

Fizikalno-kemijske karakteristike vina Pinot sivi baranjskog vinogorja

Škaljo, Irma

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:399855>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Irma Škaljo
0058219216

**FIZIKALNO-KEMIJSKE KARAKTERISTIKE VINA
PINOT SIVI
BARANJSKOG VINOGORJA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnološki aspekti proizvodnje vina

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

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Fizikalno-kemijske karakteristike vina Pinot sivi baranjskog vinogorja

Irma Škaljo, 0058219216

Sažetak: Cilj ovog završnog rada bio je odrediti fizikalno-kemijske karakteristike vina Pinot sivi, baranjskog vinogorja, podregije Hrvatsko Podunavlje, berba 2018. Pinot sivi podrijetlom je iz Burgundije, no široko je rasprostranjen diljem svijeta te se proizvodi u raznim vinogradarskim regijama. Vino je tamnije i dublje žućkaste boje te se najčešće proizvodi kao sortno vino zbog prirodno niske kiselosti i visokog udjela šećera u bobicama. Miris je intenzivan, pretežno voćnog karaktera, obiluje aromama banane, kruške i jabuke, iza čega slijede herbalne note suhog bilja. Okus je pun i zaobljen, kiseline su blage, solidno snažan alkohol daje mu blago pikantnu notu, a bogat ekstrakt produžuje okus. U analiziranom vinu određen je udio etanola, koncentracija neprevrelog šećera, slobodnog, vezanog i ukupnog sumpora te hlapljivih i ukupnih kiselina. Papirnom kromatografijom utvrđena je prisutnost vinske, jabučne, limunske i mliječne kiseline, a HPLC-om su određene su koncentracije glukoze, fruktoze, jabučne, vinske, limunske kiseline, etanola i glicerola. Svi analizirani parametri nalaze se unutar dopuštenih granica koje se određene zakonskom regulativom.

Ključne riječi: baranjsko vinogorje, bijelo vino, fizikalno-kemijske karakteristike, Pinot sivi

Rad sadrži: 28 stranica, 6 slika, 2 tablice, 22 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Datum obrane: 5. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology or Biotechnology or Nutrition

The physicochemical characteristics of Pinot Gris wine from Baranja vineyards

Irma Škaljo, 0058219216

Abstract: The aim of this undergraduate thesis was to determine the physicochemical characteristics of the Pinot gris wine from the Baranja vineyard, sub-region Croatian Danube, vintage 2018. Pinot gris originates from Burgundy, but is widely distributed throughout the world and is produced in various wine-growing regions. The wine has a darker and deeper yellowish colour and is most often produced as a varietal wine due to the naturally low acidity and high sugar content in the berries. The smell is intense, predominantly fruity, full of aromas of banana, pear and apple, followed by herbal notes of dried herbs. The taste is full and rounded, the acids are mild, solidly strong alcohol gives it a slightly spicy note, and the rich extract prolongs the taste. In the analysed wine, the proportion of ethanol, concentration of unfermented sugar, free, bound and total sulphur as well as volatile and total acids were determined. The presence of tartaric, malic, citric and lactic acid was determined by paper chromatography, and the concentrations of glucose, fructose, malic, tartaric, citric acid, ethanol and glycerol were determined by HPLC. All analysed parameters are within the permissible limits determined by legal regulations.

Keywords: Baranja vineyard, physicochemical characteristics, Pinot gris, white wine

Thesis contains: 28 pages, 6 figures, 2 tables, 22 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Vesna Zechner-Krpan, PhD / Full Professor

Thesis defended: 5th July, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. VINOGRADSKA PODRUČJA REPUBLIKE HRVATSKE	2
2.1.1. REGIONALIZACIJA VINOGRADSKIH PODRUČJA HRVATSKE	2
2.1.2. HRVATSKO PODUNAVLJE	3
2.1.3. BARANJSKO VINOGORJE	3
2.2. PINOT SIVI	3
2.2.1. POVIJEST I RASPROSTRANJENOST	3
2.2.2. BOTANIČKA OBILJEŽJA	4
2.2.3. KARAKTERISTIKE VINA PINOT SIVI	5
2.3. PROIZVODNJA BIJELOG VINA	6
2.3.1. BERBA GROŽĐA	6
2.3.2. RUNJENJE – MULJANJE	7
2.3.3. CIJEĐENJE MASULJA	8
2.3.4. PREŠANJE	8
2.3.5. SUMPORENJE	8
2.3.6. BISTRENJE MOŠTA	9
2.3.7. ALKOHOLNA FERMENTACIJA	9
2.3.8. NJEGA I DORADA VINA	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. KEMIKALIJE	14
3.1.2. APARATURE	15
3.2. METODE	15
3.2.1. ODREĐIVANJE SUMPOROVOG DIOKSIDA	15
3.2.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ŠEĆERA RS-METODOM	16
3.2.3. ODREĐIVANJE ALKOHOLA KEMIJSKOM METODOM	17
3.2.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH KISELINA U VINU	18
3.2.5. ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH KISELINA U VINU	19
3.2.6. ODREĐIVANJE JABUČNE I VINSKE KISELINE PAPIRNOM KROMATOGRAFIJOM	19
3.2.7. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI	20

4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. KEMIJSKA ANALIZA VINA	22
4.2. PAPIRNA KROMATOGRAFIJA	22
4.3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)	23
4.4. RASPRAVA	24
5. ZAKLJUČCI.....	26
6. POPIS LITERATURE.....	27

1. UVOD

Prema Zakonu od vinu (NN 32/2019) vino je definirano kao poljoprivredni prehrambeni proizvod dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježega i za preradu u vino pogodnoga grožđa. Uzgoj vinove loze i umijeće spravljanja vina imaju dugu povijest koja seže nekoliko tisuća godina unatrag, a smatra se da potječe iz Male Azije. Feničani i Egipćani posvetili su posebnu pažnju uzgoju vinove loze i spravljanju vina, koristeći ga u vjerskim obredima i svečanostima, dok je za Grke i Rimljane poznato da su štovali bogove vina Dioniza i Bakha. Područje Hrvatske pružilo je iznimno povoljne klimatske i geografske uvjete za uzgoj vinove loze još u predrimskom razdoblju. Smatra se da su stanovnici primorskog dijela današnje Republike Hrvatske već tada uzgajali vinovu lozu i proizvodili vino. Antički izvori govore da su se aktivnosti vezane uz proizvodnju vina odvijale i u sjevernim krajevima Hrvatske, i to u rimskoj pokrajini Panoniji (Herjavec, 2019).

Pinot sivi, suho bijelo vino (berba 2018), je proizvod vinarije Kalazić te prema kakvoći spada u kategoriju vrhunsko vino. Vinarija prostorno pripada vinogorju Baranja, podregiji Hrvatsko Podunavlje. Pinot sivi podrijetlom je iz Burgundije, no danas je široko rasprostranjen te se proizvodi u raznim vinogradarskim regijama diljem svijeta. Najčešće se proizvodi kao sortno vino zbog prirodno niske kiselosti i visokog udjela šećera u bobicama. Okusi i mirisi značajno variraju ovisno o regiji i stilu vina, međutim, uobičajene karakteristike uključuju arome kruške, jabuke, koštičavog i tropskog voća te note suhog bilja.

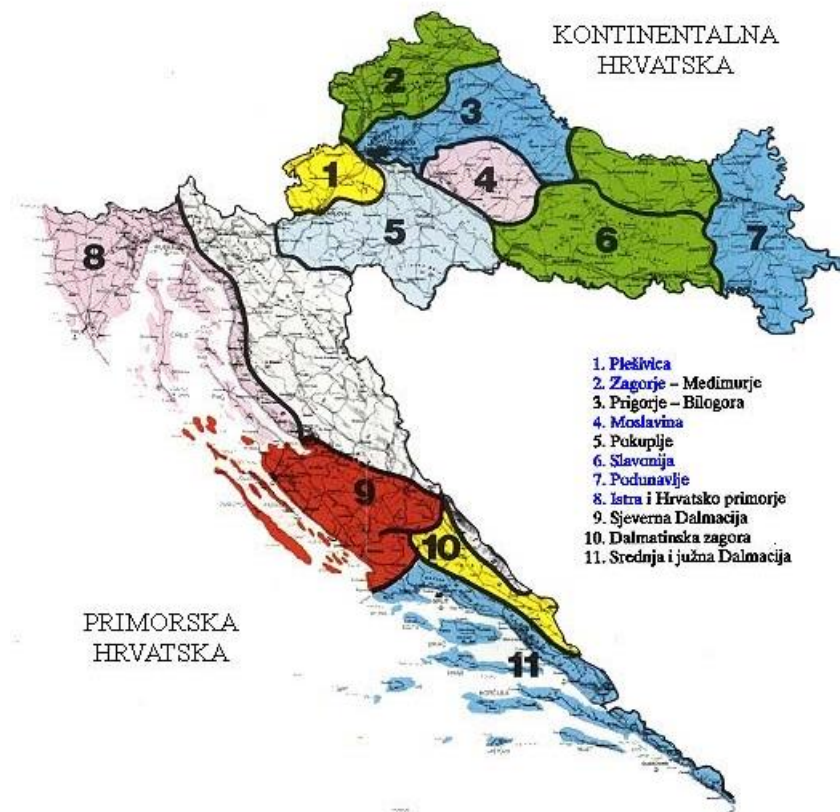
U ovom radu napravljena je analiza fizikalno-kemijskih parametara vina Pinot sivi baranjskog vinogorja. Korištenjem laboratorijskih kemijsko-analitičkih metoda, analizirani su sljedeći parametri: koncentracija slobodnog i vezanog te ukupnog sumpora, koncentracija šećera, volumni postotak alkohola, koncentracija ukupnih i hlapljivih kiselina. Nadalje, primjenom HPLC analize određene su koncentracije glukoze, fruktoze, glicerola, etanola te jabučne, vinske i limunske kiseline.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Vinogradska područja Republike Hrvatske

2.1.1. Regionalizacija vinogradskih područja Hrvatske

Za svako geografsko područje uzgoja vinove loze karakteristične su određene klimatske (temperatura, oborine, kretanje vjetra) i geomorfološke prilike (sastav tla, nagib terena) koje utječu na kvalitetu grožđa i kakvoću budućega vina (Maletić i sur., 2015). Osim navedenog, na kvalitetu konačnog proizvoda također utječu i izbor podloge, tradicija karakteristična za određeno područje, sorta te tehnologija proizvodnje (Mirošević, 1996). Prema Pravilniku o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze (NN 76/19), područje Republike Hrvatske podijeljeno je na zone, regije, podregije i vinogorja te se navedena podjela temelji na administrativnim granicama gradova i općina utvrđenim u skladu s posebnim propisom kojim se uređuju područja županija, gradova i općina u Republici Hrvatskoj. Područje Republike Hrvatske dijeli se na 4 vinogradske regije: Slavonija i hrvatsko Podunavlje, Središnja bregovita Hrvatska, Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija. Navedene vinogradske regije podijeljene su na podregije (Slika 1).



Slika 1. Vinogradarske podregije Republike Hrvatske (Anonimus 1)

2.1.2. Hrvatsko Podunavlje

Hrvatsko Podunavlje vinogradska je podregija na istoku Hrvatske koju karakterizira izuzetno plodno tlo i ravničarski reljef. Većina vinograda nalazi se na obroncima planina, na nadmorskim visinama od 100 m (okolica Vukovara) do 240 m (obronci Erdutskog, Baranjskog i Banskog brda te Fruške gore) (Maletić i sur., 2015). Prema Pravilniku o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze (NN, 76/19), podregija Hrvatsko Podunavlje podijeljena je na vinogorje Srijem, vinogorje Erdut i vinogorje Baranja. Najčešće korištena podloga u ovoj podregiji je Kober B55, a nastala je kao rezultat križanja američkih vrsta *Vitis berlandieri* i *Vitis riparia*. Ovu podlogu karakterizira relativno kratak vegetacijski ciklus te izvrsna otpornost na različite vrste tla (Kojić, 2020).

2.1.3. Baranjsko vinogorje

Baranjsko vinogorje smješteno je na obroncima Banske Kose ili Banovog Brda visokog 241 m. Blizina rijeke Dunav doprinosi plodnosti tla i osigurava povoljnu mikroklimu koja oblikuje kvalitetu vinove loze i vina. Na osnovu izuzetnih uvjeta za uzgoj vinove loze, Banska kosa još je prije 2000 godina privukla pažnju Rimljana koji su je nazvali "Mons aureus" ili Zlatno brdo. Ova titula je 1000 godina kasnije potvrđena od strane Nijemaca koji su ovo područje nazvali Goldberg, ističući time iznimne uvjete za proizvodnju vrhunskih vina. Banska kosa uzvisina je duga oko 21 kilometra i široka 5 kilometara, smještena na području između Belog Manastira i Batine (Predojević, 2016). Vinogradi vinarije Kalazić leže na obroncima Banske kose, na nadmorskoj visini između 180 i 200 m. Tlo u Baranjskom vinogorju karakterizira visoka propusnost i značajan udio pijeska, što čini izvrsnu podlogu za proizvodnju vina s izrazito mineralnim profilom. Klima u ovom području podliježe oscilacijama između minimalnih zimskih i maksimalnih ljetnih temperatura. Zimske temperature nerijetko dosežu do -20 °C, dok ljetne temperature mogu narasti i do 40 °C (Anonimus 2).

2.2. Pinot sivi

2.2.1. Povijest i rasprostranjenost

Pinot sivi široko je rasprostranjena vrsta vinove loze koja se smatra mutacijom Pinota crnog. Svrstava se bijelim vinovim lozama vrste *Vitis vinifera*. S obzirom da su prvi tragovi postojanja vinove loze vrste Pinot datirani na prije 2000 godina, u navedenom vremenskom razdoblju

događale su se brojne mutacije unutar ove sorte rezultirajući vrstama Pinot Noir, Pinot Gris, Pinot Blanc, Pinot Meunier, Pinot Noir Précoce i Pinot Teinturier. Analizom DNA otkriveno je da svi navedeni tipovi Pinota imaju isti genetski otisak kada se analizira standardni set od osam DNA markera, što ukazuje na činjenicu da se radi o različitim mutacijama zajedničkog pretka. Podrijetlo Pinota sivog datira još iz antičkih vremena, a prvi spisi o ovoj sorti potječu iz Burgundije u Francuskoj. Pinot sivi prvi se put spominje pod nazivom „Fourmenteau“ ili „Fromenteau“ u srednjem vijeku. Kasnije se proširio na područje Alsacea u Francuskoj, gdje je postao iznimno popularan. U Alsaceu je poznat pod nazivom "Tokay d'Alsace" zbog svoje sličnosti u boji s mađarskim vinom Tokay (Robinson i sur., 2012). Iz Francuske ga je navodno početkom 18. stoljeća prenio trgovac Ruland Speyer, odakle se rasprostranio i u ostale zemlje umjerene klime. Pinot sivi danas je zastupljen u svim vinorodnim regijama svijeta, od kojih su najznačajnije Italija, Njemačka, Švicarska, Sjedinjene Američke Države, Australija i Novi Zeland. U Italiji je poznat pod nazivom „Pinot Grigio“, dok se u Njemačkoj često koristi naziv „Grauburgunder“ ili „Ruländer“ (Mirošević i Turković, 2003).

2.2.2. Botanička obilježja

Cvijet ove biljke je dvospolan, što znači da ima muške i ženske dijelove. Odrasli list je srednje veličine, okruglastog oblika i obično se sastoji od tri dijela. Peteljka lista ima uski, šiljasti ili oblik lire, a ponekad je preklopljena. Gornji sinusi lista su uski, plitki i nejednako urezani, dok donji sinusi obično nisu prisutni ili su slabo izraženi. Lice lista je glatko, dok je naličje rijetko prekriveno paučinastim dlačicama u čupercima. Površina lista je neravna i hrapava. Zupci na rubu lista su nejednaki, sitni, uglasti, pri čemu su glavni zupci obično duži i uži. Lice lista ima tamnozelenu boju, dok je naličje svjetlije zelene boje. U jesen list dobiva žućkastu boju, što ga razlikuje od Pinota crnog. List je debeo, a peteljka kratka i debela te ima crvenkastu boju. Zreli grozdovi su srednje veličine, gusto raspoređeni i imaju valjkasti oblik. Peteljka grozda je kratka, debela i crvenkasta. Zrele su bobice malene, bakrenastocrvene boje s blagom sivkastom prevlakom. Mogu biti duguljaste ili okruglaste, a zbog gustoće grozda često mogu biti deformirane. Kožica bobice je tanka, dok je meso sočno i sok ima sladak okus s finim sortnim okusom. Rozgva je srednje dužine i poprilično tanka. Članci su srednje dugi do kratki, a kora je tamno crvenosmeđe boje, blago ljubičasto oprášena, s čađavim mrljama i točkama (Slika 2). U područjima sjevernije klime Pinotu sivom odgovaraju plodnija, duboka tla na nižim položajima, a u južnijim područjima manje plodna tla na višim položajima. Pupa kasno te

dozrijeva u drugom razdoblju. Rodnost mu je poprilično mala te otpornost prema smrzavicama srednja. Truljenje grožđa često je u kišnim jesenima. U usporedbi s drugim sortama, pokazuje najviše sadržaje šećera (Mirošević i Turković, 2003).



Slika 2. Pinot sivi (Mirošević i Turković, 2003)

2.2.3. Karakteristike vina Pinot sivi

Vino Pinot sivi obično sadrži 10,7 – 12,5 vol % alkohola; 5,5 – 8,5 g/L ukupnih kiselina; 18,5 – 28,3 g/L ukupnog ekstrakta i 5,7 – 12,6 g/L glicerola. Vino je svijetložute do svijetloružičaste boje, punog i harmoničnog okusa. Karakteriziraju ga izražene sortne arome na orah, dim i račvu (Zoričić, 2011). Vinarija Kalazić za vino analizirano u ovom radu (Slika 3.) navodi da je vino toplog i zrelog karaktera te naglašene punoće, kojoj uz snažan alkohol ponajviše doprinosi obilan ekstrakt. Također, analizirano vino karakterizira miris na voćne arome kontinentalnog voća poput jabuka, banana i krušaka (Anonimus 2).



Slika 3. Vino Pinot sivi vinarije Kalazić baranjskog vinogorja, 2018 (vlastita fotografija)

2.3. Proizvodnja bijelog vina

2.3.1. Berba grožđa

Proizvodnja vina započinje berbom grožđa. Rane se sorte obično beru početkom rujna, dok se glavna berba izvršava u drugoj polovici rujna. Kod proizvodnje laganih bijelih svježih vina berba započinje 8 – 10 dana prije pune zrelosti grožđa. Uspješnost berbe znatno ovisi o meteorološkim prilikama. Na područjima s dugim, toplim i suhim jesenima, grožđe je bolje kvalitete, dok kiše mogu negativno utjecati na kvalitetu grožđa, smanjujući ju čak do 50 %. Više kiše dovodi do povećane količine vode u grozdu, razrjeđujući šećer i uzrokujući pucanje kože, što stvara povoljne uvjete za sivu plijesan (*Botrytis cinerea*). Ova vrsta plijesni šteti cijelom grozdu, smanjuje prinos, povećava udio peteljkovine i prisutnost štetnih mikroorganizama u grožđu, što rezultira većom količinom oksidacijskih enzima u moštu i kasnije u vinu. Mošt takvog grožđa mora se odmah obraditi jakim sumporenjem i taloženjem. U toplim i suhim uvjetima sazrijevanja grožđa ista se gljivica razvija kao "plemenita plijesan" koja doprinosi visokoj kvaliteti vina. Plemenita plijesan potiče isparavanje vode iz bobica, smanjuje kiselost i povećava koncentraciju šećera, što vinu daje posebnu aromu. Tijekom berbe, trule i bolesne grozdove treba odvojiti i obraditi odvojeno. Bitno je da se berba obavi u doba dana kada temperature nisu previsoke kako bi se spriječilo zagrijavanje grožđa, te se stoga

ona obavlja u jutarnjim satima.

Grožđe se bere u sanduke kapaciteta 20 – 30 kg kako bi ostalo neoštećeno i dalo visokokvalitetno vino jake arome. Također je važno da se prijevoz grožđa s vinograda do podruma obavi što je moguće brže kako bi se spriječile nepoželjne promjene uzrokovane prisutnošću kisika, kao što je posmeđivanje grožđa zbog oksidacije fenolnih spojeva.

Za određivanje pravog vremena berbe, ključni su sadržaj šećera i ukupnih kiselina u grožđu te njihov odnos. Mjerenje šećera i kiselina u grožđu započinje 15 dana prije očekivanog roka berbe i nastavlja se svakodnevno. Berba se vrši kada se utvrdi stagnacija sadržaja šećera tijekom 1 – 2 dana. Takav stupanj zrelosti grožđa naziva se tehnološkom zrelošću. Za bijele sorte preporučljivo je berbu obaviti nekoliko dana prije stagnacije razine šećera u bobici, što posebno vrijedi za sorte s nižim ukupnim kiselinama (Zoričić, 2011).

2.3.2. Runjenje – muljanje

Strojevi za runjenje i muljanje grožđa prema redoslijedu radnji nazivaju se runjače-muljače ili muljače-runjače (Slika 4). Runjenje je tehnološka operacija kojom se peteljkovina odvaja od bobica, kako bi se spriječilo ekstrahiranje neželjenih komponenti iz peteljkovine u mošt. Za dobivanje masulja grožđe se nekada gnječilo ili muljalo nogama, a isti se postupak danas primjenjuje pomoću muljače bez odvajanja peteljki. Moderni strojevi koriste kombinaciju muljače i runjače koja se sastoji od koša za prihvat grožđa, rupičastog valjka za odvajanje bobica od peteljkovine te valjaka za muljanje (Herjavec, 2019). Muljanje je operacija koja za cilj ima otvaranje bobice grozda i oslobađanje soka ispod pokožice (Boulton i sur., 1996). Ovim mehaničkim postupkom dolazi do prvog kontakta kisika sa sokom prilikom čega enzimi grožđa kataliziraju određene biokemijske reakcije kojima nastaju novi spojevi. Bitno je da kod muljanja ne dođe do oštećenja sjemenki jer bi to uzrokovalo ekstrakciju taninskih spojeva koji su nepoželjni u bijelim vinima. Također, stanice kože nakon ovog postupka moraju ostati cijele, to jest ne smije doći do njihovog usitnjavanja (Herjavec, 2019).



Slika 4. Električna muljača – runjača (Anonimus 4)

2.3.3. Cijeđenje masulja

Nakon postupka runjenja-muljanja na košu preše vrši se ocjeđivanje masulja bez primjene povišenog tlaka te se ovim postupkom dobiva najkvalitetnija frakcija mošta – samotok. Samotok se najčešće koristi za proizvodnju bijelih vina vrhunske kvalitete, s obzirom da sadrži najmanje taninskih i ostalih spojeva ekstrahiranih iz krute faze masulja (Herjavec, 2019).

2.3.4. Prešanje

Prešanje ili tiještenje postupak je kojim se uz pomoć primjene visokog tlaka istisne sok iz masulja ili komine. Vršiti se primjenom mehaničkih ili kontinuiranih preša. Prilikom tiještenja masulja bijelog grožđa pomoću mehaničkih preša potrebno je obaviti određeni broj rastresanja. Ukoliko se ne vrši rastresanje, povećanje pritiska ne dovodi do značajnog povećanja količine dobivenog mošta (Zoričić, 2011). Frakcija mošta koja se dobije prešanjem naziva se prešavina te ona čini 10 – 40 % od ukupne količine mošta. Obično je lošije kvalitete od samotoka te ju je potrebno zasebno skladištiti. Ima višu pH vrijednost u odnosu na samotok, manju ukupnu kiselost, veću hlapljivu kiselost i veći sadržaj fenolnih spojeva te zbog toga vina dobivena njenom fermentacijom nerijetko imaju gorak i trpak okus (Herjavec, 2019).

2.3.5. Sumporenje

Mošt bijelog vina potrebno je sumporiti nakon ocjeđivanja samotodne i prešavinske frakcije kako bi se inhibirao rast mikroorganizama koji su s kožice grožđa dospjeli u mošt i kako bi se spriječio oksidativni postupak koji izaziva posmeđivanje. Bitno je da se postupak sumporenja

provede pravodobno i u optimalnoj količini. Količina sumporovog dioksida potrebna za sumporenje ovisi o sadržaju šećera, pH vrijednosti i temperaturi mošta te ju je potrebno eksperimentalno odrediti. Ukoliko se radi o zdravom grožđu, koncentracija SO₂ ne bi trebala prelaziti 100 mg/L. Iznimka je mošt koji sadrži visoke koncentracije šećera, grožđe koje je dugo čekalo na preradu i koje je obrano u toplijim jesenima, kada je obično potrebno upotrijebiti više od 100 mg/L (Herjavec, 2019). Mošt koji potječe od pljesniva grožđa obično nakon sumporenja pokazuje nizak sadržaj slobodnog i visok sadržaj ukupnog sumporovog dioksida. Zbog toga se preporučuje prethodna pasterizacija kako bi se inaktivirali enzimi koji to uzrokuju (Šantek, 1996).

2.3.6. Bistrenje mošta

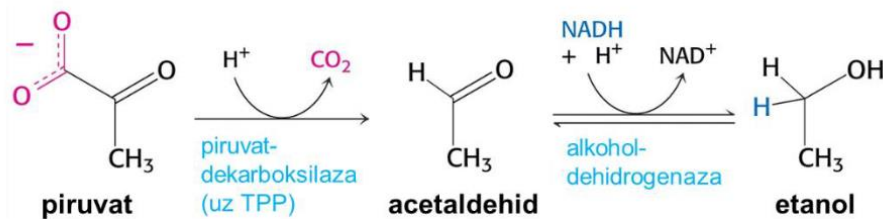
Nakon sumporenja sljedeći korak u proizvodnji vina je bistrenje mošta. Ovaj se postupak provodi stacionarnim taloženjem, a dodatno se može provoditi i dodatkom bistrila poput bentonita. Mošt je potrebno što prije ohladiti kako bi se odgodio početak alkoholne fermentacije i inhibirali oksidacijski enzimi. Postupku bistrjenja također pridonosi prethodno sumporenje zbog koagulacijskog djelovanja SO₂, što rezultira taloženjem proteina. Nakon 3 – 4 sata taloženja istaloži se gruba mutnoća, a nakon 24 – 32 sata istalože se i najfinije čestice. Bitno je da mošt nije previše bistar – taloženje ne smije biti dulje od 32 sata jer se tada javljaju problemi s pokretanjem fermentacije (Herjavec, 2019).

2.3.7. Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija ključni je korak u proizvodnji vina za koji su zaslužni autohtoni ili inokulirani kvasci, a od njih su najznačajniji kvasci iz roda *Saccharomyces*. Kvasci koji se nalaze u moštu za fermentaciju mogu potjecati s površine grožđa, s opreme vinarije ili se može raditi o inokuliranim selekcioniranim sojevima. Najzastupljenije vrste kvasaca koje se nalaze na grožđu su *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stellata* i *Candida pulcherrima*, dok su kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus* obično zastupljeni u manjim koncentracijama (Zechner-Krpan, 2017).

Pojam alkoholna fermentacija biokemijski podrazumijeva anaerobnu mikrobnu konverziju šećera iz mošta u etanol i CO₂. Osim etanola i ugljikova dioksida, kao nusprodukti alkoholne fermentacije nastaju i drugi spojevi poput glicerola, octene, jantarne kiseline i drugih organskih

kiselina. Fermentabilni šećeri iz mošta uključuju se u glikolizu u stanici kvasca te se u nizu reakcija razgrade do piruvata. U anaerobnim uvjetima piruvat se dekarboksilira do acetaldehida pomoću enzima piruvat dekarboksilaza te nadalje slijedi redukcija acetaldehida u etanol, pri čemu se NADH oksidira u NAD⁺ (Slika 5).



Slika 5. Prikaz anaerobne razgradnje piruvata u etanol (Berg i sur., 2013)

Svaka alkoholna fermentacija ima 2 faze koje se vizualno mogu uočiti: burna i tiha fermentacija (Ribereau-Gayon i sur., 2006). Burna fermentacija događa se na početku pri visokim koncentracijama šećera te je lako uočljiva zbog pojave pjene i šuma uzrokovanog pojačanim nastajanjem ugljikova dioksida. Tijekom burne fermentacije razgradi se najviše šećera te nastaje etanol i različiti hlapljivi spojevi. Dolazi do naglog povišenja temperature te je zbog toga potrebno kontinuirano praćenje temperature i hlađenje ako se temperatura približi kritičnoj (28 - 30 °C). Ova faza fermentacije obično traje 3 - 7 dana nakon čega dolazi do smirenja fermentacije te se ta faza zove tiha fermentacija ili doviranje. Karakterizira ju sniženje temperature i smanjenje brzine oslobađanja CO₂. Nastavlja se razgradnja ostatka neprevrelog šećera te dolazi do laganog taloženja kvasaca, tartarata, proteina i grubih čestica mutnoće. Doviranje može trajati i do mjesec dana, a kod predikatnih vina još dulje (Herjavec, 2019).

Idealna temperatura za fermentaciju bijelih moštova kreće se između 16 - 22 °C, pri čemu je optimalna temperatura 18 °C. Tijekom alkoholne fermentacije oslobađa se toplinska energija te je stoga potrebno spriječiti prekomjerni porast temperature hlađenjem. Ukoliko temperatura dostigne 35 - 40 °C, postoji opasnost od zastoja fermentacije, gubitka hlapljivih tvari arome i alkohola te također može doći do pojave jakog pjenjenja i razlijevanja vina. Visoke temperature fermentacije rezultiraju vinima lošije kvalitete te je moguće razvijanje nepoželjnih mikroorganizama. Fermentaciji također ne odgovaraju ni niske temperature manje od 10 °C.

Kako bi se održavala optimalna temperatura, tijekom fermentacije upotrebljavaju se izmjenjivači topline. To su uređaji koji omogućuju hlađenje ili zagrijavanje mošta, a mogu biti u obliku zmijskih bakrenih cijevi kroz koje prolazi rashladna tekućina ili u obliku paralelnih cijevi smještenih vodoravno jedna iznad druge. Fermentacija može biti spontana ili inokulirana. Spontanu fermentaciju vrše kvasci koji se nalaze na površini grožđa ili na opremi vinarije. Različiti autohtoni sojevi nisu prisutni u jednakim koncentracijama tijekom cijelog procesa spontane fermentacije, već rastu sukcesivno, u izravnoj ovisnosti o koncentraciji šećera i etanola. Na početku fermentacije dominira kvasac *Hanseniaspora uvarum* koji proizvodi prve količine etanola (4 - 5 vol %). Također, ovaj kvasac podnosi vrlo visoke početne koncentracije šećera u moštu. Nakon što etanol prijeđe 5 vol %, fermentaciju obično preuzima *Candida stellata* koja tolerira niže koncentracije šećera i etanol do 10 vol %. Fermentaciju iznad 10 vol % alkohola provodi kvasac *S. cerevisiae* koji može podnijeti do 15 vol % etanola. Kod inokulirane fermentacije koriste se starter-kulture selekcioniranih kvasaca. Tu se najčešće radi o sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji se nacjepljuju u točno određenoj koncentraciji (Ribereau-Gayoun i sur., 2006).

Upravljanje fermentacijom može se postići vođenjem hladne, hlađene i fermentacije iznad četiri. Hladna se fermentacija provodi pri niskim temperaturama te je za nju potrebno koristiti tzv. krio-kvasce. U praksi se najčešće provodi hlađena fermentacija kod koje se hlađenje može provoditi orošavanjem posuda te korištenjem fermentacijskih posuda s dvostrukim stijenkama između kojih protječe rashladna tekućina. Fermentacija iznad četiri temelji se na dodavanju vina u mošt prije početka fermentacije tako da sveukupni udio alkohola u moštu iznosi 5 vol % (Herjavec 2019). Pri navedenom udjelu alkohola dolazi do ugibanja divljih kvasaca, posebno kvasca *Kloeckera apiculata* te razgradnju šećera uglavnom nastavljaju kvasci iz roda *Saccharomyces* (Ribereau-Gayon i sur., 2006).

2.3.8. Njega i dorada vina

Nakon završene alkoholne fermentacije slijede postupci dorade i njege koji obuhvaćaju nadolijevanje, pretakanje, sumporenje i stabilizaciju vina (Herjavec, 2019).

2.3.8.1. Nadolijevanje

Nadolijevanje je postupak koji se vrši odmah nakon završetka burne fermentacije kako bi se

smanjila izloženost vina kisiku i razmnožavanje nepoželjnih mikroorganizama u vinu. Posude u kojima se nalazi vino zbog toga uvijek moraju biti do vrha pune te se nadolijevanje također vrši i tijekom dozrijevanja vina zbog ishlapljivanja. Hlapljenje je najjače u malim hrastovim bačvama, dok je najslabije ako se vino čuva u velikom posuđu od inoksa. Osnovno pravilo kod nadolijevanja je da se ono vrši s istovrsnim ili sličnim zdravim vinom (Herjavec, 2019).

2.3.8.2. Pretakanje

To je postupak koji se vrši nakon što su se istaložile čestice mutnoće kako bi se postiglo bistrenje vina. Talog koji se dobije sedimentacijom sastoji se od izumrlih stanica kvasaca, kristala tartarata, soli teških metala i proteina. Prvi pretok može biti otvoren, uz pristup zraka kako bi se omogućilo hlapljenje viška CO₂, ili zatvoren uz što manji pristup zraka u slučaju da se radi o vinu sklonom posmeđivanju. Treći pretok i nadalje su uglavnom zatvoreni pretoci pomoću crpki. Kako bi se ustanovilo treba li se vino prvi put pretakati otvoreno ili zatvoreno, radi se test na posmeđivanje. Test se provodi tako da se vino iz svake posude ostavi stajati preko noći u poklopljenoj čaši. Ako dođe do promjene boje vina od vrha prema dnu, ono je sklono posmeđivanju i potrebno ga je pretočiti zatvoreno. Ako nije došlo do promjene boje, tj. do posmeđivanja, vino se može otvoreno pretočiti (Herjavec, 2019).

2.3.8.3. Sumporenje

Prvo sumporenje vina obavlja se nakon alkoholne fermentacije po odvajanju vina od grubog taloga kvasca, a posljednje pri punjenju vina u boce. U pravilu je bijela vina potrebno sumporiti više od crvenih (Šantek, 1996). Za vina s većom kiselosti, s više alkohola te za zdrava vina potrebno je upotrijebiti manje sumpora. Ukoliko se radi o vinima za malolaktičnu fermentaciju, njih se treba slabije sumporiti jer slobodni SO₂ ometa metabolizam malolaktičnih bakterija. Tijekom dozrijevanja vina potrebno je kontrolirati količinu slobodnog SO₂. Ona u velikoj mjeri ovisi o materijalu posuda u kojima vino dozrijeva. Drveno posuđe je poroznije te se više kisika otapa u vinu zbog čega je potrebna količina slobodnog sumporovog dioksida za vina dozrijevana u drvenom posuđu veća od količine koja je potrebna ako se rabi vinsko posuđe od inoksa (Herjavec, 2019).

2.3.8.4. Bistrenje

Nestabilnost i замуćenje vina uzrokuju kristalizirane soli vinske kiseline te koloidne čestice poput proteina, peptida, tanina i polisaharida. Stabilizacija vina postiže se primjenom bistrila, hlađenjem, filtriranjem te centrifugiranjem. Proces spontanog bistrenja vina bio bi iznimno dugotrajan te se zbog toga upotrebljavaju tvari koje potpomažu bistrenje. Bistrenje se vrši nakon prvog pretakanja vina. Bistrilo veže čestice mutnoće, dolazi do flokulacije, aglomeracije čestica i stvaranja taloga koji se pretakanjem odvaja od izbistrenog dijela vina (Boulton i sur., 1996). Neka od bistrila koja se upotrebljavaju su bentonit, kieselsol, želatina, bjelanjak od jajeta, tanini te aktivni ugljen. Stabilizacija hlađenjem provodi se 7 dana na temperaturi od -4 do -6 °C. Cilj hlađenja je kristalizacija tartarata, soli vinske kiseline. Pritom se u vino dodaju kristali vinskog kamena kao središte kristalizacije. Pred punjenje vina u boce dodaju se spojevi poput metavinske kiseline koji sprječavaju daljnje nastajanje kristala tartarata i замуćivanje vina (Zoričić, 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U ovom radu analizirano je bijelo vino Pinot sivi, berba 2018. godina, privatnog proizvođača Kalazić, vinogorja Baranja.

3.1.1. Kemikalije

- H_3PO_4 (25 %)
- H_2O_2
- Metilno crvenilo
- Metilno plavilo
- Etanol (96%)
- Fehling I (69,3 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)
- Fehling II (346 g/L K,Na-tartarata)
- 30%-tni KI
- 26%-tna H_2SO_4
- 1%-tna otopina škroba
- 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- 1%-tna otopina glukoze
- Destilirana voda
- 0,01, 0,1 i 1 M NaOH
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (33,834 g/L)
- 20%-tna otopina KI
- H_2SO_4 (konc.)
- Fenolftalein
- 0,1 % H_3PO_4
- octena kiselina
- n - butanol
- standardi za papirnu kromatografiju: jabučna, limunska i vinska kiselina (3 g/L)
- 10 %-tna otopina $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3.1.2. Aparature

- Laboratorijska aparatura za određivanje sumporovog dioksida
- Laboratorijska aparatura za određivanje šećera
- Laboratorijska aparatura za određivanje alkohola
- Laboratorijska aparatura za određivanje ukupnih kiselina
- Laboratorijska aparatura za određivanje hlapljivih kiselina
- Laboratorijska aparatura za određivanje jabučne, limunske i vinske kiseline pomoću papirne kromatografije
- HPLC uređaj, Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japan).

3.2. Metode

Sve analitičke metode korištene pri laboratorijskoj analizi opisane su u internom laboratorijskom priručniku Praktikum biotehnologija 3, Tehnologija vina (Zechner-Krpan i Petravić-Tominac, 2008).

3.2.1. Određivanje sumporovog dioksika

Priprema indikatora u otopini H₂O₂: 2 mL vodikovog peroksida doda se u 100 mL destilirane vode te se doda indikator po potrebi do pojave prljavo sivoplave boje (2 - 3 mL). Indikator je smjesa otopine A i B (100 mL A + 15 mL B).

Otopina A: 0,03 g metilnog crvenila u 100 mL 96 %-tnog alkohola

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

Određivanje slobodnog sumporovog dioksida (20 minuta bez grijanja)

U tikvicu za kuhanje otpipetira se 10 mL analiziranog vina i 5 mL 25 %-tne fosforne kiseline. U apsorpcijsku tikvicu doda se unaprijed pripremljeni reagens tako da razina tekućine bude do proširenog grla apsorpcijske tikvice. Otvori se dovod vode kroz hladilo te dovod vode u vakuum sisaljci do pojave mjehurića. Nakon 20 minuta apsorpcijska tikvica koja sadrži reagens se skida te se titrira s 0,01 M NaOH. Utrošeni volumen 0,01 M NaOH u mililitrima množi se s 32 kako bi se dobili mg slobodnog SO₂ po litri vina.

Određivanje vezanog sumpornog dioksida (10 minuta s grijanjem)

Nakon određivanja slobodnog sumpora mijenja se reagens u apsorpcijskoj tikvici te se vino zaostalo u tikvici za kuhanje zagrijava pomoću plamenika uz što manji plamen. Zagrijavanje se vrši 10 minuta te se nakon toga sadržaj apsorpcijske tikvice titrira s 0,01 M NaOH. Utrošeni mililitri 0,01 M NaOH ponovno se množe s 32 za izračun vezanog SO₂ u 1 litri vina.

Određivanje ukupnog sumpornog dioksida

Ukupni SO₂ dobije se zbrajanjem slobodnog i vezanog sumpornog dioksida. Također, moguće je izravno odrediti ukupni SO₂ u vinu tako da se pipetira 10 mL vina i 5 mL 25 %-tne H₃PO₄ te se odmah počinje zagrijevati do vrenja. Nakon toga se uključuje vakuumska sisaljka, a nakon 10 minuta se titrira. Potrošena količina 0,01 M NaOH pomnožena sa 32 daje masu ukupnog SO₂ u 1 litri vina. Pri tome se ne uzima u obzir slobodni SO₂.

3.2.2. Određivanje koncentracije šećera RS-metodom

Određivanje koncentracije šećera RS-metodom vrši se tako da se 5 mL uzorka prenese u okruglu tikvicu te se doda 20 mL destilirane vode. Nakon toga, dodaju se po 10 mL otopine A (Fehling I) i otopine B (Fehling II) te se kuha 2 minute u tikvici s okruglim dnom od 250 mL uz povratno hladilo. Nakon kuhanja, uzorak 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 te se doda 2 mL škroba (1 %-tna otopina) i titrira se s 0,1 M Na₂S₂O₃ do boje puti, koja se zadržava 1 minutu.

Kontrola se provodi pomoću glukoza testa koji se vrši tako da se uzme 5 mL 1 %-tne otopine glukoze i 20 mL destilirane vode (ukupan volumen 25 mL) i ponavlja gore opisani postupak. Slijepa proba provodi se uzimanjem 25 mL destilirane vode i ponavljanjem gore opisanog postupka.

Koncentracija šećera izračunava se pomoću formule:

$$RS = \frac{50 * (a - b)}{(a - c) * d}$$

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

3.2.3. Određivanje alkohola kemijskom metodom

Kemijska metoda određivanja alkohola temelji se na oksidaciji alkohola u kiseloj sredini uz pomoć kalijevog bikromata (K₂Cr₂O₇). Alkohol se oksidira u octenu kiselinu, dok se šesterovalentni krom iz kalijevog bikromata reducira u trovalentni krom.

Navedeni postupak oksidacije može se opisati kemijskom jednačinom:



Reagensi:

- 1) K₂Cr₂O₇ (33,834 g/l)
- 2) 0,1 M Na₂S₂O₃
- 3) 20 %-tna otopina KI
- 4) 1 %-tna otopina škroba
- 5) H₂SO₄ (konc.)

Opis postupka:

Prvi korak je razrjeđivanje vina u omjeru 1:10 tako da se u odmjernu tikvicu od 50 mL stavi 5 mL uzorka i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Zatim se uzme 5 mL razrijeđenog uzorka i stavi u tikvicu za destilaciju od 50 mL. U tikvicu se doda 5 - 6 mL destilirane vode i neutralizira se s 0,1 M NaOH uz univerzalni indikator.

Aparatura za destilaciju sastoji se od okrugle tikvice za destilaciju, hladila, lule i Erlenmeyerove tikvice koja je uronjena u rashlađenu vodu i u koju se hvata destilat. U Erlenmeyerovu tikvicu prije početka destilacije dodaje se 10 mL kalijevog bikromata i 5 mL koncentrirane sumporne kiseline. Destilacija se provodi do smanjenja volumena uzorka u tikvici za destilaciju do približno 3 mL. Lulu je nakon završetka destilacije potrebno isprati s nekoliko mlazova destilirane vode u Erlenmeyerovu tikvicu u koju se hvatao destilat, sadržaj tikvice promućkati i začeptiti tikvicu gumenim čepom.

Začepljena Erlenmeyerova tikvica ostavi se stajati 5 minuta kako bi došlo do potpune

oksidacije alkohola. Pritom se jedan dio kalijeveg bikromata troši za oksidaciju alkohola, dok drugi dio ostaje u suvišku. Nakon 5 minuta sadržaj Erlenmeyerove tikvice od 100 mL prebaci se kvantitativno u veću Erlenmeyerovu tikvicu od 500 mL te se doda 200 mL destilirane vode i 10 mL 20 %-tne otopine kalijeva jodida. Potrebno je ostaviti začepljenu tikvicu 5 minuta kako bi se provela oksidoredukcijska reakcija. Kalijev jodid dodaje se kako bi se odredio preostali suvišak kalijeveg bikromata zaostalog nakon oksidacije alkohola. Pri tome se krom iz kalijeva bikromata reducira iz šesterovalentnog oblika u trovalentni, a jod iz kalijeveg jodida se oksidira u elementarni jod. Količina oslobođenog elementarnog joda ekvivalentna je količini kalijeveg bikromata. Oslobođeni elementarni jod određuje se oksidoredukcijskom titracijom otopinom 0,1 M natrijevog tiosulfata pri čemu se jod reducira, a tiosulfat oksidira. Indikator koji se koristi tijekom titracije je 1 %-tna otopina škroba (prije titracije potrebno je dodati 5 mL). Titracija se provodi do pojave tirkizno-zelene boje koja se pojavljuje kad su potrošene zadnje količine elementarnog joda.

Količina alkohola u uzorku vina izračunava se prema formuli:

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

pri čemu je a = utrošak 0,1 M otopine Na₂S₂O₃.

3.2.4. Određivanje ukupnih kiselina u vinu

Određivanje ukupnih kiselina u vinu zasniva se na principu neutralizacije svih slobodnih organskih i anorganskih kiselina i njihovih soli te drugih kiselih tvari s otopinom natrijeva hidroksida, iz čijeg se utroška izračuna količina ukupnih kiselina. Količinu ukupnih kiselina potrebno je izraziti u jednoj od kiselina koje se nalaze u vinu. U ovoj metodi ukupna kiselost izražena je kao vinska kiselina u g/L. Prije analize baždari se pH-metar. Potom se trbušastom pipetom uzme 25 mL uzorka vina i stavi u laboratorijsku čašu od 100 mL te se odredi pH. Vino je prije titracije potrebno zagrijati do vrenja kako bi se uklonio CO₂ i dobro ohladiti. Titracija se vrši s 0,1 M NaOH uz pH-metar do pH 7.

Masena koncentracija ukupnih kiselina izražena kao vinska kiselina računa se prema formuli:

$$\gamma = V * 0,3 * f$$

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 0.1 M NaOH odgovara 0,3 g/L vinske kiseline.

3.2.5. Određivanje hlapljivih kiselina u vinu

Pod hlapljive kiseline u vinu spadaju octena, mravlja, propionska i maslačna kiselina. Od navedenih kiselina najzastupljenija je octena kiselina čiji udio iznosi 95 - 99 %. Vrelište octene kiseline je na 118 °C, što znači da isparava sporije nego alkohol i voda. Količina hlapljivih kiselina u vinu najčešće se kreće između 0,4 - 0,8 g/L izraženo u octenoj kiselini. Ako koncentracija prijeđe 0,8 g/L, postoji sumnja da je došlo do oksidacije zbog aktivnosti bakterija mliječne ili octene kiseline. Hlapljive kiseline prevode se destilacijom vina u destilat, a zatim neutraliziraju otopinom natrijevog hidroksida, iz čijeg utroška se izračuna količina hlapljivih kiselina.

Postupak: Trbušastom se pipetom uzme 5 mL uzorka, stavi se u tikvicu kruškastog oblika i doda 1 mL 25 % H₃PO₄. Za vrenje vode u Erlenmeyerovoj tikvici treba ubaciti nekoliko komadića porozne gline ili staklene kuglice. U Erlenmeyerovu tikvicu u koju se hvata destilat doda se 50 mL destilirane vode te se destilacija vrši do podizanja razine tekućine u Erlenmeyerovoj tikvici na 60 mL. Destilat se zatim zagrije do početka vrenja i titrira uz fenolftalein s 0,1 M natrijevim hidroksidom.

Izračunavanje:

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

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.

3.2.6. Određivanje jabučne i vinske kiseline papirnom kromatografijom

Na kromatografskom papiru Whatman No 1, izrezanom na dimenzije 55 x 192 mm, 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 (standardi sadrže 3 g/L jabučne, limunske i vinske kiseline), odnosno uzorka vina. Pri rukovanju s kromatografskim papirom koriste se kirurške rukavice. Uzorak,

odnosno standardi, nanose se kap po kap te se nakon svakog nanošenja mrlje suše fenom tako da njihov promjer bude maksimalno 3 mm. Nakon nanošenja i sušenja, radi razvijanja 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

Kromatogram se razvija 2 - 3 sata, nakon čega se grafitnom olovkom označi fronta otapala prije početka sušenja kromatograma. Nakon toga kromatogram se suši na zraku, zatim se uranja u otopinu indikatora te ponovno suši na zraku. Na temelju položaja mrlja na kromatogramu u odnosu na poznatu smjesu standarda izračunavaju se R_f vrijednosti prema izrazu:

$$R_f = \frac{\text{Udaljenost sredine mrlje od starta}}{\text{Udaljenost fronte otapala od starta}}$$

Priprema smjese za razvijanje kromatograma: Smjesa octene kiseline, n-butanola i destilirane vode stavlja se u lijevak za odjeljivanje i promućka, a kao razvijlač 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 u odmjernejoj tikvici od 100 mL te se doda 2 - 3 kapi 1 M NaOH za postizanje lagano lužnate otopine.

3.2.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Moderna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) evoluirala je iz kolonske kromatografije povećanjem aktivne površine adsorbensa. HPLC sustav sastoji se od injektora za unos uzorka, sisaljke s kontroliranim protokom mobilne faze, kolone, detektora, jedinice za obradu podataka i pisača. Princip rada HPLC uređaja temelji se na tlačenju mobilne faze pomoću visokotlačne pumpe kroz kolonu u kojoj se nalazi stacionarna faza. Brzina kojom pojedine komponente prolaze kroz kolonu

razlikuje se ovisno o svojstvima stacionarne i mobilne faze, kao i o svojstvima samih komponenata. Vrijeme koje je potrebno određenoj komponenti da prođe kroz kolonu i stigne do detektora naziva se vrijeme retencije. Pri istim uvjetima provođenja kromatografije određena tvar uvijek pokazuje isto vrijeme retencije, te se ta vrijednost koristi za identifikaciju komponenata nepoznate smjese.

Postupak: Uzorci vina analizirani su kao otopina razrijeđena 10 puta. Svaki uzorak se sastoji od 200 μL vina, 500 μL destilirane vode i 500 μL ZnSO_4 . Da bi se osiguralo taloženje prisutnih proteina, uzorci se vorteksiraju, ostave da miruju 20 minuta, a zatim centrifugiraju pri brzini od 10 000 o/min. Nakon centrifugiranja provodi se kromatografija. Mobilna faza koja se koristi je 0,1 % H_3PO_4 , dok će rezultate detektirati RID detektor. Kromatografija započinje injektiranjem 20 μL uzorka u uređaj za kromatografiju, postavlja se temperatura na 55 °C i protok na 0,5 mL/min. Nakon završene kromatografije dobiveni su rezultati i informacije o spojevima prisutnim u analiziranom uzorku vina.

4. REZULTATI i RASPRAVA

4.1. Kemijska analiza vina

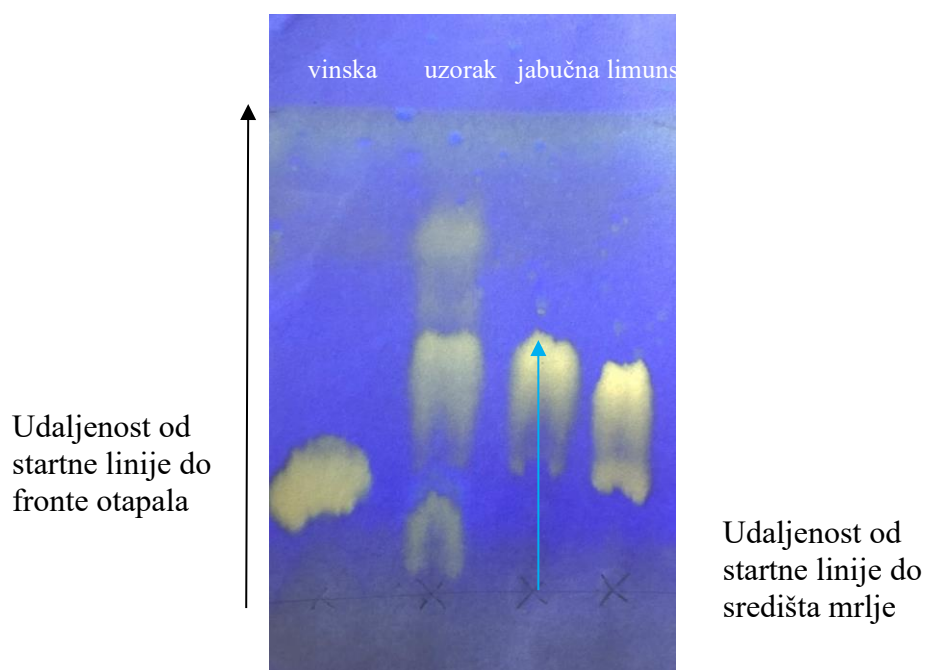
Analiza vina Pinot sivi, berba 2018., proizvođača Kalazić, vinogorja Baranja, provedena je u tri paralele kako bi se osigurala točnost mjerenja. Dobiveni rezultati mjerenja kao i aritmetička sredina prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Rezultati kemijske analize vina Pinot sivi baranjskog vinogorja

	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Srednja vrijednost
Slobodni SO₂ [mg/L]	27,20±0,009	28,80±0,001	38,40±0,0	31,47±0,031
Vezani SO₂ [mg/L]	32,00±0,761	41,60±0,090	38,40±0,022	37,33±0,021
Ukupni SO₂ [mg/L]	59,2±0,099	70,4±0,341	76,8±0,234	68,8±0,036
Reducirajuće supstance [g/L]	2,041±0,044	2,245±0,001	2,11±0,002	2,132±0,003
Ukupne kiseline [g/L]	5,10±0,022	5,22±0,001	5,16±0,044	5,16±0,002
Hlapljive kiseline [g/L]	0,36±0,115	0,48±0,002	0,36±0,087	0,40±0,337
Alkohol [vol %]	11,44±0,098	11,36±0,654	11,32±0,002	11,37±0,006
pH	3,6			

4.2. Papirna kromatografija

Papirnom kromatografijom utvrđeno je da analizirano vino sadrži: vinsku kiselinu ($R_f = 0,292$), jabučnu kiselinu ($R_f = 0,458$) i limunsku kiselinu ($R_f = 0,375$), kao što je prikazano na Slici 6. Njihove točne koncentracije zatim su određene HPLC analizom. Na kromatogramu je također vidljiva vrpca ($R_f = 0,792$), koja potječe od mliječne kiseline.



$$R_f = \frac{\text{udaljenost sredine mrlje od starta (mm)}}{\text{udaljenost fronte otapala od starta (mm)}}$$

Slika 6. Skica kromatograma (Zechner-Krpan i Petravić Tominac, 2008)

4.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti analiziran je sadržaj glukoze, fruktoze, glicerola, etanola te limunske, vinske i jabučne kiseline. Dobiveni rezultati prikazani su u obliku masene koncentracije odnosno volumnog postotka u Tablici 2.

Tablica 2. Rezultati HPLC analize vina Pinot sivi baranjskog vinogorja

Glukoza [g/L]	2,07 ± 0,009
Fruktoza [g/L]	5,5 ± 0,361
Jabučna kiselina [g/L]	4,4 ± 0,001
Vinska kiselina [g/L]	8,01 ± 0,056
Limunska kiselina [g/L]	0,23 ± 0,002
Glicerol [g/L]	7,21 ± 0,761
Etanol [vol %]	13,05 ± 0,003

4.4. RASPRAVA

Kemijskom analizom (Tablica 1.) vina Pinot sivi berbe 2018. određene su koncentracije slobodnog, vezanog i ukupnog sumpornog dioksida (mg/L), ukupnih i hlapljivih kiselina (g/L), reducirajućih šećera (g/L) te volumni postotak alkohola. Potom je provedena analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) kojom su određene koncentracije glukoze (g/L), fruktoze (g/L), glicerola (g/L), limunske kiseline (g/L), vinske kiseline (g/L), jabučne kiseline (g/L) i etanola (vol %).

Prema članku 6. Pravilnika o proizvodnji vina (NN 2/2005) ukupni sadržaj sumpornog dioksida u vinima, osim kod pjenušavih, gaziranih i specijalnih vina u prometu ne smije biti veći od 210 mg/L kod ružičastih i bijelih vina, od toga slobodnog najviše do 40 mg/L.

Vrijednost ukupnog sadržaja sumporova dioksida određenog kemijskom metodom u analiziranom vinu iznosi 68,8 mg/L, dok je vrijednost slobodnog sumporova dioksida 31,47 mg/L (Tablica 1.). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su izmjerene vrijednosti u skladu s navedenim Pravilnikom.

Članak 7. istog Pravilnika navodi da hlapljiva kiselost, izražena kao octena kiselina, u vinima u prometu ne smije biti veća od 1,0 g/L (ružičasta i bijela vina).

Hlapljiva kiselost dobivena kemijskom analizom iznosi 0,4 g/L (Tablica 1.), što zadovoljava navedeni kriterij.

Koncentracija reducirajućih šećera u analiziranom vinu određena kemijskom metodom iznosi 2,132 g/L (Tablica 1.), dok je prema provedenoj HPLC analizi koncentracija glukoze 2,07 g/L (Tablica 2.). S obzirom da, prema članku 12. Pravilnika o proizvodnji vina (NN 2/2005), sadržaj neprevrelih šećera u suhim vinima iznosi 0 – 4 g/L, vino iz ovog rada se može svrstati u kategoriju suha vina.

Članak 13. Pravilnika o proizvodnji vina (NN 2/2005) određuje da ukupna kiselost vina u prometu, izraženo kao vinska kiselina, mora biti najmanje 4 g/L, a najviše do 14 g/L. Rezultat kemijske analize ukupnih kiselina iznosi 5,16 g/L (Tablica 1). Koncentracija vinske kiseline određena HPLC analizom iznosi 8,01 g/L (Tablica 2). Navedene koncentracije odgovaraju odredbama navedenog Pravilnika.

U istom Članku naveden je minimalni sadržaj glicerola koji moraju sadržavati vina u prometu i on iznosi 5 g/L. Analizom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti određena je koncentracija glicerola od 7,21 g/L (Tablica 2.), što zadovoljava propisani uvjet.

Članak 13. Pravilnika o proizvodnji vina (NN 2/2005) također navodi maksimalnu dozvoljenu koncentraciju limunske kiseline, koja iznosi 1 g/L. HPLC analizom određena koncentracija limunske kiseline iznosi 0,23 g/L (Tablica 2), što je ispod maksimalne dopuštene koncentracije te stoga odgovara odredbama Pravilnika.

Prema Članku 25. Pravilnika o proizvodnji vina (NN 2/2005), vrhunska vina u prometu moraju sadržavati najmanju prirodnu volumnu alkoholnu jakost:

10,0 vol % u zoni B,

10,5 vol % u zoni C1,

11,0 vol % u zoni C2,

11,5 vol % u zoni C3.

S obzirom da analizirano vino, prema Pravilniku o vinogradarskim područjima (NN 159/2004), potječe iz zone C1, pripisuje mu se najmanja prirodna volumna alkoholna jakost od 10,5 vol %. Volumna alkoholna jakost određena kemijskom metodom iznosi 11,37 vol % (Tablica 1.), a ona određena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti iznosi 13,05 vol % (Tablica 2.). Izmjerene vrijednosti odgovaraju propisima navedenog Pravilnika.

HPLC analizom također je određena koncentracija jabučne kiseline od 4,4 g/L (Tablica 2.) te je prisutnost iste kiseline potvrđena papirnom kromatografijom (Slika 6.) Na papirnoj kromatografiji utvrđena je i prisutnost mliječne kiseline, što ukazuje da se odvila i spontana djelomična jabučno-mliječna fermentacija (Slika 6.).

5. ZAKLJUČCI

1. Kemijskom analizom vina Pinot sivi baranjskog vinogorja utvrđeno je da analizirano vino sadrži: 31,47 mg/L slobodnog, 37,33 mg/L vezanog i 68,8 mg/L ukupnog sumporova dioksida; 2,132 g/L reducirajućih šećera; 5,16 g/L ukupnih kiselina; 0,4 g/L hlapljivih kiselina te 11,37 vol % etanola.
2. Papirnom kromatografijom utvrđena je prisutnost jabučne, vinske, limunske i mliječne kiseline. Prisutnost mliječne kiseline ukazuje na to da se dogodila spontana djelomična jabučno-mliječna fermentacija.
3. HPLC analizom određeno je da koncentracija glukoze u analiziranom vinu iznosi 2,07 g/L; koncentracija jabučne kiseline 4,4 g/L; koncentracija vinske kiseline 8,01 g/L; koncentracija etanola 13,05 vol. %.; koncentracija limunske kiseline 0,23 g/L i koncentracija glicerola 7,21 g/L.
4. Sve izmjerene vrijednosti u skladu su s propisima Pravilnika o proizvodnji vina (NN 2/2005) i Pravilnika o vinogradarskim područjima (NN 159/2004).
5. Prema sadržaju neprevrelih šećera analizirano se vino svrstava u suha vina.

6. POPIS LITERATURE

Anonimus 1: <http://zemljopishrvatske.blogspot.com/> 5.6.2023.

Anonimus 2: <https://www.vinoteka-vinita.hr/kalazi%C4%87-pinot-sivi.html> 21.5.2023.

Anonimus 3: <https://www.wine-searcher.com/grape-382-pinot-gris> 15.6.2023.

Anonimus 4: [https://www.amgrupa.hr/upload/katalog/714006490\(22\).jpg](https://www.amgrupa.hr/upload/katalog/714006490(22).jpg) 15.6.2023.

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2013) Biokemija. Školska knjiga, Zagreb, str. 36-45

Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. (1996) Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, International Thomson Publishing. New York, str. 65-67 i 289-291.

Herjavec S. (2019) Vinarstvo. Nakladni Zavod Globus. Zagreb, Hrvatska

Kojić N. (2020) Tradicija i uvjeti uzgoja vinove loze u vinogorju Baranja. Glasnik Zaštite Bilja, 43. (5.), str. 80-84. <https://doi.org/10.31727/gzb.43.5.10>

Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I., Preiner D., Zdunić G., Bubola M., Stupić D., Andabaka Ž., Marković Z., Šimon S., Žulj Mihaljević M., Ilijaš I., Marković D. (2015) Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze. Državni zavod za zaštitu prirode. Zagreb, str. 24-32.

Mirošević N. (1996) Vinogradarstvo. Nakladni zavod Globus. Zagreb, Hrvatska, str. 83.

Mirošević N., Turković Z. (2003) Ampelografski atlas II. Dio. Golden marketing i Tehnička knjiga. Zagreb, Hrvatska, str. 288-289.

Pravilnik o proizvodnji vina (2005) Narodne novine Republike Hrvatske (NN 2/2005)

Pravilnik o vinogradarskim područjima (2004) Narodne novine Republike Hrvatske (NN 159/2004)

Pravilnik o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze (2019) Narodne novine Republike Hrvatske (NN 76/19)

Predojević Ž. (2016) Zlatno brdo i tisućljetna vinogradarska tradicija. Godišnjak Ogranka Matice hrvatske Beli Manastir 12, str. 76-100.

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. (2006) Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications. Wiley, West Sussex, Ujedinjeno Kraljevstvo. Str. 58-89.

Robinson J., Harding J., Vouillamoz J. (2012) Wine Grapes - A complete guide to 1,368 vine varieties, including their origins and flavours. Ecco, New York. str. 1584-1609.

Šantek M. (1996) Sumporni dioksid i vino. Vlastita naklada, Zagreb. str 44.

Zakon o vinu (2019) Narodne novine Republike Hrvatske, (NN 32/2019) https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_03_32_641.html Pristupljeno 2. lipnja 2023.

Zechner-Krpan V. (2017) Tehnologija vina – Proizvodnja mirnih vina. http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_biokemijsko_inzenjerstvo/laboratorij_za_bi_im_i_tsp/biotehnoloski_aspekti_proizvodnje_vina

Zechner-Krpan V., Petravić Tominac V. (2008) Tehnologija vina – Praktikum Biotehnologija 3. (Radni materijal za internu uporabu), Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Zoričić M. (2011) Vinogradarsko vinarski priručnik. Slobodna Dalmacija. Split, Hrvatska.

Izjava o izvornosti

Ja Irma Škaljo izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Irma Škaljo
Vlastoručni potpis