine vina i to utoliko manja ukoliko ima više alkohola.

Na osnovi specifične težine destilata iz tablice (po Windischu) očita se količina alkohola u g/L vina, a iz ove vrijednosti volumni postoci etanola.

3.1.3.7. Enzimsko određivanje glicerola

Princip:

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 L-laktat dehidrogenaze (L-LDH), piruvat se reducira u L-laktat pomoću reduciranog nikotinamid-adenin dinucleotida (NADH) uz nastajanje NAD⁺.

Pri 340 nm mjeri se smanjenje apsorbancije zbog potrošnje NADH. Nastali NAD⁺ 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 uzorakakoje iznose 0.005 - 0.010, što odgovara koncentraciji glicerola od otprilike 0,086-0,171 mg/L u uzorku. Ukoliko je konverzija glicerola završena unutar 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. Vrijeme analize je 10-ak minuta, a količina kemikalija u kitu je dovoljna za 70 određivanja. Sadržaj kita, kao i upute za čuvanje navedeni su u tekstu koji slijedi.

Za određivanje glicerola koristimo komercijalno dostupni enzimski kit koji sadži reagentse potrebne za 70 određivanja (kit K-GCROL, Megazyme, Irska).

SADRŽAJ KITA ZA ODREĐIVANJE GLICEROLA:

- 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 ili kad se sumnja u inhibiciju zbog nekog sastojka uzorka.

PRIPREMA REAGENSA ZA ANALIZU GLICEROLA:

Bočica 1 i bočica 5 koriste se bez pripreme.

Priprema Bočice 2: Prije vađenja tableta iz bočice zagrijte bočicu na sobnu temperaturu (po mogućnosti u eksikatoru) radi sprečavanja kondenzaciju vlage na kontejneru. Ukoliko se otvori bočica dok je još hladna onda tablete apsorbiraju vlagu i smanjuje se stabilnost komponenata sadržanih u tabletama Procijenite koliko analiza treba provesti da bi prema tome otopili potrebu količinu reagensa. Da bi dobili volumen reagensa koji je potreban za 5 planiranih analiza otopite jednu tabletu iz bočice 2 u 1,1 mL (tj. 2 puta po 550 µL) Tris/HCl pufera (bočica 1) i otapajte 1-2 minute. Otapanje možete poboljšati nježnim mućkanjem ili miješanjem. Nakon otpanja će se s vremenom apsorbancija otopljenog NADH postepeno smanjivati, ali je ovako pripremljen reagens prikladan za upotrebu otprilike 4 dana ukoliko se čuva pri 4 °C, odnosno oko 4 tjedna ako se čuva pri pri -20 °C.

Priprema bočica 3 i 4: koriste se bez pripreme, osim što se prije prvog otvaranja moraju protresti da se ukloni ostatak enzima koji se mogu istaložiti na gumenom čepu. Nakon toga čuvajte bočice u uspravnom položaju. Vrtloženjem bočica homogenizirajte sadržaj prije upotrebe. Stabilno preko 2 godine pri 4 °C. Koncentracija glicerola određuje se iz ekstinkcijskog koeficijenta NADH.

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.

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.

Pipetirati u kivetu	Slijepa proba	Uzorak
Destilirana voda (temperature oko 25 °C)	2,1 mL (2100 µL)	2,00 mL (2000 µL)
uzorak	-	0,1 mL (100 µL)
Otopina 2 (NADH/ATP/PEP/Tris HCl)	0,2 mL (200 µL)	0,2 mL (200 µL)
Suspenzija 3 (PK/L-LDH)	0,02 mL (20 µL)	0,02 mL (20 µL)
Zatvoriti parafilmom i promiješati (nježno okretati kivetu). Nakon otprilike 4 minute očitati apsorbanciju (A₁) (kad završi reakcija koja se odvija kada se doda suspenzija 3) (PK/L-LDH).		
Dodati suspenziju 4 (GK):		
Suspenzija 4 (L- MDH)	0,02 mL (20 µL)	0,02 mL (20 µL)
Promiješati (zatvoriti parafilmom i nježno okretati kivetu). Očitati apsorbanciju (A₂) na kraju reakcije (oko 5 minuta). Ako se reakcija nije zaustavila nakon 5 minuta onda nastavite očitavati apsorbanciju u intervalima od 2 minute sve dok se apsorbancija ne ustali.		

RAČUNANJE KONCENTRACIJE GLICEROLA:

Odredite razliku apsorbancija (**A₁**-**A₂**) za slijepu probu i za uzorak. Potom razliku apsorbancija za slijepu probu oduzmite od razlike apsorbancija za uzorak tako da se dobije $\Delta A_{\text{glycerol}}$. Ova vrijednost bi u pravilu trebala iznositi najmanje 0,1. Koncentracija glicerola može se dalje izračunati prema jednadžbi:

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

gdje je:

c – koncentracija glicerola (g/L)

V – konačni volumen (mL) = 2,34 mL

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

ϵ – ekstinkcijski koeficijent NADH pri 340 nM = 6300 ($l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

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 razrijeđenja (za razrijeđenje 1:20 množi se faktorom 20).

3.1.3.8. Određivanje jabučne, vinske, mliječne i limunske kiseline papirnom kromatografijom

Postupak za određivanje jabučne, vinske, mliječne i limunske kiseline u vinu papirnom kromatografijom:

Pri rukovanju s kromatografskim papirom potrebno je raditi s kirurškim rukavicama. Za određivanje kiselina u uzorku vina koristi se kromatografski papir Whatman No 1, koji se izreže na odgovarajuće dimenzije (55 x 192 mm). Na kromatografskom papiru povuče se grafitnom olovkom startna linija po širini papira na visini od 2,5 cm od osnove. Na liniji se obilježe točke na udaljenosti 1,5 cm od ruba papira i na ta obilježena mjesta nanosi se po 50 μ L smjese standarda (koja sadrži po 3 g/L jabučne, vinske, mliječne i limunske kiseline) odnosno uzorka vina. Nanosi se kap po kap, a mrlje odmah suše toplim zrakom (fenom) tako da promjer mrlja bude maksimalno 3 mm. Nakon nanošenja i sušenja, radi razvijanje kromatograma papir se stavlja u kadu za kromatografiju u kojoj se nalazi ranije pripremljena smjesa otapala ovog sastava:

octena kiselina 10 mL

n - butanol 40 mL

destilirana voda 50 mL

Vrijeme razvijanja kromatograma je 2-3 sata, nakon čega treba označiti frontu otapala grafitnom olovkom prije nego se kromatogram počne sušiti. Zatim slijedi sušenje na zraku, uranjanje u otopinu indikatora i ponovo sušenje na zraku. Na temelju položaja mrlja na kromatogramu u odnosu na poznatu smjesu standarda, R_f vrijednosti se izračunavaju prema izrazu:

$$R_f = \text{udaljenost sredine mrlje od starta} / \text{udaljenost fronte otapala od starta}$$

R_f srednja za jabučnu kiselinu (standard) = 0,56

R_f srednja za vinsku kiselinu (standard) = 0,38

R_f srednja za mliječnu kiselinu (standard) = 0,69

R_f srednja za limunsku kiselinu (standard) = 0,45

Priprema smjese za razvijanje kromatograma: Smjesa octene kiseline, n-butanola i destilirane vode stavlja se u lijevak za odjeljivanje i promućka, a kao razvijač koristi se gornja bistra faza. Nakon razvijanja i sušenja kromatograma, on se uroni u otopinu indikatora (bromfenol – plavo).

Volumen otapala u kadi za kromatografiju: (10 + 40 + 50) x 2

Priprema otopine indikatora: 100 mg bromfenol-plavog otopi se u apsolutnom etanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL, te doda 2-3 kapi 1M NaOH za postizanje lagano lužnate otopine.

