

Proizvodnja i analitika osnovnih parametara kakvoće domaćeg bijelog vina Hrvatskog zagorja

Jakopec, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:646458>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Preddiplomski studij Biotehnologija

ZAVRŠNI RAD

**Proizvodnja i analitika osnovnih parametara
kakvoće domaćeg bijelog vina Hrvatskog zagorja**

Marta Jakopec

6688/BT

Zagreb, 2015.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

**Proizvodnja i analitika osnovnih parametara kakvoće
domaćeg bijelog vina Hrvatskog zagorja**

Marta Jakopec

6688/BT

Sažetak: Cilj završnog rada bio je proizvesti i analizirati domaće bijelo vino podrijetlom iz privatne obiteljske vinarije Ilčić, Hrvatsko zagorje. U analitičko-kemijskom laboratoriju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta analizirani su osnovni parametri kakvoće proizvedenog domaće vina pomoću aparatura za određivanje šećera, alkohola, sumpora i kiselina, tankoslojne kromatografije za određivanje jabučne, limunske i vinske kiseline te enzimskog kita za određivanje glicerola. Rezultati analiziranog domaće bijelog vina su u skladu s vrijednostima Pravilnika o vinu iz 1996. godine.

Ključne riječi: bijelo vino, kemijska analiza, proizvodnja bijelih vina, tankoslojna kromatografija

Rad sadrži: 38 stranica, 14 slika, 2 tablice, 23 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Rad predan: rujanj, 2015.

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Production and basic quality parameters analyses of domestic white wine from Hrvatsko zagorje

Marta Jakopec

6688/BT

Abstract: The aim of final work was to produce and analyze domestic white wine from family vineyard Ilčić, in Hrvatsko zagorje. In the analytical chemical laboratory at Faculty of Food Technology and Biotechnology produced domestic white wine was analyzed using basic quality parameters. Laboratory methods, chemical procedures and apparatus were used for detecting sugar, alcohol, sulfur, acids while thin-layer chromatography was used for detecting malic, citric and wine acid. For detecting glycerol Enzyme kit was used. The results of analyzed domestic white wine were in accordance with the Croatian wine regulations from year 1996.

Keyword: chemical analyses, TLC, white wine, white wine production

Thesis contains: 38 pages, 14 figure, 2 tables, 23 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Vesna Zechner - Krpan, Full Prof.

Thesis delivered: September, 2015.

Sadržaj	str.
1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio.....	2
2.1. Povijest vinogradarstva Hrvatskog zagorja.....	2
2.1.1. Podregija Zagorje-Međimurje.....	3
2.1.2. Rajnski rizling.....	4
2.1.3. Sivi pinot.....	5
2.1.4. Graševina.....	6
2.2. Proizvodnja bijelog vina.....	8
2.2.1. Berba grožđa.....	8
2.2.2. Runjanje-muljanje.....	8
2.2.3. Prešanje.....	9
2.2.4. Sumporenje.....	10
2.2.5. Alkoholna fermentacija.....	10
2.2.6. Pretakanje vina.....	13
2.2.7. Filtracija vina.....	13
2.2.8. Punjenje vina u boce.....	13
3. Eksperimentalni dio.....	15
3.1. Materijali, aparature i metode.....	15
3.1.1. Materijali.....	15
3.1.2. Aparature.....	15
3.1.3. Metode.....	16
3.1.3.1. Određivanje koncentracije šećera RS-metodom.....	16
3.1.3.2. Određivanje alkohola i ekstrakta denzitometrijski.....	17
3.1.3.3. Određivanje alkohola kemijskom metodom.....	18
3.1.3.4. Određivanje sumpora.....	19
3.1.3.4.1. Određivanje slobodnog sumpora.....	19
3.1.3.4.2. Određivanje vezanog sumpornog dioksida.....	20
3.1.3.4.3. Određivanje ukupnog sumpora.....	20
3.1.3.5. Određivanje ukupnih kiselina u vinu.....	21
3.1.3.6. Određivanje hlapljivih kiselina po polumikro postupku.....	21
3.1.3.7. Određivanje jabučne, vinske, mliječne i limunske kiseline papiernom kromatografijom.....	22
3.1.3.8. Enzimsko određivanje glicerola.....	23
4. Rezultati.....	27
4.1. Kemijska analiza.....	27
4.2. Papirna kromatografija.....	31
4.3. Određivanje koncentracije glicerola.....	32
5. Rasprava.....	33
5.1. Kemijska analiza.....	33

5.2. Papirna kromatografija.....	35
5.3. Određivanje koncentracije glicerola.....	35
6. Zaključci.....	36
7. Literatura.....	37

1.UVOD

Prema Zakonu o vinu iz 1996. godine, vinom se smatra proizvod dobiven alkoholnim vrenjem mošta ili masulja od svježeg (ili prosušenog) grožđa plemenite vinove loze *Vitis vinifera*. Pretpostavlja se da se godišnje iskoristi 90 milijuna tona grožđa od čega 71 % fermentira u vino dok Europa pokriva 70 % svjetske proizvodnje. Vino, uz alkohol koji stvaraju vinski kvasci fermentacijom šećera, sadrži niz drugih sastojaka: organskih kiselina, mineralnih tvari, vitamina, fenola (ojojene i taninske tvari) koje blagotvorno djeluju na organizam. Primijetili su to i stari Egipćani, Sumerani, Grci i Rimljani čijom zaslugom ljudi danas širom svijeta uživaju ovaj proizvod.

Hrvatska je zemlja duge tradicije proizvodnje grožđa i vina. U posljednjih desetak godina povećavaju se površine pod vinovom lozom, a time i proizvodnja vina. U sortimentu vinove loze prevladavaju tri sorte i to Graševina, Malvazija istarska i Plavac mali koje čine 45% ukupnog sortimenta (Grgić i sur., 2011.). Pravilnikom o vinu područje Republike Hrvatske podijeljeno je na 2 vinogradarske regije, a domaće vino proizvedeno je iz grožđa podrijetlom iz regije kontinentalne Hrvatske, točnije iz vinogradarske zone B1 koja obuhvaća područje Zagorja i Međimurja. Grožđe korišteno za vinifikaciju je podrijetlom iz okolice Zlatara, čije je vinogorje poznato po tradicionalnoj obradi grožđa i obiteljskim vinarijama. Analizirani mošt je produkt sljubljivanja (kupažiranja) triju sorti: Graševine, Rajnskog Rizlinga i Sivog pinota.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Povijest vinogradarstva Hrvatskog zagorja

Hrvatsko zagorje je prijelazno područje s alpskog na panonski prostor, omeđeno riječnim vodotocima i gorama, karakterizirano izvrsnim prirodnim karakteristikama, pa nije čudo što se na ovim prostorima gaji vinova loza i podižu vinogradi od davnina. Zagorci su poznati po njihovom običaju da imaju vinograd i da vole popiti dobro vino, a što se onda nadovezuje na cijeli niz djelatnosti kojih ih povezuju sa vinogradarstvom i vinarstvom.

Zapisi iz 12. stoljeća govore nam o počecima današnjeg područja Krapinsko – zagorske županije. Širenje Rimskog Carstva nije zaobišlo ni ove krajeve, a upravo su Rimljani oni koji su donijeli vinovu lozu i podizali vinograde na obroncima planina. U 13. i 14. stoljeću krenula su osvajanja Turaka koji su sjekli i uništavali vinograde, jer im vjera zabranjuje pijenje alkohola. Nakon povlačenja Turaka počinje i obnova vinograda. Povijesne okolnosti utjecale su u velikoj mjeri na razvoj vinogradarstva. Istraživanja vezana uz Veliku hrvatsku seljačku bunu 1573. godine govore nam da je proizvodnja vina u to vrijeme bila veća od vrijednosti proizvodnje žitarica, a neki povijesni izvori tvrde da je buna pokrenuta upravo zbog vina, odnosno odluke feudalaca da se kmetovima ograniči trgovina »blagotvornom kapljicom«. Proizvedeno vino iz feudalnih vinograda bilo je namijenjeno tržištu, pa su feudinci otvarali gostionice u naseljima i na svojim posjedima. Zbog želje za udobnošću i raskošnim životom uznapredovalo je dobro podrumarenje i ubrzo su se pojavila kvalitetnija vina, a vinogradi su u to doba imali najveću vrijednost od svih vrsta poljoprivrednih površina. Vino je stoljećima bilo svakodnevni prijatelj seljaka koji su za vrijeme rada u polju ili vinogradu nosili male 'barilčke' ili 'pletanke' i 'demižone' (Slika 1), a najbolja je okrijepa bila hladna kapljica vina. U 19. stoljeću svladana je tehnika dobrog 'podrumarenja', kad se osnivaju vinogradarsko-voćarske zadruge zbog edukacije vinogradara i obnove vinograda poslije filoksere, te organiziranog i lakšeg izlaska na tržište. O vinogradarstvu i vinarstvu i proizvodnji vina raspravljalo se na velikom Vinskom saboru 4. rujna, 1894. g., u Beču na teme: 'Oplemenjivanje američke loze europskom', 'Patvorenje i kvarenje vina', te 'Vinifikacija ili o umjetnoj kvasini', i 'Aktualne prilike u trgovini vina' (Anonimus 1).



Slika 1. Demižon

(www.vinopedia.hr/wiki/index.php?title=demi%C5%BEon)

2.1.1. Podregija Zagorje-Međimurje

Podregija Zagorje-Međimurje (Slika 2). brežuljkast je kraj sa šest vinogorja: Međimurje - 1100 ha, Varaždin - 3280 ha, Ludbreg - 490 ha, Krapina - 1030 ha, Zlatar - 1850 ha i Zabok - 1340 ha (Anonimus 2). Zagorski vinogradi smješteni su na brežuljcima blagih, a ponegdje i strmih nagiba s prekrasnim pogledom na plodne doline i šumovite gore Ivančice, Medvednice i dr. (Slika 3).



Slika 2. Hrvatska vinogorja

(www.bbz.hr/images/uploads/683/hrvatsko-vinogradarstvo-i-vinarstvo-gospodarski-znacaj-i-potencijal.pdf)

Karakteristične su stare kvalitetne bijele sorte (Belina, Lipovina, Kraljevina, Plavec žuti i dr.), čije grožđe proizvođači uglavnom tradicionalnim načinom prerađuju u svojim kletima pretežno za vlastite potrebe. Vina su svjetla, lagana, kiselkasta, a u lošijim godinama i kisela, pa otuda i navika da se skoro redovito piju pomiješana s kiselicom tj. mineralnom vodom pa otuda njemački naziv gemišt. Za razliku od Zagorja, u Međimurju, uz Kraljevinu, sve se više uzgaja Graševina, Moslavac i Rizling rajnski, dok su ostale bijele (Pinot bijeli, Silvanac, Traminac, Chardonnay, Muškat ottonel i dr.) i crne sorte (Portugizac, Frankovka) znatno manje prisutne.



Slika 3. Zagorski vinogradi

(www.vuglec-breg.hr/vinarija-a2?lang=hr)

2.1.2. Rajnski rizling

Rajnski rizling je najpoznatija i najcjenjenija bijela vinska sorta koja daje u sjevernim vinorodnim područjama najplemenitija vina svjetskog glasa (Slika 4). Kvalitete Rajnskog Rizlinga otkrivene su slučajno u 18. stoljeću u Johannisbergu u Rajnskoj oblasti. Benediktinci su svake jeseni slali grožđe na provjeru i čekali za službeno dopuštenje za berbu. Jedne godine kurir se s dozvolom vratio se u samostan s jako velikim zakašnjenjem kad je grožđe već prezrelo, a neke bobice je zahvatila plemenita plijesan. Isprva u strahu da im je propao urod, Benediktinci su živjeli od loze i prodaje vina (Anonimus 3).



Slika 4. Rajnski rizling – grozd i trs

(<http://www.vinskipodrum.com/teorija/DetaljSorte.asp?SortaID=4>)

Karakteristike sorte su naglašena kiselost, punoća i elegantna aroma te plemeniti, diskretni miris. Vino od rajnskog rizlinga je puno, zaokruženo, sa značajnim mirisom i aromom te dugim životnim vijekom, a starenjem njegova vrijednost raste. Prednost ove kasno dozrijevajuće sorte je da prema kraju duge faze dozrijevanja akumulira mnogo šećera i kod toga ne izgubi mnogo kiselina. Dobra je podloga plemenitoj plijesni, koja se razvija na već zrelim bobicama, što daje osnovu za odlična suha, ali i slatka vina s prirodnim neprovrelim šećerom. Zahtijeva južni položaj, puno sunca i topline te zaštitu od vjetra. Bere se kasno, a za predikatna vina i u prosincu. Normalno dozrijelo grožđe daje vina svjetle do slamnato žute boje s zelenim odsjajem. Vino od izbornih bobica su zlatno-žute boje i starenjem u boci prelazi u jantarno-žutu boju. Prema Pravilniku o Nacionalnoj listi priznatih kultivara uzgoj ove sorte se preporuča u podregijama kontinentalne Hrvatske. Kutjevo, Feričanci, Plešivica-Okić i Međimurje su poznata vinogorja karakteristična za proizvodnju vrhunskih vina ove sorte koja se uzgaja u vinogorjima cijelog slovenskog podravskog rajona te opskrbljuje tržište RH velikim brojem vrhunskih i kvalitetnih vina.

2.1.3. Sivi pinot

Sivi pinot je vinska sorta bijeloga grožđa (mutant pinota crnog) slabije rasprostranjena od rajnskog rizlinga zbog velike osjetljivosti na bolesti, a naročito na sivu plijesan. Rano zri te nije pogodno za izrazito toplu klimu. Slabijoj rasprostranjenosti također doprinosi neredovita i niža rodnost koja se može prevladati brojnim klonovima ove sorte. Zreli grozdovi su bakrenasto crvene boje, a bobice sivkasto oprasene pa je i boja vina izraženije žuta, sve do

jantarno žute. Miris je intenzivan i prisutna je eterska nota s kompleksnim okusom. Vino je suho, toplo, djelomično mekano i svježije. Sivi pinot svrstan je među dopuštene sorte u svim vinogorjima Kontinentalne Hrvatske, i u svim vinogorjima podregije Istra, Hrvatsko primorje i Dalmatinska zagora. Vino nema visoku ukupnu kiselost, a izrazito je bogato proantocijanidolom iz sjemenaka. Najpoznatiji hrvatski Sivi pinot dolazi iz Kutjevačke vinarije (Slika 5).



Slika 5. Sivi pinot

(www.blog.vino.hr/archives/3502)

2.1.4. Graševina

Graševina je najzastupljenija i najviše šticeana vinska sorta bijeloga grožđa, prije poznata pod nazivom grašica. Za to jedinstveno ime zaslužan je izgled bobice koji podsjeća na zrno graška prije početka sazrijevanja (Slika 6). Potječe iz Francuske i Pravilnikom je uvrštena među preporučene kultivare u svim podregijama regije Kontinentalna Hrvatska. Prema službenim podacima i procjenama, svaki peti trs u hrvatskim vinogradima je graševina. Po izgledu i glavnim karakteristikama to je tipična sorta zapadnoeuropske grupe umjerene bujnosti, maloga, tipično vinskog grozda i bobice. Često se uzgaja zbog dobre i redovite rodnosti i još bolje kvalitete grožđa, mošta i vina čiji udio šećera i ukupnih kiselina varira ovisno o kraju. Zbog toga se vina graševine u sastavu razlikuju, ali veže ih ugodna aroma i žuto-zelena kristalno bistra boja, srednji sadržaj alkohola i ekstrakta. Ugodno je gorkasto, a već kao mlado vino razvija sortni miris i aromu istaknute svježine. Sorta je vrlo prilagodljiva i uspijeva na većini hrvatskih tala, nije preosjetljiva na bolesti i štetnike te izvrsno podnosi

niske zimske temperature. Izuzetna pitkost i svježina čini ga najpopularnijim vinom u Hrvatskoj. Najveći broj vrhunskih graševina dolazi iz podregije Slavonija na položajima 200 – 300 metara nadmorske visine, na lakšim i kalijem bogatim tlima dok se u podregiji Zagorje - Međimurje manji broj vina graševina uvrštava među vrhunske. Kutjevačka graševina je, uz pošip s Korčule i iločki traminac, među prvim bijelim hrvatskim vinima zaštićenim u vrhunskoj kategoriji.



Slika 6. Graševina

(www.agroklub.com/sajmovi-dogadjanja/grasevina-sampion-vinovite-i-najbolje-hrvatsko-vino/3040/)

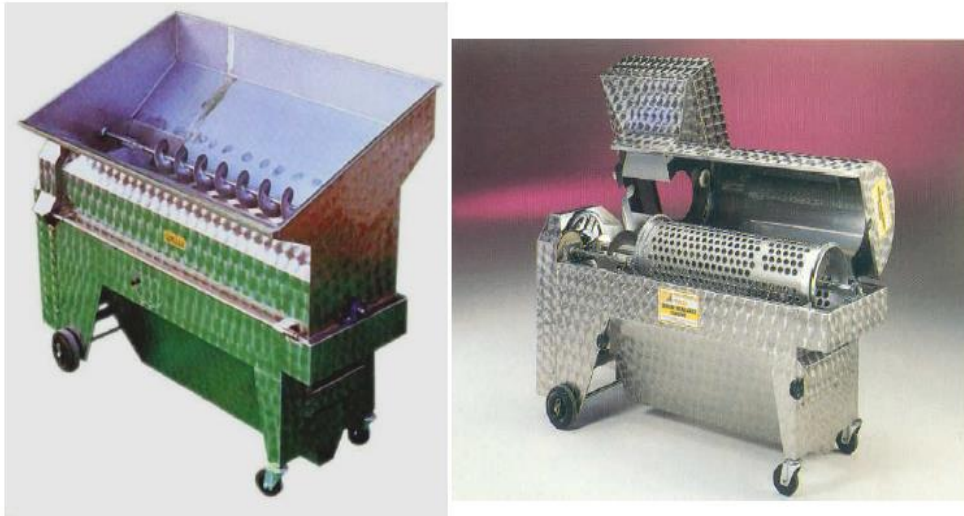
2.2. Proizvodnja bijelog vina

2.2.1. Berba grožđa

Prerada grožđa u mošt, odnosno vino, počinje berbom i presudna je za kvalitetu i senzorna svojstva vina. Prije same berbe obavezno je obaviti pripremne radnje u podrumu u kojemu sve mora biti besprijekorno čisto. Grožđe se bere kada postigne tehnološku zrelost, tj. kada je omjer šećera i kiselina optimalan, a da bi se to točno odredilo vinogradar mora obilaziti vinograde desetak dana prije uobičajene berbe, voditi računa o analitičkim pokazateljima (mjeriti udio šećera i kiselina) te pratiti promjene koje se događaju na grožđu (zdravstveno stanje trsa i grozda, odrvenjavanje peteljke grozda, vremenske prilike itd.). Ono se može odmah sumporiti, a do podruma mora stići neoštećeno, jer u suprotnom dolazi do oksidacije i smanjene kvalitete vina. Sorta vinove loze je značajan čimbenik kvalitete grožđa, a u konačnici i vina. Svaka sorta ima svoje specifičnosti u pogledu sadržaja šećera, kiselina, tvari arome, boje i drugih komponenata te zastupljenosti pojedinih dijelova grozda kao što su peteljkovina, pokožica ili sjemenke. Primjerenim tehnološkim postupcima i dobrim izborom kultivara moguće je postići visoku kvalitetu finalnog proizvoda (Muštović, 1985.).

2.2.2. Runjanje-muljanje

Kakvoća mošta i budućeg vina u znatnoj mjeri ovisi o pravilnom odabiru opreme za pojedinu radnju koja mora odgovarati određenoj vrsti prerade (tehnološki postupak prerade bijeloga ili crnoga grožđa) i o njihovoj povezanosti u liniju prerade i dorade vina. Prva radnja u procesu prerade grožđa je runjanje-muljanje s ciljem odvajanja bobica od peteljke (runjanje) koje se zatim gnječe (muljanje) kako bi se oslobodio mošt. Ne tako davno grožđe se muljalo tako da ga se gnječilo nogama i to je ujedno i najstariji način muljanja. Čvrsti i tekući dio tako gnječenog grožđa zajedno nazivamo masulj, a samo tekući dio nazivamo groždani sok ili mošt. Mošt se najvećim dijelom sastoji od vode (75 do 80%), šećera (groždani – glukoza i voćni – fruktoza) i kiselina (vinska, limunska, jabučna, jantarna itd.). Ostali sastojci prisutni u vinu su: dušične tvari, mineralne tvari, tvari boje, tvari arome i vitamini (Zoričić, 1996.). Runjanjem se sprječava ekstrakcija taninskih i drugih tvari koji bi inače prešli iz peteljke u mošt posebice tijekom vrenja, jer svi ti sastojci nisu topivi u moštu nego u alkoholu. Runjača - muljača sastoji se od lijevka za prihvat grožđa, rupičastog valjka za odvajanje bobice od peteljkovine i valjaka koji gnječe bobice (Slika 7).

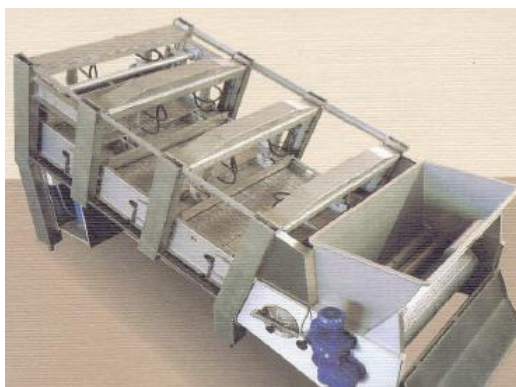


Slika 7. Runjača-muljača

([www. http://www.veleri.hr/files/datoteke/nastavni_materijali/k_vinarstvo_1/3_-_Vinifikacija_sa_presama.pdf](http://www.veleri.hr/files/datoteke/nastavni_materijali/k_vinarstvo_1/3_-_Vinifikacija_sa_presama.pdf))

2.2.3. Prešanje

Iza muljanja-runjanja slijedi prešanje koje se može obaviti kontinuirano (bez prekida) ili diskontinuirano (s prekidom u radu), a neophodan je tehnološki zahvat koji se posebice koristi u proizvodnji kvalitetnih vina prije samog početka alkoholne fermentacije. Prešanje se odvija u dvije faze: prskanje kožice bobica za oslobađanje samotoka iz sredine bobice i gnječenje bobica pod povećanim pritiskom za oslobađanje soka iz periferne zone siromašne šećerom, a bogatije polifenolima. Samom postupku moramo pristupiti što je moguće brže, a ciklus prešanja mora biti što kraći zbog izbjegavanja nepoželjne oksidacije mošta. Također jako prešanje pod povećanim pritiskom, s ciljem dobivanja veće količine mošta je nepoželjno, jer ide na štetu kakvoće mošta, a kasnije i vina. Na Slici 8. prikazana je kontinuirana preša.



Slika 8. Kontinuirana preša

(www.veleri.hr/files/datoteke/nastavni_materijali/k_vinarstvo_1/3_-_Vinifikacija_sa_presama.pdf)

2.2.4. Sumporenje

Nakon prešanja, mošt se sumpori kako bi se spriječila oksidacija, spontana fermentacija (zaustavio rad nepoželjnih kvasaca i bakterija) i potpomoglo taloženje (sumpor pospješuje koagulaciju tvari mutnoće). Količina sumpora koja se dodaje u mošt ovisi o pH vrijednosti, temperaturi te o zdravstvenom stanju grožđa pa se tako nezrelo i bolesno grožđe treba čim brže obraditi i takav mošt više sumporiti. Nakon prešanja, mošt treba brzo ohladiti na temperaturu optimalnu za taloženje (10 °C) ili za kontrolirano vrenje (15 do 17 °C). Taloženje se može provoditi i uz pomoć enzima (brže i sigurnije bistrenje, bistrenje pri višim temperaturama), ali i dodatkom nekih bistrila (bentonit), u slučajevima jako zaraženog (bolesnog) grožđa ili u sušnim godinama, kad se očekuju kasniji problemi s bistrenjima vina. Također je moguća i primjena aktivnog ugljena i drugih enoloških preparata, kojima se već u problematičnom moštu rješavaju loši mirisi, boje i okusi.

2.2.5. Alkoholna fermentacija

Mošt se zatim pretače u čistu bačvu i spreman je za alkoholnu fermentaciju. Uzročnik alkoholnog vrenja u vinu je vinski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* koji miruje na pokožici bobice. U moštu u kojem je rastvoren šećer, započinje njegovo intenzivno razmnožavanje, a u anaerobnoj fazi kvasci razlažu šećer na razne spojeve, a najviše na alkohol i CO₂, najvažnije i osnovne produkte. Uz alkohol u vinu se u manjim količinama nalazi i niz raznih drugih

spojeva poput glicerola, octene, jantarne i drugih kiselina te nastaje i određena količina energije koja se oslobađa u vidu topline.

U početku alkoholne fermentacije mošt se jako zamuti, stvaraju se mjehurići i debela pjena te započine vrenje pa temperatura poraste za 10, 20 i više stupnja. Pod utjecajem raznih čimbenika kao što su nepoželjna temperatura, sastav mošta, nepoželjni mikroorganizmi i dr., može doći do prekida vrenja. S obzirom na to se poduzimaju odgovarajuće mjere kao napr. taloženje mošta ili pasterizacija uz uporabu selekcioniranih kvasaca ili jačim sumporenjem grožđa. Kvasci obično prestaju s radom pri temperaturi od 35 – 40 °C, a na visokim temperaturama dolazi i do gubitka mirisnih tvari i alkohola, jakog pjenjenja te razlijevanja vina. Mošt koji vrije kod previsoke temperature može i da ne dovrje do kraja, jer se kvasci iscrpe, prije nego li je sav šećer potrošen. Visoke temperature fermentacije daju vina slabije kvalitete i postoji opasnost da se počnu razmnožavati i patogeni mikroorganizmi. Idealna temperatura za fermentaciju bijelih moštova je ona između 16 – 22 °C. Također, vrenju ne pogoduju ni preniske temperature (manje od 10 °C), jer je ono slabo, dugotrajno, a može doći i do prestanka vrenja usprkos neprovrelom šećeru što je česta pojava u mnogim podrumima u kasnu jesen. Kod prekida vrenja postoji opasnost od pojave hlapljivih kiselina, octikavosti, nepoželjnog sastava mošta, visoke koncentracije šećera, nedovoljnog sadržaja kiselina, visokog sadržaja SO₂, CO₂ itd. Idealna fermentacija je ona sa što kraćom predfermentativnom fazom te ravnomjernom i čim dužom fermentacijom. Moštovi s velikom koncentracijom šećera također mogu predstavljati problem, jer oni teško započinju fermentaciju i teško je završavaju.

Kisik je još jedan bitan čimbenik, jer kvasci za razmnožavanje trebaju kisik te mošt treba biti u kontaktu sa zrakom do početka vrenja, nakon čega se postavlja vrelnjača koja sprječava hlapljenje alkohola, a omogućuje izlazak CO₂ te se fermentacija nastavlja u anaerobnim uvjetima. Ako dođe do zastoja fermentacije, mošt treba ponovno prozračiti, da bi se potaknulo razmnožavanje kvasaca i po potrebi dodati još hrane za kvasce.

Kiseline u moštu su bitne za pravilan tijek fermentacije, jer osiguravaju optimalan pH potreban za rad kvasaca (3 – 4). U moštu i vinu nalaze se organske kiseline, kao što su: vinska, jabučna, mliječna, jantarna, ugljična i octena. Kvasci su vrlo osjetljivi na octenu kiselinu koja se počinje stvarati već u ranoj fazi fermentacije, iako je djelomično proizvode i sami kvasci. *Saccharomyces* obično proizvodi octenu količinu u granicama od 100 do 200 mg/L, na što utječe soj kvasca, temperatura vrenja i sastav mošta (Boulton i sur., 1996.).

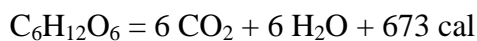
Različiti metali, kao što su bakar, željezo, cink, prisutni na grožđu od tretiranja zaštitnim sredstvima ili sa strojeva mogu usporiti ili zaustaviti fermentaciju, a također i antibiotik botriticin koji izlučuje gljiva *Botrytis cinerea* (prisutna na grožđu koje je zaraženo sivom plijesni) može usporiti vrenje.

Uz navedene čimbenike koji utječu na fermentaciju, najvažnije je pratiti tijek fermentacije, mjeriti temperaturu i količinu šećera, kako bi se, ako dođe do problema, moglo na vrijeme reagirati.

Kvasac koristi energiju na dva načina: iz šećera u moštu putem respiracije, čime razlaže šećer uz prisustvo kisika te ga koristi za razmnožavanje, i fermentacije koja se odvija bez prisustva kisika.

Za svoje potrebe kvasac koristi kisik iz šećera prilikom njegove razgradnje:

Disanje (uz prisustvo zraka – aerobno)



Fermentacija (bez prisustva zraka – anaerobna)



Fermentacija se dijeli na burnu i tihi. Burnu fermentaciju karakterizira istovremena razgradnja velike količine šećera koja nastupa kada se kvasac razmnoži u dovoljnoj količini. Posljedično dolazi do naglog i velikog pada sadržaja šećera, porasta temperature i jakog pjenjenja uslijed oslobađanja velike količine CO₂. Obično traje 3 - 7 dana, a u slučaju kontrolirane fermentacije i dulje. Nakon burne fermentacije nastupa tiha fermentacija koja je period stišavanja vrenja, kada temperatura znatno pada, a pjenjenje tekućine slabi, jer se oslobađa manje CO₂. Umjesto spontanog vrenja u fermentaciji grožđa, sada se tim procesom može upravljati i trend suvremenog podrumarstva u proizvodnji bijelih vina jest da se vrenje ne prepušta djelovanju mikroflore kvasaca s grožđa pa se takva fermentacija zove vođena ili kontrolirana. Ako se želi proizvesti vino na ovaj način, mora se izvršiti taloženje mošta na način da se mošt zasumpori i doda mu se određena količina bistrila. Na taj način blokiramo kvasce donesene na grožđu, koji uglavnom ugibaju, a sumporni dioksid i bistrilo ubrzavaju taloženje u moštu prisutnih nečistoća (čestica zemlje, dijelova bobice, ostataka sredstava za zaštitu, raznih sluzi mošta i dr.). Talozenje uglavnom traje od 10 - 24 sata, a najviše ovisi o

temperaturi. Zatim se mošt dekantira i prebacuje u vrionicu uz dodatak selekcioniranih kvasaca.

Prestankom vrenja, sad već mlado vino se polako hladi, smanjuje mu se volumen, a na vrhu vrionične posude pojavljuje se otpražnjeni dio u koji prodire zrak te ukoliko ga ne nadolijemo mladim vinom iste kakvoće dolazi do oksidacije. Druga opcija, ako nemamo takvom mlado vino, je pretakanje uz obavezno sumporenje, ali prije odvojimo grubi talog.

2.2.6. Pretakanje vina

Nakon što je fermentacija završila slijedi pretakanje vina kojim se odvaja relativno bistro mlado vino od taloga koji se istaložio na dnu vinske posude. Prvi se pretok preporuča u studenom, nastupom prvih hladnijih dana, drugo početkom siječnja, a treće početkom ožujka. Ukoliko je u vinu ostalo neprovrela šećera, obavlja se naknadno vrenje na način da se uzmuti talog slatkog nepretočenog vina, koje se iza toga obilno zrači pretakanjem. Također, može se upotrijebiti zdravo grožđe nekog drugog nepretočenog vina, a koje nije potpuno provrelo ili selekcioniranim vinskim kvascem.

2.2.7. Filtracija vina

Zatim slijedi čišćenje vina, a najbolji rezultati postižu se kombiniranjem filtriranja i bistrenja. Postoje kemijska bistrila koja se spajaju s određenim sastojkom vina u netopiv spoj koji se taloži (napr. želatina, bjelance jajeta, mlijeko) i mehanička koja povlače mutež vina sa sobom na dno bačve (kaolin, španjolska zemlja, ugljen, celuloza, vinski talog i dr.). Filtriranje je postupak odstranjivanja nečistoća iz vina zadržavanjem čestica na filtracijskom sloju kroz koji prolazi vino, a odvajanje se može postići zadržavanjem čestica ili apsorpcijom (čestice se zadržavaju zbog privlačenja uslijed razlike električnog naboja).

2.2.8. Punjenje vina u boce

Završna faza, nakon završene dorade, stabilizacije i filtracije, je punjenje vina u boce, a proljeće je idealno vrijeme za punjenje kvalitetnih bijelih vina jer su tada potpuno izražene sorte karakteristike. Boce za punjenje prvo treba namočiti u toploj vodi, zatim isprati četkom

u 2 % otopini sode, a nakon toga isprati toplom i hladnom vodom te ih pustiti da se iscijede. Treba koristiti nove plutene čepove, a neposredno prije upotrebe držati ih 10 - 12 sati u hladnoj vodi. Danas se prakticira sterilno punjenje u atmosferi inertnog plina kako bi se eliminirao kisik u boci.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali, aparature i metode

3.1.1. Materijali

- 0,1 M NaOH
- 0,01 M NaOH
- 25 % H₃PO₄
- 30 %-tni KI
- 26 %-tna H₂SO₄
- 1 %-tni škrob
- 0,1 M Na₂S₂O₃
- 1 %-tna glukoza
- Standard za papirnu kromatografiju (po 3 g/L jabučne, vinske, mliječne i limunske kiseline)
- Octena kiselina
- n-butanol
- Fehling I (69,3 g/L CuSO₄×5 H₂O)
- Fehling II (346 g/L K,Na-tartarata)
- Destilirana voda
- Indikatori: -fenolftalein

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

3.1.2. Aparature

- Laboratorijska aparatura za određivanje šećera
- Laboratorijska aparatura za određivanje alkohola
- Laboratorijska aparatura za određivanje sumpora
- Laboratorijska aparatura za određivanje hlapljivih kiselina
- Laboratorijska aparatura za određivanje ukupnih kiselina
- Laboratorijska aparatura za određivanje jabučne, vinske, mliječne i limunske kiseline
- Kit K-GCROL (Megazyme, Irska) za kemijsko određivanje glicerola
- pH – metar 744 Metrohm (Metrohm, AG; Zofingen, Švicarska)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 13E Varian (Varian, Mulgrave, Australija)

3.1.3. Metode

3.1.3.1. Određivanje koncentracije šećera RS-metodom

(Određivanje reducirajućih supstanci)

Postupak:

Vino: 2 mL vina uz dodatak 23 mL destilirane vode se uzme za uzorak. Doda se 10 mL otopine A (Fehling 1) i 10 mL otopine (Fehling II). Kuha se točno 2 minute u tikvici s okruglim dnom od 250 mL uz povratno hladilo, zatim se ohladi pod vodom i doda 10 mL otopine C (30%-tni KI) i 10 mL otopine D (26%-tne H_2SO_4). Sve se dobro izmiješa i doda 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): uzme se 5 mL 1%-tne glukoze i 20 mL destilirane vode (ukupan volumen 25 mL) i ponovi gore opisani postupak.

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

IZRAČUNAVANJE KONCENTRACIJE ŠEĆERA:

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

RS = reducirajuće supstance (g/L)

a = mL 0,1 M $Na_2S_2O_3$ 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

3.1.3.2. Određivanje alkohola i ekstrakta denzitometrijski

Princip:

Količina alkohola i ekstrakta u vinu odredi se pomoću piknometra - količina alkohola na osnovi specifične težine destilata, a količina ekstrakta na osnovi specifične težine ostatka od destilacije. To je tzv. denzitometrijska metoda.

1. Određivanje specifične težine vina

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

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

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

B - masa praznog piknometra

C - vodena vrijednost piknometra

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

2. Određivanje količine alkohola u vinu

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

nadopuni do oznake destiliranom vodom, obriše i važe. Specifična težina destilata izračunava se kao pod 1.

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

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

3. Određivanje ekstrakta u vinu

Piknometar u kojem je bio destilat isprazni se i ispere 2-3 puta destiliranom vodom pa se u njega pomoću lijevka izlije ostatak od destilacije iz tikvice. Prenosjenje mora biti bez gubitaka. Zatim se tikvica ispere 3 puta vrućom destiliranom vodom i to se sve prenese u piknometar, koji se tako napuni do ispod oznake i stavi u vodenu kupelj na 20 °C / 20min. Nakon termostatiranja nadopuni se destiliranom vodom do oznake i važe. Specifična težina ostataka od destilacije izračuna se kao pod 1., a iz tablice se očita količina ekstrakta u vinu u g/L.

3.1.3.3. Određivanje alkohola kemijskom metodom

Postupak: Vino se razrijedi u odnosu 1:10, tako da se u odmjernu tikvicu od 50 mL stavi 5 mL vina i dopuni destiliranom vodom do oznake. U postupak se uzima 5 mL ovako razrijeđenog vina koje se stavi u tikvicu za destilaciju od 50 mL, doda još 5-6 mL destilirane vode i sadržaj neutralizira s 0,1 M NaOH uz univerzalni indikator. 17

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

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

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

IZRAČUNAVANJE KOLIČINE ALKOHOLA:

$$\text{Alkohol (vol\%)} = \left(10 - \frac{a}{6.9}\right) \times 2$$

a = utrošak 0,1 M otopine Na₂S₂O₃

3.1.3.4. Određivanje sumpora

(uobičajena metoda)

3.1.3.4.1. Određivanje slobodnog sumpora (20 minuta bez grijanja)

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

3.1.3.4.2. Određivanje vezanog sumpornog dioksida

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

3.1.3.4.3. Određivanje ukupnog sumpora

Ukupni SO₂ dobije se zbrajanjem vrijednosti slobodnog i vezanog SO₂.

Priprema indikatora u otopini H₂O₂

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

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

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

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

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

3.1.3.5. Određivanje ukupnih kiselina u vinu

Princip određivanja ukupnih kiselina:

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

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

Postupak:

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

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

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

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

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

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

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

3.1.3.6. Određivanje hlapljivih kiselina po polumikro postupku

Princip određivanja hlapljivih kiselina:

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

Postupak:

Za određivanje hlapljivih kiselina uzima se trbušastom pipetom 5 mL uzorka, stavi se u tikvicu kruškastog oblika i doda se 1 mL 25% H_3PO_4 . Pri tome treba paziti da površina vode u Erlenmayer tikvici za proizvodnju pare bude uvijek iznad nivoa tekućine u kruškastoj tikvici. Za vrenje vode u Erlenmayer tikvici treba ubaciti nekoliko komadića porozne gline ili staklene kuglice. Od probe treba predestilirati 60 mL, a dobiveni destilat zagrijati do početka vrenja i titrirati uz fenolftalein s 0,1 M natrij hidroksidom.

Izračunavanje:

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

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

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

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

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

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

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

octena kiselina 10 mL

n - butanol 40 mL

destilirana voda 50 mL

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

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

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

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

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

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

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

Volumen otapala u kadi za kromatografiju: $(10+40+50) \times 2$

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

3.1.3.8. Enzimsko određivanje glicerola

SADRŽAJ KITA ZA ODREĐIVANJE GLICEROLA:

- Bočica 1: Tris/HCl pufer (20 mL, 1 M, pH 7,4) i magnezijev klorid (30 mM M), uz natrijev azid (0,02 % w/v) kao konzervans. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.

- Bočica 2: 14 tableta koje sadrže NADH, ATP i PEP. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C. Maksimalna trajnost ovih tableta postiže se čuvanjem u zabrtvljenom kontejneru u prisutnosti siilkagela pri 4 °C ili pri -20 °C.
- Bočica 3: sadrži 1,5 mL suspenzije piruvat kinaze (600 U/mL) i L-laktat dehidrogenaze (550 U/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 4: Suspenzija glicerokinaze (1,5 mL, 85 U/mL). Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C.
- Bočica 5: standard glicerola (5 mL otopine, 0,20 mg/mL) uz natrijev azid (0,02 % w/v) kao konzervans. Stabilnost preko 2 godine pri 4 °C. Standard glicerola analizira se samo kad postoji sumnja u točnost spektrofotometra ali kad se sumnja u inhibiciju zbog nekog sastojka uzorka.

PRIPREMA REAGENSA ZA ANALIZU GLICEROLA: Bočica 1 i bočica 5 koriste se bez pripreme. Priprema Bočice 2: Prije vađenja tableta iz bočice zagrijte bočicu na sobnu temperaturu (po mogućnosti u eksikatoru) radi sprečavanja kondenzaciju vlage na kontejneru. Ukoliko se otvori bočica dok je još hladna onda tablete apsorbiraju vlagu i smanjuje se stabilnost komponenata sadržanih u tabletama. Da bi dobili volumen reagensa koji je potreban za 5 planiranih analiza otopite jednu tabletu iz bočice 2 u 1,1 mL (tj. 2 puta po 550 μ L) Tris/HCl pufera (bočica 1) i otapajte 1-2 minute. Otapanje možete poboljšati nježnim mućkanjem ili miješanjem. Nakon otapanja će se s vremenom apsorbancija otopljenog NADH postepeno smanjivati, ali je ovako pripremljen reagens prikladan za upotrebu otprilike 4 dana ukoliko se čuva pri 4 °C, odnosno oko 4 tjedna ako se čuva pri -20 °C. Priprema bočica 3 i 4: koriste se bez pripreme, osim što se prije prvog otvaranja moraju protresti da se ukloni ostatak enzima koji se mogu istaložiti na gumenom čepu. Nakon toga čuvajte bočice u uspravnom položaju. Vrtloženjem bočica homogenizirajte sadržaj prije upotrebe. Stabilno preko 2 godine pri 4 °C. Koncentracija glicerola određuje se iz ekstinkcijskog koeficijenta NADH.

POSTUPAK ODREĐIVANJA GLICEROLA:

Valna dužina: 340 nm

Kiveta: širina 1 cm

Temperatura: oko 25 °C

Volumen uzorka : 50 μ L

Konačni volumen u kivetu iznosi 1,17 mL.

Pipetirati u kivetu	Slijepa proba	Uzorak
Destilirana voda (temperature oko 25 °C)	1,05 mL (1500 µL)	1,00 mL (1000 µL)
uzorak	-	0,05 mL (50 µL)
Otopina 2 (NADH/ATP/PEP/Tris HCl)	0,1 mL (100 µL)	0,1 mL (100 µL)
Suspenzija 3 (PK/L-LDH)	0,01 mL (10 µL)	0,01 mL (10 µL)
Zatvoriti parafilmom i promiješati (nježno okretati kivetu). Nakon otprilike 4 minute očitati apsorbanciju (A1) (kad završi reakcija koja se odvija kada se doda suspenzija 3) (PK/L-LDH).		
Dodati suspenziju 4 (GK):		
Suspenzija 4 (L- MDH)	0,01 mL (10 µL)	0,01 mL (10 µL)
Promiješati (zatvoriti parafilmom i nježno okretati kivetu). Očitati apsorbanciju (A2) na kraju reakcije (oko 5 minuta). Ako se reakcija nije zaustavila nakon 5 minuta onda nastavite očitavati apsorbanciju u intervalima od 2 minute sve dok se apsorbancija ne ustali.		

RAČUNANJE KONCENTRACIJE GLICEROLA: Odredite razliku apsorbancija (A1-A2) za slijepu probu i za uzorak. Potom razliku apsorbancija za slijepu probu oduzmite od razlike apsorbancija za uzorak tako da se dobije $\Delta A_{\text{glycerol}}$. Ova vrijednost bi u pravilu trebala iznositi najmanje 0,1.

Koncentracija glicerola može se dalje izračunati prema jednadžbi:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A(\text{glycerol})$$

gdje je:

c – koncentracija glicerola (g/L)

V – konačni volumen (mL) = 2,34 mL

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

ε – ekstinkcijski koeficijent NADH pri 340 nM = 6300 (l mol⁻¹ · cm⁻¹)

d - put svjetlosti (1 cm)

v - volumen uzorka (mL) = 0,05 mL

$$c = 0,3421 \times \Delta A(\text{glicerol})$$

Ako je uzorak bio razrijeđen, rezultat treba množiti s faktorom razrijeđenja (za razrijeđenje 1:20 množi se faktorom 20).

4. REZULTATI

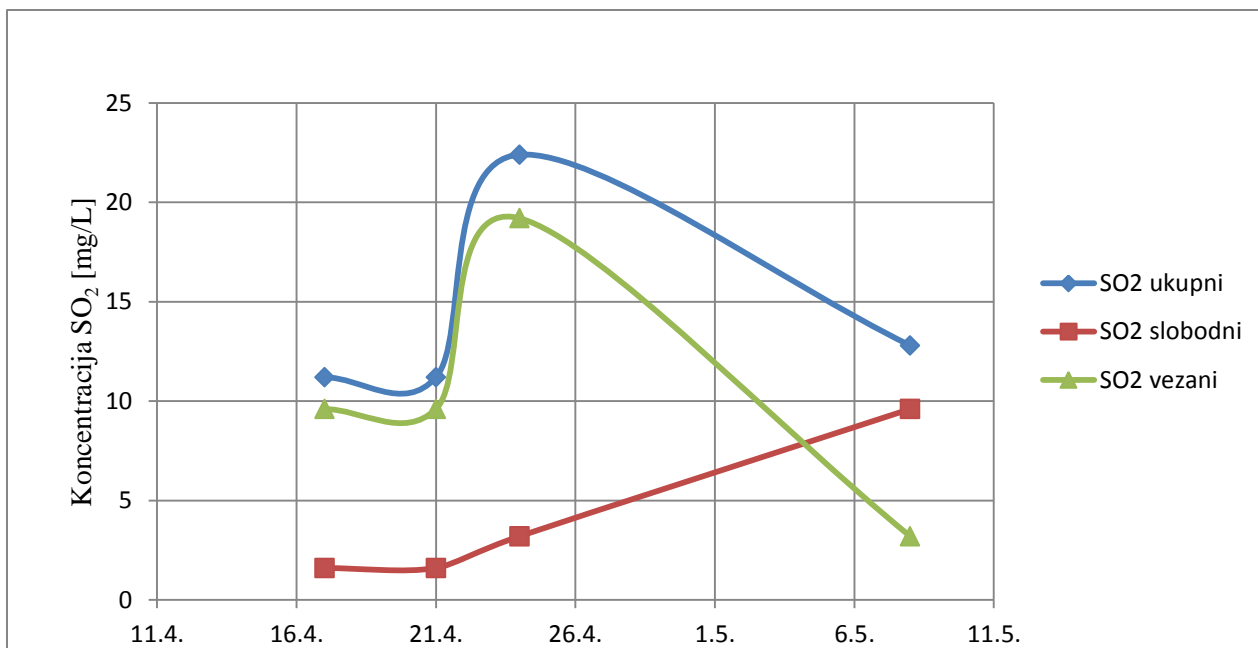
4.1. Kemijska analiza

Prilikom kemijske analize domaćeg bijelog vina rađena su tri paralelna mjerenja te su u Tablici 1. prikazni rezultati, tj. srednje vrijednosti svih kemijskih analiza.

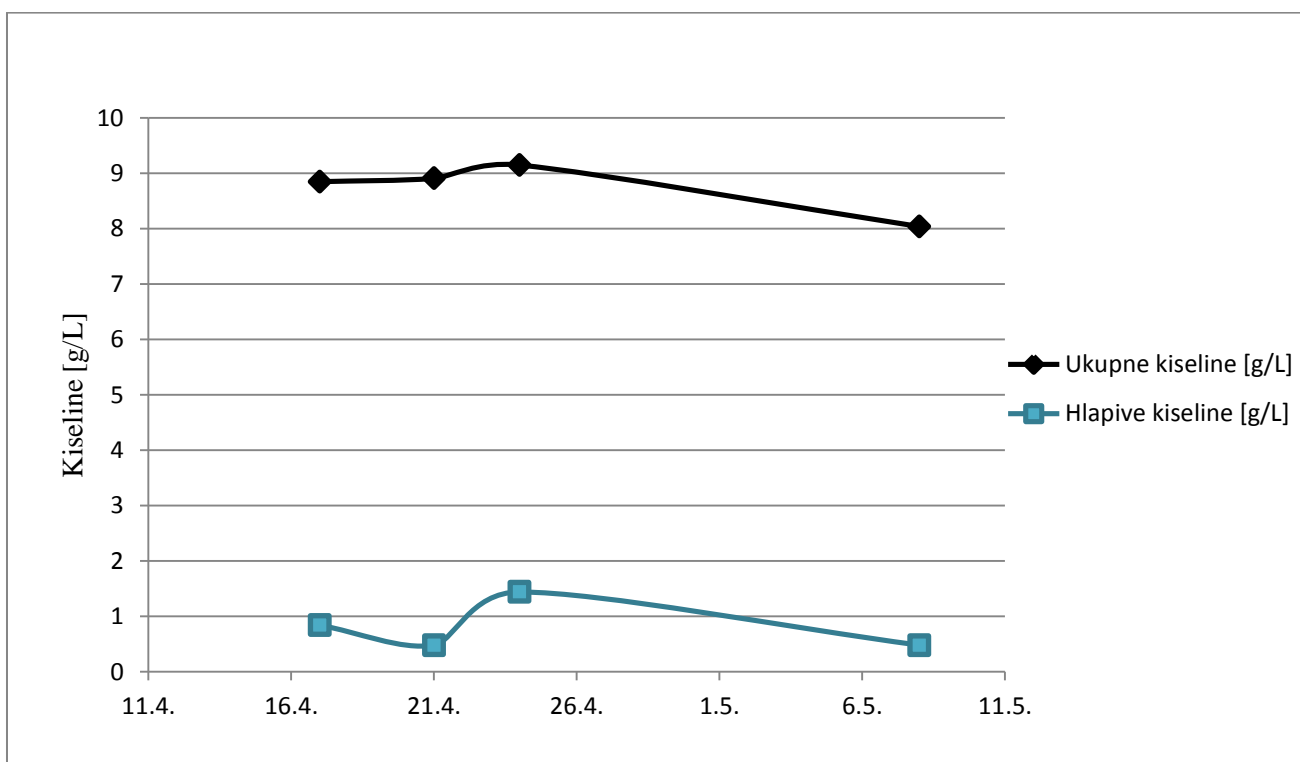
Tablica 1. Rezultati laboratorijske kemijske analize bijelog domaćeg vina

		17.4.2015	21.4.2015	24.4.2015	8.5.2015	15.5.
SO ₂ [mg/L] (Slika 9.)	slobodni	1,6	1,6	3,2	9,6	
	vezani	9,6	9,6	19,2	3,2	
	ukupni	11,2	11,2	22,4	12,8	
KISELINE [g/L] (Slika 10.)	ukupne	8,85	8,91	9,15	8,04	
	hlapljive	0,84	0,48	1,44	0,48	
RS [g/L] (Slika 11.)		1,418	1,418	1,42	1,21	
Br. stanica [st/mL] (Slika 12.)		7,88x10 ⁶	7,88x10 ⁶	1x10 ⁵	4x10 ⁷	1,44x10 ⁶
alkohol [%] kem met (Slika 13.)				8,17	7,42	7,65
alkohol [%] dezint (Slika 13.)						9,29

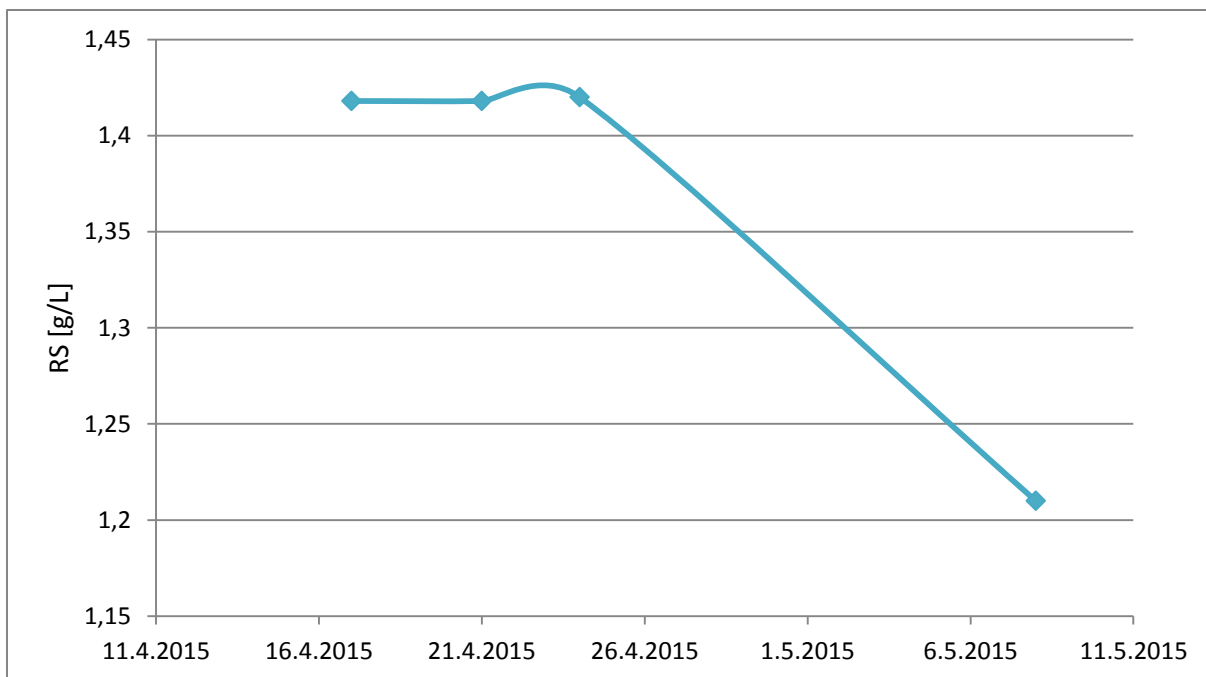
Na Slikama 9., 10., 11., 12., i 13. prikazane su grafički ovisnosti koncentracije SO₂, kiselina, šećera, broja stanica kvasca i volumnog % alkohola o tijeku alkoholne fermentacije.



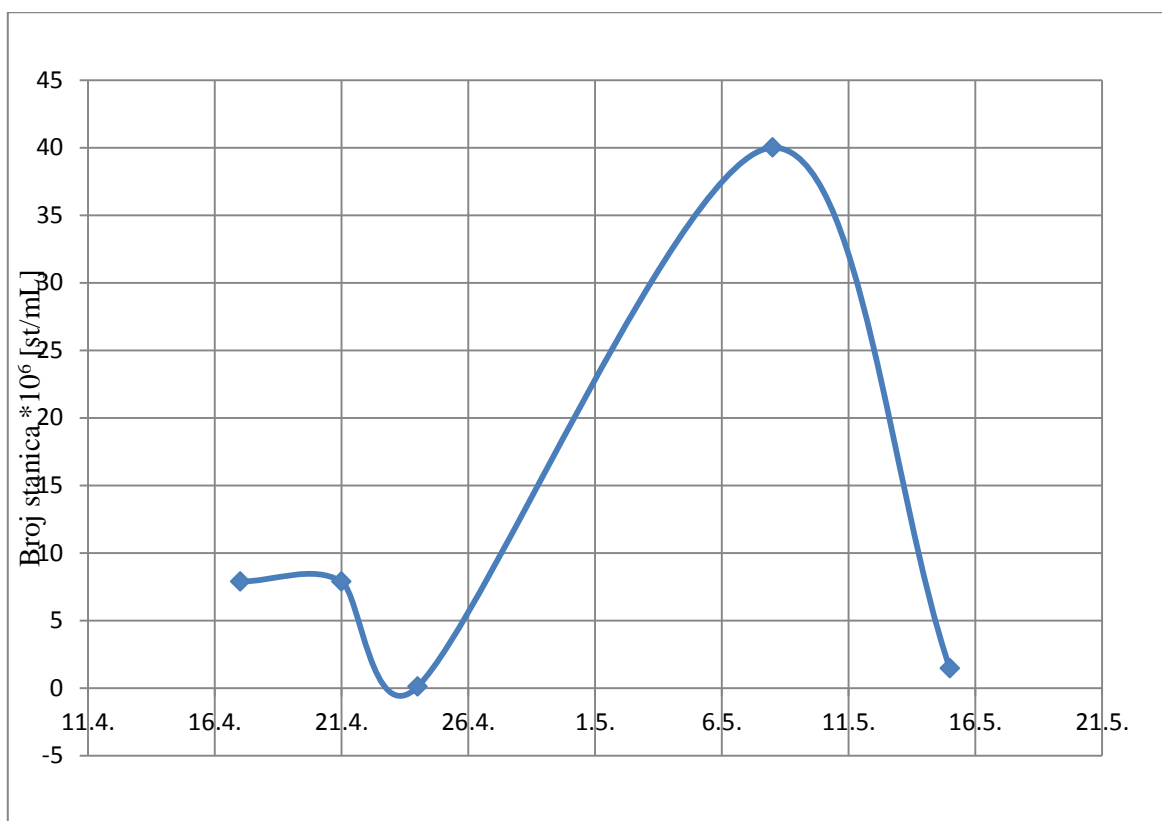
Slika 9. Ovisnost koncentracije SO₂ o tijeku alkoholne fermentacije



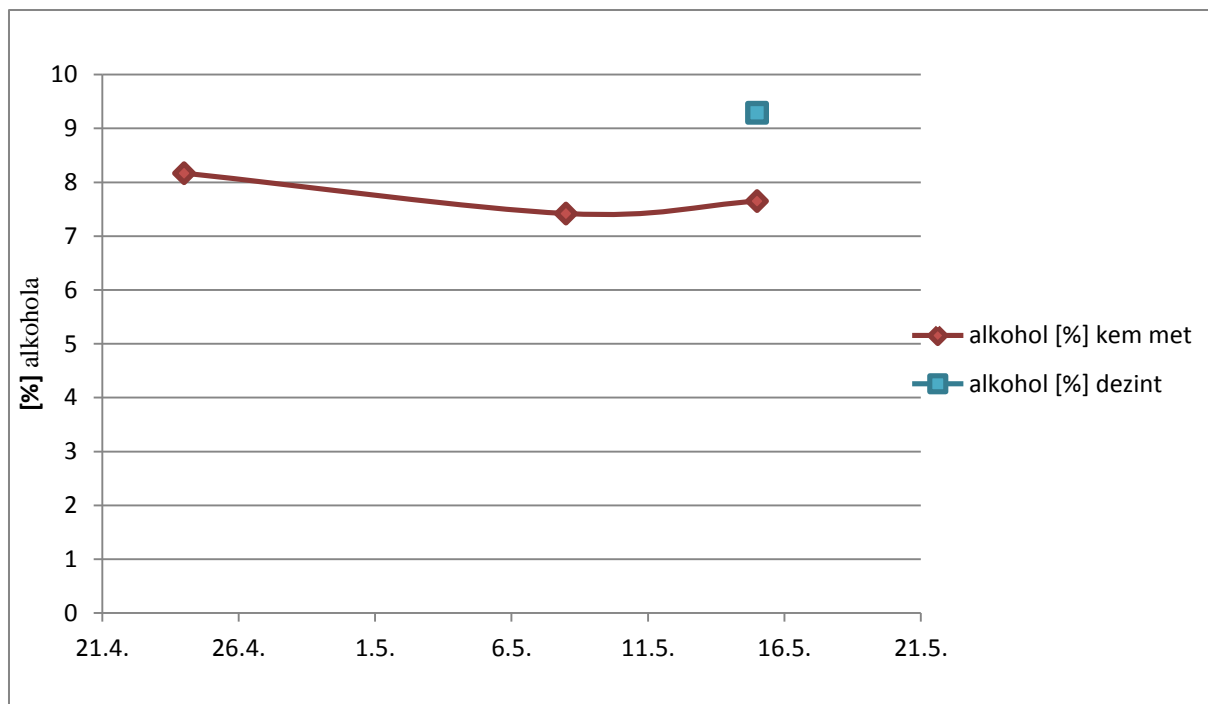
Slika 10. Ovisnost koncentracije kiselina o tijeku alkoholne fermentacije



Slika 11. Ovisnost koncentracije šećera o tijeku alkoholne fermentacije



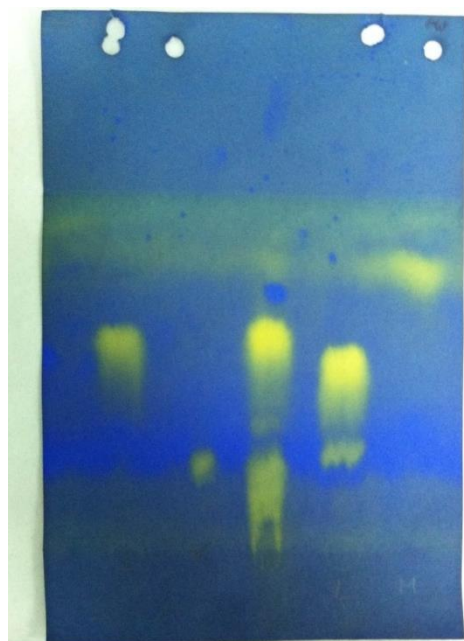
Slika 12. Ovisnost broja stanica kvasca o tijeku alkoholne fermentacije



Slika 13. Ovisnost vol. % alkohola o tijeku alkoholne fermentacije

4.2. Papirna kromatografija

Na Slici 14. prikazan je kromatogram sa 4 standarda: jabučna (Rf 0,56), vinska (Rf 0,38), limunska (Rf 0,45) i mliječna (Rf 0,69) kiselina, a u sredini se nalazi uzorak domaćeg bijelog vina. Analizirano vino sadrži vinsku, limunsku i jabučnu kiselinu.



M=mliječna kiselina

J=jabučna kiselina

L=limunska kiselina

V=vinska kiselina

U=uzorak

J V U L M

Slika 14. Kromatogram

4.3. Određivanje koncentracije glicerola

Mjerenjem koncentracije glicerola pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary E14 Varian u 3 paralelna uzorka dobivena je srednja vrijednost koncentracije glicerola koja iznosi 4,596 g/L, a rezultati su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Spektrofotometrijsko mjerenje glicerola u uzorku bijelog domaćeg vina

		Uzorak		
	S	1	2	3
A1	1,3364	1,3109	1,3020	1,3159
A2	1,3139	0,6165	0,6019	0,6255
A1-A2	0,0225	0,6944	0,7001	0,6904
ΔA	-	0,6719	0,6776	0,6679
c razrjeđenja (g/L)	-	0,2296	0,23157	0,22825
c uzorak (g/L)	-	4,592	4,6314	4,565

5. RASPRAVA

5.1. Kemijska analiza

Prema članku 12, Pravilnika o vinu Ministarstva poljoprivrede i šumarstva, u ovisnosti o količini šećera vina se mogu svrstati u navedene kategorije:

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

Iznimno, vino s visokom ukupnom kiselosti može imati i veću količinu neprevrela šećera od propisane za:

- suho vino: ukupna kiselost uvećana za 2 g/L, ali ne više od 9 g/L;
- polusuho vino: ukupna kiselost uvećana za 10 g/L, ali ne više za 18 g/L.

Članak 13.

Ukupna kiselost vina u prometu mora biti najmanja 4 g/L, izraženo kao vinska kiselina, a najviše do 14 g/L.

Članak 6.

Ukupni sadržaj sumpornog dioksida u vinima, osim kod pjenušavih, gaziranih i specijalnih vina u prometu ne smije biti veći od:

- 160 mg/L kod crnih vina, od toga slobodnog najviše do 30 mg/L;
- 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:

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

Članak 7.

Hlapljiva kiselost, izražena kao octena kiselina, u proizvodima u prometu ne smije biti veća od:

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

Navedene granice hlapljive kiselosti iz stavka 1. ovog članka odnose se na sve proizvode od grožđa proizvedenog u Republici Hrvatskoj.

Iznimno od odredbe stavka 1. ovog članka, hlapljiva kiselost može biti veća, kod vina s ukupne alkoholne jakosti veće od 13 vol %.

S obzirom na koncentraciju šećera analizirano vino može se svrstati u suha vina s obzirom da je ukupna koncentracija neprevrelog šećera manja od 4 g/L. Promatrajući RS vrijednosti vidi se da koncentracija šećera pada tijekom fermentacije, što prati porast volumnog udjela etanola nakon prvog mjerenja, a vrijednosti se razlikuju ovisno o metodi mjerenja.

Koncentracija ukupnih kiselina u vinu je od samog početka bila vrlo visoka i tijekom fermentacije je bila približno konstantna što se i vidi na grafu. Ukupna kiselost odgovara Pravilniku o proizvodnji vina, Članak 13., prema kojem je dozvoljena maksimalna ukupna kiselost do 14 g/L. Udio hlapljivih kiselina izražen kao octena kiselina tijekom fermentacije je padao s iznimkom u trećem mjerenju. Ukupna koncentracija hlapljivih kiselina je u granicama dozvoljenim Pravilnikom, Članak 7. (do 0,8 g/L) i iznosi 0,48 g/L.

Udio SO₂ u početku je konstantan, zatim raste pa ponovno pada. Ukupna koncentracija sumpornog dioksida odgovara Pravilniku.

Koncentracija kvasaca dobivena brojanjem u Thomaovoj komorici varirala je tijekom mjerenja, a konačno je iznosila $1,44 \times 10^6$ st/mL

5.2. Papirna kromatografija

Kromatogram sadrži 5 fronti od kojih 4 odgovaraju standardnim otopinama kiselina, a 1 odgovara uzorku analiziranog vina. Uspoređujući prijedene putove kiselina i uzorka (R_f vrijednosti) vidimo da uzorak sadrži jabučnu, vinsku i limunsku kiselinu.

5.3. Određivanje koncentracije glicerola

Glicerol je indikator kvalitete vina, a na njegovu koncentraciju utječe zrelost grožđa, mikroorganizmi, tip korištene opreme u vinskom podrumu, pH, temperatura fermentacije, izvori dušika te soj kvasca koji provodi fermentaciju. Koncentracija glicerola u analiziranom bijelom vinu iznosi 4,596 g/L što odgovara rasponu prosječne koncentracije glicerola u suhim stolnim vinima koji je otprilike 4 - 10 g/L.

6. ZAKLJUČCI

Analizirano domaće bijelo vino obiteljske vinarije Ilčić sadržavalo je:

1. 7,65 vol % alkohola;
2. 8,04 g/L ukupnih kiselina;
3. 0,48 g/L hlapljivih kiselina;
4. 9,6 mg/L slobodnog SO₂, 3,2 mg/L vezanog SO₂, 12,8 mg/L ukupnog SO₂;
5. 1,21 g/L reducirajućih šećera;
6. Jabučnu, vinsku i limunsku kiselinu;
7. Koncentraciju glicerola 4,596 g/L.
8. Svi izmjereni parametri slažu se s Pravilnikom o vinu iz 1996. Godine.

7. LITERATURA

- Anonimus 1 http://www.vinari-klanjec.com/index_pov03.asp
- Anonimus 2 <http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=Hrvatska>
- Anonimus 3 <http://www.vino-marcius.com/hr/rajsnki-rizling>
- Anonimus 4 <http://www.pporahovica.hr/Pinot-Sivi-70.aspx>
- Anonimus 5 <http://www.vino-kerman.com/vinograd-i-vino/>
- Anonimus 6 <http://www.kutjevo.com/hr/proizvodi/vino/buteljirani-program/grasevina-kvalitetno-vino>
- Anonimus 7 <http://www.capovina.hr/pinot.html>
- Anonimus 8 <http://www.ordinacija.hr/zdravi-tanjur/jedi-zdravo/znete-li-sve-o-grasevini/>
- Anonimus 9 <http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/287540.html>
- Anonimus 10
<file:///C:/Users/User/Downloads/GENO%207.osnove%20proizvodnje%20vina.pdf>
- Anonimus 11 <http://lumens.fthm.hr/edata/2011/202a7f78-0d27-4baf-a1e7-3bb44d97e77e.pdf>
- Anonimus 12 http://www.krizevci.net/vinograd/htm/sav_alkoholno_vrenje.htm
- Anonimus 13 <http://free-sk.t-com.hr/ddomin20/podrumarstvo.htm>
- Anonimus 14 <http://arhiv.slobodnadalmacija.hr/20040922/vrt01.asp>
- Anonimus 15 <http://www.agroklub.com/vinogradarstvo/tehnologija-bijelih-vina/10433/>
- Anonimus 16 http://www.veleri.hr/files/datoteke/nastavni_materijali/k_vinarstvo_1/3_-_Vinifikacija_sa_presama.pdf
- Anonimus 17 <http://www.vinskipodrum.com/teorija/DetaljSorte.asp?SortaID=4>

Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1996.), Principles and practices of winemaking, Chapman and Hall, International Thomson Publishing, New York

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

Grgić, I., Gugić, J., Zrakić, M. (2011.), Samodostatnost Republike Hrvatske u proizvodnji grožđa i vina, Agronomski glasnik 3/2011.

Muštović, S. (1985.): Vinarstvo sa enohemijom i mikrobiologijom, Privredni pregled, Beograd

PRAVILNIK O VINU (1996.), na temelju članka 56. stavka 1. Zakona o vinu ("Narodne novine", br. 34/95)

Zoričić, M. (1996.), Podrumarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb