

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij**  
**Biotehnologija**

**Tomislav Vološen**

7020/BT

**Određivanje tvari arome rose vina proizvedenog  
kupažiranjem sorti Pinot sivi i Izabela**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Biotehnološki aspekti proizvodnje vina**

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

**Zagreb, 2017.**

# 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 slada i piva**  
**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

## **Određivanje tvari arome rose vina proizvedenog kupažiranjem sorti Pinot sivi i Izabela**

**Tomislav Vološen, 0058206013**

**Sažetak:** Cilj završnog rada bio je odrediti tvari arome domaćeg rose vina proizvedenog kupažiranjem sorti Pinot sivi i Izabela, berba 2016. Detektirana je veća koncentracija viših alkohola i manja koncentracija estera, što ukazuje da se fermentacija odvijala pri višim temperaturama. Osnovna analiza vina obuhvaćala je određivanje etanola kemijskom i denzimetrijskom metodom, određivanje koncentracije neprevrelog šećera, slobodnog, vezanog i ukupnog sumpora te hlapljive i ukupne kiseline. Enzimskim kitom je određena koncentracija glicerola. Papirnom kromatografijom utvrđena je prisutnost vinske i jabučne kiseline, dok mliječna, limunska i octena nisu detektirane. Vino je podvrgnuto HPLC i GC analizi pri čemu su određene hlapljive komponente i etanol. Svi analizirani parametri koji podliježu zakonskoj regulativi, nalaze se unutar dopuštenih granica.

**Ključne riječi:** aroma vina, enzimski kit, GC metoda, HPLC metoda, rose vino

**Rad sadrži:** 35 stranica, 6 slika, 6 tablica, 12 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad 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

**Pomoć pri izradi:** Dr. sc. Antonija Trontel

**Datum obrane:** 07.07.2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology**  
**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **Aroma determination of rose wine produced after blending of Pinot gris and Izabela**

**Tomislav Vološen, 0058206013**

**Abstract:** The goal of final work was to determine the aroma of domestic rose wine produced after blending of Pinot gris and Isobela, year 2016. The higher concentration of higher alcohols and lower concentration of esters were detected, which indicate that the fermentation took place at higher temperatures. Basic analysis included determination of ethanol by chemical and densimetric method, determination of residual sugars, free, bound and total sulfur dioxide as well as total and volatile acids. Glycerol concentration was determined by the enzyme kit. The presence of wine and malic acid was specified by paper chromatography, while lactic, citric and acetic acids were not detected. Wine was also subjected to HPLC and GC analyses, due to determination of volatile components and ethanol. All analyzed parameters are within the permitted limits.

**Keyword:** enzyme kit, GC method, HPLC method, rose wine, wine aroma

**Thesis contains:** 35 pages, 6 figures, 6 tables, 12 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic version is deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb**

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

**Assistance:** Antonija Trontel, PhD.

**Defence date:** 07.07.2017.

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | 2  |
| <b>2.1. Osnovne karakteristike sorti vinove loze Pinot sivi i Izabela</b> ..... | 2  |
| <b>2.1.1. Pinot sivi</b> .....  | 2  |
| 2.1.1.1 . Botanička obilježja sorte Pinot sivi .....                            | 3  |
| 2.1.1.2. Karakteristike vina sorte Pinot sivi .....                             | 4  |
| <b>2.1.2. Izabela</b> .....   | 4  |
| 2.1.2.1. Botanička obilježja sorte Izabela .....                                | 5  |
| 2.1.2.2. Karakteristike vina sorte Izabela .....                                | 5  |
| <b>2.2. Kupažiranje vina</b> .....  | 6  |
| <b>2.3. Tvari arome vina</b> .....  | 7  |
| <b>2.3.1. Podjela tvari arome prema podrijetlu</b> .....                        | 7  |
| <b>2.3.2. Podjela tvari arome prema kemijskoj strukturi</b> .....               | 9  |
| 2.3.2.1. Viši alkoholi .....  | 9  |
| 2.3.2.2. Kiseline .....   | 10 |
| 2.3.2.3. Aldehidi .....   | 11 |
| 2.3.2.4. Ketoni .....   | 12 |
| 2.3.2.5. Acetali .....  | 12 |
| 2.3.2.6. Esteri .....   | 12 |
| 2.3.2.7. Laktoni.....   | 13 |
| 2.3.2.8. Terpeni.....   | 13 |
| 2.3.2.9. Spojevi s dušikom i sa sumporom .....                                  | 14 |
| 2.3.2.10. Fenoli i njihovi derivati .....                                       | 14 |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | 15 |
| <b>3.1. Metode</b> .....  | 15 |
| 3.1.1. Određivanje koncentracije šećera RS-metodom .....                        | 15 |
| 3.1.2. Određivanje alkohola (etanola) kemijskom metodom .....                   | 15 |
| 3.1.3. Određivanje alkohola denzimetrijski .....                                | 17 |
| 3.1.4. Određivanje sumporovog dioksida .....                                    | 18 |
| 3.1.5. Određivanje ukupnih kiselina u vinu .....                                | 18 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1.6. Određivanje hlapljivih kiselina po polumikro postupku .....                                      | 19 |
| 3.1.7. Određivanje jabučne, mliječne, limunske, octene i vinske kiseline papirnom kromatografijom ..... | 20 |
| 3.1.8. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....                                     | 21 |
| 3.1.9. Plinska kromatografija (GC) .....  | 22 |
| 3.1.9.1. Analiza hlapljivih komponenti u vinu pomoću plinske kromatografije ...                         | 23 |
| 3.1.9.2. Analiza etanola u vinu pomoću plinske kromatografije .....                                     | 24 |
| 3.1.10. Određivanje glicerola pomoću enzimskog kita .....   | 24 |
| <b>3.2. Materijali</b> .....  | 27 |
| <b>3.3. Aparature</b> .....   | 28 |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | 29 |
| <b>4.1. Rezultati</b> .....   | 29 |
| 4.1.1. Rezultati analize parametara vina kemijskom metodom .....  | 29 |
| 4.1.2. Rezultati papirne kromatografije .....   | 29 |
| 4.1.3. Rezultati analize dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.                    | 29 |
| 4.1.4. Određivanje glicerola pomoću enzimskog kita.....   | 30 |
| 4.1.5. Plinska kromatografija .....   | 30 |
| 4.1.5.1. Analiza hlapljivih spojeva prisutnih u vinu pomoću plinske kromatografije..                    | 30 |
| 4.1.5.2. Analiza etanola prisutnog u vinu pomoću plinske kromatografije.....                            | 31 |
| <b>4.2. Rasprava</b> .....  | 32 |
| <b>5. ZAKLJUČAK</b> .....   | 35 |
| <b>6. LITERATURA</b> .....  | 36 |

# 1. UVOD

„Vino je poljoprivredni prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta od svježeg i za preradu u vino pogodnog grožđa. Sorte vinove loze za proizvodnju vina moraju pripadati vrsti *Vitis vinifera* ili križancima *Vitis vinifera* s drugim vrstama roda *Vitis*“ (Zakon o vinu, 2003). Na kvalitetu vina, osim grožđa, utječu prikladna oprema i iskustvo vinara. Iskusni vinari se poigravaju sa parametrima runjenja, muljanja, fermentacije, pa i sa procesom odležavanja vina u bačvama kako bi dobili vino vrhunske kvalitete te očuvali njegov bogati aromatski sastav.

Do sada je određeno oko 3000 različitih spojeva u grožđu, moštu i vinu, oko 2000 otpada na spojeve arome, koji u težinskom omjeru zauzimaju tek oko 1‰ u vinu (odnosno oko 0,8 - 1,2 g/L), ali i bez obzira na tako malen sadržaj, utjecaj na senzornu ocjenu je ogroman. Prisutni spojevi porijeklom su iz grožđa, ali nastaju i tijekom alkoholne fermentacije ili tijekom dozrijevanja i starenja vina (Orlić i Jeromel, 2010). Različite sorte vinove loze sadrže kvalitativno i naročito kvantitativno različite aromatske spojeve, a na taj sastav utječu mnogobrojni čimbenici poput mikroklimatskih uvjeta kraja gdje se loza uzgaja, sastava tla, zdravstvenog stanja loze i grožđa, stupnja zrelosti. Tu su još i tehnološki postupci poput berbe, transporta i prerade (postupci maceracije, ekstrakcije, hidrolize, taloženja, bitstrenja i uporaba pektolitički enzimi), pa uvjeti u kojima se obavlja alkoholno vrenje, kvasci (rod, vrsta i soj kvasaca odgovornih za alkoholne vrenje), temperature pod kojima su provedene pojedine radnje (npr. berba, preradba, vrenje itd.), pH i rH mošta i vina, te kako se provodi i koliko dugo traje proces starenja. Spojevi odgovorni za miris, okus i aromu vina su alkoholi, kiseline, aldehidi, ketoni, terpeni, pirazini i merkaptani.

U ovom radu su se koristile plinska kromatografija (eng. gas chromatography, GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. high-performance liquid chromatography, HPLC) kojima su u analiziranom vinu određene hlapljive komponente te etanol, glicerol i kiseline.

Laboratorijske kemijske analize su obuhvaćale određivanje: kiselosti vina (što podrazumijeva određivanje ukupnih i hlapljivih kiselina), kvalitativne koncentracije jabučne, mliječne, vinske, limunske i octene kiseline papirnom kromatografijom, vezanog i slobodnog sumpora, koncentracije šećera RS-metodom i alkohola kemijskom i denzimterijskom metodom. Enzimskim kitom se odredila koncentracija glicerola u ispitivanom vinu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Osnovne karakteristike sorti vinove loze Pinot sivi i

#### Izabela

Osnovnim karakteristikama vrste i sorte loza, njihovim biološkim karakteristikama, ekološkim uvjetima uzgoja, mjerama i načinima uređenja i kontrole rasta, razvitka i plodnosti bavi se vinogradarstvo. Vinogradarstvo se dijeli na opće vinogradarstvo i ampelografiju. Biologijom i ekologijom loze, razmnožavanjem, tehnikom podizanja i uzdržavanja vinograda, tehnologijom proizvodnje i berbe grožđa bavi se opće vinogradarstvo. Ampelografija se bavi znanstvenim istraživanjem nazivlja, podrijetla i rasprostranjenosti, biološkim i gospodarskim značajkama vrsta i sorata loze te njihovom klasifikacijom i opisom.

#### 2.1.1. Pinot sivi

Pinot sivi (poznat još kao Pinot gris, Burgunder, Grigio) se ubraja u visokokvalitetne bijele sorte. Bobica je blijedo plave boje do ružičaste (Slika 1). Ljuska bobice je tanka i podložna botritisu što omogućava proizvodnju botritiziranih vina.



**Slika 1.** Pinot sivi (Mirošević i Turković, 2003)

U područjima sjeverne klime raste na plodnom dubokom tlu u nizini, a u južnim područjima su potrebna manje plodna tla na uzvisinama. Pinot sivi potječe iz Burgundije u Francuskoj, a nastao je somatskom mutacijom pupa sorte Pinot crni. Sorta se prvo prenijela iz Francuske u Njemačku, a zatim se rasprostranila i u druge države koje imaju umjerenu klimu. Danas se uzgaja i u Austriji, Sloveniji i Mađarskoj, ali i u Kaliforniji, Australiji i Novom Zelandu (Simon, 2004).

Prema Pravilniku o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze (2012) Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva RH, pinot sivi je vino iz vinogorja Požega-Pleternica koji je dio podregije Slavonija svrstane u regiju istočna kontinentalna Hrvatska i zonu C1. Sortu karakterizira mala rodnost, sklonost da u kišnoj jeseni trune te otpornost prema smrzavicama. Rodnost je puno bolja ako se koriste klonske selekcije (Mirošević i Turković, 2003).

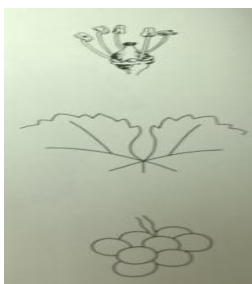
#### **2.1.1.1. Botanička obilježja sorte Pinot sivi**

Sorta je homogena s karakterističnim botaničkim obilježjima (Slika 2). Razlike između biotipova odnose se na veličinu grozda, intenzitet mirisa i arome (Mirošević i Turković, 2003).

Mladi izboj: vršak je raširen, dlakav, bjelkasto zelen; vršni listići su otvoreni, dlakavi, srebrno zeleni.

List: mali, srcolik, trodijelan, plojka naborana, valovita, tamnozelene boje.

Grozđ: malen, cilindričan, zbijen s jednim krilcem; kompaktni; bobica malena, jajolika, često deformirana zbog zbijenosti grozda, odvaja se dosta lako od peteljčice; kožica sivo-ružičasta, tanka, obavijena obilnim maškom, meso sočno, jednostavnog neutralnog okusa.



**Slika 2.** Botanička obilježja (Mirošević i Turković, 2003)

Agrobiološka svojstva: Trs je srednje bujan, kretanje vegetacije je rano; mladica vitka sa srednje dugim internodijima. Prikladan je za različita tla, ali ne podnosi previše vlažna ni vapnenasta tla. Odgovara mu uzgajanje u umjerenj klimi na položajima s dobrom ekspozicijom.

Rodnost: Sorta je dosta rodna, s gustom sadnjom mogu se postići dosta veliki prinosi grožđa.

Berba: Dozrijeva ranije, berba se može obaviti strojno, ali grožđe treba brzo preraditi.

Otpornost na bolesti: Pinot sivi vrlo je osjetljiv prema botritisu, a donekle i klorozu, stoga zahtjeva neke posebne zahvate rezidbe naročito u uvjetima vlažne klime.



Organoleptička ocjena vina: Ako se brzo preradi bez učešća koma daje vino slamnato žute boje, istaknutog mirisa i arome, mekano, ugodno kiselo, dovoljnog sadržaja alkohola, sa starenjem vino razvije najfiniji buke.

### **2.1.1.2. Karakteristike vina sorte Pinot sivi**

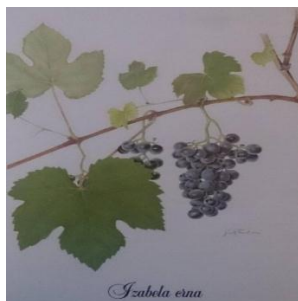
Velik utjecaj na vino ima usklađenost položaja, tla i klime na kojem se sorta uzgaja. Pinot sivi kao sorta bogata je šećerima i daje vino vrhunske kvalitete. Izražen je poseban sortni miris i okus. Karakteristične je sivozelenkastožute do slamnate boje, finog i mekanog okusa, nježne i izražene arome, skladnog mirisa i specifičnog bukea.

Sadrži 11,5-12,5 vol. % alkohola, 5,5-7,5 g/L ukupnih kiselina te 19-25 g/L ekstrakta. Poslužuje se na temperaturi 10-12 °C uz sva predjela i pikantna jela.

U Elzasu u Francuskoj Pinot gris daje bogata, mirisna bijela vina s crtom oraha, dima, začina, a katkad i meda pri čemu se radi o suhim, slatkim ili botritisom napadnutim i izrazito slatkim vinima. Talijanski Pinot grigio većinom je svjež, prilično lagan i neutralan (Simon, 2004).

### **2.1.2. Izabela**

Izabela crna (poznata još i kao Isabelle, Fragola i Čimavica) ubraja se u kvalitetne crne sorte. Sorta je američkog podrijetla i nastala je prirodnim križanjem američke vrste *Vitis labrusca* i *Vitis vinifera*. Danas je rasprostranjena svugdje po svijetu, ali osobito u europskim zemljama gdje se rasprostranila nakon propasti vinograda zbog filoksera.



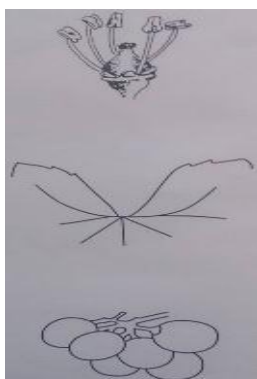
**Slika 3.** Izabela crna (Mirošević i Turković, 2003)

Zakonom je zabranjena, no sadi se u području kontinentalne Hrvatske. Izabela se prema Pravilniku o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze (2012) sadi većinom u

zonama B i C1 koje obuhvaćaju podregije Moslavina, Prigorje-Bilogora, Pleševica, Pokuplje, Zagorje-Međimurje, Podunavlje i Slavonija. Nije izbirljiva što se tiče tla, raste u svim klimama. Otporna je na smrzavice, srednje je otporna na peronosporu i druge bolesti.

#### **2.1.2.1. Botanička obilježja sorte Izabele**

Sorta je homogena s karakterističnim botaničkim obilježjima (Slika 4).



**Slika 4.** Botanička obilježja (Mirošević i Turković, 2003)

Mladi izboj: vršci mladica su uspravni, vunasti, sivo-zelenkasti sa rubnim crvenilom na mladim listovima. Mladica je uspravnog rasta, rebrasta, tamnozeleno s crvenkastim obojenjem na osunčanoj strani. Cvijet je dvospolan.

List: cijeli ili trodijelan sa slabo naglašenim gornjim sinusima, a sinus peteljke je u obliku slova „V“, poluzatvoren. Lice je tamnozeleno, sjajno, mjehurasto, s naglašenim svijetlozelenim nervima. Naličje lista je zeleno sivkasto sa smeđim nijansama, baršunasto, s rebrastom nervaturom.

Groz: Malen do srednje veličine, stožast i rastresit, zeleno-crvenkaste peteljkovine. Na koljencu se lako otkida, a pri većoj trešnji trsa bobice lako otpadaju. Rast je osrednji.

Bobica: zrela bobica je srednje velika do velika, tamnoplave, čvrste kožice s obilnom peteljkom.

#### **2.1.2.2. Karakteristike vina sorte Izabela**

U svim zemljama Europske unije i SAD-a komercijalna proizvodnja vina iz grožđa sorte Izabela je zabranjena i ne smije se stavljati u promet, ali se može proizvoditi za vlastite

potrebe. Zabrana proizvodnje vina iz grožđa Izabela postoji zbog velike koncentracije metanola koja se nalazi u vinu. Pošto postoje brojne tehnike kojima se koncentracija metanola može znatno smanjiti, ipak se danas često nalazi u vinogradima. U prilog sadnji Izabele idu osebujna aroma i miris koje ova sorta posjeduje, također su izrazito veliki prinosi i laganog je uzgoja.

## **2.2. Kupažiranje vina**

Kupažiranje ili sljublivanje vina različitih vinskih sorti je dugo utemeljena tradicija u mnogim vinarskim regijama, a predstavlja proces u kojem se dva ili više vina miješaju u određenom omjeru i time se dobivaju vina s izmjenjenim sastavom i organoleptičkim osobinama. Kupažirati se mogu različite sorte, različite berbe i različiti položaji iste sorte kao i različite cisterne ili bačve iste berbe. Svaka država ima svoje propise o kupažiranju i označavanju vina. Prema Zakonu o vinu RH vina mogu nositi oznaku sorte, ako su proizvedena od najmanje 85 % grožđa te sorte, a oznaku godine berbe mogu nositi vina koja sadrže najmanje 85 % vina iz godine berbe oznake koju nose. Zabranjeno je miješati stolno, kvalitetno ili vrhunsko vino sa specijalnim vinima; masulj, mošt ili vino plemenite vinove loze s proizvodima direktno rodnih hibrida; zdrava vina s bolesnim vinima i vinima s manom; bijela vina s crnim vinima radi dobivanja rose vina. Kroz godine uvjeti sazrijevanja vina nisu isti tako da se kakvoća vina mijenja, stoga se kupažiranjem ostvaruje standardizacija i uniformnost koja je izuzetno važna pri velikoj proizvodnji, ali i zbog zahtjeva tržišta.

Kupažiranje vina se može provesti u bilo kojoj fazi proizvodnje vina – od miješanja mošta prije fermentacije, (ne samo iz navedenih razloga, već i zbog pokretanja fermentacije), do bilo koje sljedeće faze proizvodnje. Vinar sam odlučuje koji način kupažiranja će odabrati. Kupažiranjem vina se najčešće poboljšava svojstvo koje je kod jednog vina prenaplašeno, a drugom vinu nedostaje, a to se ostvaruje standardizacijom, balansiranjem, ostvarivanjem kompleksnosti, dobivanjem određenog stila i optimiranjem vina. Međutim, mnogo je svojstava koja određuju kvalitetu vinu i sva se moraju uzeti u obzir. Prije nego se pristupi kupažiranju vina, mora se utvrditi sadržaj onih sastojaka koje se u njemu želi popraviti (npr. alkohol, ukupna kiselost, ekstrakt, boja, miris), nakon čega treba utvrditi najpovoljniji odnos pojedinog vina za kupažu (putem kušanja ili računskim putem). Metoda kušanja se više koristi u slučajevima kada se u vinima želi obaviti popravak boje okusa i mirisa, dok se za popravak sadržaja pojedinih sastojaka vina (alkohola, ukupne

kiselosti i dr.) služi računskim putem s time što i u ovim slučajevima po obavljenom kupažiranju treba obaviti i kušanje vina. Jedan od načina za određivanje alkohola, ostatka šećera ili ukupne kiseline u kupaži od dva ili više vina je uz pomoć Pearsonovog kvadrata (tzv. križni račun).

Prilikom kupažiranja prvo se naprave različiti omjeri u malim volumenima. Napravljeni uzorci se podvrgavaju senzorskoj analizi i bira se uzorak s najboljom senzorskom ocjenom. Potom se provodi kupažiranje vina u velikom volumenu. Tri tjedna se smatra minimalan period u kojem se vino ostavlja da odstoji radi uspostavljanja ravnoteže između pojedinih sastojaka kupažiranog vina. Nakon kupažiranja je potrebno provesti i test stabilizacije kupažiranog vina kako ne bi došlo do pojave nepoželjnih reakcija.

Jedan od ključnih parametara prilikom kupažiranja je boja vina. Boja je izrazito bitna kad se kupažiranjem proizvodi rose vino. Uvijek se nastoji dobiti boja rose vina koja odgovara standardiziranim bojama rose vina uzimajući u obzir zahtjeve tržišta. Također kupažiranjem se može znatno poboljšati miris i okus vina s ciljem povećanja profinjenosti i kompleksnosti arome kupažiranog vina.

## **2.3. Tvari arome vina**

Aroma vino čini prepoznatljivim te mu daje sortni karakter i mjerilo je kakvoće. Aroma proizlazi iz grožđa, direktno ili indirektno preko enzimskih, kemijskih i toplinskih procesa uzrokovanih kvašćevim metabolizmom ili su spojevi arome nastali složenim redoks-reakcijama koje se zbivaju u bačvi ili boci (Thorngate, 1997). Na aromu utječe klima, zemljište, sorta grožđa, zrelost grožđa, uvjeti fermentacije (pH, temperatura, soj kvasaca), tehnološki postupci proizvodnje (enološke metode, tvari kojima se tretira vino), starenje i drugo (Vas i sur., 1998).

### **2.3.1. Podjela tvari arome prema podrijetlu**

Tvari arome nastaju tijekom cijele proizvodnje vina. Na svaku komponentu arome utječu različiti kemijski i biokemijski procesi, počevši od grožđa kao sirovine preko tehnoloških postupaka kojima se dobije mošt do alkoholne fermentacije i starenja vina u bocama ili bačvama. Spojevi arome nastaju u različitom vremenu pa se mogu podijeliti s obzirom na period njezina nastanka: primarna aroma, sekundarna aroma, bouquet fermentacije i bouquet starenja.

Primarna aroma nastaje već u vinogradu. Ovisi o tlu, klimi, sistemu uzgoja i navodnjavanja, zrelosti grožđa prilikom berbe itd. Većina spojeva iz primarne arome služe kao prekursori iz kojih u sljedećim fazama arome nastaju tvari arome koji su prisutni u krajnjem proizvodu. Najvažnija grupa spojeva koja karakterizira primarnu aromu spojeva su terpeni. Analiza terpena se može upotrijebiti za karakterizaciju sorti. Do sada je dokazano 50 monoterpenskih komponenti (Jackson, 1994).

Posljedice manipulacije grožđa nakon berbe do početka fermentacije određuje sastav sekundarne arome vina. Svi tehnološki postupci kojima se podvrgava grožđe utječu na ekstrakciju tvari arome i nastajanje novih aroma. Spojevi koji nastaju većinom su proizvod djelovanja enzima. Enzimi koji sudjeluju su hidrolaze, oksigenaze i hidrosireduktaze koje mogu pozitivno i negativno utjecati na aromu, ovisno o uvjetima u kojima se odvijaju. Bistrenje mošta također znatno utječe na sekundarnu aromu vina. Izbistreni i deaerirani mošt daje vino koje je siromašno na hlapljivim spojevima, pogotovo etil esterima.

Alkoholnom fermentacijom nastaju spojevi koji najviše pridonose aromi vina. Najvažnije komponente koje nastaju su viši alkoholi. Kvasac je odgovoran za alkoholnu fermentaciju mošta i zbog toga je on ključan prilikom stvaranja arome konačnog proizvoda. Osim viših alkohola nastaju još i masne kiseline i hlapljivi organski spojevi sa sumporom, fenoli te aldehidi i ketoni. Hlapljivi organski spojevi sa sumporom nastaju kao rezultat sumporenja mošta i grožđa. Fenoli su proizvod kvašćevog metabolizma. Aldehidi i ketoni su intermedijeri alkoholne fermentacije, ali se najčešće reduciraju do alkohola. Nastajanje tvari arome posljedica je slijeda biokemijskih mehanizama koje provode kvasci. Kvasci kao supstrat koriste šećere, dušične spojeve, masne kiseline, lipide, sterole, vitamine i minerale. Biokemijski procesi reguliraju početak fermentacije, njezin tijek i krajnje proizvode. Faktori koji utječu na biokemijske procese su temperatura i pH mošta te soj kvasca koji se koristi.

Zadnje arome koje nastaju u vinu nastaju za vrijeme starenja vina u bačvama ili bocama. Nisu sva vina pogodna za starenje. Vino tijekom starenja gubi svježi voćni bouquet i sortne karakteristike, ali dobiva određeni starosni bouquet. Starenje se odvija u dvije faze: dozrijevanje i starenje u boci. Dozrijevanje traje između 6 do 24 mjeseca i predstavlja vrijeme između fermentacije i punjena u boce. Dozrijevanje se najčešće odvija u drvenim hrastovim bačvama u kojim dolazi do ekstrakcije tvari iz drveta. Starenje u boci traje najkraće pola godine do 50-ak godina, a dulje starenje karakteristično je za crna vina. Promjene koje se događaju tijekom starenja vina u boci su: promjena u sastavu estera,

formiranje spojeva uslijed razgradnje karotena i ugljikohidrata te kiselo katalizirane reakcije monoterpena.

## **2.3.2. Podjela tvari arome prema kemijskoj strukturi**

### **2.3.2.1. „Viši“ alkoholi**

„Viši“ alkoholi su alkoholi koji imaju više od dva ugljikova atoma. Najvažniji „viši“ alkoholi su: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol. Ovi alkoholi su sekundarni proizvodi alkoholne fermentacije i sintetiziraju se paralelno s etanolom. Neki „viši“ alkoholi potječu iz grožđa i prolaze fermentaciju nepromijenjeni. Većina „viših“ alkohola ima oštar i prodoran miris. U manjim koncentracijama su poželjni, dok u većim daju nepoželjan, prodoran miris vina. Sinteza „viših“ alkohola ovisi o uvjetima alkoholne fermentacije. Na sintezu povoljno utječu više temperature, ali i kisik i prisutnost suspendiranih tvari u moštu. U Tablici 1. su prikazani samo neki „viši“ alkoholi koje proizvodi kvasac te njihove koncentracije, kao i pragovi osjetljivosti i pripadajući mirisi vina.

**Tablica 1.** Neki „viši“ alkoholi koje proizvodi kvasac, njihove koncentracije, pragovi osjetljivosti i pripadajući mirisi vina (Nykänen 1986; Henschke i Jiranek, 1993; Lambrechts i Pretorius, 2000).

| Viši alkohol         | Aminokiselina iz koje nastaje      | Koncentracija u vinu [mg/L] | Prag osjetljivosti [mg/L]                                 | Miris                                  |
|----------------------|------------------------------------|-----------------------------|---|--|
| propanol             | treonin / 2-aminomaslačna kiselina | 9-68 / 125                  | 500 <sup>†</sup><br>800 <sup>‡</sup>                      | omamljujući                            |
| butanol              | -                                  | 0,5 - 8,5                   | -   | miris karakterističan za više alkohole |
| izobutil-alkohol     | valin                              | 9 - 28 (100)<br>140         | 500 <sup>†</sup><br>75,0 <sup>*</sup><br>200 <sup>‡</sup> | alkoholni                              |
| aktivni amil-alkohol | izoleucin                          | 15 - 150                    | 65 <sup>‡</sup>   | marcipan                               |
| izoamil-alkohol      | leucin                             | 45 - 490                    | 300 <sup>†</sup><br>7,0 <sup>*</sup><br>70 <sup>‡</sup>   | marcipan                               |
| heksanol             | -                                  | 0,3 - 12                    | 5,2 <sup>*</sup><br>4 <sup>‡</sup>                        | -                                      |
| tirozol              | tirozin                            | -                           | -   | pčelinji vosak, nalik na med           |
| triptofol            | triptofan                          | -                           | -   | -                                      |
| fenetil-alkohol      | fenilalanin                        | 10 - 80                     | 7,5 <sup>*</sup><br>125 <sup>‡</sup>                      | cvjetni, nalik na ružu                 |

\*Koncentracije određene u više od 50 % otopina alkoholnih pića, podrijetlom iz žitnih sirovina, s masenim udjelom etanola od 9,4 %.

† u vinu; ‡ u pivu; - nisu navedeni podaci.

### 2.3.2.2. Kiseline

Kiseline u vinu se mogu podijeliti na hlapljive i nehlapljive. Sve hlapljive kiseline imaju intenzivan miris. Octena kiselina je najvažnija hlapljiva kiselina, no važne su i mravlja, propionska i maslačna kiselina. Octena kiselina ima miris na ocat, propionska kiselina na mast, a maslačna kiselina na užegli maslac. Ove kiseline su uvijek prisutne u vinu no ispod su granice detekcije osjetila.

Masne kiseline poput izovalerijanska, heksanska i kapronska su također bitan sastojak vina. Nastaju za vrijeme fermentacije i starenja, a sudjeluju u reakcijama sinteze estera. U

Tablici 2. navedene su neke hlapljive masne kiseline koje proizvodi kvasac, koncentracije praga osjetljivosti i pripadajući miris u vinu.

**Tablica 2.** Neke hlapljive masne kiseline koje proizvodi kvasac, koncentracije praga osjetljivosti i pripadajući mirisi u vinu (Lambrechts i Pretorius, 2000).

| Hlapljiva masna kiselina | Koncentracija u vinu [mg/L] | Prag osjetljivosti [mg/L]      | Pripadajući miris   |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---|
| mravlja kiselina         | 50                          | -                              | -   |
| octena kiselina          | 150-900                     | 700 - 1000<br>100 - 125<br>400 | po octu, prodoran   |
| propionska kiselina      | tragovi                     | 20,0*                          | užegao, lagano prodoran   |
| maslačna kiselina        | tragovi                     | 2,2 / 4,0*                     | prodoran  |
| izomaslačna kiselina     | tragovi                     | 8,1*                           | prodoran, manje od maslačne kiseline                              |
| valerijanska kislina     | tragovi                     | -                              | neugodan  |
| izovalerijanska kiselina | < 3                         | 0,7*                           | užegao, po siru, znoju, s vremena na vrijeme po truleži, smrdljiv |
| 2-metilmaslačna kiselina | -                           | -                              | -   |
| heksan-kiselina          | tragovi – 37                | 8<br>8,8*                      | kiseo, po octu, siru, znoju, užegao, mastan, oštar                |
| heptan-kiselina          | tragovi                     | -                              | -   |
| oktan-kiselina           | tragovi – 41                | 13<br>15*                      | uljast, mastan, užegao, sapunast, sladak, po voću, maslacu        |
| nonan-kiselina           | -                           | -                              | -   |
| dekan-kiselina           | tragovi – 54                | 10<br>8,2*                     | mastan, neugodan, užegao, po citrusima, fenolni                   |
| tridekan-kiselina        | 15 - 118                    | -                              | mastan, po citrusima, neugodan                                    |

\*Koncentracije određene u više od 50 % otopina alkoholnih pića, podrijetlom iz žitnih sirovina, s masenim udjelom

etanola od 9,4 %.

- nisu navedeni podaci.

### 2.3.2.3. Aldehidi

Najvažniji aldehidi u grožđu su heksanal i heksen. Daju travnati i nezreli miris što ukazuje na pojedina sorte ili na to da je vino proizvedeno od nezrelog grožđa. Najviše aldehidi nastaju kao nusproizvod alkoholne fermentacije. Najvažniji aldehyd je acetaldehyd koji čini 90 % vina. Iznad osjetilne granice daje nepoželjnu aromu oksidiranog vina. U zdravom vinu acetaldehyd je ispod osjetilne granice. Drugi aldehyd koji ima utjecaj na aromu vina je furfural koji nastaje degradacijom šećera, a vinu daje aromu po kuhanom vinu.



#### **2.3.2.4. Ketoni**

Mnogi ketoni su nusproizvodi fermentacije. Najvažniji keton je diacetil koji nema većeg utjecaja na aromu vina. Većinom se pojavljuje u vinima koja su zaražena nekim sojevima bakterija mliječne kiseline, a također može biti i proizvod kvasca, ako se fermentacija provodi na visokoj temperaturi.

#### **2.3.2.5. Acetali**

Acetali nastaju za vrijeme starenja vina. Reakcija se odvija između aldehida i hidroksilne grupe dvaju alkohola. Posjeduju miris po povrću. Detektirano je u vinima oko dvadesetak acetala, a iz udjela se vidi da imaju mali utjecaj na aromu.

#### **2.3.2.6. Esteri**

U vinima je detektirano oko 160 estera. Većina ih je nađena u tragovima i njihova niska hlapljivost i neintenzivan miris ih čini nevažnim za aromu vina.

Udio najvažnijih estera je iznad osjetljive granice, a najčešće imaju voćni karakter pa se često spominju i povezuju s aromom mladih vina. Esteri su spojevi koji nastaju kondenzacijom karboksilne grupe organskih kiselina i hidroksilne grupe alkohola ili fenola. Veća je količina estera pri nižim temperaturama alkoholne fermentacije. Također pri nižim temperaturama sintetiziraju se esteri voćnog mirisa npr. izoamil-acetat. Pri višim temperaturama većinom nastaju esteri većih molekulskih masa.

Sinteza i hidroliza estera se nakon završene alkoholne fermentacije nastavlja neenzimskim putem, a teži kemijskoj ravnoteži estera i odgovarajućih kiselina i alkohola. U Tablici 3. navedeni su neki esteri dobiveni djelovanjem kvasca, njihove koncentracije u vinu, vrijednosti praga osjetljivosti i pripadajući miris u vinu.

**Tablica 3.** Neki esteri proizvedeni djelovanjem kvasca, njihove koncentracije u vinu, vrijednosti praga osjetljivosti i pripadajući miris u vinu (Lambrechts i Pretorius, 2000).

| <b>Esteri</b>        | <b>Koncentracija u vinu [mg/L]</b> | <b>Prag osjetljivosti [mg/L]</b> | <b>Miris</b>                  |
|----------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| etil-acetat          | -                                  | 17,62*<br>12,3                   | po laku, laku za nokte, voćni |
| izoamil-acetat       | 0,03 - 8,1                         | 0,26*                            | po banani, kruški             |
| 2-fenetil-acetat     | 0,01 - 4,5                         | -                                | po ruži, medu, voćni, cvjetni |
| etil-izovalerat      | nema podataka - 0,7                | -                                | po jabuci, voćni              |
| izobutil-acetat      | 0,01 - 0,8                         | -                                | po banani                     |
| etil-butanoat        | 0,01 - 1,8<br>0,01 - 3             | 0,4 (pivo)                       | cvjetni, voćni                |
| etil-2-metilbutanoat | nema podataka - 0,9                | -                                | po jagodi, ananasu            |
| heksil-acetat        | -                                  | -                                | -                             |
| etil-heksanoat       | tragovi - 3,4                      | 0,08                             | po jabuci, banani, ljubičici  |
| etil-oktanoat        | 0,05 - 3,8                         | 0,58<br>0,258*                   | po ananasu, kruški            |
| etil-dekanoat        | tragovi - 2,1                      | 0,5                              | cvjetni                       |

\*Koncentracije određene u više od 50 % otopina alkoholnih pića, podrijetlom iz žitnih sirovina, s masenim udjelom etanola od 9,4 %.  
- nisu navedeni podaci.

### 2.3.2.7. Laktoni

Laktoni su ciklički esteri, a nastaju ciklizacijom hidroksikarboksilnih kiselina. Nastaju tijekom cijelog procesa proizvodnje vina od grožđa pa do starenja u bocama. Najvažniji lakton iz grožđa je 2-vinil-2-metiltetrahidrofuran-5-on. Tijekom fermentacije nastaju iz amino kiselina ili organskih kiselina.

### 2.3.2.8. Terpeni

Po kemijskoj strukturi terpeni se grupiraju na temelju rasporeda skupine s C-atoma koji čine osnovnu strukturu izoprena. Terpeni mogu sadržavati različite funkcionalne grupe. Mnogi terpeni u vinu imaju hidroksilnu funkcionalnu grupu te ih zovemo terpenski alkoholi. Iako ih je u vinu malo, imaju značajan utjecaj na aromu vina, a vinu daju miris cvijeća i voća.

Danas veliku pažnju privlače glukozidno vezani terpeni. Primijećeno je da se starenjem vina ovi spojevi odvajaju od prekursora i daju vinu pojačani sortni miris. Terpeni u vinu potječu od grožđa i zbog toga je kvalitativna i kvantitativna analiza terpena specifična za pojedinu sortu.

### **2.3.2.9. Spojevi s dušikom i sa sumporom**

Dušikov spoj koji se nalazi u vinu je pirazin. To je ciklički spoj s dušikom koji ima miris na zeleni papar. Potječe od 2-metoksi-3-izobutilpirazina.

Sumporni spojevi nastaju metabolizmom kvasaca iz aminokiselina koje sadrže sulfidne skupine. Spojevi sumpora kao što su sulfidi i merkaptani nepoželjna su komponenta vina. Nose neugodan miris i okus koji podsjeća na šparoge, gumu ili luk. Sumporovodik je također nepoželjan spoj koji nastaje u vinu. Često je prisutan u mladom nedovršenom vinu. Gotovo vino koje sadrži ovaj spoj nije za konzumaciju. Nastaje kvašćevom redukcijom elementarnog sumpora. Posjeduje jako neugodan miris na pokvarena jaja.

Tioeteri su organski spojevi sa sumporom koje karakterizira jedan ili više sumpora vezanih za dva ugljika. Jedan od bitnijih tioetera je dimetilsulfid. Njegov izvor je pokožica bobice crnog grožđa. Udio dimetilsulfida raste tijekom starenja vina i značajno utječe na bouquet vina. Ima miris na rakove, a kad mu je udio niži ima miris na melasu.

### **2.3.2.10. Fenoli i njihovi derivati**

Fenoli su grupa spojeva koja je posebno važna za kakvoću crnih vina. Kod bijelih vina su također važni, ali su prisutni u mnogo manjim količinama. Fenoli uvelike utječu na miris, okus, boju i stabilnost vina. Mogu vući podrijetlo iz grožđa, metabolizma kvasca i iz drvenih bačvi.

Naročito veliki utjecaj na aromu imaju hlapljivi fenoli kao što su etilvanilat i metilvanilat koji imaju miris na vaniliju. Grožđe je velik izvor hidroksicimetine kiseline koja se za vrijeme fermentacije transformira u hlapljive fenole. Od fenola koji su nastali za vrijeme fermentacije najveći utjecaj ima tirosol, a najvažniji fenol koji potječe iz drvene bačve je vanilin.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Metode

#### 3.1.1. Određivanje koncentracije šećera RS-metodom

##### **Postupak:**

**Vino:** 5 mL mladoga vina uzima se za analizu, uz dodatak 20 mL destilirane vode (ukupan volumen 25 mL). Doda se 10 mL otopine A (Fehling 1) i 10 mL otopine B (Fehling II). Nakon kuhanja u trajanju od 2 minute u tikvici s okruglim dnom od 250 mL uz povratno hladilo, uzorak se ohladi pod vodom i doda se 10 mL otopine C (30%-tni KI) i 10 mL otopine D (26%-tne  $H_2SO_4$ ). Sve se dobro izmiješa i doda se 2 mL škroba (1%-tna otopina) te titrira s 0,1 M  $Na_2S_2O_3$  do prelaza tamno smeđe boje u boju puti koja se treba zadržati 1 minutu.

**Glukoza test (kontrola):** 5 mL 1%-tne glukoze i 20 mL destilirane vode (ukupan volumen 25 mL) čini uzorak za analizu, te se ponovi gore opisani postupak.

**Slijepa proba:** Za analizu se koristi 25 mL destilirane vode i ponovi gore opisani postupak.

##### **Izračunavanje koncentracije šećera:**

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

gdje je:

RS = reducirajuće supstance (g/l),

a = mL 0,1 M  $Na_2S_2O_3$  utrošeni za slijepu probu,

b = mL 0,1 M  $Na_2S_2O_3$  utrošeni za uzorak,

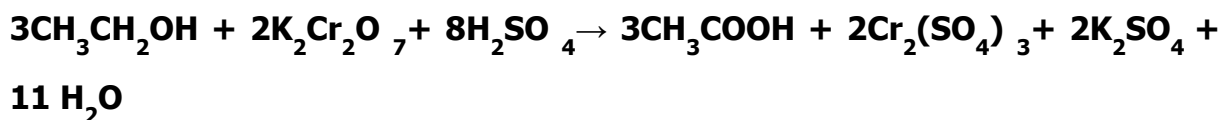
c = mL 0,1 M  $Na_2S_2O_3$  utrošeni za kontrolu (glukoza test),

d = mL uzorka uzeti za analizu.

#### 3.1.2. Određivanje alkohola (etanola) kemijskom metodom

##### **Princip:**

Metoda se zasniva na oksidaciji alkohola s kalijevim bikromatom u kiseloj sredini, prema jednadžbi:



Alkohol se iz vina destilira i uvodi izravno u otopinu kalijevog bikromata koji je zakiseljen s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gdje se odvija oksidacija.

### **Reagensi:**

- 1)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (33,834 g/l); 1 mL ove otopine ekvivalent je 0,01 vol. % etanola.
- 2) 0,1M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- 3) 20%-tni KI
- 4) 1%-tni škrob
- 5) koncentrirana  $\text{H}_2\text{SO}_4$

### **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 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 NaOH uz univerzalni indikator.

U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, u koju će se hvatati destilat, stavi se 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 mL koncentrirane sumporne kiseline. Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu u Erlenmeyerovoj tikvicu, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija traje dok u tikvici za destilaciju ne ostane približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao).

Po završetku destilacije lula se ispere s nekoliko mlazova destilirane vode u istu Erlenmeyerovu tikvicu u koju se hvatao destilat. Sadržaj Erlenmeyer 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 dio ostane u suvišku.

Sadržaj se potom kvantitativno prebaci u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL uz ispiranje tikvice, doda se oko 200 mL destilirane vode radi razrjeđenja i 10 mL 20%-tne otopine KI (radi određivanja preostale količine kalijevog bikromata) i ostavi se začepljeno 5 minuta. Tada dolazi do oksido-redukcijskog procesa između preostalog kalijevog bikromata i kalijeva jodida: krom se iz šesterovalentnog reducira u trovalentni, a jod se iz KI oksidira u elementarni jod, zbog čega otopina dobije tamnu boju. Pritom se elementarni jod oslobađa u količini ekvivalentnoj kalijevom bikromatu. Nakon toga uzorku se doda 5 mL 1%-tne otopine škroba i titrira se s 0,1 M otopinom natrijevog tiosulfata, pri čemu dolazi do oksidoredukcije

između joda i natrijevog tiosulfata, u kojoj se jod reducira, a tiosulfat oksidira. Titracija se provodi do pojave tirkizno-zelene boje koja označava nestanak posljednje količine joda.

#### **Izračunavanje količine alkohola:**

$$\text{alkohol (vol\%)} = 2(10 - a / 6,9) ,$$

gdje je a = utrošak 0,1 M otopine  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

Faktor 2 proizlazi iz ekvivalencije između kalijevog bikromata i alkohola i količine vina upotrijebljene za analizu.

Ova je kemijska metoda brza i precizna, a pri pravilnom radu daje rezultate koji se praktično ne razlikuju od rezultata dobivenih piknometrom. Vrlo je osjetljiva pa se zato radi s malom količinom alkohola, zbog čega se vino mora jako razrjeđivati.

### **3.1.3. Određivanje alkohola denzimetrijski**

#### **Postupak:**

Piknometar se ispere 2- 3 puta vinom koje se analizira, a potom se pomoću specijalnog lijevka napuni tako da nivo bude iznad oznake. Nakon temperiranja pri sobnoj temperaturi, višak se vina iznad oznake ukloni pomoću filter papira. Uzorak se iz piknometra prenese u tikvicu za destilaciju od 250 mL, piknometar se ispere 2–3 puta s nekoliko mililitara hladne destilirane vode i sve se to prelije u tikvicu za destilaciju. Prilikom destilacije, destilat se hvata u isti piknometar preko specijalnog lijevka, tako da se u piknometar ulije malo destilirane vode kako bi vrh lijevka bio uronjen. Destilacija traje dok se piknometar ne napuni destilatom do  $\frac{3}{4}$  njegovog volumena. Tada se piknometar nadopuni destiliranom vodom do oznake, obriše i izvaže.

#### **Izračunavanje količine alkohola:**

$$\gamma = \frac{A - B}{C}$$

$\gamma$  – Specifična težina destilata

A – masa piknometra s destilatom

B – masa praznog piknometra

C – vodena vrijednost piknometra

Vrijednosti B i C, potrebne za računanje, određene su ranije za svaki pojedini piknometar, a na osnovu specifične težine destilata iz tablice po Windischu očita se količina alkohola u g/L vina, a iz te vrijednosti odrede se volumni postoci etanola.

### **3.1.4. Određivanje sumporovog dioksida**

#### **Određivanje slobodnog sumporovog dioksida (20 minuta bez grijanja):**

10 mL vina koje analiziramo i 5 mL fosforne kiseline (w=25%) otpipetira se u tikvicu za kuhanje preko lijevka. U apsorpcionu tikvicu dodati se već pripremljeni reagens tako da nivo bude do proširenog grla apsorpcijske tikvice. Otvori se voda koja struji kroz hladilo i voda u vakuum sisaljci do pojave mjehurića u menzuri, na jednoj strani, i u tikvicama aparature. Nakon 20 minuta skinuti tikvicu s reagensom i titirati s 0,01 M NaOH. Utrošene mL 0,01 M NaOH treba pomnožiti s 32 da bi se dobili mg slobodnog SO<sub>2</sub> u jednoj litri vina.

#### **Određivanje vezanog sumporovog dioksida:**

Vino koje je ostalo u tikvici za kuhanje nakon određivanja slobodnog sumpora i dalje ostaje u toj tikvici. Mijenja se reagens u maloj apsorpcionoj tikvici. Pod tikvicu za kuhanje stavi se 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 SO<sub>2</sub> u jednoj litri vina.

#### **Određivanje ukupnog sumporovog dioksida:**

Ukupni SO<sub>2</sub> dobije se zbrajanjem vrijednosti slobodnog i vezanog SO<sub>2</sub>.

#### **Priprema indikatora u otopini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:**

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

### **3.1.5. Određivanje ukupnih kiselina u vinu**

#### **Princip metode:**

Hlapljive kiseline određuju se tako da se postupkom destilacije vina prevode u destilat, a zatim neutraliziraju otopinom natrijevog hidroksida. Na temelju utroška natrijevog

hidroksida, izračuna se količina hlapljivih kiselina. Octena kiselina, na koju otpada 95 – 99% od cjelokupne količine hlapljivih kiselina, isparava teže i sporije od alkohola i vode, pa se destilacija provodi u struji vodene pare, čime se omogućava da cjelokupna količina octene kiseline pređe u destilat.

#### **Postupak:**

Trbušastom pipetom se uzme 5 mL uzorka, te se stavi u tikvicu kruškastog oblika i doda se 1 mL 25%  $H_3PO_4$ . Posebnu pažnju treba obratiti na površinu vode u Erlenmeyerovoj tikvici za proizvodnju pare. Naime, voda uvijek treba biti iznad nivoa tekućine u kruškastoj tikvici. Za vrenje vode u Erlenmeyer 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:**

$$\gamma = 1,2 \times V,$$

gdje je:

$\gamma$  = 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.

### **3.1.6. Određivanje hlapljivih kiselina po polumikro postupku**

#### **Princip metode:**

Hlapljive kiseline određuju se tako da se postupkom destilacije vina prevode u destilat, a zatim neutraliziraju otopinom natrijevog hidroksida. Na temelju utroška natrijevog hidroksida, izračuna se količina hlapljivih kiselina. Octena kiselina, na koju otpada 95 – 99% od cjelokupne količine hlapljivih kiselina, isparava teže i sporije od alkohola i vode, pa se destilacija provodi u struji vodene pare, čime se omogućava da cjelokupna količina octene kiseline pređe u destilat.

#### **Postupak:**

Trbušastom pipetom se uzme 5 mL uzorka, te se stavi u tikvicu kruškastog oblika i doda se 1 mL 25%  $H_3PO_4$ . Posebnu pažnju treba obratiti na površinu vode u Erlenmeyerovoj tikvici za proizvodnju pare. Naime, voda uvijek treba biti iznad nivoa tekućine u kruškastoj tikvici. Za vrenje vode u Erlenmeyer 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:**

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

gdje je:

y = 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.

**3.1.7. Određivanje jabučne, mliječne, limunske, octene i vinske kiseline papirnom kromatografijom**

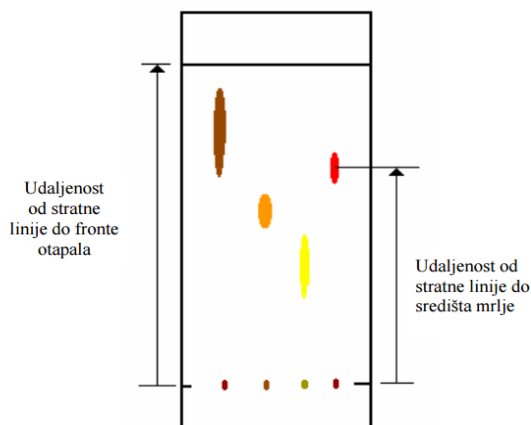
**Postupak:**

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 osnovne. Na liniji se obilježe točke, na udaljenosti od 1,5 cm od ruba papira, na koje se nanosi po 50 µL smjese standarda (sadrži po 3 g/L octene, vinske, mliječne i jabučne kiseline), odnosno uzorka vina (Slika 5). Nanosi se kap po kap, uz naknadno sušenje vrućim zrakom, točnije fenom, kako promjer nanesenih kapi ne bi prelazio 3 mm. Nakon nanošenja i sušenja, radi razvijanja kromatograma papir se stavlja u kadu za kromatografiju u kojoj se nalazi ranije pripremljena smjesa otapala. Vrijeme razvijanja kromatograma je 2–3 sata, nakon čega treba označiti frontu otapala grafitnom olovkom prije nego se kromatogram počne sušiti. Nakon sušenja na zraku, kromatogram se uroni u otopinu indikatora i ponovno suši na zraku. Na temelju položaja mrlja na kromatogramu u odnosu na poznatu smjesu standarda,  $R_f$  vrijednost izračunava se prema izrazu:

$$R_f = \frac{\text{udaljenost od startne linije do središta mrlje}}{\text{udaljenost od startne linije do fronte otapala}}$$

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

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



**Slika 5.** Izgled kromatograma (Skripta vježbi Tehnologija vina, BT3)

### **Priprema smjese za razvijanje kromatograma:**

|                  |       |
|------------------|-------|
| Octena kiselina  | 10 mL |
| n – butanol      | 40 mL |
| destilirana voda | 50 mL |

Smjesa octene kiseline, n–butanola i destilirane vode stavlja se u lijevak za odlijevanje 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  $(10 + 40 + 50) \times 2$

### **Priprema otopine indikatora:**

100 mg bromfenol–plavog otopi se u apsolutnom etanolu o odmjernoj tikvici od 100 mL, te se doda 2–3 kapi 1M NaOH za potizanje lagano lužnate otopine.

## **3.1.8. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

### **Princip metode:**

High performance liquid chromatography (HPLC) ili tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je analitička metoda koja omogućava separaciju sastojaka na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Mobilna faza je tekućina i sastojke odnosi u kolonu u kojoj se razdvajaju njegovi sastojci. Sastojci koji se kromatografiraju raspoređuju se između dviju faza – stacionarne i mobilne – pri čemu mobilna faza prolazi kroz stacionarnu noseći sa sobom sastojke. Kromatografski proces se odvija kao rezultat ponavljanih sorpcijsko-desorpcijskih zbivanja tijekom prolaza uzorka kroz

stacionarnu fazu i odvajanja sastojaka uslijed razlika koeficijenta raspodjele pojedinih njegovih komponenata.

### **Postupak**

Uzorak vina se razrijedi 10 puta. U razrijeđenje potrebno je dodati  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  kako bi se mogli proteini istaložili, jer se proteini mogu taložiti na koloni. Uzorak se vorteksira 20 sekundi i pusti da odstoji 20 minuta. Nakon toga se centrifugira 5 minuta na 10.000 o/min. Na kolonu (Supelco C610H ,30 cm x 7,8 mm) injektira se 20  $\mu\text{L}$  (automatski uzorkivač) uzorka te postavi temperatura od 55 °C i protok od 0,5 mL/min. Kao mobilna faza koristi se 0,1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a komponente se detektiraju RID-detektorom. Analiza se ponavlja kako bi se dobilo dvije paralele radi kontrole rezultata. Na Slici 6. prikazan je HPLC uređaj korišten u radu.



**Slika 6.** Shimadzu HPLC uređaj (Anonimus 1, 2014)

### **3.1.9. Plinska kromatografija (GC)**

#### **Princip:**

Gas chromatography (GC) ili plinska kromatografija je analitička metoda kojom se komponente smjese razdjeljuju, identificiraju i kvantificiraju. Koristi se za razdvajanje hlapljivih spojeva, te spojeva koji se derivatizacijom mogu prevesti u hlapljivi oblik. Mobilna faza je plin nosilac (dušik, helij ili vodik) koja odnosi uzorak u kolonu u kojoj se razdvajaju njegovi sastojci. Sastojci koji se kromatografiraju raspoređuju se između dviju faza – stacionarne i mobilne – pri čemu mobilna faza prolazi kroz stacionarnu noseći sa sobom

hlapljive sastojke. Kromatografski proces se odvija kao rezultat ponavljanih sorpcijsko-desorpcijskih zbivanja tijekom prolaza uzorka kroz stacionarnu fazu i odvajanja sastojaka uslijed razlika koeficijenata raspodjele pojedinih njegovih komponenata .

### **3.1.9.1. Analiza hlapljivih komponenti u vinu pomoću plinske kromatografije**

#### **Postupak:**

Za ovu analizu korišten je plinski kromatograf PE Autosystem XL GC koji je integriran s headspace blokom (HS 40XL). Za analizu se koristio plameno-ionizacijski detektor (FID). Korištena je kolona ZB-5MS (Zebron, Phenomenex), 60 m x 0,25 mm I.D. x 0,50  $\mu$ m d<sub>f</sub>.

#### **Uvjeti rada headspace bloka:**

Temperatura pećnice: 100 °C

Vrijeme termostiranja: 20 min

Vrijeme pod tlakom: 0,2 min

Vrijeme injektiranja: 0,05 min

Vrijeme uzimanja uzorka: 0,1 min

Viala zatvorena: da

Način rada headspace bloka: konstantan

Vrijeme trajanja jedne GC analize: 40 min

Plin nositelj: helij

Pritisak plina nositelja: 25 Psi

#### **Uvjeti rada plinskog kromatografa:**

Temperatura injektora: 110 °C

Temperatura detektora: 250 °C

Temperaturni program: 35 °C, 5 min; 10 °C/min →60 °C; 60 °C, 2 min; 10 °C/min, 180 °C;

180 °C, 7 min

### 3.1.9.2. Analiza etanola u vinu pomoću plinske kromatografije

#### **Postupak:**

Za analizu je korišten plinski kromatograf AE Autosystem HL GC. Detektor je plameno-ionizacijski, a kolona koja se koristila je vZB-WAXplus 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm d<sub>f</sub>.

Priprema uzorka: 150 µL vina se pomiješa sa 150 µL internog standarda (1-heksanol) i 1200 µm etil-acetata. Uzorak potom profiltrirati kroz filter debljine 0,22 µm ili podvrgnuti centrifugiranju.

#### **Uvjeti rada plinskog kromatografa:**

Volumen injektiranja: 1 µL

Temperatura injektiranja: 210 °C

Protok kroz kolonu: 2,71 mL/min

Mobilna faza: etil-acetat

Linearna brzina: 52,8 cm/s

Temperatura detektora: 250 °C

Temperaturni program: 90 °C, 2 min; 20 °C/min do 240 °C; 240 °C, 4 min

#### **Izračun:**

Za izračun se koristio baždarni pravac za etanol:

$$\frac{A}{A_{IS}} = 0,058 * \varphi(Etanol) + 0,0032$$

$$R^2 = 0,99$$

$\varphi$ (Etanola)-volumni udio etanola

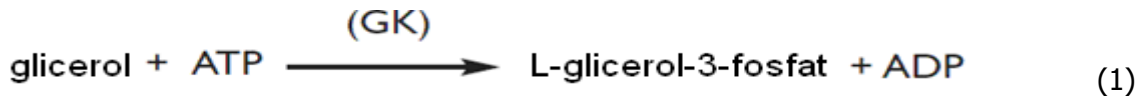
A - površina pika za etanol dobiven iz uzorka

A<sub>is</sub> - površina pika za interni standard

### 3.1.10. Određivanje glicerola pomoću enzimskog kita

#### **Princip:**

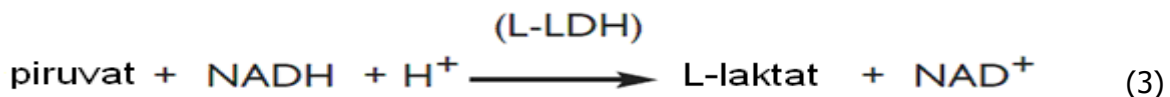
Glicerol se fosforilira pomoću adenzin-5'-trifosfata (ATP) u L-glicerol-3-fosfat reakcijom koju katalizira glicerokinaza (GK) (1).



Adenozin-5'-difosfat (ADP) koji nastaje u reakciji 1 ponovo se konvertira u ATP uz nastajanje piruvata (reakcija 2). 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 dinukleotida (NADH) uz nastajanje  $\text{NAD}^+$  (reakcija 3).



Pri 340 nm mjeri se smanjenje apsorbancije uzrokovano potrošnjom NADH. Nastali  $\text{NAD}^+$  je u stehiometrijskom odnosu s količinom glicerola u uzorku (reakcija 3). Ova je metoda specifična za glicerol. Linearna je u rasponu 0,8 - 35  $\mu\text{g}$  glicerola u uzorku. Pri provođenju analize dopuštene su razlike apsorbancije dvaju istovjetnih uzoraka koje iznose 0,005 - 0,010, što odgovara koncentraciji glicerola od otprilike 0,086 - 0,171 mg/L u analiziranom uzorku. Ukoliko su uzorci razrijeđeni, koncentracija dobivena analizom razrijeđenog uzorka množi se faktorom razrjeđenja F. Uzorci bijelih i crnih vina analiziraju se bez ikakve posebne pripreve, osim razrjeđenja 1:20, pa prema tome faktor razrjeđenja F iznosi 20. Ukoliko je konverzija glicerola završena za otprilike 5 minuta, može se zaključiti da nije bilo interferencija. Ovo se može dalje provjeriti dodavanjem glicerola u kivetu nakon završetka reakcije (oko 20  $\mu\text{g}$  u 0,1 mL), što treba dovesti do značajnog povećanja apsorbancije. Standard glicerola analizira se samo kad postoji sumnja u točnost spektrofotometra ali kad se sumnja u inhibiciju zbog nekog sastojka uzorka.

### **Postupak:**

Valna dužina: 340 nm

Kiveta: širina 1 cm

Temperatura: oko 25 °C

Volumen uzorka (0,1 – 2 mL) koji sadrži 0,8 - 35  $\mu\text{g}$  glicerola po kiveti.

Određivanje glicerola u uzorcima bijelih i crnih vina može se provesti bez prethodne obrade uzorka pa se uzorak samo razrjeđuje i to obično u omjeru 1:20 te se uzima 0,1 mL uzorka. Mjeriti prema zraku (bez kivete u spektrofotometru) ili prema vodi. Konačni volumen u kiveti iznosi 2,34 mL. Očitati prema zraku (bez kivete na putu svjetla) ili prema vodi.

| Pipetirati u kivetu  | Slijepa proba     | Uzorak            |
|--|-------------------|-------------------|
| Destilirana voda (temperature oko 25 °C)   | 2,00 mL (2000 µL) | 1,90 mL (1900 µL) |
| Uzorak   | -                 | 0,1 mL (100 µL)   |
| Pufer  | 0,2 mL (200 µL)   | 0,2 mL (200 µL)   |
| Otopina 2 (NADH/ATP/PEP/Tris HCl)  | 0,1 mL (100 µL)   | 0,1 mL (100 µL)   |
| Suspencija 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 ( $A_1$ ) (kad završi reakcija koja se odvija kada se doda suspencija 3) (PK/L-LDH).   |                   |                   |
| Suspencija 4 (GK)  | 0,02 mL (20 µL)   | 0,02 mL (20 µL)   |
| Zatvoriti parafilmom i nježno okretati kivetu radi miješanja. Očitati apsorbanciju ( $A_2$ ) 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. |                   |                   |

### **Račun:**

Odrediti razliku apsorbancija ( $A_1 - A_2$ ) za slijepu probu i za uzorak. Potom razliku apsorbancija za slijepu probu oduzeti od razlike apsorbancija za uzorak tako da se dobije  $\Delta A_{\text{glicerol}}$ . Ova vrijednost bi u pravilu trebala iznositi najmanje 0,1.

Koncentracija glicerola može se dalje izračunati prema jednadžbi:

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

gdje je:

c - koncentracija glicerola [g/L]

V - konačni volumen [mL] = 2,34 mL

MW - molarna masa glicerola [g/mol] = 92,01

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

d- put svjetlosti (1 cm)

v- volumen uzorka [mL] = 0,1 mL

## 3.2. Materijal

- 0,1 M NaOH
- 0,01 M NaOH
- 1M NaOH
- 25 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 96% alkohol
- 30 %-tni KI
- 26 %-tna H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 1 %-tni škrob
- 0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- 1 %-tna glukoza
- 20%-tni KI
- K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (33,834 g/L)
- koncentrirana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Fehling I (69,3 g/L CuSO<sub>4</sub>×5 H<sub>2</sub>O)
- Fehling II (346 g/L K,Na-tartarata)
- Destilirana voda
- Indikatori:
  - fenolftalein
  - metilno crvenilo
  - bromfenol-plavo
- octena kiselina
- n – butanol
- Standard za papirnu kromatografiju (po 3 g/L jabučne, vinske, mliječne, octene i limunske kiseline)
- 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- 10% otopina ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O
- Etil-acetat
- 1-heksanol
- Enzimski kit za određivanje glicerola K-GCROL (Megazyme, Irska)



### 3.3. 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 i vinske kiseline pomoću papirne kromatografije
- HPLC uređaj, Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan).
- GC uređaj, PE Autosystem XL GC with Headspace Sampler (HS 40XL)
- Spektrofotometar Varian Cary 3 UV/VIS Spectrophotometer, SAD

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

#### 4.1.1. Rezultati analize parametara vina kemijskom metodom

Tijekom analize domaćeg rose vina kupažiranjem sa sortama Pinot sivi i Izabela, proizvedenog 2016. godine, provedene su tri paralele radi statističke pouzdanosti, a dobiveni rezultati su prikazani kao srednja vrijednost u Tablici 4.

**Tablica 4.** Rezultati analize parametara analiziranog domaćeg rose vina

|                       | Reducirajuće<br>supstance<br>[g/L] | Volumni udio<br>etanola<br>[% vol] | pH   | Ukupne<br>kiseline<br>[g/L] | Hlapljive<br>kiseline<br>[g/L] | SO <sub>2</sub><br>slobodni<br>[mg/L] | SO <sub>2</sub><br>vezani<br>[mg/L] | SO <sub>2</sub><br>ukupni<br>[mg/L] |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Srednja<br>vrijednost | 1,66                               | 10,29*<br>13,21**                  | 3,08 | 7,95                        | 0,78                           | 6,5                                   | 12,6                                | 19,1                                |

\*udio etanola dobiven kemijskom metodom

\*\*udio etanola dobiven denzimetrijskom analizom

#### 4.1.2. Rezultati papirne kromatografije

Analizom je ustanovljeno da vino sadrži jabučnu i vinsku kiselinu. Nisu detektirane octena, mliječna i limunska kiselina.

#### 4.1.3. Rezultati analize dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

U Tablici 5. prikazani su rezultati provedene analize pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Tablica 5. prikazuje retencijska vremena i koncentracije ugljikohidrata, etanola i organskih kiselina prisutnih u vinu. Rezultati u Tablici 5. su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Tijekom analize provedene su tri paralele radi bolje statističke pouzdanosti.

**Tablica 5.** Retencijska vremena i koncentracije ugljikohidrata, etanola i organskih kiselina prisutnih u analiziranom vinu (rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija).

|                   | <b>Analizirano rose vino</b>   |
|-------------------|--|
| <b>Spoj</b>       | <b><math>\gamma</math> (g L<sup>-1</sup>) / <math>\varphi</math> (%)<sup>a</sup></b> |
| Glukoza           | n.d.   |
| Fruktoza          | n.d.   |
| jabučna kiselina  | 2,95 $\pm$ 0,02  |
| vinska kiselina   | 3,78 $\pm$ 0,04  |
| limunska kiselina | n.d.   |
| mliječna kiselina | n.d.   |
| octena kiselina   | n.d.   |
| Etanol            | 11,34 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>  |
| Glicerol          | 6,02 $\pm$ 0,02  |

#### **4.1.4. Određivanje glicerola pomoću enzimskog kita**

Koncentracija glicerola u vinu određena je pomoću enzimskog kita. Analiza se provodila u šest paralela radi statističke pouzdanosti. Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost. Masena koncentracija glicerola u vinu je iznosila 5,67 g L<sup>-1</sup>.

#### **4.1.5. Plinska kromatografija**

##### **4.1.5.1. Analiza hlapljivih spojeva prisutnih u vinu pomoću plinske kromatografije**

U Tablici 6. se nalaze rezultati analize provedene pomoću plinske kromatografije. Tablica sadrži retencijska vremena i koncentracije nekih hlapljivih spojeva prisutnih u vinu. Interni standard N-butanol koji se koristio u ovoj metodi također je vidljiv u Tablici 6. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti. Tijekom analize provedene su tri paralele radi bolje statističke pouzdanosti.

**Tablica 6.** Retencijska vremena i koncentracije nekih hlapljivih spojeva prisutnih u analiziranom vinu određene HS-GC-FID metodom

|                        |                          | <b>Analizirano<br/>rose vino</b> |
|------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| <b>Spoj</b>            | <b>t<sub>R</sub>/min</b> | <b>γ (mg L<sup>-1</sup>)</b>     |
| acetaldehid            | 4,14                     | 78,66                            |
| propan-1-ol            | 6,37                     | 10,32                            |
| butan-2-ol             | 7,46                     | n.d.                             |
| etil-acetat            | 7,71                     | 93,05                            |
| 2-metil-propan-1-ol    | 8,23                     | 26,56                            |
| <i>N</i> -butanol (IS) | 9,51                     | -                                |
| 3-metil-butan-1-ol     | 12,26                    | 101,35                           |
| 2-metil-butan-1-ol     | 12,43                    | 22,64                            |
| Etil-butirat           | 14,49                    | n.d.                             |
| isoamil acetat         | 16,80                    | 0,73                             |
| etil heksanoat         | 19,95                    | 1,08                             |
| etil-oktanoat          | 24,25                    | 0*                               |
| 2-feniletilacetat      | 26,11                    | n.d.                             |

\*ispod LOD; n.d. nije detektirano; IS = interni standard

#### **4.1.5.2. Analiza etanola prisutnih u vinu pomoću plinske kromatografije**

Vino je bilo podvrgnuto analizi etanola pomoću plinske kromatografije. Analiza se provodila u tri paralele radi statističke pouzdanosti. Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Masena koncentracija etanola u vinu određena pomoću plinske kromatografije je  $11,48 \pm 0,20 \text{ g L}^{-1}$ .

## 4.2. Rasprava

Prema članku 5. Pravilnika o proizvodnji vina Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, vinogradarsko područje Hrvatske razvrstano je u slijedeće zone proizvodnje:

1. Zona B obuhvaća ove podregije: Moslavina, Prigorje-Bilogora, Plešivica, Pokuplje i Zagorje-Međimurje.
2. Zona C1 obuhvaća ove podregije: Podunavlje, Slavonija.
3. Zona C2 obuhvaća ove podregije: Istra, Hrvatsko Primorje i Dalmatinska Zagora.
4. Zona C3 obuhvaća ove podregije: Sjeverna, Srednja i Južna Dalmacija.

Prema člancima 15., 20. i 26. Pravilnika o proizvodnji vina Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, najmanji sadržaj stvarnog alkohola u vinu u prometu, ovisno od kakvoće i zone proizvodnje, mora biti (u volumnim %):

### Zona B

- za stolno vino i stolno vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....8,5
- za kvalitetno vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....9,5
- za vrhunsko vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....10

### Zona C1

- za stolno vino i stolno vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....9,5
- za kvalitetno vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....10
- za vrhunsko vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....10,5

### Zona C2

- za stolno vino i stolno vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....10
- za kvalitetno vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....10,5
- za vrhunsko vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....11

### Zona C3

- za stolno vino i stolno vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....10
- za kvalitetno vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....11
- za vrhunsko vino s oznakom kontroliranog podrijetla.....11,5

Prema članku 1. Pravilnika o proizvodnji vina Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, vino u prometu mora sadržavati:

1. ukupnih kiselina, izraženih kao vinska kiselina, najmanje 4 g/L i najviše 14 g/L;
2. glicerola: najmanje 5,0 g/L
3. limunska kiselina: najviše 1g/L.

Prema članku 12. Pravilnika o vinu Ministarstva poljoprivrede i šumarstva, sadržaj neprevrelog šećera u vinu može biti:

1. suho vino do 4 g/L;
2. polusuho vino 4 – 12 g/L;
3. poluslatko vino 12 – 50 g/L;
4. slatko vino više od 50 g/L.

Prema Članku 7. Pravilnika o proizvodnji vina Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, hlapljiva kiselost, izražena kao octena kiselina, u proizvodima u prometu ne smije biti veća od:

1. 0,8 g/L u moštu u fermentaciji i mladom vinu;
2. 1,0 g/L u ružičastim i bijelim vinima;
3. 1,2 g/L u crnim vinima, u vinima kasne berbe i vinima izborne berbe;
4. 1,8 g/L u desertnim vinima, vinima izborne berbe bobica, vinima izborne berbe prosušanih bobica i ledenom vinu.

Prema članku 6. Pravilnika o proizvodnji vina Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, ukupni sadržaj sumpornog dioksida u vinima, osim kod pjenušavih, gaziranih i specijalnih vina u prometu ne smije biti veći od:

1. 160 mg/L kod crnih vina, od toga slobodnog najviše do 30 mg/L;
2. 210 mg/L kod ružičastih i bijelih vina, od toga slobodnog najviše do 40 mg/L.

Iznimno od stavka 1. ovog članka ukupni sadržaj sumpornog dioksida kod vina sa ostatkom šećera većim od 5 g/L, izraženo kao invertni šećer, može biti:

1. 210 mg/L kod crnih vina, od toga slobodnog najviše do 40 mg/L,
2. 260 mg/L kod ružičastih i bijelih vina, od toga slobodnog najviše do 50 mg/L;
3. 300 mg/L , od toga slobodnog najviše 50 mg/L kod vina sa oznakom kasna berba;
4. 350 mg/L , od toga slobodnog najviše 60 mg/L kod vina sa oznakom izborna berba;
5. 400 mg/L , od toga slobodnog najviše 70 mg/L kod vina sa oznakom izborna berba bobica, izborna berba prosušanih bobica i ledeno vino.

Rose vino analizirano u ovom radu pripada prema proizvodnji u zonu B. Proizvedeno je od dviju sorte grožđa Pinot sivi i Izabela. S obzirom na koncentraciju reducirajućih šećera (1,66 g/L) vino pripada suhim vinima. HPLC-om nije detektirana glukoza i fruktozu u uzorku.

Analiza hlapljivih spojeva vina pomoću plinske kromatografije pokazala je prisutnost „viših“ alkohola, aldehida i estera, a oni su produkti alkoholne fermentacije.

„Viši“ alkoholi, koji vinu daju posebnu aromu, a prisutni su u analiziranom vinu: propan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, 3-metil-butan-1-ol i 2-metil-butan-1-ol. Butan-2-ol nije detektiran u uzorku. Od aldehida je određen samo acetaldehid koji je i najzastupljeniji aldehyd u vinu. Od estera je određen etil-acetat, isoamil acetat i etil heksanoat, a etil-butirat i 2-feniletilacetat nisu određeni, dok je ispod limita detekcije bio etil-oktanoat. U analiziranom vinu je najviše prisutno 3-metil-butan-1-ol-a i etil-acetata.

Od analiziranih hlapljivih komponenti dominiraju „viši“ alkoholi. Acetaldehid je također prisutan u velikoj koncentraciji. Od estera jedino etil-acetat je prisutan u velikoj koncentraciji dok su ostali esteri u razmjerno niskim koncentracijama.

Alkohol u domaćem rose vinu je analiziran pomoću četiri metode. Rezultati GC-a i HPLC-a se poklapaju i iznose 11,48 % (vol/vol) odnosno 11,34 % (vol/vol). Analize provedene kemijskim metodama pokazuju odstupanje od navedenih rezultata (etanol određen kemijskom metodom 10,29 %(vol/vol) odnosno denzimetrijskom analizom 13,21 % (vol/vol). Do odstupanja je moglo doći zbog grubih pogrešaka prilikom rada, netočno baždarenog posuđa ili nedovoljno čistih kemikalija koje su se koristile tijekom analize. Također, denzimetrijska metoda je izrazito nepouzdana i neponovljiva te se prilikom analiza javlja velik rasap između rezultata.

Vino sadrži 7,95 g/L ukupnih kiselina i 0,78 g/L hlapljivih kiselina što je unutar granica koje je propisalo Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva. Kiseline koje su detektirane pomoću HPLC-a i koje čine ukupnu kiselost su jabučna i vinska kiselina. Limunska, mliječna i octena kiselina nisu detektirane. Rezultate dobivene HPLC-om potvrđuju rezultati papirne kromatografije (detektirana je prisutnost jabučne i vinske kiseline, a mliječna, limunska i octena nisu prisutne). Hlapljive kiseline su i pokazatelj kvalitete i zdravstvenog stanja grožđa, stoga se po rezultatima vidi da nije bilo aktivnosti octenih bakterija te da je vino zdravo.

Tijekom proizvodnje za vrijeme prvog pretoka je dodano 5 g kalijevog metabisulfita na 40 L vina. Utvrđeno je da je udio slobodnog sumpora u vinu 6,5 mg/L, a ukupnog 19,1 mg/L što je u skladu s Pravilnikom o proizvodnji vina Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva.

Glicerol je određivan pomoću enzimskog kita i HPLC metodom. Obje metode su prikazale sličnu vrijednost (5,67 g/L enzimski kit i 6,02 g/L HPLC) što se slaže sa propisanom granicom od minimalne koncentracije glicerola (> 5 g/L).

## 5. ZAKLJUČAK

Domaće rose vino proizvedeno 2016. godine kupažiranjem sorti Pinot sivi i Izabela sadržavalo je:

1. Veća prisutnost „viših“ alkohola, a manja estera ukazuje da se fermentacija odvijala pri višim temperaturama. Koncentracija estera se može povećati odležavanjem vina.  
78,66 mg/L acetaldehid  
10,32 mg/L propan-1-ol  
26,56 mg/L 2-metil-propan-1-ol  
101,35 mg/L 3-metil-butan-1-ol  
22,64 mg/L 2-metil-butan-1-ol  
93,05 mg/L etil-acetat  
0,73 mg/L isoamil acetat  
1,08 mg/L etil heksanoat  
butan-2-ol, etil butirat i 2-feniletilacetat nisu detektirani, a etil-oktanoat je ispod limita detekcije.
2. Vino ima 11,4 % (vol/vol) (aritmetička sredina) alkohola prema preciznijim metodama (HPLC i GC).  
10,29 % (vol/vol) alkohola (kemijskim metodama),  
13,21 % (vol/vol) alkohola (denzimetrijskom metodom),  
11,34 % (vol/vol) alkohola (HPLC),  
11,48 % (vol/vol) alkohola (GC).
3. Proizvedeno je suho vino (1,66 g/L neprevrelog šećera), te je fermentacija je provedena do kraja (nisu prisutne glukoza i fruktoza).
4. Koncentracija glicerola (5,85 g/L, prikazano kao aritmetička sredina rezultata dobivenih enzimskim kitom i HPLC-om), ukupnih (7,95 g/L) i hlapljivih (0,78 g/L) kiselina te ukupnog (19,1 mg/L) i slobodnog (6,5 mg/L) sumpora su unutar zakonskih okvira.
5. Analiza vina je pokazala da je proizvedeno domaće rose vino u skladu s Pravilnikom o vinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva.



## 6. LITERATURA

Anonimus 1,(2014)

<http://www.spectralabsci.com/Products/Default.aspx?productId=242&categoryId=11>, pristupljeno 13.6.2017.

Anonimus 2, (2009) <http://www.vinopedija.hr>, pristupljeno 13.6.2017.

Anonimus 3, (2004) <http://www.vinogradarstvo.com/preporuke-i-aktualni-savjeti/aktualni-savjeti-vinogradarstvo/berba-grozda>, pristupljeno 11.6.2017.

Anonimus 4, (2015) <http://prirodna.hr/stranice/kuharica/teme/Grozde---izabela>, pristupljeno 7.6.2017.

Fazinić, N., Milat, V. (1994) Hrvatska vina, Mladinska knjiga, Zagreb.

Grba, S. (2010) Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji, Plejada, Zagreb.

Henschke, P.A., Jiranek, V. (1993) Yeasts – metabolism of nitrogen compounds. In: Wine Microbiology and Biotechnology, G.H. Fleet (Ed.), Harwood Publishers, Chur, Switzerland (1993), 77-164.

Jackson, R.S. (1994) Wine Science, Academic Press, Californija, str. 178-212.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma – A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* **21**, Special Issue, 97-129.

Mirošević, N., Turković, Z. (2003) Ampelografski atlas, 1. izd., Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.

Nykänen, L. (1986) Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture* **37**, 84-96.

Orlić S., Jeromel A. (2010) Tehnologija vina. U: Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji (Grba, S., ured.), Plejada, Zagreb, str. 131-188.

Pravilnik o vinu (1996) *Narodne novine*, (NN 96/1996).

Pravilnik o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze (2012) *Narodne novine*, (NN 74/2012).

Simon, J. (2004) Velika knjiga o vinu, Profil International, Zagreb.

Thorngate, J.H. (1997) The physiology of human sensory response to wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **48**, 271-279.

Vas, GY., Koteleky, K., Farkas, M., Dobo, A., Vekey, K. (1998) Fast screening method for wine headspace compounds using solid-phase microextraction (SPME) and capillary GC technique. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 100-104.

Zakon o vinu (2003) *Narodne novine* **96**, (NN 96/2003).

## 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.*

---

ime i prezime studenta