4. Rezultati

4.1. Dnevnik fermentacije i dozrijevanja vina

Tablica 1. Podaci o procesu

Masa grožđa	550 kg	300 kg grožđa sorte Graševina bijela i 250 kg grožđa sorte Rajnski rizling bijeli iz okolice Iloka (zona C1)
Volumen fermentora	250 L	Slika 6
Temperatura fermentacije	15-16 °C	Fermentor je od inoxa, zato je tijekom fermentacije bio zamotan u deku kako temperatura ne bi bila preniska za optimalan rad kvasca, a nakon završetka je deka uklonjena kako bi se kvasci i druge nečistoće brže istaložili
Volumen mošta	270 L	2014. godina je bila dosta kišna, zbog toga je manji volumen dobivenog mošta nego prijašnjih godina (ista masa grožđa)
Količina kvasca	100 g	Selekcionirani vinski kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Uvaferm CM)

Tablica 2. Dnevnik vinifikacije

25.09.2014.g	Berba, muljanje, prešanje, odstajalo u plastičnoj posudi i dodano V (sumpovina: 5 – 6 % otopina SO ₂) =0.4 L	Slika 4.a Inače se dodaje oko 100 mL sumpovina po hL vina, dodano više zbog slabije kvalitete grožđa
27.09.2014.g	Pretakanje u fermentor, dodavanje kvasca i hrane za kvasac	Slika 5
28.10.2014.g	Dodano 15 g kalijevog metabisulfita	Slika 4.b Još sumporimo zbog loše kvalitete grožđa i male količine ukupnih kiselina
01.11.2014.g	Prvi pretok	Slika 8.a; Slika 9.
20.11.2014.g	Analiza: 16 mg/L SO ₂ i 8.5 g/L ukupnih kiselina	Slika 7.a.
25.11.2014.g	Analiza: 18 mg/L SO ₂	Dodajemo 5 g kalijevog metabisulfita da postignemo koncentraciju iznad 20 mg/L
02.02.2015.g	Analiza: 20 mg/L SO ₂ i 8 g/L ukupnih kiselina, pH =2.7	Slika 7.b Dodajemo 10 g kalijevog metabisulfita
08.02.2015.g	Drugi pretok	Slika 8.b; Slika 9; Slika 10. Pretočeno vino se dodatno zaštićuje parafinskim uljem kako bi se spriječio kontakt vina sa zrakom



Slika 8. Bistrenje vina

a) poslije prvog pretoka



b) poslije drugog pretoka



Slika 9. Oprema za pretakanje vina



Slika 10. Parafinsko ulje

4.2. Kemijska analiza domaćeg bijelog vina

Prilikom kemijske analize vina rađena su tri paralelna mjerenja kako bi izmjereni podaci bili točniji. U Tablici 3. prikazana je srednja vrijednost kemijske analize domaćeg bijelog vina.

Tablica 3. Dobivene vrijednosti laboratorijske analize domaćeg bijelog vina

Mjereni parametri		Srednja vrijednost
RS metoda (g/L)		0,03617
pH		2,81
Ukupne kiseline (g/L)		7,89
Hlapljive kiseline (g/L)		0,54
Sumpor	Slobodni (mg/L)	17,6
	Vezani (mg/L)	30,4
	Ukupni (mg/L)	48
Alkohol	Kemijska metoda (%)	11,46
	Denzitometrijska metoda (%)	11,53
Glicerol (g/L)		8,0058

4.3. Papirna kromatografija

Na kromatogramu (Slika 11.) mogu se vidjeti pet fronti; 4 standarda i jedan uzorak domaćeg bijelog vina. Analizirano vino sadrži jabučnu (R_f 0,59), vinsku (R_f 0,40), mliječnu (R_f 0,77) i limunsku (R_f 0,50) kiselinu.



Linija otapala
Mliječna kiselina (R_f 0,77)
Jabučna kiselina (R_f 0,59)
Limunska kiselina (R_f 0,50)
Vinska kiselina (R_f 0,40)
Linija starta

Standard jabučne kiseline (R_f 0,56)	Standard vinske kiseline (R_f 0,38)	Uzorak	Standard limunske kiseline (R_f 0,45)	Standard mliječne kiseline (R_f 0,69)
---	--	--------	--	--

Slika 11. Izgled kromatograma

5. Rasprava

Prilikom proizvodnje domaćeg bijelog vina provedena je sustavna analiza određenih parametara bitnih za praćenje procesa fermentacije, kako bi se proces mogao nadzirati, usmjeravati u željenom smjeru, a nakon provedene analize i donijeti zaključak jesu li postupci za vrijeme vinifikacije rezultirali zadovoljavajućom kvalitetom konačnog proizvoda. Samostalna analiza provedena je na prostoru vinarije za vrijeme procesa vinifikacije te je u nekoliko navrata intervernirano dodatnim sumporenjem, jer je to bilo potrebno zbog loše kvalitete grožđa. Nakon proizvodnje vino je laboratorijski analizirano.

Prema Pravilniku o vinu Ministarstva poljoprivrede i šumarstva vinogradarsko područje Republike Hrvatske razvrstano je u vinogradarske zone proizvodnje. Iločko vinogorje pripada vinogradarskom području kontinentalne Hrvatske, podregiji Podunavlje, točnije zoni C1. Za svaku zonu su zasebno određene vrijednosti nekih kemijskih veličina koje vino s tog podneblja mora zadovoljiti da bi moglo biti plasirano na tržištu. Istaknula sam samo veličine koje su određivane u ovom završnom radu te koje se odnose na stolno vino u zoni C1.

Članak 39.

Najmanji sadržaj stvarnog alkohola u vinu u prometu mora biti (u volumnim %): 9,5.

Izmjerena koncentracija alkohola u volumnim postocima iznosi 11,46 % (uzmemo li obzir kemijsku metodu određivanja alkohola u uzorku domaćeg bijelog vina), što je više od propisanog minimuma. Koncentracija alkohola izmjerena denzitometrijskom metodom iznosi 11,53 %, što također odgovara zahtjevima Pravilnika. Iako je 2014. godina bila loša za vinogradare zbog brojnih kiša i male količine sladora u grožđu, sljubljuvanjem dviju sorti grožđa prije fermentacije ipak je postignut odgovarajući stupanj pretvorbe šećera glukoze u etanol i zadovoljavajuća koncentracija alkohola u domaćem bijelom vinu.

Članak 46.

Vino u prometu mora sadržavati:

1. ukupnih kiselina, izraženih kao vinska kiselina, najmanje 4,5 g/L i najviše 14 g/L;

Koncentracija ukupnih kiselina izmjerena u laboratoriju Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta iznosi 7,89 g/L, a na prostoru vinarije 8 g/L. Srednja vrijednost od 7,945 g/L odgovara postavljenim granicama koje su propisane Pravilnikom. Vino iz kontinentalne Hrvatske sadrži veću količinu kiselina i manje količine šećera nego vina sa Jadrana, gdje prevladava toplije i sunčanije vrijeme, a za vina su karakteristične manje količine kiselina i veće količine šećera.

U domaćem bijelom vinu je izmjereno 0,54 g/L hlapljivih kiselina. Koncentracija je vrlo niska što je dobar rezultat. Hlapljive kiseline se uglavnom odnose na octenu kiselinu, čiji reski okus i miris nisu poželjni u vinu u većim koncentracijama.

2. šećera (u gramima na litru; g/L):

- suho vino sadrži u pravilu najviše 4 g/L neprevrelog šećera. Suho vino s visokim prirodnim kiselinama može imati i veću količinu neprevrelog šećera, koja može biti jednaka sadržaju kiselina (izraženih kao vinska kiselina u g/L), povećan za 2 g/L, a najviše može imati 9 g/L.

Količina reducirajućih šećera u vinu je u skladu sa Pravilnikom. RS-metodom je izmjerena koncentracija šećera od 0,03617 g/L stoga zaključujem da se radi o suhom vinu sa izrazito niskom koncentracijom šećera, što i jest tipično za domaća bijela vina.

3. sadržaj sumporovog dioksida u vinima, osim kod pjenušavih, gaziranih i specijalnih vina u prometu ne smije biti veći od 160 mg/L, od toga slobodnog najviše 30 mg/L.

U uzorku je laboratorijski izmjereno 17,6 mg/L slobodnog sumpora i 30,4 mg/L vezanog sumpora. Na prostoru vinarije provedena je i dodatna analiza slobodnog SO₂ u vinu, kojom je izmjereno 20 mg/L slobodnog SO₂ u vinu. Srednja vrijednost koncentracije slobodnog SO₂ iznosi 18,8 mg/L. Zbrajanjem koncentracija slobodnog i vezanog sumpora dobivamo da je koncentracija ukupnog sumpora 49,2 mg/L.

4. sadržaj glicerola mora biti minimalno 5,0 g/l.

Koncentracija glicerola u uzorku iznosi 8,0058 g/L, što je u skladu sa Pravilnikom o vinu.

Svi navedeni rezultati pokazuju da su mjereni parametri u skladu sa zakonskom regulativom. Izmjerena koncentracija SO₂ je mnogo manja od maksimalne dozvoljene količine slobodnog i vezanog sumpora tj. u području je optimalnih vrijednosti. Prisutnost SO₂ u vinima je poželjna, ali prevelike količine djeluju negativno na okus i kakvoću vina te na ljudsko zdravlje. Koncentracije ukupnih i hlapljivih kiselina u skladu su s dozvoljenim koncentracijama u bijelim vinima. Papirnom kromatografijom dokazano je prisustvo jabučne, vinske, mliječne i limunske kiseline u analiziranom domaćem bijelom vinu, zbog čega zaključujem da je došlo do spontane malolaktičke fermentacije. Rezultati analize ukupnih kiselina i slobodnog SO₂ dobiveni kemijskom analizom potvrđuju rezultate dobivene titracijskom analizom u vinariji, zbog čega zaključujem da je korištenje gotovih kompleta za analize opravdano pa čak i poželjno. Mali vinari često nemaju sredstva i mogućnosti za nošenje uzoraka vina na analize, stoga korištenjem ovih jednostavnih i brzih metoda mogu nadzirati fermentaciju i po potrebi pravovremeno intervenirati.

Proveden proces vinifikacije bio je uspješan, jer je dobiven konačni proizvod koji zadovoljava kriterije propisane Pravilnikom o vinu.

6. Zaključci

Analizirano domaće bijelo vino je sadržavalo:

1. 11,46 vol % alkohola izmjereno kemijskom metodom i 11,53 vol % alkohola izmjereno denzitometrijskom metodom,
2. 7,945 g/L ukupnih kiselina,
3. 0,54 g/L hlapljivih kiselina,
4. 18,8 mg/L slobodnog SO₂, 30,4 mg/L vezanog SO₂, 49,2 mg/L ukupnog SO₂,
5. 0,03617 g/L reducirajućih šećera izmjereno RS-metodom,
6. 8,0058 g/L glicerola,
7. Svi izmjereni parametri odgovaraju onima koji karakteriziraju bijelo stolno vino iz vinogradarske zone C1, čime je dokazano da proizvedeno bijelo domaće vino odgovara zahtjevima Pravilnika o vinu iz 1996. godine te da je proveden postupak vinifikacije bio uspješan.

7. Literatura

- Anonymus 1 <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=64729>
Pristupljeno 14.8.2015.
- Anonymus 2 <http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=gra%C5%A1evina>
Pristupljeno 16.8.2015.
- Anonymus 3 http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=rizling_rajnski
Pristupljeno 18.8.2015.
- Anonymus 4 <http://www.vino-kerman.com/vinograd-i-vino/>
Pristupljeno 19.8.2015.
- Anonymus 5 <http://www.hucrowinestories.eu/hr/grad-ilok>
Pristupljeno 21.8.2015
- Anonymus 6 <http://www.uvaferm.com/>
Pristupljeno 21.8.2015
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1996.): Principles and practices of winemaking, Chapman and Hall, International Thomson Publishing, New York
- Grba, S. (2010.), Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Plejada, Zagreb
- Law, J. (2006.): Od vinograda do vina, Veble commerce, Zagreb
- Muštović, S. (1985.), Vinogradarstvo s enokemijom i mikrobiologijom, Privredni pregled, Beograd
- PRAVILNIK O VINU (1996.), na temelju članka 56. stavka 1. Zakona o vinu ("Narodne novine", br. 34/95)
- Radovanović, V. (1986), Tehnologija vina, 2. Izdanje, IRO „Građevinska knjiga“, Beograd
- Sokolić, I. (2004.): VINO, sunca i čovjeka rod, vlast. nakl. Ivan Sokolić, Novi Vinodolski
- Zoričić, M. (1996.), Podrumarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb