

Utjecaj skladištenja na tvari boje i arome vina sorte Bover

Mačinković, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:549708>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-23**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



zir.nsk.hr



image not found or type unknown

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Maja Mačinković

**UTJECAJ SKLADIŠTENJA NA TVARI BOJE I AROME VINA SORTE
BOUVIER**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija vina
Tema rada je prihvaćena na III. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 05. srpnja 2017.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Anita Pichler*

Utjecaj skladištenja na tvari boje i arome vina sorte Bouvie *Maja Mačinković, 365-DI*

Sažetak: Na kakvoću i organoleptička svojstva vina velik utjecaj imaju uvjeti i način skladištenja vina. Različiti uvjeti, ponajprije materijal posude u kojoj vino odležava, različito djeluju na zadržavanje odnosno na gubitak određenih tvari karakterističnih za pojedinu vrstu vina. Odležavanjem vina ne mijenjaju se bitno osnovni kemijski sastojci vina koji određuju kategoriju kakvoće vina. Međutim, različiti načini skladištenja odnosno odležavanja vina utječu na aromu i organoleptička svojstva vina. Aroma vina potječe jednim dijelom iz grožđa, jedan dio produciraju kvasci tijekom alkoholne fermentacije, a dio nastaje odležavanjem i njegovanjem mladog vina. Pojedine komponente arome nastaju tijekom odležavanja vina, a pojedine postepeno nestaju te na taj način vino mijenja svoja organoleptička svojstva. Odležavanjem vina u inox cisterni postiže se najbolje zadržavanje svježine, mladosti i karakterističnog voćnog mirisa. Nasuprot tome, odležavanjem vina u staklenoj boci i drvenoj bačvi vino brže stari te na taj način gubi svoju svježinu. U ovom radu ispitan je utjecaj dugogodišnjeg skladištenja na aromu i kemijski sastav vina sorte Bovier.

Ključne riječi: Bouvier, tvari arome, polifenoli, flavonoidi, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 75 stranica
19 slika
3 tablica
49 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	prof. dr. sc. <i>Mirela Kopjar</i>	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. <i>Anita Pichler</i>	član-mentor
3.	prof. dr. sc. <i>Nela Nedić Tiban</i>	član
4.	izv. prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i>	zamjena člana

Datum obrane: 06. listopada, 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Wine technology

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. III. held on July 05, 2017.

Mentor: Anita Pichler, PhD associate prof.

Influence of storage on the color and aroma of Bouvier wine

Maja Mačinković, 365-DI

Summary: The conditions and the way of wine storage has a great influence on the quality and organoleptic properties of wine. Different conditions, first of all the material containers in which the wine is aging, have different effects on the retention or loss of certain substances that are characteristic for certain types of wine. During wine aging, they do not change the basic chemical ingredients of wine that determine the category of wine quality. However, different ways of wine storage or agning, affect the aroma and organoleptic properties of wine. One part of wine aroma originates from the grapes, and one part is produced by yeasts during alcoholic fermentation, but the last part is formed during aging and nurturing of the young wine. Some aroma compounds are formed during the wine aging, and some gradually disappear and in this way the wine changes its organoleptic properties. The wine aging in stainless steel tanks is the best preservation of purity, youth and characteristic fruity smell. By contrast, when wine ages in glass bottles and wooden barrels, it becomes older much faster and thus loses its purity. This paper studies the influence of a long-term storage on aroma and chemical composition of Bouvier grape varieties.

Key words: Bouvier, aroma components, flavonoids, polyphenols, antioxidant activity

Thesis contains: 75 pages
19 figures
3 tables
49 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Mirela Kopjar, PhD full prof. | chair person |
| 2. Anita Pichler, PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. Nela Nedić Tiban, PhD, full prof. | member |
| 4. Natalija Velić, PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: October 06, 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Prije svega, zahvalila bih se svojim roditeljima koji su mi omogućili ovo školovanje i bili velika podrška. Želim se zahvaliti i svome bratu koji mi je uz roditelje bio najveća podrška i ove studentske dane učinio lakšima. Također, hvala i svim kolegama i kolegicama bez kojih bi ovi dani bili puno teži.

Na kraju, veliko hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr.sc. Aniti Pichler na uloženom trudu, vremenu i podršci. Jednako tako, hvala i asistentici Ivani Ivić.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. GROŽĐE	4
Podjela i botanička svojstva vinove loze.....	4
Mehanička i kemijska svojstva.....	5
2.2. DEFINICIJA I PODJELA VINA	9
Sorte grožđa za proizvodnju vina.....	10
2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA	12
Alkohol.....	12
Ugljikohidrati.....	14
Kiseline.....	16
Aldehidi i ketoni.....	20
Esteri.....	20
Tvari arome.....	21
Enzimi.....	22
Fenolni spojevi.....	22
Mineralne tvari (pepeo).....	25
Ekstrakt vina.....	26
Dušične tvari.....	26
Koloidi vina.....	27
Proteini.....	27
2.4. PROIZVODNJA VINA	28
Proizvodnja bijelih vina.....	28
2.5. ODREĐIVANJE SASTOJAKA AROME PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM	35
Plinska kromatografija.....	35
Spektrofotometrija masa.....	38
SPME analiza.....	39
3. EKSPERIMENTALNI DIO	41
3.1. ZADATAK	42
3.2. MATERIJAL I METODE	42
Vino sorte Bouvier.....	42
Kemijska analiza vina.....	43
Analiza arome vina plinskom kromatografijom primjenom SPME analize.....	50
4. REZULTATI	53
5. RASPRAVA	59
6. ZAKLJUČCI	65
7. LITERATURA	67

Popis oznaka, kratica i simbola

SPME Solid Phase Microextraction (mikroekstrakcija na čvrstoj fazi)

GC Plinska kromatografija

GC/MS Plinska kromatografija sa maseno-selektivnim detektorom

1. UVOD

Vino je zasigurno jedno od najcjenjenijih i najplemenitijih alkoholnih pića. Šturim znanstvenim rječnikom, vino se definira kao proizvod dobiven djelomičnom ili potpunom fermentacijom masulja ili mošta od svježeg grožđa europske sorte vinove loze, *Vitis viniferae*.

Laici smatraju da je vino jednostavnog sastava, no dobri poznavatelji znaju da vino sadrži izuzetno mnogo različitih spojeva, različitih kemijskih svojstava. Svi ti spojevi su podrijetlom iz grožđa. Neki spojevi nepromijenjeni prelaze u vino, no većina ih doživljava bitne promijene tijekom fermentacije. Svaka grupa tih spojeva igra veću ili manju ulogu u definiciji kakvoće vina.

Sorta Bouvier je sorta bijelog grožđa koja je zbog svog niskog prinosa pomalo zanemarena. Ova sorta daje izrazito ljupka vina, zlatno žute boje, blagog okusa i mirisa. Sorta ima veliku sposobnost nakupljanja šećera, niski sadržaj kiselina, dobro se drži na trsu te je otporna na mraz i *Botrytis*. Vino proizvedeno od ove sorte brzo stari i pije se mlado.

Zadatak ovoga rada je ispitati utjecaj skladištenja na gubitak tvari arome i boje vina sorte Bouvier. Ispitivanje se vršilo prije skladištenja i nakon šest godina skladištenja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GROŽĐE

Plod vinove loze, grožđe, je sirovina za proizvodnju vina. Njegovu osnovnu strukturu čini grozd. Zbog svojih fizioloških, kemijskih, senzorskih i drugih svojstava grožđe se koristi za potrošnju u svježem, neprerađenom stanju ili kao sirovina za proizvodnju alkoholnih i bezalkoholnih pića (Moreno i Peinado, 2012.).

Podjela i botanička svojstva vinove loze

Vinova loza (*Vitis vinifera*) je vrlo stara kultura koja je kroz svoju prošlost doživjela brojna burna razdoblja i promjene. Od samog početka uzgoja vinove loze počela je proizvodnja vina kao produkta spontane fermentacije soka grožđa. Rod *Vitis* je relativno velik, sadržava nekoliko desetaka vrsta od kojih je više od polovice vezano za Sjevernu Ameriku, a ostali, izuzev *Vitis vinifera*, za Istočnu Aziju. *Vitis vinifera* jedini je predstavnik roda *Vitis* na području Europe i zapadne Azije te se još naziva euroazijska loza. Samo pripadnici ove vrste mogu nositi naziv vinova loza (Maletić i sur., 2008.).

Vinova loza pripada porodici *Ampelidae*. To je povijuša vitkog stabla koja traži potporu uz koju se može oslanjati i penjati učvršćujući se viticama ili se pruža po zemlji.

Porodica *Ampelidae* objedinjuje 10 rodova od kojih je za vinogradarsku praksu i znanost najznačajniji rod *Vitis*. Rod *Vitis* čine dva podroda, *Muscadinia* i *Euvitis*. Podrod *Euvitis* je podijeljen na 30 američkih, 40 azijskih i 1 euroazijsku vrstu.

Euroazijska vrsta (*Vitis vinifera*) je podijeljena na *Vitis vinifera* var. *silvestris* (europska divlja loza) i *Vitis vinifera* var. *sativa* (europska kulturna loza).

Američke vrste koje se koriste kao podloga za europske vinske loze dijele se na *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis berlandieri*.

Sorte vinove loze koje se koriste za proizvodnju vina moraju pripadati vrsti *Vitis vinifera* ili njezinim križancima s drugim vrstama roda *Vitis*.

Postoje različiti hibridi vinove loze koji su nastali namjernim cijepljenjem različitih sorti ili slučajnim oprašivanjem, otporni su na filokseru, peronosporu i pepelnicu te se prilagođavaju

različitim klimatskim uvjetima. U hibride spadaju američko-američki hibridi, europsko-američki i kompleksni hibridi (Zorčić, 1966.).

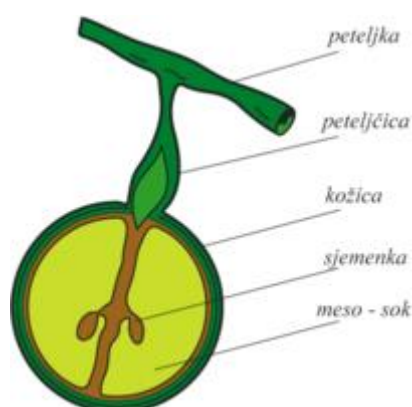
Mehanička i kemijska svojstva

Mehanički sastav podrazumijeva količinu pojedinih dijelova grozda kao što su peteljka, pokožica, sjemenke i groždani sok.

Grozd se sastoji od glavne osi i ogranaka, a završava sa peteljčicom koja nosi bobice. Grožđe, kao osnova strukture grozda, se sastoji od peteljke i bobice kao glavnog i najvažnijeg dijela. Kod zdravog grožđa, u stadiju pune zrelosti, na peteljku otpada 3 do 8 %, a na bobice 92 do 97 % od ukupne težine grozda.

Struktura i tip grozda razlikuju se ovisno o sorti. Rastresiti grozdovi su odlika stolnog grožđa, dok vinski kultivari imaju više zbijenije grozdove.

Struktura grozda predstavlja postotni udio pojedinih dijelova grozda i karakteristična je za svaku pojedinu sortu vinove loze. Predstavlja njeno ampelografsko i tehnološko obilježje. Postotni odnos varira ovisno o sorti, klimatskim uvjetima, vrsti tla, zdravstvenom stanju loze i grožđa, stupnju zrelosti grožđa. Odnos između težine bobica i težine peteljke od velikog je značaja kako za randman, tako i za kemijski sastav mošta (Paunović i Daničić, 1976.).



Slika 1 Shematski presjek bobice s peteljkom i peteljčicom (Web 1)

Peteljka predstavlja skelet grozda i završava peteljčicama koje nose cvijet, a nakon oplodnje bobicu. Tijekom vegetacije peteljka je zeljasta i provodi hranjive tvari iz mladice i lista u bobicu. Krajnji oblik peteljka postiže u fazi šaranja bobica, gubi klorofil, ali ostaje zelena i nakon što grožđe sazrije.

Udio peteljke kod vinskih sorti se kreće između 2 i 8 %, dok kod stolnih sorti može biti 1,5 %. Takav odnos peteljke, u odnosu na bobice, može utjecati na randman mošta i vina. Sorte s manjim postotkom peteljke u grozdu imaju veći randman i obratno.

Osim za randman mošta, peteljka je važna i za kemijski sastav vina. Siromašna je šećerom (10 g šećera na kg grožđa), na mineralne tvari otpada 5 do 6 % suhe tvari, od čega polovinu čini kalij. Peteljka se odlikuje niskom kiselošću čija se pH vrijednost kreće iznad 4. Bogata je polifenolima (osobito kod crnih sorti). Ovakav kemijski sastav peteljke može biti od značajnog utjecaja na kvalitetu vina (Paunović i Daničić, 1976.).

Pri proizvodnji vrhunskih vina, runjenjem se peteljka odvaja kako bi se spriječilo otapanje sredstava za zaštitu (pesticida) u mošt, radi postizanja bolje kvalitete, dobivanja više alkohola. Ukoliko se peteljka ne odvaja, u budućem vinu može doći do povećanja ukupne količine polifenola, naročito tanina čija se količina može povećati i do 25 %.

Najzastupljeniji polifenol u peteljci je leukocijanidol koji je ekstrahiran iz peteljke bijelog grožđa i značajan je za formiranje okusa. Vrlo važan sastojak peteljke su i tanini. Najznačajniji predstavnici zelenih tanina su procijanidini iz skupine leukoantocijana čije su molekule više ili manje polimerizirane. Stupanj polimerizacije se veže uz gorčinu koja ima utjecaj na okus budućeg vina (Sokolić, 1976.).

Korištenjem strojeva za preradu grožđa, koji lome i gnječe peteljku, pojedine tvari više ili manje iz peteljke prelaze u vino. Takva vina su opora, gorka i zelena te je to razlog da se prilikom prerade grožđa treba voditi računa o što manjem oštećenju peteljke (Sokolić, 1976.).

Bobica, kao glavni i najvažniji dio grozda, čini 92 do 97 % grozda. Tijekom vegetacije kod većine sorata je zelene boje i obavlja fotosintezu. Šaranjem grožđa zelena boja se polako gubi i prelazi u zeleno žutu, crvenkastu ili tamno crvenu boju čiji se intenzitet povećava

približavanjem stadiju pune zrelosti. Bobice se razlikuju po obliku, veličini, boji, krupnoći te većoj ili manjoj zbijenosti na grozdu.

Težina bobica u grozdu se povećava tijekom vegetacije i najveću vrijednost doseže u stadiju pune zrelosti. Završetkom ove faze dolazi do promjene odnosa, prestaje dotok hranjivih tvari kroz odrvenjelu peteljku, isparavanjem se gubi dio vode, a samim time se smanjuje težina bobica. Na promjenu odnosa težine bobica i peteljke može utjecati i veći priljev vode u stadiju pune zrelosti grožđa, kao i za vrijeme elementarnih nepogoda (tuče).

Bobicu čini sjemenka, kožica i meso sa grožđanim sokom. Odnos navedenih dijelova je različit kod različitih sorti, ali se može razlikovati i kod istih sorti, ovisno o vremenskim prilikama, naročito u vrijeme cvatnje, oplodnje, razvoja i dozrijevanja bobica (Paunović i Daničić, 1976.).

Sjemenka se sastoji od masne jezgre, koju okružuje drvena ljuska prekrivena taninskom kutikulom. U njoj se nalazi najviše sastojaka potrebnih za ishranu klice. Uz vodu i ugljikohidrate (najviše celuloze), u kemijskom sastavu sjemenke ima najviše eteričnog ulja (16 %). Ulje sadrži 65 do 70 % linoleinske kiseline i 0,1 % tokoferola. Od čvrstih dijelova grozda, najviše tanina je sadržano u sjemenci. Sazrijevanjem grožđa sadržaj taninskih spojeva opada. Tanini se nalaze u vanjskom dijelu sjemenke (taninska kutikula) i prelaze u vino tijekom maceracije.

Neki od sastojaka kutikule sjemenke, fenolni sastojci, dušični spojevi i fosfati, djelomično su topivi u procesu vinifikacije (naročito kod crnih vina). Zbog toga je vrlo važno voditi računa o intenzitetu gnječenja grožđa prilikom prerade. U koliko se sjemenka ošteti, dolazi do ekstrakcije tanina i u konačnici se dobiju opora i gorka vina.

Svaka bobica bi trebala imati 4 sjemenke. Uslijed nepotpune oplodnje broj sjemenki kod pojedinih sorti varira od 1 do 4. Postoje i besjemene sorte, a namijenjene su za sušenje (grožđice) i za jelo u svježem stanju (stolno grože). Razvoj i veličina sjemenke utječe na veličinu i sastav bobice, a broj sjemenki je međuovisan s težinom bobica, sadržajem šećera i kiselina (Paunović i Daničić, 1976.).

Kožica predstavlja vanjski omotač bobice i sastoji se od 6 do 10 slojeva stanica. Stanice su manje na vanjskom dijelu, povećavaju se prema unutrašnjosti. Zahvaljujući elastičnosti stanične stjenke tijekom rasta i sazrijevanja kožica povećava svoj volumen. U stadiju pune zrelosti postotni udio kože iznosi 8 do 11 % težine bobica.

Epiderma se sastoji iz jednog sloja stanica i prekrivena je kutikulom. Kutikula je važna za burnu fermentaciju, oslobađajući ekstrakte voska i oleinsku kiselinu ubrzava rast kvasca. Oštećenjem epiderme povećava se udio šećera, opada elastičnost i bobica puca.

Kožica je prekrivena slojem purina. Voštani sloj pretežno čini oleinska kiselina, a ostatak čine esteri masne kiseline i aldehidi. Voštana prevlaka sprečava prodiranje vode i čuva bobicu od evaporacije, a dozrijevanjem njena propusnost opada.

Kožica ima mali sadržaj šećer (0,7 do 3,0 g na 1000 bobica), dok meso sadrži 140 do 170 g šećera. Bogata je celulozom, proteinima i netopljivim pektinima, polifenolima, a sadrži i taninske spojeve čija se količina može smanjiti pojavom plijesni na grožđu.

Kod većine sorti kožica je jedino mjesto u kojemu se nalaze tvari boje. Bogata je pigmentima, naročito žutim i crvenim, dok klorofil, ksantofil i karotenoide sadrži dok je zelena, a u punoj zrelosti ih ima jako malo. Kožica se naziva još i voštani mašak. Boja se javlja u fazi šaranja, a maksimum se postiže u punoj zrelosti (Paunović i Daničić, 1976.).

Antocijani zauzimaju 3 do 4 sloja stanica ispod epiderme, slabo su topivi u vodi, naročito pri niskim temperaturama. Uz nastali alkohol i povišenu temperaturu tijekom alkoholne fermentacije prelaze u vino (Prce, 2014.).

U kožici su sadržani brojni aromatski spojevi koji daju izražen i karakterističan miris pojedinim sortama.

Meso sa groždanim sokom predstavlja glavni dio bobice. Čine ga velike stanice čija je unutrašnjost ispunjena groždanim sokom - mošt. U punoj zrelosti meso zauzima 75 do 85% težine bobica. Bijele sorte imaju sok žuto zelene do zlatno žute boje, dok crne sorte imaju djelomično obojen sok. Gustoća soka ovisi o sadržaju šećera, a kreće se od 1,065 do 1,110 kg/L, kod prezrelog grožđa više (Paunović i Daničić, 1976.).

2.2. DEFINICIJA I PODJELA VINA

Prema zakonu o vinu (NN 14/2014.), vino je poljoprivredno prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta od svježeg ili za preradu u vino pogodnog grožđa.

Prema ovom Zakonu, grožđem se smatra zdrav, zreo, prezreo, prosušen ili prirodno smrznut plod vinove loze poznatih kultura namijenjen proizvodnji vina ili drugih proizvoda od grožđa i vina čiji sok sadrži minimalnu količinu šećera od 64 °Oechsle.

Vina se dijele na:

Vina u užem smislu riječi

- mirna vina,
- pjenušava vina,
- gazirana vina.

Specijalna vina:

- desertna vina,
- aromatizirana vina,
- likerska vina.

Po boji vina se dijele na:

- bijela,
- ružičasta (rose, opolo),
- crna (crvena).

Po sadržaju neprevrelog šećera vina se dijele na:

- mirna vina: suha, polusuha, poluslatka i slatka,
- pjenušava, biser i gazirana vina: vrlo suha, suha, polusuha, poluslatka i slatka.

Prema kakvoći, vina se svrstavaju u kategorije ovisno o kakvoći prerađenog grožđa, prirodu po hektaru, stupnju zrelosti grožđa, prerade i njege, randmanu, količini prirodnog alkohola i drugih sastojaka, te organoleptičkim (senzorskim) svojstvima.

Po kakvoći mirna vina se dijele na:

Stolna vina

- stolno vino bez oznake zemljopisnog podrijetla,
- stolno vino s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom.

Kvalitetna vina

- kvalitetno vino s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom.

Vrhunska vina

- vrhunsko vino s kontroliranih i ograničenih vinorodnih područja,
- vrhunsko vino s kontroliranih i ograničenih specifičnih vinorodnih područja,
- predikatna vina s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom,
- kvalitetna i vrhunska vina koja su u podrumskim uvjetima čuvana pet ili više godina, od toga najmanje tri godine u boci, mogu nositi oznaku »arhivsko vino« (NN, 2003.).

Sorte grožđa za proizvodnju vina

- Vinske sorte:
 - visoko kvalitetne za proizvodnju vrhunskih vina,
 - kvalitetne sorte za proizvodnju kvalitetnih vina na izuzetnim položajima i vrhunskih vina,
 - sorte niske kakvoće za proizvodnju stolnih vina.
- Sorte vinove loze dijele se na (NN, 2014.):
 - preporučene sorte od kojih se preradom mogu dobiti vrhunska i kvalitetna vina sa oznakom kontroliranog podrijetla,

- dopuštene sorte koje se u određenim vinogorjima posebno ne ističu u proizvodnji vina, ali ne narušavaju njegovu kvalitetu već ga u određenim agroekološkim uvjetima dopunjuju,
- privremeno dopuštene sorte, koje su zatečene u pojedinim vinogorjima na dan stupanja Pravilnika na snagu, a zbog svojih organoleptičkih i gospodarskih svojstava nisu predviđene Pravilnikom. Njihov uzgoj je dopušten samo do njihovog biološkog iskorištenja.

Naivaznije vinske sorte u Republici Hrvatskoj:

KONTINENTALNA HRVATSKA

Bijela vina

- ❖ Graševina bijela
- ❖ Rizling Rajnski bijeli
- ❖ Chardonnay bijeli
- ❖ Traminac mirisavi
- ❖ Traminac crveni
- ❖ Pinot bijeli
- ❖ Pinot sivi
- ❖ Sauvignon bijeli
- ❖ Plemenka bijela

Crna vina

- ❖ Frankovka crna
- ❖ Cabernet Sauvignon crni
- ❖ Portugizac crni
- ❖ Pinot crni
- ❖ Zweigelt
- ❖ Merlot crni

PRIMORSKA HRVATSKA

Crna vina

- ❖ Plavac mali
- ❖ Babić crni
- ❖ Merlot crni
- ❖ Teran crni
- ❖ Cabernet Sauvignon crni
- ❖ Plavina crna
- ❖ Crljenak

Bijela vina

- ❖ Malvazija Istarska bijela
- ❖ Pošip bijeli
- ❖ Grk bijeli
- ❖ Maraština bijela
- ❖ Žilavka bijela
- ❖ Kujundžusa bijela
- ❖ Žlahtina bijela

2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA

Alkohol

Vino sadrži veliki broj različitih alkohola. Alkoholi se mogu podijeliti u dvije osnovne skupine, alifatske i aromatske.

Alifatski alkoholi se dijele na monovalentne i viševalentni. Od monovalentnih alkohola najzastupljeniji alkoholi u vinu su etanol i metanol (Prce, 2014.).

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) predstavlja glavni produkt alkoholne fermentacije, i iza vode je najzastupljeniji sastojak vina. U vinu etanol mora potjecati isključivo iz alkoholne fermentacije iz šećera, iz grožđa, odnosno mošta. U iznimnim slučajevima etanol može potjecati iz saharoze koja se dodaje u svrhu popravljivanja mošta, osim kod proizvodnje

vrhunskih vina gdje dodavanje saharoze nije dozvoljeno. Sadržaj etanola u vinu se kreće između 10 % i 12 % te je važan čimbenik za kakvoću vina (Vrdoljak, 2009.).

Metanol (CH_3OH) ne nastaje kao produkt fermentacije. U vinu je nastao kao nusprodukt, hidrolizom pektinskih tvari, posredstvom enzima pektinesteraze. Metanol se u vinu nalazi u malim količinama. Njegov sadržaj se kreće od 0,18 do 0,44 % u odnosu na etanol. Crna vina imaju 2 do 3 puta veći udio metilnog alkohola u odnosu na bijela vina zbog činjenice da crna vina imaju duži kontakt tekuće faze s krutom fazom (trop), za vrijeme maceracije. Vina od hibridnih sorti imaju više metanola nego ona napravljena od grožđa *Vitis vinifera* (Vrdoljak, 2009.).

Metanol je otrovan te se nakon uzimanja brzo oksidira do mravlje kiseline ili do formaldehida. Kod unosa toksične doze metanola javljaju se abdominalna bol, otežano disanje, a može uzrokovati i sljepilo (Klapec i Šarkanj, 2016.).

Viši alkoholi nastaju radom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* tijekom alkoholne fermentacije. Uz hlapive estere bitan su čimbenik fermentacijske arome vina. Tijekom alkoholne fermentacije, mogu nastati metabolizmom ugljikohidrata (nastaje oko 35 % viših alkohola) i transformacijom odgovarajućih aminokiselina – Ehrlichova reakcija.

Glavni predstavnici viših alkohola su: 1-propanol (n-propanol), izobutanol (2-metil-1-propanol), amilni alkohol (2-metil-1-butanol), izoamilni alkohol (3-metil-1-butanol), 2 feniletanol. Koncentracija viših alkohola do 300 mg/L doprinosi razvoju željene arome vina, dok koncentracija veća od 400 mg/L negativno utječe na aromu vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006.).

Alkoholi koji sadrže više hidroksilnih skupina nazivaju se viševalentni alkoholi ili polioli. Od viših alkohola u vinu posebno se može izdvojiti glicerol, kojega nakon etanola ima najviše.

Glicerol je trovalentni alkohol koji nastaje alkoholnom fermentacijom i veoma je važan parametar kvalitete vina jer utječe na viskoznost, slatkoću i harmoničnost vina. Naročito puno glicerola sadrže vina dobivena od grožđa koje je napadnuto plemenitom plijesni (15 do 20 g/L). Ostali polioli su butandiol, arabitol, sorbitol, manitol (Ribéreau-Gayon i sur, 2006.).

Manitol je šesterovalentni alkohol koji se javlja samo u vinima u kojima je došlo do manitne fermentacije. U pravilu se ne nalazi u zdravim vinima nego isključivo u bolesnim. To su najčešće vina koja su fermentirala na povišenim temperaturama i kod kojih je iz tog razloga fermentacija prestala, a bakterije nastavljaju prevođenje fruktoze u manitol koji vinu daje slatkast okus s povećanim sadržajem ekstrakta (Web 2).

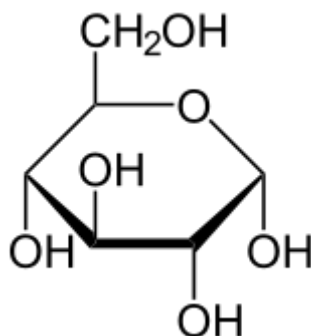
Od aromatskih alkohola koji su prisutni u vinu značajni su feniletanol, tirozol i benzil alkohol, a nastali su fermentacijom iz fenilalanina. Najzastupljeniji je feniletanol, koji ima miris meda. Prisutan je u malim količinama (5 do 15 mg/L), ali je jako važan za bouquet vina (Vrdoljak, 2009.).

Ugljikohidrati

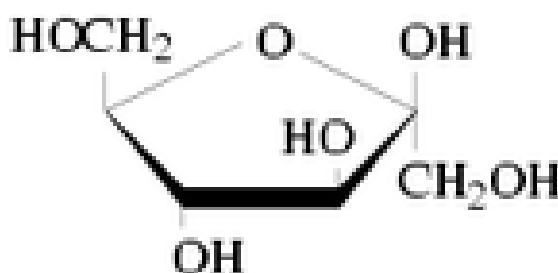
Ugljikohidrati nastaju fotosintezom u svim zelenim dijelovima vinove loze. Ponajviše ih nastaje u listu i bobici dok su još zeleni, tj. dok sadrže klorofil (Vrdoljak, 2009.). Utjecajem sunčeve energije uz prisutnost ugljikovog dioksida i pomoću klorofila, na listu i bobici nastaje škrob koji se konvertira u šećer. Na količinu nastalog šećera utječe sorta, stupanj zrelosti, klimatski uvjeti, bolest, štetnici (Čobanov, 2016.).

Ugljikohidrati su građeni od ugljika, vodika i kisika. Prema složenosti se mogu podijeliti na monosaharide (glukozu i fruktozu), disaharide (saharoza, maltoza, laktoza) i polisaharide (amiloza, amilopektin, celuloza, škrob) (Stričević i Sever, 2001.).

Od monosaharida u grožđu, moštu i vinu najzastupljenije su heksoze, D-glukoza i D-fruktoza. Zastupljenost fruktoze u odnosu na glukozu raste zrenjem grožđa. Zelena bobica sadrži svega $\frac{1}{4}$ fruktoze i $\frac{3}{4}$ glukoze. Zrenjem se razlika smanjuje pa se pri tehnološkoj zrelosti grožđa odnos glukoze i fruktoze izjednači (Vrdoljak, 2009.).



Slika 2 Strukturna formula glukoze (Web 3)



Slika 3 Strukturna formula fruktoze (Web 4)

Pentozе su prisutne u manjim količinama (0,3 do 2 g/L), ne previru prilikom alkoholne fermentacije, zastupljenije su u crnim nego u bijelim vinima. Najpoznatije pentozе su L-arabinoza i D-ksiloza (Ribéreau-Gayon i sur., 2006.).

Od oligosaharida u grožđu su prisutni saharoza, maltoza, laktoza, rafinoza i trehaloza. Samo je saharoza bitna za kakvoću vina, ostali nemaju utjecaj.

Važno je još istaknuti i visokomolekularne polisaharide u grožđu, pektine, škrob, glikogen i sluzave tvari. Oni znatno otežavaju taloženje i bistrenje vina (Vrdoljak, 2009.).

Određivanje šećera u grožđu i moštu provodi se moštnim vagama (Oechslova i Baboova ili Klosterneuburška), te refraktometrom (Horvat, 2010.).

Visokokvalitetne sorte mogu imati od 22 do 28% šećera, dok kvalitetne sorte mogu imati 18 do 22% šećera (Vuković, 2000.).

Kiseline

Kiseline u vinu su prisutne kao normalni sastojci vina, ali i kao produkti kvarenja. Prema pravilniku o proizvodnji vina (NN 2/2005) ukupna kiselost vina u prometu mora biti najmanja 4 g/L, izraženo kao vinska kiselina, a najviše do 14 g/L.

Kiseline u vinu mogu biti:

- ukupne kiseline (sadržaj svih kiselina u vinu), iskazane kao vinska kiselina,
- hlapljive i nehlapljive kiseline.

Najveći udio čine vinska i jabučna kiselina. Udio jabučne kiselina je na početku visok, a prema stadiju pune zrelosti se smanjuje. Mala koncentracija kiseline u vinu daje tupi okus vinu (Horvat, 2010.).

Pad koncentracije kiselina u grožđu vezan je uz oksidaciju i izgaranje u procesu disanja, a ti procesi su vezani uz temperaturu. Prema tome, niska kiselost se bilježi u toplijim područjima, dok se visoka kiselost bilježi u hladnijim područjima (Prce, 2014.).

Kiseline u vinu su organske (hlapljive i nehlapljive), anorganske kiseline i soli različitih kiselina.

Organske kiseline uglavnom potječu iz grožđa odakle preko mošta prelaze u vino. Manji dio organskih kiselina nastaje u samom vinu transformacijom nekih sastojaka mošta tijekom alkoholne fermentacije ili kasnije za vrijeme čuvanja vina (Paunović i Daničić, 1976).

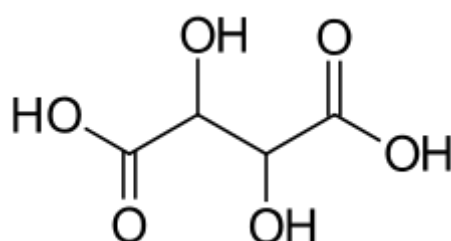
U vinu, organske kiseline mogu biti podrijetlom iz (Horvat, 2010.):

- grožđa odnosno mošta (vinska, jabučna, limunska, askorbinska, oksalna, glikolna, glukonska),
- kao produkti alkoholne fermentacije (piruvična, mliječna, octena, sukcinna, oksalna i fumarna kiselina),
- mliječna kiselina nastala malolaktičkom fermentacijom iz jabučne kiseline,
- kiseline nastale razvojem sive plijesni na grožđu.

Organske kiseline koje se nalaze u vinu su vrlo važne za organoleptička svojstva vina, te za fizikalno-kemijsku i mikrobiološku ispravnost vina (Horvat, 2010.).

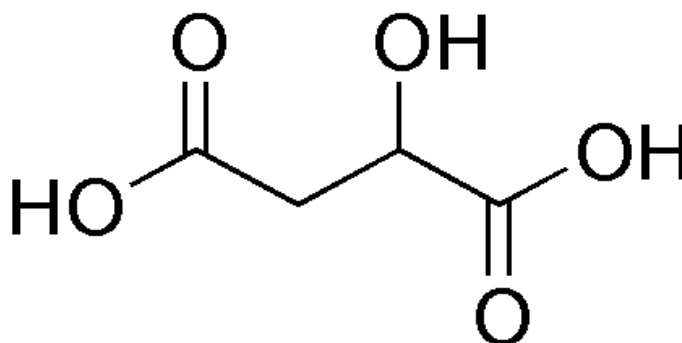
Od nehlapljivih kiselina u vinu treba istaknuti: vinsku, jabučnu, mliječnu, jantarnu i limunsku kiselinu. Udio nehlapljivih kiselina u vinu se kreće od 3,5 do 10 g/L.

Vinsku kiselinu sadržavaju svi zeleni dijelovi loze. U moštu se nalazi u količini od 1 do 8 g/L, a u vinu od 0,5 do 2 g/L. To je najjača i najizraženija organska kiselina mošta te najviše utječe na pH vrijednost vina. Vezivanjem s mineralima kalija i kalcija vinska kiselina prelazi u svoje soli – tartarate. Tartarati nisu dobro topljivi na nižim temperaturama pa se mogu istaložiti u obliku sitnih kristala (Vrdoljak, 2009.).



Slika 4 Strukturna formula vinske kiseline (Web 5)

Koncentracija jabučne kiseline u moštu iznosi 12 g/L, a u vinu od 0,6 do 2,7 g/L, u nekim slučajevima i do 12 g/L. Dozrijevanjem grožđa njena se koncentracija smanjuje. Pad koncentracije povezan je sa temperaturom zraka te je iz tog razloga koncentracija jabučne kiseline zastupljenija u vinima sjevernih krajeva i u hladnijim godinama. Veća koncentracija jabučne kiseline daje zeljast i neharmoničan okus vinu. Malolaktičkim (mliječno-kiselim) vrenjem jabučna kiselina se pretvara u slabiju (manje kiselu) mliječnu kiselinu.

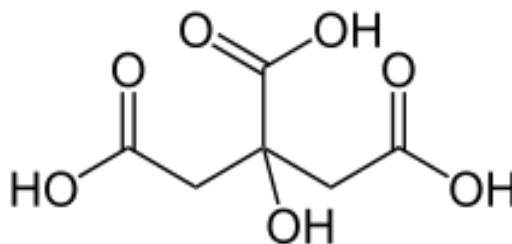


Slika 5 Strukturna formula jabučne kiseline (Web 6)

Mliječna kiselina se u vinu javlja kao sekundarni metabolit alkoholne fermentacije. U većoj mjeri nastaje u pokvarenom vinu uslijed metabolizma mliječno-kiselih bakterija.

Jantarna kiselina nastaje kao sekundarni produkt alkoholne fermentacije, iz acetaldehida i degradacijom glutaminske kiseline. Prisutna je u neznatnim količinama i vinu daje gorčinu.

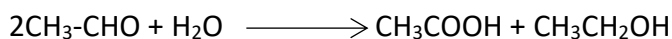
Limunska kiselina nastaje u procesu glikolize, Krebsovom ciklusu i ciklusu glioksalne kiseline, a mogu je stvoriti i plijesni (*Botrytis*) iz šećera grožđa. Limunska kiselina inhibira djelovanje kvasca, ali ga ne prekida. U moštu i vinu se nalazi u manjoj koncentraciji od vinske i jabučne. U toku razvoja bobice i sazrijevanja grožđa, sadržaj limunske kiseline se ne mijenja puno i kreće se u prosjeku od 0,3 do 0,8 g/L. Iz mošta prelazi u vino, u kojem je dosta nepostojana, a mogu je metabolizirati i mliječno kisele bakterije. Vina od grožđa koje je napadnuta plemenitom plijesni sadrže više limunske kiseline.



Slika 6 Strukturna formula limunske kiseline (Web 7)

Hlapljive kiseline predstavljaju grupu masnih kiselina koje se nalaze u vinu, a pod određenim uvjetima mogu ispariti. Nastaju uglavnom kao sekundarni proizvodi alkoholne fermentacije, a mogu nastati i u procesu kvarenja. Od hlapljivih kiselina najzastupljenija je octena kiselina. U vinu se nalazi u koncentraciji od 300 do 600 mg/L (Ribéreau-Gayon i sur., 2006.).

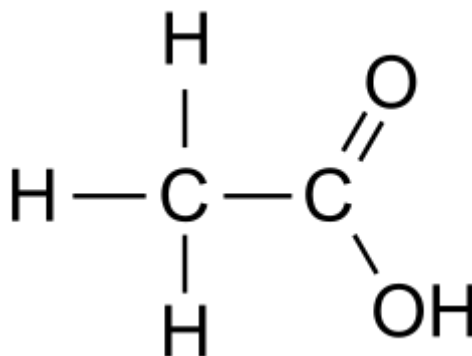
Octena kiselina nastaje kao sekundarni proizvod alkoholnog vrenja iz acetaldehida (Web 8):



ili nakon alkoholnog vrenja tijekom čuvanja vina, oksidacijom etanola:



Veće količine octene kiseline nastaju i kao rezultat nekog kvarenja djelovanjem bakterija (octikavost, zavrelica, vinski cvijet i dr.).



Slika 7 Strukturna formula octene kiseline (Web 9)

Prema Pravilniku o proizvodnji vina (NN 2/2005.) hlapiva 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.

Vino može sadržavati i sljedeće kiseline: mravlju, propionsku, maslačna, kaprionsku, kaprilnu, kaprinsku i laurinsku kiselinu.

Mravlja kiselina se nalazi u tragovima kao i propionska i maslačna kiselina, osim u vinima u kojim je došlo do nekog kvarenja.

Masne kiseline srednjeg lanca (kaprionska, kaprilna, kaprinska kiselina), koje čine bitnu komponentu arome vina, sintetiziraju kvasci kao međuprodukt pri biosintezi masnih kiselina dugog lanca. Ove kiseline u vinu, u interakciji s drugim hlapivim komponentama, pozitivno utječu na njegove aromatske karakteristike.

Anorganske kiseline koje se javljaju u moštu i vinu nalaze se najčešće u obliku kalijevih i kalcijevih soli. Najvažnije su fosforna i sumporna kiselina, a njihov sadržaj u moštu i vinu je nizak i rijetko prelazi 0,5 g/L (Ribéreau-Gayon i sur., 2006.).

Aldehidi i ketoni

Aldehidi i ketoni predstavljaju skupinu spojeva koji imaju veliki značaj za organoleptička svojstva vina. Utječu na tvorbu karakteristične arome i bouqueta vina. Aldehidi su vrlo reaktivni spojevi i lako se oksidiraju u karboksilne kiseline. Njihova aktivnost se lako inaktivira vezanjem sumporaste kiseline što je jedan od glavnih razloga sumporenja bačvi. U najvažniju reakciju spada vezivanje aldehida sa sumporastom kiselinom i njenim solima, pri čemu nastaju lako topljive kiseline. Pozitivan utjecaj aldehida je u tome što u čistom obliku daju oštar miris, koji podsjeća na voće. Najintenzivniji miris daju heptanal i izovalerijanski aldehidi s većim brojem ugljikovih atoma. Tijekom alkoholne fermentacije nastaju novi aldehidi, uglavnom acetaldehid na kojega otpada 90% (Vrdoljak, 2009.). Jedan dio acetaldehida nastaje oksidacijom etanola za vrijeme čuvanja vina. U bijelim vinima koncentracija acetaldehida može biti i do 300 mg/L, dok ga u crnim vinima ima znatno manje (20 do 30 mg/L). U većim količinama vinu daje specifičan okus i miris na oksidirano i ishlapljeno (miris i okus oskоруše, jabuke odstajale na zraku) (Web 2).

Alifatskih aldehida u vinu ima vrlo malo, te daju ugodan voćni miris (Vrdoljak, 2009.).

Ketona u moštu i vinu su slabo zastupljeni (40 do 60 mg/L). Najzastupljeniji je aceton, a slijede ga acetoin i diacetil. U znatno manjim količinama ima butan-2-ona, pentan-2-ona, 3-oksi-2-butan-2-ona, heptan-2-ona i oktan-3-ona. Većina ima miris svježeg maslaca, što u koncentracijama većim od 1 mg/L može dati aromu užeglost (Vrdoljak, 2009.).

Esteri

Esteri nastaju reakcijom esterifikacije alkohola i kiselina. Grožđe sadrži malo estera i to su uglavnom esteri masnih kiselina i alkohola, dok ih u vinu ima više. Udio estera se povećava tijekom fermentacije te je to razlog zašto ih ima više u vinu nego u polaznoj sirovini, grožđu.

Od estera masnih kiselina u vinu su zastupljeni: etil propionat, etil valerijat, etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanat.

Esteri octene kiseline su: etil acetat, propil acetat, izopropil acetat, izobutil acetat i izoamil acetat i oni daju ugodan miris i svježinu vinu (Vrdoljak, 2009).

Tvari arome

Tvari arome potječu iz brojnih skupina kemijskih spojeva koji su prisutni u samom grožđu i tijekom vinifikacije prelaze u vino. Aroma vina naziva se bouquet. Ona određuje karakter i kvalitetu vina. Sadržaj tvari arome u vinu ovisi o sorti vinove loze, zrelosti grožđa, načinu uzgoja, klimi, sastavu tla, primjeni agrotehničkih mjera, te o samoj tehnologiji proizvodnje vina. Aromatične tvari nalaze se uglavnom u koži, znatno manje ih je u mesu i sjemenkama grožđa. Poznate su brojne aromatične tvari koje pripadaju velikom broju različitih, lako hlapljivih kemijskih spojeva: hlapive karboksilne kiseline, alkoholi, esteri, aldehidi, ketoni, eterična ulja, više masne kiseline, terpeni, te tvari slične smolama i voskovima (Vrdoljak, 2009.).

Arome u vinu, ovisno o njihovom podrijetlu i načinu formiranja možemo podijeliti na:

- primarne (sortne) arome,
- sekundarne (fermentativne),
- tercijarne arome (bouquet).

Najvažniji hlapljivi spojevi primarne arome grožđa, spojevi nositelji sortne arome, su monoterpeni (Pozderović, 2010.):

- geraniol,
- linalol,
- nerol,
- α -terpineol,
- citronelol

- hotrineol

Ovi spojevi su odgovorni za voćne i cvjetne mirise aromatičnih sorti. Terpeni mogu biti slobodni u hlapljivom obliku ili vezani za šećere (glikozidi).

Sekundarne arome su rezultat mikrobioloških transformacija mošta (alkoholne i malolaktičke fermentacije), a predstavljene su prvenstveno acetatnim i etilnim esterima, te višim alkoholima (1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2- i 3-metil-1-butanol).

Tercijarne arome (bouquet), se formiraju za vrijeme dozrijevanja i starenja vina, kemijskim i biokemijskim transformacijama (hidrolize, esterifikacije, oksidacije) već spomenutih aromatskih spojeva.

Tvari arome se određuju instrumentalnim metodama: plinska kromatografija (GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), analitičkim metodama i senzorskim ocjenjivanjem (Vrdoljak, 2009.).

Enzimi

Enzimi igraju vrlo važnu ulogu u vinarstvu kao pokretači kemijskih reakcija tijekom fermentacije, vinifikacije, starenja vina i razvoja sekundarnog bouqueta vina. Ovisno o zdravstvenom stanju grožđa, enzimi uglavnom provode reakcije oksidacije i hidrolize. Prisutan je veliki broj enzima, a najvažniji su: saharaza, pektinaza, tanaza i katalaza.

Saharaza (invertaza) provodi hidrolizu saharoze u glukozu i fruktozu. Pektaza je značajna za bistrenje vina, hidrolizira pektinske tvari na metanol i poligalakturonsku kiselinu. Enzim tanaza se nalazi u grožđu, a u mošt i vino dospijeva sa plijesni trulog grožđa. Tanaza katalizira tvorbu taninskih tvari. Katalaza ubrzava oslobađanje kisika iz vodikovog peroksida i ostalih peroksidnih spojeva (Prce, 2014.).

Fenolni spojevi

Fenoli su organski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina (OH) neposredno vezanih na benzenski prsten. Po broju hidroksilnih skupina fenoli se dijele na monofenole, difenole, trifenole i polifenole. Fenolni sastav mošta i vina, te njihova

antioksidativna aktivnost se dosta istražuje ponajviše zbog velikog utjecaja na organoleptička svojstva vina (boja, gorčina, trpkost) te njihov blagotvoran utjecaj na zdravlje.

U suhim bijelim vinima ukupni fenolni spojevi se nalaze u koncentraciji između 50 i 350 mg/L, dok se u crnim vinima nalazi znatno veća koncentracija ukupnih fenola. Razlog toga je što se većina fenolnih spojeva nalazi u kožici i sjemenci bobice, koje su zbog tehnologije proizvodnje bijelih vina vrlo kratko u doticaju sa sokom grožđa, te zbog činjenice da bijele sorte uopće ne sadržavaju neke pigmente (npr. antocijane) koji su vrlo značajni za sastav ukupnih polifenola u crnom vinu (Osrečak i sur., 2011.).

Fenolne tvari se lako oksidiraju u dodiru sa zrakom. Djelovanjem enzima polifenoloksidaza oksidacija je intenzivnija i dolazi do pojave posmeđivanja vina. Namirnice koje sadrže visoki udio fenolnih spojeva su vrlo značaja za industriju zbog utjecaja na oksidaciju lipida što rezultira konačnim proizvodom visoke nutritivne vrijednosti i kvalitete (Kähkönen i sur., 1999.).

Prema strukturi spojeva, fenoli se dijele na fenolne kiseline, flavonoide i neflavonoide (stilbeni). Najznačajniji fenolni spojevi u moštu i vinu su fenolne kiseline i njihovi derivati, flavonoidi, tanini i antocijani. Fenolni spojevi ekstrahiraju se alkoholnom fermentacijom iz masulja, i prelaze iz mošta u vino (Mihovilović, 2016.).

Predstavnici neflavonoida u grožđu i vinu su fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne) i stilbeni, a predstavnici flavonoida su flavonoli, proantocijanidini, flavan-3-oli, antocijani i tanini (Jakobek i sur., 2009.).

Flavonoidi se u prirodi nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani su s molekulama šećera i hidroliziraju tijekom fermentacije. To su žuti pigmenti sadržani u kožici bijelog i crnog grožđa. Najviše flavonoida se nalazi u crnim vinima i čine 85% ukupnih fenola, dok u bijelim vinima prevladavaju neflavonoidi (Jakobek i sur., 2009.).

Flavonoli su svijetlo žuti pigmenti prisutni i u bijelom i u crnom grožđu. U bijelim vinima su nositelji boje, a u crnim vinima su maskirani antocijanima. U grožđu se javljaju kao glikozidi i brzo hidroliziraju, a najviše ih ima u kožici grožđa brzo hidroliziraju, a najviše ih ima u kožici

grožđa. Kvercetin je jedan od najzastupljenijih flavonola u kožici crvenog grožđa (Moreno i Peinado, 2012.).

Antocijani se nalaze u pokožici grožđa, odgovorni su za plavu, crvenu i ljubičastu boju. Sadržaj antocijana u vinu ovisi o: vrsti grožđa, klimatskim uvjetima, uvjetima uzgoja vinove loze, vrsti tla, itd. Vrlo su nestabilne molekule, a na njihovu stabilnost utječu pH, kisik, temperatura i svjetlost, enzimi, struktura i koncentracija. Većina antocijana različiti su oblici tri osnovna spoja: pelargonidina, cijanidina i delfinidina.

Hidrolizom antocijana nastaju antocijanidini (aglikoni) i šećerna komponenta. Šećeri koji su vezani na antocijanidine i čine glikozide su: monosaharidi (glukoza, ramnoza, galaktoza, arabinoza i ksiloza), disaharidi i trisaharidi (rutinoza, soforoza, ambubioza i glukorutinoza). Molekule antocijanidina su podložne degradaciji tijekom prerade, na njih utječu pH, temperatura, svjetlost, kisik, prisutnost enzima, flavonoida, proteina i iona metala (Pozderović, 2010.).

Glavnu razliku između antocijana čini broj hidroksilnih skupina, broj šećera koji su vezani na njihovu strukturu, alifatskih ili aromatskih karboksila vezanih na šećer u molekuli, te položaj tih veza. Razliku čini broj i pozicija hidroksi i metoksi skupina u B-prstenu molekule (Kong i sur., 2003.).

Tanini su polimeri flavonoidnih i neflavonoidnih fenola. Nalaze se u čvrstim dijelovima grožđa, kožici i sjemenkama, a najveći utjecaj imaju na trpkost, gorčinu i oporost vina. Dijeleg se na hidrolizirajuće i kondenzirane tanine.

Hidrolizirajući tanini su polimeri galne kiseline ili njenih derivata te šećera glukoze. Javljaju se kao esteri i lako hidroliziraju. U grožđu se većinom nalaze kondenzirani tanini koji se teže hidroliziraju. Koncentracija tanina u bijelom moštu iznosi maksimalno 0,2 g/L, a u crnom moštu 1 do 2,5 g/L i više. Koncentracija tanina u bijelom vinu je maksimalno 0,5 g/L, a u crnom vinu 4 g/L (Perić, 2013.).

Flavan-3-oli su bezbojni spojevi, prisutni u prirodnim supstratima kao aglikoni. Koncentracija im varira obzirom na sortu, od 5 do 100 mg/L. U vino dospijevaju ekstrakcijom iz sjemenke, kožice i peteljke. Nemaju utjecaj na boju vina, ali mu daju oporost.

Neflavonoidi su sastavni dio lignina i tkiva biljaka, a dolaze vezani na antocijane i šećere. Nalaze se u kožici bobice, a u vinu se nalaze slobodni ili u obliku estera, te pridonose aromi vina. Osnovni predstavnici neflavonoidi su: derivati hidroksicimetne kiseline, derivati hidroksibenzojeve kiseline i stilbeni.

Derivati hidroksicimetne kiseline su najvažniji fenoli bijelih vina i nalaze se u grožđu i soku. Hidroksicimetne kiseline u grožđu se ne nalaze u slobodnoj formi, već su vezane u estere s vinskom kiselinom, a mogu se vezati i sa šećerima i drugim organskim kiselinama. U vinu su vezane sa vinskom i manje sa jabučnom kiselinom, a dijelom se nalaze u slobodnoj formi. Glavnina hidroksicimetnih kiselina se kod većine kultivara *Vitis vinifera* nalazi u stanicama mesa (Cedilak, 2016.).

U derivate hidroksibenzojeve kiseline ubraja se galna, vanilinska i salicilna kiselina. Sjemenka sadrži galnu, a kožica salicilnu kiselinu. Vaniliska kiselina nastaje tokom starenja vina, djelomičnom degradacijom antocijana.

Od stilbena najznačajniji je resveratrol. Nastaje u grožđu kao odgovor na infekciju izazvanu plijesnima ili na utjecaj UV-zračenja. Ekstrahira tijekom vinifikacije crnih vina. Resveratrol je najpoznatiji antioksidant, a sadrži i mnoga druga povoljna svojstva, sprječava rast tumorskog tkiva i pojavu osteoporoze, djeluje kao prirodni fungicid, sprječava replikaciju virusa herpesa (Karalić, 2014.).

Mineralne tvari (pepeo)

Mineralne tvari su anorganske tvari vina koje ulaze u njegov sastav, a zaostale su nakon isparavanja vode i potpunog spaljivanja suhe tvari. U grožđe dospijevaju iz zemljišta, a manji dio mineralnih tvari dolazi u vino prilikom prerade grožđa i njege vina (Vrdoljak, 2009.).

Mineralne tvari se nalaze u moštu u količini od nekoliko g/L, a najviše je kalija, kalcija, magnezija, željeza i fosfora. Bolju aromu i bouquet te jače izražene sortne karakteristike grožđa imaju vina sa većom količinom mikroelemenata (Fe, Mn, Zn, Co, Ni) (Vrdoljak, 2009.).

Količina pepela u vinu ovisi o sorti vinove loze, kakvoći i zrelosti grožđa, sastavu tla, mikro i makroklimatskim uvjetima, te tehnologiji prerade grožđa u vino. Crna vina sadrže veće

količine pepela jer se tijekom fermentacije masulja ekstrahiraju veće količine mineralnih tvari iz čvrstih dijelova grožđa (Vrdoljak, 2009.).

Ekstrakt vina

Ukupni suhi ekstrakt vina predstavlja skup svih organskih i mineralnih tvari koje se nalaze u vinu i nisu hlapljive pod specifičnim fizikalnim uvjetima. Ekstrakt sadrži ugljikohidrate, nehlapive kiseline (vinska, mliječna, jabučna), mineralne tvari, glicerol, butilen, glikol, bojane i taninske tvari (Vrdoljak, 2009.).

Ekstrakt u vinu može biti:

- ukupni suhi ekstrakt, čine ga svi sastojci vina koji nisu hlapivi pod specifičnim fizikalnim uvjetima,
- nereducirani ekstrakt bez šećera, dobije se kada se od ukupnog suhog ekstrakta oduzme sadržaj ukupnih šećera u vinu,
- reducirajući ekstrakt, dobije se kada se od ukupnog suhog ekstrakta oduzme sadržaj ukupnih šećera umanjen za 1 g ako je sadržaj šećera preko 1 g/L.

Uz ova tri navedene ekstrakta izračunava se još i ekstrakt bez šećera i bez hlapivih kiselina.

Sadržaj ekstrakta u vinu je važan parametar kakvoće, ovisi o vrsti vina, sorti grožđa, klimatskim uvjetima i tehnologiji prerade. Kvalitetne i vrhunske sorte daju vina s više ekstrakta, dok stolne sorte daju vina sa manje ekstrakta, isto tako i krajevi s manje sunca, daju manje ekstrakta u odnosu na krajeve s puno sunca, koji daju vina s većim sadržajem ekstrakta. Crna vina su bogatija ekstraktom zbog većeg sadržaja tanina (Vrdoljak, 2009.).

Dušične tvari

Najviše dušičnih tvari nalazi se u čvrstim dijelovima grožđa, peteljkovini, kožici i sjemenkama. Količina ovisi o bogatstvu tla dušičnim spojevima, zdravstvenom stanju (zdravo grožđe ima više spojeva s dušikom) i o načinu prešanja (preševina ima više dušičnih tvari od samotoka). Spojevi sa dušikom se u moštu i vinu nalaze kao organski i anorganski spojevi. Tu spadaju:

proteini, polipeptidi, amini, amidi, heksozamini, nukleinski dušik, biološki amini (Zoričić, 1996.).

Dušične tvari mogu utjecati na boju, aromu, bistroću i postojanost vina. U vinu se nalaze u malim količinama, a ukoliko su prisutni u većim količinama, mogu uzrokovati zamućenje vina, uz to su i dobar izvor dušika bakterijama koje uzrokuju kvarenja vina (Vrdoljak, 2009.).

U vino se nalazi znatno manja količina dušika u odnosu na mošt, a to je posljedica ugradnje aminokiselinskog dušika u stanice kvasca za fermentaciju. Kod vina, čiji je mošt dobiven kontinuiranim prešanjem, smanjena je koncentracija ukupnog dušika što se može objasniti vezanjem proteina i taloženjem s taninskim tvarima (Vrdoljak, 2009.).

Koloidi vina

Koloidne tvari u vinu imaju nepovoljan učinak na organoleptička svojstva vina. Dovode do zamućenja vina, povećanje viskoznosti, opalesciranje i pojavu kataforeze (čestice posjeduju istovrstan naboj). To su sluzave tvari sastavljene od proteina i pektinskih tvari. Veličina čestica je od 1 do 100 μm . Koloidi se dijele na lipofilne i liofobne. Liofilni koloidi imaju sposobnost vezanja vode i tako povećavaju kiselost vina. Liofilni koloidi uglavnom sadrže kompleksne spojeve željeza, fosfora i bakra. Liofobni koloidi su osjetljivi na elektrolite te pri malim promjenama pH dolazi do njihove koagulacije (Prce, 2014.).

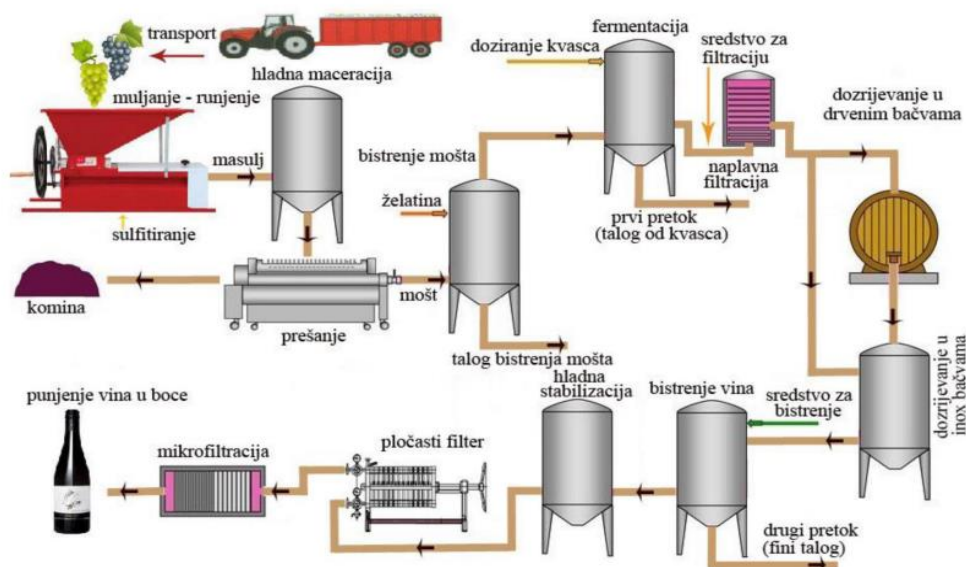
Proteini

Proteini su makromolekule građene od velikog broja aminokiselina međusobno povezanih peptidnom vezom. U vinu potječu iz grožđa i iz kvasaca, a odumiranjem kvasaca prelaze u vino. Vrlo su nestabilni spojevi (posebno u bijelim vinima) i u vinu se ponašaju kao koloidi sa pozitivnim električnim nabojem. Talože se sa taninima. Mlada bijela vina sadrže veću količinu koaguliranih proteina odakle i potječe njihova nestabilnost. Crna vina imaju znatno više tanina u odnosu na bijela, te zbog toga količina koaguliranih proteina predstavlja manji problem kod crnih vina jer se oni talože sa taninima (Vrdoljak, 2009.).

2.4. PROIZVODNJA VINA

Tehnologija proizvodnje vina zahtjeva dosta uloženog truda, ljubavi i vremena. Podrazumijeva pravilan izbor osnovnih postupaka obrade grožđa i mošta što u konačnici daje visokokvalitan finalni proizvod.

Proizvodnja bijelih vina



Slika 8 Vinifikacija bijelih vina (Web 10)

Proizvodnja vina započinje berbom grožđa. Potrebno je pratiti dozrijevanje grožđa (15 dana prije berbe) kako bi se odredio termin berbe. Pravilno određeno termina berbe jedan je od uvjeta za proizvodnju dobrog vina. Prati se udio šećera i ukupnih kiselina.

Kada je postignuta stadij tehnološke zrelosti započinje se s berbom. Berba se može obavljati ručno ili strojno. Nakon berbe grožđe se odvozi u vinariju u gajbama ili u rinfuzi u traktorskim ili kamionskim prikolicama.

Vrlo je važno da period od berbe do prerade grožđa bude što kraći kako bi se spriječili oksidativni procesi, naročito ako su grozdovi i bobice oštećeni tijekom berbe ili ukoliko je

grožđe oštećeno bolestima te da bi se spriječilo razmnožavanje mikroorganizama i divljih kvasaca.

Prijem grožđa u vinariji se sastoji od vaganja, vizualnog pregleda (stanje zrelosti, zdravlje, pljesnivost, oštećenje od tuče) i određivanja šećera i ukupnih kiselina (Vrdoljak, 2009.).

U većim vinarijama grožđe se prihvaća u prihvatne bunkere i transportira do muljače, dok se u manjim vinarijama prihvaća u manje bunkere ili se direktno ubacuje u prihvatni koš stroja za runjanje i muljanje grožđa.

Runjanje je postupak odvajanja peteljke od bobica, provodi se u uređaju sa perforiranim cilindrom i lopaticama, bobice padaju u muljaču. Uređaj za runjanje može biti prije ili poslije muljače. U muljači se odvija gnječenje bobica i oslobađanje soka (mošta) iz mesa bobica (muljanje grožđa). Danas postoje moderni strojevi, runjača – muljača, na kojima se bobica od peteljke odvaja runjanjem u bubnju s rupicama, a zatim se na valjcima gnječe (muljaju) bobice, na taj način se dobije smjesa soka i krutih dijelova bobice (sjemenka i kožica), odnosno masulj.

Runjanje i muljanje je potrebno obaviti u što kraćem vremenskom periodu. Vrlo važno je odvajanje peteljkovine jer se vino oslobađa gorčine i trpkosti, te mirisne komponente sorte dolaze do većeg izražaja (Muštović, 1985.).



Slika 9 Električna runjača-muljača za grožđe (Web 11)

Ukoliko grožđe nije zdravo potrebno ga je sumporiti već kod muljanja i runjanja dodatkom kalijevo­g metabisulfita (vinobrana) ili 15% otopinom sumporaste kiseline. U ovoj fazi se dodaje samo dio sumporaste kiseline, a ostatak se dodaje poslije bistrenja mošta (Pozderović, 2013.).

Nakon muljanja i runjanja slijedi prešanje masulja. Prije prešanja masulj se može depektinizirati s ciljem razgradnje protopektina i pektina kako bi se olakšalo prešanje kao i veće iskorištenje mošta. Prešanje je potrebno provesti u što kraćem roku, jer što je kraći vremenski period od muljanja do prešanja vino će biti kvalitetnije, boljeg okusa i mirisa.

Nakon što se preša napuni masuljem otoči se samotok. Samotok je mošt dobiven istjecanjem iz preše prije tlačenja. To je najkvalitetniji dio mošta, sadrži više šećera od prešavine, ta manji udio pektina i tanina i daje najkvalitetnije vino.



Slika 10 Preša za grožđe (Web 12)

Prešanje se provodi u tri faze, najčešće kontinuiranim pužnim prešama, a kvaliteta prešavine ovisi o duljini prešanja i primijenjenom tlaku. Prešanje se ne smije provoditi brzo i naglo, a tlak je potrebno povećavati postepeno. Primjenom manjeg tlaka i laganim istjecanjem mošta, manje pektina prijeđe iz tropa u mošt, a naglim povećanjem tlaka dolazi do brzog sabijanja tropa i onemogućeno je otjecanje mošta.

Ukoliko nije provedeno sumporenje prilikom muljanja grožđa potrebno je sumporiti mošt nakon prešanja. Mošt se sumpori radi taloženja nečistoća i ubrzanog bistrenja vina, kako bi se spriječilo razmnožavanje štetnih mikroorganizama i divljih kvasaca u moštu te radi sprječavanja oksidacijskih procesa, enzimatskog i neenzimatskog posmeđivanja. Količini dodanog sumpora ovisi zdravstveno stanje grožđa, sastavu mošta i temperaturi. Gnjlilo i oštećeno grožđe potrebno je jače sumporiti kao i mošt s više sladora, jer slador veže dio sumpora i na taj način smanjuje udio aktivnog sumpora. Prevelike količine sumpora loše djeluju na zdravlje ljudi te na organoleptička svojstva vina (Pozderović, 2013.).

Da bi se ubrzalo bistrenje mošta, kasnije vina, potrebno je provesti depektinizaciju mošta. Mošt je potrebno depektinizirati radi smanjenja viskoziteta mošta i kako bi se ubrzalo njegovo bistrenje. Depektinizacija se provodi dodatkom depolimerizacijskih i deesterifikacijskih enzima. Brzina depektinizacije je ovisna o temperaturi, optimalna temperatura je od 10 do 25°C i više. Kod nižih temperatura se dodaje više enzima. Depektinizacija se provodi u vertikalnim tankovima u kojima će se provesti i bistrenje mošta (Pozderović, 2013.).

Bistrenje mošta se provodi kako bi se istaložile nečistoće koje su u mošt dospjele sa grožđa i koje bi kasnije mogle negativno utjecati na bistroću i kvalitetu vina. Bistrenje mošta se može provoditi spontanim taloženjem kroz 24 sata ili dodatkom bistrila. Vrenje mošta je sigurnije i mirnije ukoliko je mošt izbistren. Bistrenjem vina vežu se aroma, tvari boje i druge tvari koje utječu na okus vina. Najveći dio arome se producira fermentacijom mošta, dio nastaje tijekom odležavanja vina, a dio potječe iz mošta. Iz tog razloga je potrebno bistrenje provesti onda kada će se oduzeti najmanje arome. U suvremenim postupcima se provodi bistrenje mošta prije vrenja kako bistrila ne bi vezala više arome.

Nakon bistrenja mošt se prebaci u posudu u kojoj će se provoditi alkoholno vrenje. Alkoholno vrenje mošta izazivaju kvasci koji u moštu razlažu šećer na etanol, CO₂ i druge sastojke, glicerol, jantarnu kiselinu, hlapive kiseline, acetaldehid, više alkohole, aminokiseline i metanol uz oslobađanje topline. Prva faza fermentacije je aerobna tj. kvasci koriste kisik iz zraka i potpuno razlažu šećer do CO₂. Energija koja se oslobađa koristi se za intenzivan rast i razmnožavanje selekcioniranog kvasca. U drugoj (anaerobnoj) fazi oslobađa se znatno manja

količina energije. Šećeri se razlažu do etanola i CO₂. Fermentacija je strogo anaeroban proces, ali povremenim provjetravanjem postiže se bolje iskorištenje šećera (Vrdoljak, 2009.).

Pored dodatka razmnožene kulture selekcioniranog vinskog kvasca u mošt je potrebno dodati vitamine i minerale koji su hrana kvascu. Dodatkom ovih preparata osigurava se sigurno vrenje bez zastoja, te se sprječava nastanak nekih štetnih tvari (SO₂). Kvasac je značajan za nastajanje arome vina jer najveći dio arome vina nastaje tijekom alkoholnog vrenja (Pozderović, 2013.).

Prilagodбом pojedinih čimbenika tijekom fermentacije može se dobiti vino željene kakvoće i sastava: temperatura mošta, sastav mikroflore mošta, kemijski sastav mošta, sadržaj SO₂ i CO₂.

Vrenje se provodi u drvenim, metalnim ili betonskim vrionicima, u dvije odvojene faze:

- Glavno (burno vrenje), toplo, na temperaturi od 15 do 18 °C (maksimalno 20 °C) u trajanju pet do deset dana i hladno na 10 do 15 °C, od 7 do 14 dana.
- Naknadno (tiho) vrenje na minimalnoj temperaturi od 15 °C, tri do šest tjedana.

Alkoholna fermentacija je zaštićen proces prilikom kojeg vinski kvasci proizvode CO₂ čime nastaju anaerobni uvjeti nepogodni za rast i razmnožavanje nepoželjnih mikroorganizama.

Suvremena tehnologija danas preporuča vrenje pri niskim temperaturama tzv. hladno vrenje na temperaturama od 8 do 17 °C uz upotrebu selekcioniranih kvasaca pogodnih za hladno vrenje. Na visokim temperaturama (25 °C i više) vrenje je burno, CO₂ naglo izlazi i odnosi iz mošta aromatične tvari i alkohol što nepovoljno djeluje na kvalitetu vina. Takva vina nemaju izražen sortni miris (Pozderović, 2013.).

Pri nižim temperaturama (13 do 17 °C ili niže) vrenje je ujednačenije, iskorištenje šećera je bolje, dobivaju se skladnija vina sa više aromatičnih i buketnih tvari i manje hlapljivih kiselina. Kod nižih temperatura u vinu se otapa više CO₂ koji daje svježinu vina. Ova vina imaju izraženi sortni voćni miris, bolje zadržavaju svježinu i imaju bolji okus (Pozderović, 2013.).

Nakon što je završilo glavno (burno vrenje) u vinu je zaostao manji udio šećera zbog čega se nastavlja tiho (naknadno) vrenje pri kojemu prevrije preostali šećer. Ukoliko je nakon glavnog vrenja u vinu zaostala veća količina šećera, naknadno vrenje može biti burnije i do njega uglavnom dolazi nakon pretoka, u proljeće, kada temperatura u podrumu poraste. Kada je vino proizvedeno od grožđa koje ima visoki udio šećera, kod takvog vina redovito dolazi do naknadnog vrenja i takvo vino sporije dozrijeva.

Završetkom glavnog vrenja potrebno je nadolijevanje posuda u kojima se odvija vrenje kako bi se održali anaerobni uvjeti. Nadolijevanje se vrši samo u slučaju korištenja drvenih bačvi. Vino se naglo hladi, oslobađa se nakupljeni CO₂, dolazi do intenzivnog taloženja nepoželjnih produkata vrenja i spontanog bistrenja (talože se stanice vinskog kvasca, soli teških metala, proteini i zaostale čestice grožđa te se razgrađuju vinska i jabučna kiselina) (Vrdoljak, 2009.).

Nakon završetka vrenja, odležavanjem vina, u vinu dolazi do bistrenja te izgradnje okusa i mirisa vina. Ove promjene ovise o sastavu mladog vina, tehnološkim i enološkim postupcima, provedbi vrenja, temperaturi podruma, vrsti posuda (cisterne, inox posude, drvene bačve) i mnogim drugim faktorima. U procesu dozrijevanja vina značajnu ulogu ima kisik iz zraka s kojim vino dolazi u kontakt tokom pretoka, a kod drvenih bačvi manjim dijelom i kroz dužice bačve. Manja količina kisika je nužna i povoljno utječe na razvoj aromatičnih i buketnih tvari. To je razlog zbog kojeg se prvi pretok provodi na otvorenom, uz veći pristup zraka. Veće količine zraka su nepovoljne za kvalitetu vina i zbog toga se vina u kasnijim fazama ne smiju zračiti. Pretko je važna operaciju u proizvodnji vina. Vrijeme prvog pretoka ovisi o stupnju prevrelosti vina, jakosti vina udjelu kiseline, zdravstvenom stanju vina i stanju kvasca. Zdravo vino, po završetku vrenja, se prvi puta pretače kad se potpuno izbistri. Drugi pretok vina ovisi o vrsti vina i vremenu čuvanja, ako se vino dulje čuva potrebno ga je drugi puta pretočiti prije ljetnih mjeseci. Visokokvalitetna vina se mogu treći puta pretočiti nakon ljetnih mjeseci.

Završetkom fermentacije dolazi do spontanog bistrenja vina taloženjem produkata i spojeva koji su nastali tijekom prerade grožđa i vrenja. Bistroča je pored boje, okusa i mirisa važan faktor kvalitete. Bistrenjem se uklanjaju labilni i nestabilni spojevi, vino dobiva poželjna organoleptička svojstva, boju, bistroću, okus, miris i kemijski sastav. Bistrenje se može

ubrzati dodatkom različitih bistrila, primjenom fizikalno-kemijskih postupaka (hlađenje, ionoizmjenjivači itd.), filtriranjem i centrifugiranjem. Da bi se vino moglo puniti u boce mora biti potpuno bistro i stabilno. Nestabilni spojevi koji su trenutno otopljeni (proteini, tanini, pektini, spojevi željeza) odstranjuju se dodatkom enoloških spojeva (bistrila) koji će te spojeve vezati na sebe i na taj način ih izdvojiti iz vina i spriječiti njihovo taloženje ili taloženje njihovih produkata. Mehaničko odstranjivanje nečistoća iz vina provodi se pomoću filtera ili centrifugalnih separatora. Za filtraciju se najčešće koriste pločasti, ramski i naplavni filtri. Novi postupak filtracije vina je membranska filtracija. Membranskom filtracijom se iz vina uklanjaju makromolekule, proteini, tanini te mikroorganizmi tako da se dobije sterilno vino.

Pored bistrenja, važna je hladna stabilizacija vina. Hladna stabilizacija se provodi hlađenjem vina na temperaturu blizu temperature smrzavanja vina i držanjem na toj temperaturi 6 do 8 dana. Temperatura ovisi o sadržaju alkohola i ekstraktivnim tvarima u vinu. Pri hladnoj stabilizaciji dolazi do ubrzane kristalizacije i taloženja tartarata (soli vinske kiseline). Osim tartarata, koaguliraju i talože se nestabilne bojene tvari, proteini, pektini, a velikim dijelom se izdvajaju i talože mikroorganizmi. Nakon hladne stabilizacije potrebno je izvršiti filtraciju vina dok je još hladno (Pozderović, 2013.).

Punjenje vina predstavlja završnu fazu. Vino koje se puni mora biti stabilno kako u boci ne bi stvaralo talog. Vino u boci mora dugo vremena ostati isto ili dobivati na kvaliteti. Zbog toga je važno da se tijekom punjenja ne degradira, kao i da se u boci osiguraju uvjeti (SO_2 , O_2 i dr.) za kvalitetno čuvanje vina. To se posebno odnosi na mlada bijela vina, koja su puno osjetljivija od crnih vina. Također je važno odabrati pravo vrijeme punjenja, za flaširanje mladih kvalitetnih bijelih vina, proljetno-ljetni period je pravo vrijeme za punjenje, kad su potpuno izražene sortne karakteristike (cvjetno – voćne karakteristike), mirisa i okusa. Odležana zrela vina pune se po završetku procesa dozrijevanja, u bilo koje doba godine, a obična, konzumna vina se mogu puniti po potrebi i tijekom cijele godine (Web 14).

2.5. ODREĐIVANJE SASTOJAKA AROME PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

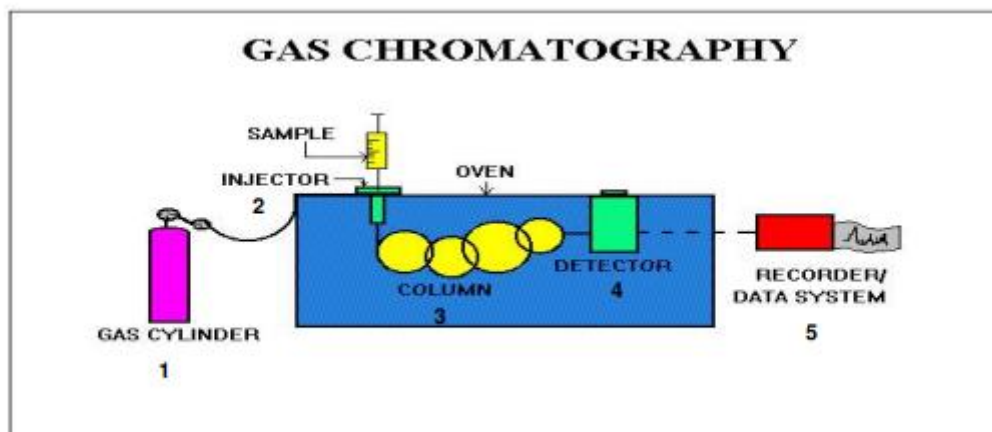
Plinska kromatografija

Kromatografija (grč. *chroma* – boja, *graphein* – pisati) je fizikalna metoda separacije kod koje se sastojci smjese (uzorka) raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, (stacionarna) dok se druga kreće u određenom smjeru (pokretna ili mobilna faza). Uzorak je otopljen u pokretnoj fazi (tekućina, plin, fluid pri superkričnim uvjetima) i kreće se uzduž nepokretne faze koja može biti u koloni ili na ravnoj plohi.

Plinska kromatografija je najraširenija separacijska tehnika kod koje je pokretna faza plin (plin nosioc), a razvila se 1950-ih. U plinskoj kromatografiji (GC) uzorak se injektira na početak kromatografske kolone, gdje isparava, a eluiranje se vrši pomoću protoka inertnog plina kao mobilne faze. Odvajanje sastojaka na GC koloni uvjetovano je razlikom u njihovoj hlapivosti. Plin nosioc nema interakcija s analiziranim komponentama već služi isključivo kao transportno sredstvo (Primorac, 2007.).

Uređaj u kojemu se vrši proces kromatografiranja naziva se plinski kromatograf, a izgrađen je od nekoliko osnovnih dijelova (**slika 11**) (Primorac, 2007.):

- Izvor stalne struje plina nosioca – boca ili generator (1)
- Uređaj za unošenje uzorka (injektor) (2)
- Kromatografska kolona smještena u termostatiranom prostoru (peći) (3)
- Uređaj za registriranje izeluiranog sastojka u struji plina nosioca kao funkcije vremena (detektor) (4)
- Pisač – Integrator – Računalo (5)



Slika 11 Shematski prikaz sustava za plinsku kromatografiju (Web 13)

Plin nositelj

Plin nosioc mora biti kemijski inertan kako ne bi došlo do reakcije s uzorkom. Kao plin nosioc koriste se helij, dušik i vodik. Izbor plina nosioca najčešće je određen tipom detektora koji se upotrebljava. Protoci plina se obično reguliraju pomoću dvostupanjskog regulatora tlaka na plinskoj boci i regulatorom tlaka postavljenim na samom uređaju.

Plin nosioc mora biti suh i pročišćen od nečistoća koje bi mogle dovesti do lošeg funkcioniranja uređaja ili raspadanja kolone, stoga je često potrebno instalirati uređaje za pročišćavanje plina. Plin mora biti dovoljne gustoće kako bi se smanjila difuzija u plinskoj fazi (Tomljanović, 2000.).

Uređaj za unošenje uzoraka (injektor)

Da bi se u konačnici dobio dobar rezultat analize, uzorak se u sustav za analizu unosi brzo, u maloj količini, pomoću mikrolitarske štrcaljke, kroz gumenu ili silikonsku membranu u zagrijani dio uređaja koji je smješten na vrhu kolone. Kako bi isparavanje uzorka bilo potpuno, temperatura prostora gdje dolazi do rasprskavanja i isparavanja uzorka mora biti za 50°C viša od temperature vrelišta najslabije hlapive komponente u uzorku (Primorac, 2007.).

Kromatografske kolone

Kromatografska kolona je srce sustava, a čini ju cijev i nepokretna faza unutar nje, dok pokretna faza prolazi kroz nju. Kromatografske kolone koje se primjenjuju u plinskoj kromatografiji variraju od 2 pa do >50 m duljine, a kako bi se mogle smjestiti u termostatiranu peć obično su u namotima promjera 10 do 30 cm. Kako bi se postiglo razdvajanje komponenata potrebno je kontrolirati temperaturu kolone, što se postiže njezinim smještanjem u termostatiranu peć, a optimalna temperatura za svaku pojedinačnu analizu ovisi točki vrelišta uzorka te željenom stupnju separacije komponenata prisutnih u uzorku. Kolone mogu biti građene od metala (čelik, bakar, aluminij), plastičnih masa, stakla i kvarca. Oblik kolone ovisi o prostoru i termostatu, a uglavnom su spiralno savijene. Osnovni zahtjev kod za izbor kolone je dobra selektivnost. Selektivnost ovisi o izboru krutog nosača, punjenju kolone te vrsti i količini selektivne tekućine.

Da bi razdvajanje uzorka plinskom kromatografijom bili dobro, selektivna tekućina mora biti:

- Selektivna i dobro otapalo za sve sastojke uzorka,
- Nehlapiva,
- Termički stabilna i pri povišenim temperaturama,
- Kemijski inertna prema sastojcima uzorka koji se analizira.

Prema načinu izvedbe kolone se mogu podijeliti na preparativne i analitičke.

Preparativne kolone imaju promjer od 10 mm i više, a duljinu do nekoliko metara. Analitičke kolone mogu biti punjene (promjer 2 do 5 mm), mikropunjene (promjer 1 mm) i kapilarne (promjer 0,1 do 0,5 mm) (Vrdoljak, 2009.; Primorac, 2007.).

Detektori

Detektor je uređaj koji mjeri promjenu u sastavu eluata mjerenjem fizikalnih i kemijskih svojstava (toplinska vodljivost, radioaktivna i plamena ionizacija, kemijske reakcije, infracrvena i UV spektrometrija, spektrometrija masa, nuklearno – magnetska rezonancija i dr.). Detektor mora pokazati brz odziv na male promjene koncentracije sastojaka za vrijeme njihove elucije iz kromatografske kolone (Primorac, 2007.).

Obzirom na selektivnost, detektori u plinskoj kromatografiji mogu biti:

- univerzalni – daju odziv za svaki sastojak u eluatu osim za čistu mobilnu fazu
- selektivni – daju odziv samo na određene grupe komponenata u eluatu (Primorac, 2007.).

Prednost imaju detektori osjetljivi prema što većem broju odjeljivanih sastojaka, brzo reagiraju i imaju široko područje linearnog odgovora i mogu se upotrebljavati u širokom temperaturnom razmaku.

Spektrometrija masa

Spektrometri su instrumenti koji daju podatke o molekularnoj strukturi. Razlikuju se: infracrveni spektar (IC), spektar nuklearno – magnetske rezonancije (NMR), ultraljubičasti spektar (UV), spektar elektron – spinske rezonancije (ESR) i spektar masa.

Spektrometar masa je uređaj u kojem se molekule bombardiraju snopom elektrona bogatih energijom. Dolazi do ionizacije i cijepanja molekula u mnogo fragmenata, od kojih su neki pozitivno nabijeni ioni. Svaka vrsta iona ima određenu masu i naboj, odnosno određeni odnos m/e što je karakteristična veličina za tu vrstu iona. Niz iona se analizira na način da se dobije signal za svaku vrijednost m/e koja je prisutna. Intenzitet svakog signala prikazuje relativnu količinu iona koja daje taj signal. Osnovni signal je najviši signal ili maksimum (engl. peak). Intenzitet osnovnog signala označava se sa 100 te se, obzirom na njegov intenzitet, izražava intenzitet ostalih signala. Spektar masa je dijagram koji pokazuje relativne intenzitete signala za različite vrijednosti m/e . Za dokazivanje identičnosti dvaju spojeva i kao pomoć pri određivanju strukture novog spoja može poslužiti spektar masa. Dva spoja su identična ako su im jednake fizikalne konstante (talište, vrelište, gustoća).

U kombinaciji plinskog kromatografa i masenog spektrometra, plinskom kromatografijom se razdvajaju sastojci, a maseni spektrometar služi kao detektor (Vrdoljak, 2009.).

SPME analiza

SPME analiza je tehnika koja se koristi za analizu širokog spektra hrane, prvenstveno iz razloga što zahtijeva manju manipulaciju ali i zato što je ekonomski prihvatljiva. Sve više se primjenjuje za pripremu čvrstih i tekućih uzoraka poput vina, piva, voća, ulja i meda.

SPME analiza se sastoji od dvije odvojene faze, apsorpcije, prilikom koje dolazi do zaostajanja analita na stacionarnoj fazi i desorpcije. Za uspješan postupak obje faze moraju biti optimizirane. Na desorpciju utječu temperatura i vrijeme desorpcije, dok na ekstrakciju utječe tip uzorka, vrijeme ekstrakcije, ionska jakost, pH uzorka, temperatura ekstrakcije i mućkanje uzorka (Zhang i sur., 1993.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada je ispitati utjecaj skladištenja na gubitak tvari arome i boje u vinu sorte Bouvier. U tu svrhu će se u navedenom vinu odrediti sadržaj tvari boje i arome. Vino će se skladištiti na temperaturi od 15 °C tijekom šest godina. Nakon isteka zadanog skladištenja vina sorte Bouvier odredit će se sadržaj tvari boje i arome te će se rezultati dobiveni prije i nakon skladištenja usporediti. Tvari boje, polifenoli, flavonoidi i antioksidacijska aktivnost odredit će se spektrofotometrijski. Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka provest će se primjenom instrumentalne plinske kromatografije i mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME). U radu će biti korišten plinski kromatograf tvrtke Agilent 5890 B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5971A.

3.2. MATERIJAL I METODE

Vino sorte Bouvier

Bouvier je sorta bijelog grožđa poznat i kao Bouvierovo hrozno u Slovačkoj, u Francusko je to Précoce de Bouvier blanc, u Austriji Bouvierrebe te u Italiji kao Precose di Bouvier bianco. Porijeklo ove sorte nije najjasnije. Pretpostavlja se da je sorta nastala križanjem bijelog pinota i zelene Silve. Ovu sortu je otkrio austrijski vinar Clotar Bouvier 1900. godine u vinogradima Gornje Radgone po kome je i dobila ime. Bouvier sorta se uzgaja isključivo u srednjoj Europi i to u Austriji, Mađarskoj, Slovačkoj, Sloveniji, Češkoj, Hrvatskoj i Srbiji (Web 14).

Sorta Bouvier ima niske zahtjeve za tlo, idealno je duboko tlo bogato mineralnim tvarima s dobrom propusnošću. Dobro podnosi sušu, otporna je na mraz i na truljenje, stoga je pogodna za uzgoj u hladnijim područjima. Otporna je na botrytis, no zbog sklonosti klorozi (žutica vinove loze) daje prilično niske prinose. Dozrijeva brzo, početkom kolovoza, berba se može obavljati od kraja kolovoza do sredine rujna. Ova sorta daje vino s visokim udjelom šećera, niskim sadržajem kiselina te visokim sadržajem ekstrakta. Za vino proizvedeno od ove sorte nije pogodno dozrijevanje u drvenim bačvama. Vino je zlatno žute boje, slatko ili

poluslatko, s izraženim voćnim aromama (marelica, sušeno voće, žute jabuke), bogato alkoholom. Brzo stari i pije se mlado (Web 16).



Slika 12 Bouvier sorta vinove loze (Web 17)

Kemijska analiza vina

Određivanje ukupnog ekstrakta i alkohola

Ukupan suhi ekstrakt ili ukupna suha tvar uključuje sve tvari koje nisu hlapive pod specifičnim fizičkim uvjetima. Ovi fizički uvjeti moraju biti takvi da tvari koje čine ekstrakt pretrpe što je moguće manje promjene u tijeku izvođenja testa.

Provedena je destilacija uzorka vina (50 mL). Suhi ostatak ili ekstrakt je cjelokupna količina onih tvari koje zagrijavanjem na 100 °C (destilacija) ne prijeđu u destilat. Mjeri se uz pomoć piknometara. Prvo se izračuna relativna gustoća ekstrakta.

$$\gamma (\text{ekstrakta}) = \frac{Q_1 - Q}{Q_2 - Q} * K$$

γ – relativna gustoća ekstrakta

Q – masa praznog piknometra

Q1 – masa piknometra sa ekstraktom

Q2 – masa piknometra sa destiliranom vodom

K – faktor korekcije = 0,99823

Iz izračunate gustoće ekstrakta, iz Tablice za preračunavanje očita se količina ekstrakta izražena u g/L. Ekstrakt bez šećera izračunat je matematički:

Ekstrakt bez šećera (g/L) = Ekstrakt (g/L) – Količina šećera (g/L)

Količina alkohola mjeri se preko destilata koji je dobiven ovom istom destilacijom. Formula je jednaka, a udio alkohola (vol %) očita se iz Tablice za preračunavanje g alkohola u litri na volumne postotke.

$$\gamma(\text{destilata}) = \frac{Q_1 - Q}{Q_2 - Q} * K$$

Određivanje ukupnih kiselina u vinu

Količina ukupnih kiselina u vinu se uglavnom kreće od 4 do 7 g/dm³ izraženih kao vinska kiselina. Za vina koja sadrže ispod 4 g/dm³ sumnja se da nisu prirodnog podrijetla. Za određivanje ukupnih kiselina u vinu koristi se metoda neutralizacije. Količina ukupnih kiselina izražava se u vinskoj kiselini. Za određivanje ukupnih kiselina koristi se odgovarajući indikator ili metoda potencijometrijske titracije.

Postupak:

Bireta se napuni otopinom 0,25 N NaOH. Zatim se pipetom uzme 25 cm³ vina i stavi u čašu od 100 cm³. Vino se predhodno zagrije do vrenja da se ukloni CO₂, a zatim se djelomično ohladi i pristupi se titraciji uz fenolftalein. Natrijev hidroksid se dodaje sve do promjene boje što je znak da je neutralizacija završena. Količina ukupnih kiselina se dobije kad se utrošak 0,25 N NaOH u cm³ pomnoži sa faktorom 0,75 ili se očita u odgovarajućoj tablici. Dobivena vrijednost predstavlja količinu ukupnih kiselina u g/dm³ izraženih u vinskoj kiselini. Postupak se radi u dvije paralele (Pozderović i Pichler, 2009.).

Određivanje slobodnog i ukupnog SO₂ u vinu

SO₂ se u vinu nalazi u slobodnom i vezanom obliku. Veže se sa aldehydima, šećerima i polifenolnim tvarima. Ovom metodom se usporedno određuje slobodni i ukupni SO₂ pa se količina vezanog izračunava na osnovu njihove razlike. Određivanje se vrši pomoću otopine joda pri čemu se SO₂ oksidira, a jod reducira pa se na osnovu utroška otopine joda izračunava količina SO₂.

Određivanje slobodnog SO₂

U Erlenmeyer-ovu tikvicu sa brušenim grlom stavi se 50 cm³ vina, zatim se doda 10 cm³ H₂SO₄ (1:4) i 3 cm³ otopine škroba, w = 0,01. Sulfatna kiselina se dodaje zbog toga što je oksidacija u kiseloj sredini intenzivnija, dok škrob služi kao indikator. Titracija se vrši otopinom I₂ c = 0,02 do pojave plave boje koja treba biti tako intenzivna da se održi 30 sec. Utrošak otopine joda u cm³ množi se s faktorom 12,8 i dobije se količina slobodnog SO₂ u mg/dm³ vina.

Određivanje ukupnog SO₂

U Erlenmeyer-ovu tikvicu stavi se 50 cm³ vina, zatim se doda 25 cm³ otopine NaOH c = 1 mol/dm³ i ostavi stajat 10 do 15 min. NaOH stvara alkalnu sredinu u kojoj se vezani SO₂ oslobađa. Zatim se doda 15 cm³ otopine H₂SO₄ (1:4) i 3 cm³ škroba w = 0,01. Tikvica se sa istom otopinom joda titrira do pojave plave boje. Utrošak otopine joda u cm³ množi se sa faktorom 12,8 i dobije količina ukupnog SO₂ u mg/dm³ vina (Pozderović i Pichler, 2009.).

Određivanje količine pepela u vinu

Sadržaj pepela definiran je kao ukupnost svih produkata koji ostaju nakon žarenja taloga preostalog od isparavanja vina. Žarenje se izvodi tako da se svi kationi (isključivši kation amonija) pretvore u karbonate ili druge bezvodne anorganske soli. Ekstrakt vina žarimo na temperaturi između 500 °C i 550 °C do potpune oksidacije organskih tvari (NN 106/2004).

Postupak:

U porculansku zdjelicu za žarenje otpipetira se 25 cm³ vina. Prije nego se pipetira zadana količina vina potrebno je homogenizirati vino u boci. Vino se otparava na vodenoj kupelji temperature 100 °C sve dok se ne dobije gusti, sirupasti, sasušeni talog. Nakon toga se zdjelica s talogom stavlja na sušenje u sušionik kroz jedan sat da ispari zaostala voda, a potom u mufolnu peć na spaljivanje. Spaljivanje počinje s temperaturom od 200 °C i svaki sat se povećava za 100 °C, sve dok se ne postigne temperatura od 500 °C. Na temperaturi od 500 °C masa se spaljuje jedan sat. Uslijed djelovanja visoke temperature masa prvo pougljeni (pocrni), a zatim postupno sagorijeva i prelazi u pepeo.

Nakon spaljivanja od jedan sata provjerava se da li je pepeo pobijelio jer je tada postupak spaljivanja završen. Porculanska zdjelica za žarenje sapepelom se vadi iz mufolne peći, stavlja na azbestnu mrežicu kroz 15 minuta, nakon toga se stavlja u eksikator na hlađenje kroz jedan sat i na vaganje.

Određivanje prirodnih šećera u vinu

U odmjernu tikvicu od 200 cm³ odvaži se 25 g vina. Sadržaju tikvice se doda 1 do 2 g kalcijevog karbonata (CaCO₃) kako bi se postigla slabo kisela reakcija i potom promiješa. Doda se 5 cm³ reagensa I i 5 cm³ reagensa II, promiješa i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Promiješa se još jednom da se sadržaj potupuno homogenizira. Kad se gornji sloj počeo izdvajati profiltrira se preko suhog, nabranog filter papira u suhu tikvicu. Dobiveni filtrat se zove F1.

U tikvicu od 300 cm³ otpipetira se 25 cm³ Luffove otopine i doda otopina šećera koja treba sadržavati nešto manje od 100 mg šećera te toliko destilirane vode da volumen iznosi 50 cm³. U tikvicu se dodaju staklene kuglice i sadržaj se zagrijava tako da provrije za dvije minute i da se vrenje nastavi deset minuta. Zagrijavanje se vrši preko azbestne mrežice uz povratno hladilo. Kad je završeno, sadržaj se hladi pod mlazom hladne vode, a poslije dvije minute dodaje se otopina kalijevog jodida (KI). Promiješa se brzo i pažljivo se dodaje 20 cm³ 25% sumporne kiseline (H₂SO₄) i 10 cm³ kalijevog tiocijanata (KCNS). Tikvica se mućka do prestanka šuma. Istaloženi jod se titrira otopinom natrijevog tiosulfata uz dodatak škroba kao indikatora dok se ne izgubi plava boja (Pozderović i Pichler, 2009.).

Određivanje sadržaja polifenolnih spojeva

Koncentracija ukupnih fenola se određuje Folin-Ciocalteu metodom. Folin-Ciocalteu metoda temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja (apsorbance) pri valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline a pri oksidaciji fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni.

Folin-Ciocalteu reagens (1:10) pripremljen je tako da je otpipetirano 3,3 mL FolinCiocalteu reagensa u odmjernu tikvicu od 100 mL i do oznake dopunjeno s destiliranom vodom. Otpipetirano je 0,2 mL uzorka soka određenog razrijeđenja, te dodano 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa te nakon stajanja 30 sekundi do 8 minuta dodano 8 mL 7,5% Na_2CO_3 (ukupni volumen mora biti 20 mL). Za slijepu probu otpipetira se 2 mL destilirane vode u epruvetu te doda 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 8 mL 7,5 % Na_2CO_3 . Nakon stajanja u mračnom prostoru 2 do 20 sati, pri čemu dolazi do razvijanja boje, mjeri se apsorbance na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm. Sadržaj polifenolnih spojeva je interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/L uzorka.

Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida učinjeno je metodom Kim, Jeong i Lee (2003.) s modifikacijom (Blasa i sur., 2005.; NN 96/03). Za kalibraciju su uzete različite koncentracije kvercetina (5-114 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a linearnost je 0,9953 (R^2). Postupak određivanja vršio se tako što je 1 mL otopine vina (1 mg/mL) pomiješan s 0,3 mL NaNO_2 (5%), a nakon 5 min je dodano 0,3 mL AlCl_3 (10%). Uzorci su pomiješani te su nakon 6 minuta neutralizirani s 2 mL otopine NaOH (1M). Absorbance je izmjerena za sve uzorke pri 510 nm, a kvantifikacija izvedena koristeći kalibracijsku krivulju. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata kvercetina (QE)/100 g vina, kao srednja vrijednost triju ponavljanja.

Određivanje antioksidacijska aktivnosti

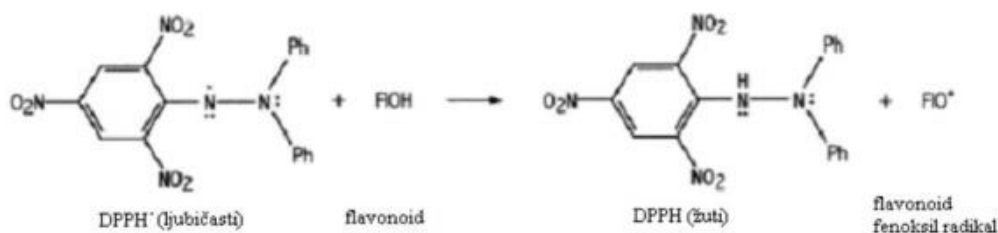
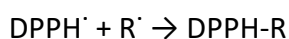
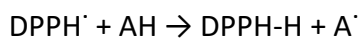
Antioksidansi su spojevi koje u niskoj koncentraciji u odnosu na oksidirani supstrat, usporavaju ili inhibiraju oksidaciju tog supstrata. Imaju svojstva koja djeluju kao reducirajuće

sredstvo, te neutraliziraju slobodne radikale dajući im svoj elektron i na taj način inhibiraju njihovu aktivnost. Slobodni radikali su molekule koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u elektronskim orbitalama. To ih čini vrlo reaktivnima u odnosu na druge molekule u stanici. Voće i povrće, kao jedna od važnijih komponenti uravnotežene prehrane, glavni su izvor antioksidanasa potrebnih ljudskom organizmu.

Nekoliko metoda je razvijeno za određivanje antioksidacijske aktivnosti na osnovi uklanjanja sintetskih radikala u polarnom organskom otapalu (npr. metanolu) pri sobnoj temperaturi. One koje su najčešće, koriste 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i 2, 2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina) (ABTS) radikale.

Antioksidacijska aktivnost je određivana primjenom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reagensa. Kod DPPH testa, uklanjanje DPPH radikala je praćeno smanjenjem absorbancije na 517 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa (AH) ili reakcije s radikalima (R').

Prva reakcija s DPPH radikalima odvija se s nekom od fenolnih tvari, ali spora sekundarna reakcija može izazvati progresivno smanjenje absorbance, te se ravnotežno stanje ne može postići nekoliko sati.



Slika 13 Prikaz reakcije DPPH radikala s flavonoidima

Za određivanje antioksidativne aktivnosti primjenjena je metoda po Shimadu i sur. (1992.) s malim modifikacijama (Shimada i sur., 1992.; NN 96/03). U kivetu je otpipetirano 0,2 mL uzorka, 2 mL metanola i 1 mL otopine DPPH. Reakcijska smjesa je ostavljena stajati 15 minuta te je absorbancija mjerena na spektrofotometru pri valnoj duljini od 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol.

Antioksidativna aktivnost je izračunata prema slijedećem izrazu:

$$\alpha\alpha(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) * 100$$

gdje je:

A0 – absorbancija slijepe probe

A1 – absorbancija uzorka

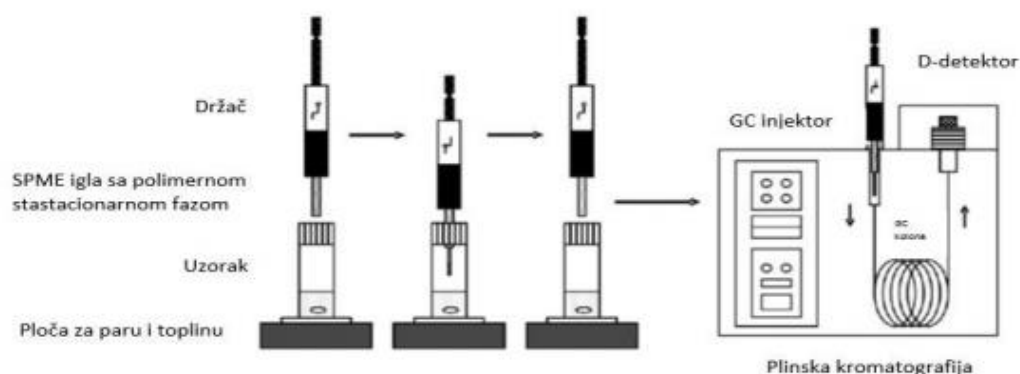
Analiza arome vina plinskom kromatografijom primjenom SPME analize

Priprema uzoraka za analizu:

Tehnika korištena prilikom pripreme uzorka je tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME) za koju je neophodna SPME aparatura. Osnova SPME aparature je igla unutar koje se na polimernu stacionarnu fazu adsorbiraju aromatični sastojci. U radu je za pripremu uzoraka korišteno punilo od polidimetilsiloksana-divinilbenzena (polimerna stacionarna faza) debljine 65 μm .

Postupak pripreme uzorka: U bočicu od 10 mL odvaže se 5 g uzorka vina. Kako bi adsorpcija aromatičnih sastojaka bila bolja dodaje se 1 g NaCl. U bočicu se ubaci magnet, te se hermetički zatvori teflonskim čepom. Bočica se postavi u vodenu kupelj, te se uz stalno miješanje uzorka magnetskom miješalicom, aromatični sastojci adsorbiraju na polimernu stacionarnu fazu unutar igle. Prije samog ispuštanja igle u nadprostor uzorka, uzorak se 5 minuta miješa na vodenoj kupelji (40 °C) radi zasićenja nadprostora sa svrhom što bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka. Adsorpcija se provodi na temperaturi od 40 °C (vodena kupelj) u trajanju od 45 minuta. Po završetku adsorpcije igla s adsorbiranim sastojcima odmah se stavlja u injektor plinskog kromatografa te slijedi njihova toplinska desorpcija.

Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka vina provedeno je primjenom instrumentalne plinske kromatografije. Tijekom izrade ovog rada korišten je plinski kromatograf tvrtke Agilent 7890 B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5977 A.



Slika 14 Korištenje SPME držača za uzorkovanje i analizu

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

Parametri ekstrakcije:

- Temperatura ekstrakcije: 40 °C
- Vrijeme ekstrakcije: 45 minuta
- Tip mikroekstrakcijske igle: 65 µm PDMS/DVB (Supelco).

GC-MS analitički uvjeti:

Kolona: HP5; 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent)

- Početna temperatura: 40 °C (2 minuta)
- Temperaturni gradijent: 6 °C/min

Plin nosač: helij (čistoće 5,0) s protokom 1 mL/min pri 40 °C

- Konačna temperatura: 230 °C
- Temperatura injektora: 250 °C
- Temperatura detektora: 280 °C
- Desorpcija uzorka u injektor: 7 min

U izradi kromatografske analize korišten je splitless mod.

4. REZULTATI

Tablični prikazi rezultata

Tablica 1 Kemijska analiza vina sorte Bouvier prije skladištenja i nakon šest godina skladištenja

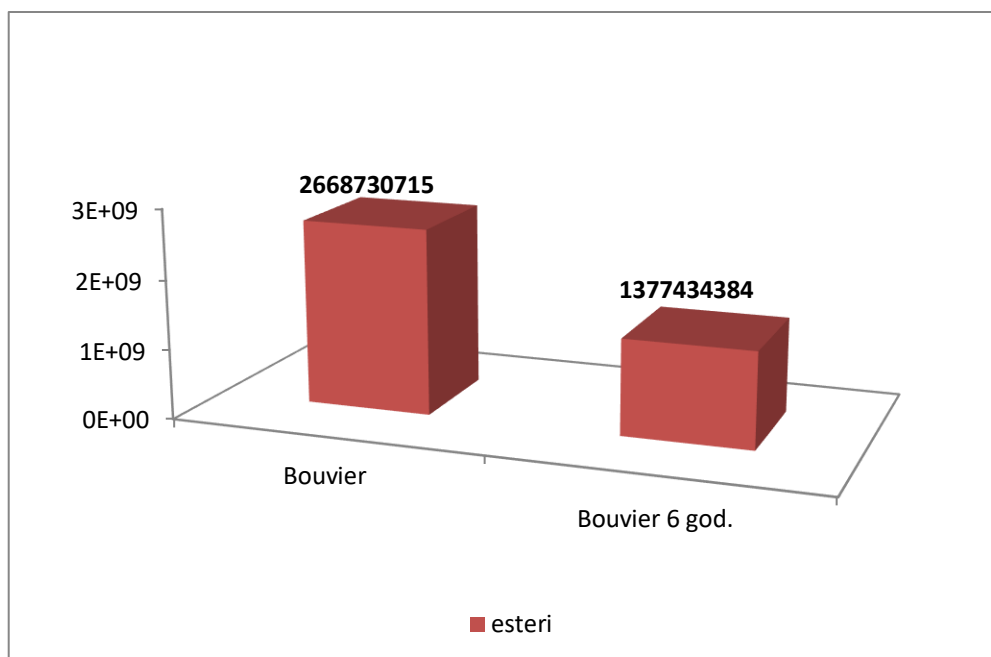
	Bouvier	Bouvier (6 godina)
Udio suhe tvari (%)	7,25	9,5
Ukupne kiseline (g/L)	5,700	5,982
Slobodni sumpor (mg/L)	59,20	329,60
Ukupni sumpor (mg/L)	310,40	476,80
Pepeo (g/L)	1,934	1,954
Prirodni šećeri (g/L)	2,12	24,90
Alkohol (vol. %)	12,65	12,20
Ekstrakt (g/L)	23,9	48,30

Tablica 2 Tvari boje vina sorte Bouvier prije skladištenja i nakon šest godina skladištenja

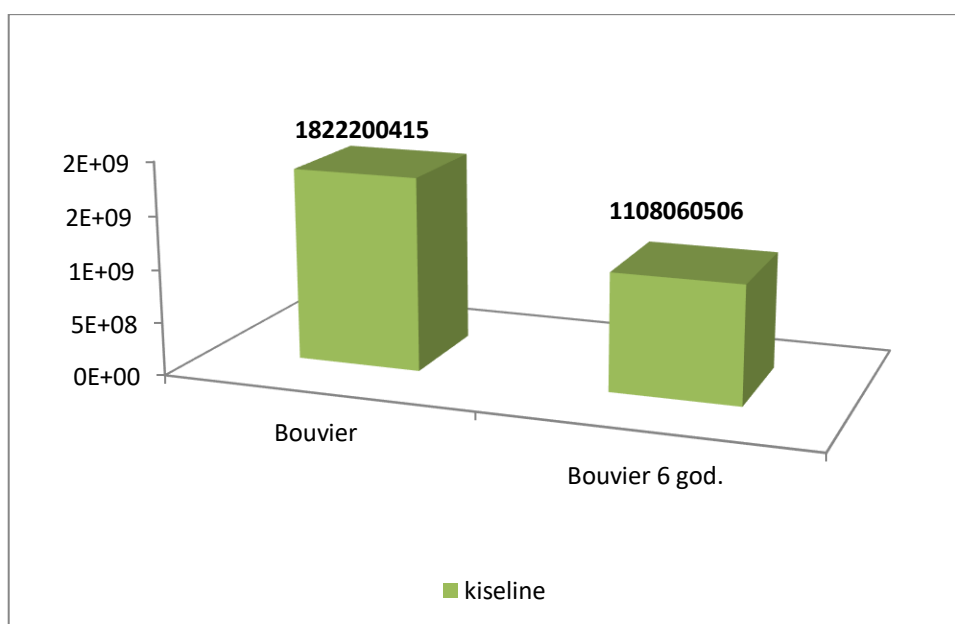
	Bouvier	Bouvier (6 godina)
Antioksidacijska aktivnost (mg/100 g)	14,37	14,19
Flavonoidi (mg/L)	170,01	135,55
Polifenoli (mg/L)	639,26	709,17

Tablica 3 Retencijska vremena aromatičnih spojeva identificiranih u ispitivanim uzorcima vina sorte Bouvier

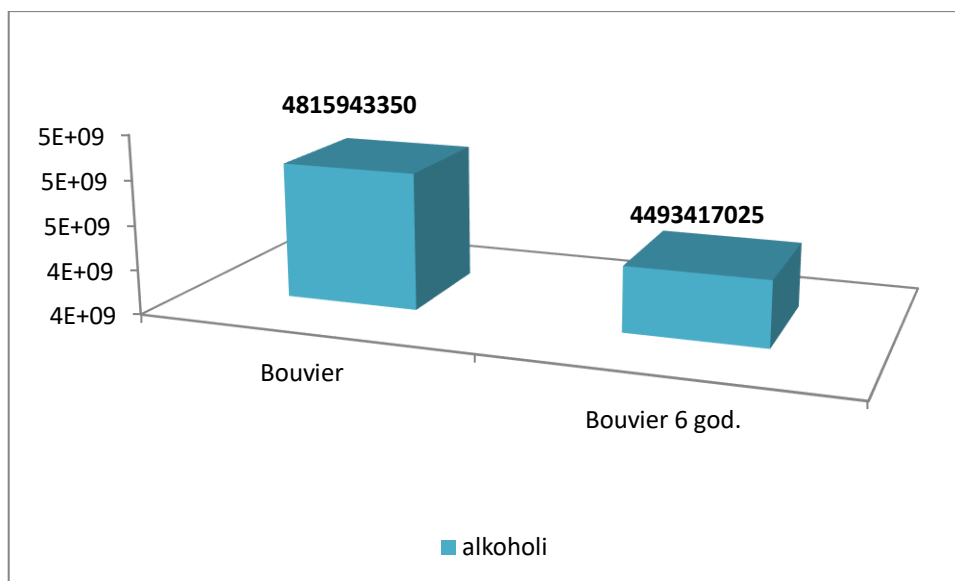
Sastojak	RT (vrijeme pojavnosti pika na kromatogramu)
Esteri	
Etil acetat	3,394
3-metilbutil acetat	8,916
Etilester heksanske kiseline	12,595
Etilester heptanske kiseline	15,475
Etilester oktanske kiseline	18,036
Etilester tetradekanske kiseline	26,347
Kiseline	
Octena kiselina	18,472
Heksanska kiselina	24,231
Heptanska kiselina	25,43
Sorbinska kiselina	27,646
Dekanska kiselina	29,463
Alkoholi	
3-metil-1-pentanol	15,166
1-heksanol	16,264
3-heksen-1-ol	17,028
2,3-butandiol	20,087
α -terpineol	22,411
Benzil alkohol	24,577
Fenetil alkohol	25,003
2-heksadekanol	28,436
Eritritol	30,071
Karbonilni spojevi	
Furfural	18,662
Dodekanal	22,523
Tetradekanal	27,364
5-hidroksimetilfurfural	34,495
Terpenoidi	
Beta felandren	9,816
Limonen	10,833
Linalool	18,899
Citronelol	23,228



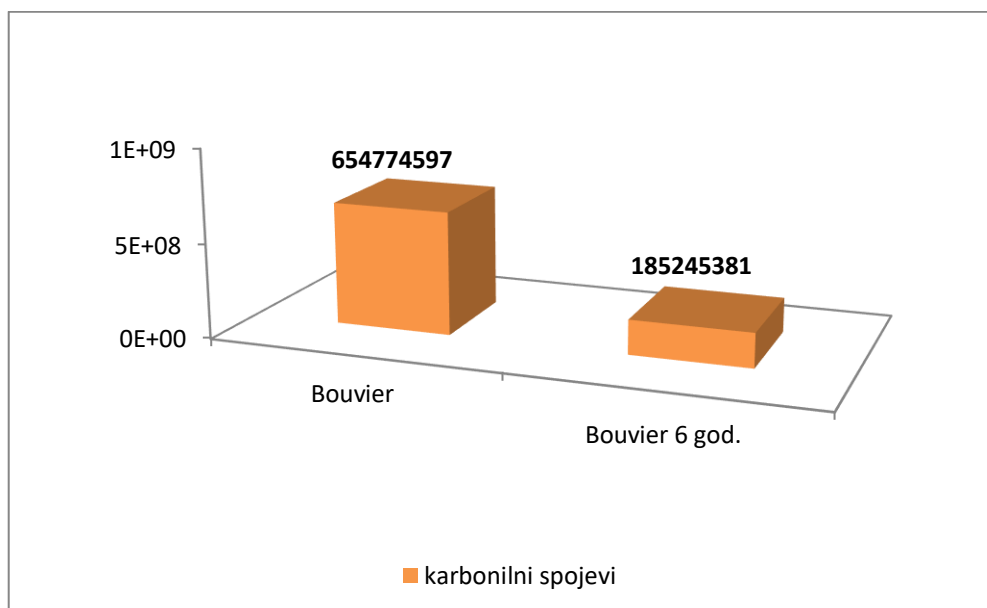
Slika 15 Sadržaj estera u vinu sorte Bouvier i Bouvier 6 godina



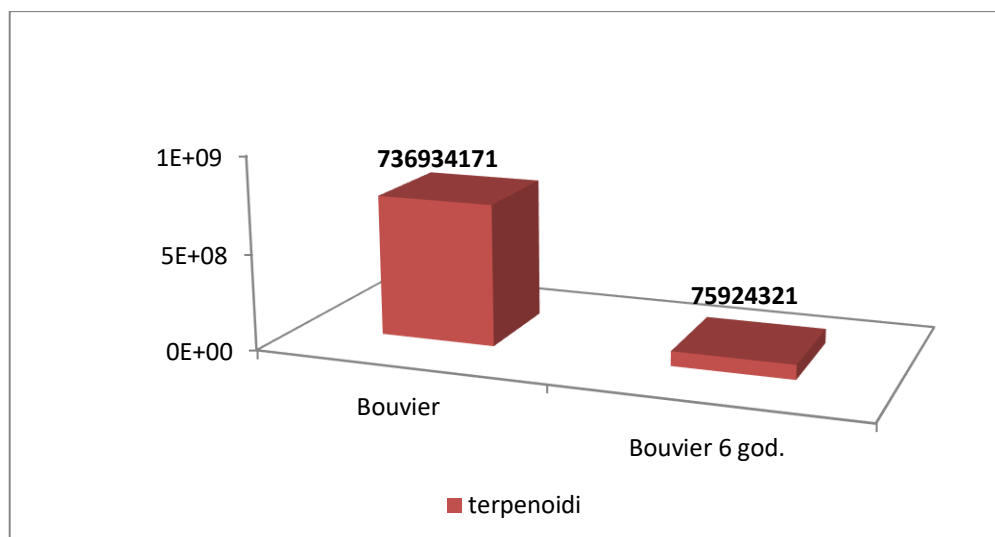
Slika 16 Sadržaj kisljina u vinu sorte Bouvier i Bouvier 6 godina



Slika 17 Sadržaj alkohola u vinu sorte Bouvier i Bouvier 6 godina



Slika 18 Sadržaj karbonilnih spojeva u vinu sorte Bouvier i Bouvier 6 godina



Slika 19 Sadržaj terpenoida u vinu sorte Bouvier i Bouvier 6 godina

5. RASPRAVA

Rezultati istraživanja utjecaja skladištenja (odležavanja) vina na kemijski sastav i aromu vina sorte Bouvier prikazani su u **Tablicama 1 do 3**, te na **Slikama 15 do 19**.

Ukupne kiseline u vinu imaju dvostruku ulogu: daju osvježavajući okus vinu i djeluju kao konzervansi. Izražavaju se kao g vinske kiseline/L.

Iz **Tablice 1** vidljivo je da razlika u udjelu ukupnih kiseline nije velika, ali u vinu Bouvier koje je skladišteno u boci sadržaj kiselina je nešto veći (5,982 g/L).

Šećeri su, u prvom redu, pokazatelji zrelosti grožđa. Ukoliko se poznaje udio šećera u soku grožđa, u gotovom vinu se može odrediti da li je tijekom proizvodnje vina u sok dodan šećer (patvorenje). S obzirom na sadržaj šećera, vina se dijele na: suha, polusuha, poluslatka i slatka vina.

Rezultati analize (**Tablica 1**) vina Bouvier pokazali su da vino koje je odležavalo u boci kroz 6 godina ima puno veći sadržaj šećera od vina koje nije skladišteno.

Ukupni suhi ekstrakt u vinu čine sve organske i mineralne tvari koje nisu hlapljive pod specifičnim fizikalnim uvjetima, a to su: ugljikohidrati, nehlapive kiseline, tvari boje, viši alkoholi, polifenoli.

U **Tablici 1** vidljivo je da je razlika u ukupnom suhom ekstraktu u oba ispitivana vina poprilično velika, te da je sadržaj ekstrakta u vinu Bouvier 6 godina (48,3 g/L) veći od mladog vina Bouvier (23,9 g/L).

Dopušteni udio alkohola u vinu kreće se od minimalno 8,5 % vol. (stolna vina) do maksimalno 15 % vol. U oba ispitivana vina udio alkohola je podjednak.

Pored suhog ekstrakta i udjela alkohola, udio pepela predstavlja jedan od glavnih parametara za kategorizaciju vina (stolno, kvalitetno i vrhunsko). Pepeo u ispitivanim vinima slijedi trend volumnog udjela alkohola.

Iz **Tablice 1** vidljivo je da skladišteno vino u boci sadrži prekomjernu količinu slobodnog SO₂. Razlog tome je što je vino tijekom skladištenja dosumporeno, radi zaštite od oksidacije.

Kod skladištenja oksidativni procesi su gotovo u potpunosti spriječeni, te se u tom slučaju SO₂ ne veže na komponente vina i ostaje prisutan u slobodnom obliku.

Iz iste tablice se vidi da je sadržaj ukupnog SO₂ također veći u skladištenom uzorku vina. Razlog je dosumporavanje vina tijekom odležavanja radi zaštite od oksidativnih procesa.

Fenolni spojevi se ekstrahiraju iz čvrstih dijelova grozda (kožice, sjemenke, ali i peteljke) u fazi maceracije kod proizvodnje crnih vina. Osim što vinu daju karakterističnu boju, okus i trpkost, imaju i zaštitnu ulogu jer uklanjaju slobodne radikale koji štetno djeluju na organizam.

Iz **Tablice 2** vidljivo je da vino Buvier nakon skladištenja od 6 godina nije izgubilo svoja antioksidacijska svojstva i da ima veći udio polifenola od mladog Bouvier vina.

Aroma vina predstavlja kombinaciju primarne, sekundarne i tercijarne arome mošta i vina, koje su prirodno prisutne u grožđu ili nastaju tijekom fermentacije i odležavanja („*bouquet*“). To su različiti hlapivi spojevi: esteri, viši alkoholi, masne kiseline, aldehidi, ketoni, terpeni i drugi spojevi. Kombinacija ovih spojeva različita je kod svakog vina i predstavlja jedan od glavnih parametara po kojem se vina razlikuju i na osnovu kojeg potrošači biraju vino za konzumaciju.

U ispitivanim vinima Bouvier identificirano je 28 različitih aromatičnih spojeva (**Tablica 3**). Ti spojevi podijeljeni su u pet skupina: esteri, kiseline, alkoholi, karbonilni spojevi i terpenoidi.

Esteri daju vinu voćnu aromu i miris banane, a nastaju reakcijom acetil-CoA sa višim alkoholima koji nastaju degradacijom aminokiselina ili ugljikohidrata.

U ispitivanim vinima identificirani su sljedeći esteri: etil acetat, 3-metilbutirat, etilester heksanske kiseline, etilester heptanske kiseline, etilester oktanske kiseline i etilester tetradekanske kiseline.

Na **Slici 15** vidljivo je da je ukupni udio estera veći kod vina prije dugogodišnjeg skladištenja, jer se u mladom vinu nalazi puno više estera nastalih alkoholnom fermentacijom. Oni se jednim dijelom gube odležavanjem vina, odnosno starenjem vina.

Kiseline potječu iz sirovine, ali dijelom nastaju i alkoholnom fermentacijom. U vinima Bouvier identificirano je pet kiselina: octena, heksanska, heptanska, sorbinska i oktanska kiselina.

Koncentracija octene kiseline u vinu vrlo je mala, jer povećane koncentracije ove kiseline nastaju kao rezultat bakterijskog kvarenja. Vino Bouvier prije skladištenja imalo je veći ukupni sadržaj kiselina od skladištenog vina (**Slika 16**).

Dio aromatskog profila vina su i alkoholi koji nastaju kao sekundarni produkti metabolizma kvasaca. U ispitivanim uzrocima identificirano je 9 alkohola (3-metil-1-pentanol, 1-heksanol, 3-heksen-1-ol, 2,3-butandiol, α – terpineol, benzil alkohol, fenetil alkohol i dr.), a prikazani su u **Tablici 3**.

Fenetil alkohol je jedan od najvažnijih, jer daje slatkast miris ruže. Nastaje tijekom fermentacije šećera. U puno većoj količini pronađen je u mladom vinu sorte Bouvier u odnosu na skladišteni uzorak vina.

Ukupni sadržaj alkohola puno je veći u vinu Bouvier prije skladištenja nego u vinu nakon dugogodišnjeg skladištenja (**Slika 17**).

Karbonilni spojevi nastaju u vinu u relativno maloj količini te nemaju važnu ulogu u stvaranju sortnih aroma vina. Aldehidi i ketoni su esencijalni za sintezu aminokiselina.

Sadržaj karbonilnih spojeva (furfural, dodekanal, tetradekanal) veći je u vinu prije skladištenja (**Slika 18**). Spoj 5-hidroksimetilfurfural pronađen je isključivo u skladištenom vinu sorte Bouvier.

Svaka sorta grožđa ima svoju karakterističnu aromu, a glavna skupina spojeva koji predstavljaju sortnu aromu su terpeni. U grožđu možemo pronaći slobodne terpene (odgovorni su za aromu grožđa i mošta) i vezane terpene (najčešće su vezani za šećere). Vezani terpeni predstavljaju tzv. „skrivenu aromu“, koju je, tijekom procesa proizvodnje vina, potrebno osloboditi. Udio terpena ovisi o tehnološkim postupcima proizvodnje (maceracija, ekstrakcija, hidroliza, uporaba enzima itd).

Na **Slici 19** prikazan je sadržaj terpena u ispitivanim uzorcima i vidljivo je da vino Bouvier prije skladištenja ima daleko veću količinu terpenoida u odnosu na skladišteno vino.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Kemijski sastav, udio tvari boje i arome vina uvelike ovise o fermentaciji i dozrijevanju te odležavanju vina.
- Rezultati istraživanja pokazali su da vino sorte Bouvier nakon dugogodišnjeg skladištenja ima veći udio ukupnih kiselina, šećera i suhog ekstrakta.
- Vrijednosti volumnog udjela alkohola i sadržaja pepela u oba ispitivana vina približno su jednake.
- Vino sorte Bovier nakon skladištenja ima veći sadržaj polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost.
- Analizirano vino prije skladištenja ima blagi voćni i cvjetni miris karakterističan za sortu, a taj miris se djelomično zadržao i poslije skladištenja što dokazuju navedeni analitički podaci.
- Većina lakše hlapljivih sastojaka više se zadržala u vinu sorte Bovier prije skladištenja.
- U ispitivanim uzorcima pronađene su značajne količine estera, posebice etil acetata, a njihov sadržaj je veći u mladom Bouvier vinu.
- Udio alkohola u ukupnoj aromi veći je kod mladog Bouvier vina, sa najvećim udjelom fenetil alkohola i 1-heksanola. Ovaj uzorak ima i veći udio kiselina i karbonilnih spojeva u ukupnoj aromi.
- Vino Bouvier nakon skladištenja od 6 godina sadržava terpenoide, ali u puno manjoj količini.

7. LITERATURA

- Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini PM, Albertini MC, Piatti E: Raw Mille fiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry* 97: 217-222, 2005.
- Cedilak A: Antioksidacijska svojstva vina. *Završni rad*, Prehrambeno biotehnološki fakultet u Zagrebu, 2016.
- Čobanov A: Kakvoća domaćeg bijelog vina Pinot sivi iz podregije Slavonija. *Završni rad*, Prehrambeno biotehnološki fakultet u Zagrebu, 2016.
- Horvat B: *Od berbe do mladog vina*. Gospodarski list; prilog prema knjizi Zoričić M: Domaće vino. Novinarsko nakladničko i trgovačko d.d., Zagreb, 15. rujan 2010.
- Jakobek L, Šeruga M, Šeruga B, Novak I, Medvidovic-Kosanović M: Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of Rubus and Prunus species from Croatia. *International Journal of Food Science and Technology*, 44:860–868, 2009.
- Karalić H: Polifenolne tvari u vinu. *Završni rad*, Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku, 2014.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela H J: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 47:3954–3962, 1999.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R: Analysis and biological activities of antocyanins. *Phytochemistry*, 64(5):923-933, 2003.
- Maletić E, Karoglan Kontić J, Pejić I: *VINOVA LOZA - Ampelografija, ekologija, oplemeljivanje*. Školska knjiga, Zagreb, 2008.
- Marić M: Određivanje kemijskog sastava tvari boje i arome u bijelim vinima baranjskog vinogorja. *Završni rad*, Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku, 2017.
- Mihovilović M: Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari boje i arome vina od jabuke. *Diplomski rad*, Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku, 2016.
- Moreno J, Peinado R: *Enological Chemistry*. Academic Press, 2012.
- MPS, Ministarstvo poljoprivrede RH: *Zakon o vinu*. Narodne novine 14/14, 2014.
- MPS, Ministarstvo poljoprivrede RH: *Pravilnik o proizvodnji vina*. Narodne novine 2/05, 2005.
- MPS, Ministarstvo poljoprivrede RH: *Zakon o vinu*. Narodne novine 96/03, 2003.
- MPS, Ministarstvo poljoprivrede RH: *Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina*. Narodne novine 106/04, 2004.
- Muštović S: Vinarstvo sa enohemijom i mikrobiologijom; proizvodnja, kvalitet, kontrola od čokota do čaše. *Privredni pregled*, Beograd, 1985.
- Osrečak M, Kozina B, Maslov L, Karoglan M: Utjecaj djelomične defolijacije na koncentraciju polifenola u vinima Graševine, Traminca i Manzonija bijelog (*Vitis vinifera* L).

- Proceedings. 46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture. Opatija. Croatia. str. 972-975, Zagreb: Regata d.o.o. Zagreb, 2011.*
- Paunović R, Dančić M: *Vinarstvo i tehnologija jakih alkoholnih pića*. Zadruga knjiga, Beograd, 1967.
- Perić P: *Sok od grožđa*. Prehrambena tehnologija u Požegi, Požega, 2013.
- Pozderović A: Tehnologija prerade sirovina biljnog podrijetla II – Osnove tehnologije vina. *Nastavni materijali*, PTF Osijek, 2013.
- Pozderović A, Pichler A: *Propisi za vježbe iz predmeta osnove prehrambene tehnologije, Osnove tehnologije vina*. Prehrambena tehnološki fakultet u Osijeku, 2009.
- Prce V: Sadržaj antocijana, polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnosti u crnim vinima slovačkih vinogorja. *Diplomski rad*, Prehrambena tehnološki fakultet u Osijeku, 2014.
- Primorac Lj: *Kontrola kakvoće hrane*. Interna skripta, Prehrambena-tehnološki fakultet Osijek, 2007.
- Ribereau Gayon, P, Glories Y, Maujean A, Dudourdieu D: *Handbook of enology – the chemistry of wine stabilization and treatments, second edition*. John Wiley and sons, Chichester, West Sussex, England, 2006.
- Ribereau Gayon, P, Glories Y, Maujean A, Dudourdieu D: *Handbook of enology – the microbiology of wine and vinifications, second edition*. John Wiley and sons, Chichester, West Sussex, England, 2006.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara, Nakamura T: Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 945–948, 1992.
- Sokolić I: *Zlatna knjiga o vinu*. Otokar Keršovani, Rijeka, 1976.
- Stričević D, Sever B: *Organska kemija*. Profil International, Zagreb, 2001.
- Tomljanović M: *Instrumentalne kemijske metode* I. dio. U.G HIJATUS, Zenica, 2000.
- Vuković M: Utjecaj membranske filtracije na organoleptička svojstva vina sorte graševina. *Diplomski rad*, Prehrambena tehnološki fakultet u Osijeku, 2010.
- Vrdoljak I: Utjecaj membranske filtracije na aromu i kemijski sastav vina sorte Graševina. *Diplomski rad*, Prehrambena tehnološki fakultet u Osijeku, 2009.

WEB 1

<http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=bobica>, pristupljeno 25.09.2017

WEB 2

https://www.veleri.hr/files/datotekep/nastavni_materijali/k_vinarstvo_2/Vinarstvo%20III%20-novo.pdf, pristupljeno 25.09.2017.

WEB 3

<https://www.google.com/search?hl=hr-US&q=alpha+glucose&tbm=isch&tbs=simg:CAQSIQEJtP23c8MBYP4aiQELEKjU2AQaAggKDAQslyncBpiCmAIAxIo6RPqE8IIoQbYHYQD1BOaA5sD1x3SNpY-nzTGJ742uTS2NMM9pj6xNBowkk60R777DlujGVnRSJDJRv35wmCoYqFi-c36EmpGZrQVM7GveTa-yZKh8QjKAYA1IAQMCxCOrv4IGgoKCAgBEgTOOpfsDA&sa=X&ved=0ahUKEwidifj2osHWAhWIZpoKHfihAlOQwg4IligA&biw=1366&bih=662#imgrc=l8MGcNh5CcdBDM;>, pristupljeno 25.09.2017.

WEB 4

https://www.google.hr/search?q=Fruktoza&hl=hr&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiiqjPHLo8HWAhXqHpoKHVAICiYQ_AUICigB&biw=1517&bih=735#imgrc=bm-XX9gBOkoaem;, pristupljeno 25.09.2017.

WEB 5

https://www.google.hr/search?q=vinska+kiselina&hl=hr&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi2_NqopMHWAhXEFZokHRDOckQQ_AUICigB&biw=1517&bih=735#imgrc=3Vb2eB9auzSOQM;, pristupljeno 25.09.2017.

WEB 6

https://www.google.hr/search?hl=hr&biw=1517&bih=735&tbm=isch&sa=1&q=jabu%C4%8Dna+kiselina&oq=JA+kiselina&gs_l=psy-ab.1.0.0i7i30k1.78005.78848.0.80648.3.3.0.0.0.126.359.0j3.3.0....0...1.1.64.psy-ab..0.3.355...0j0i67k1.0.WStwAkz9Npg#imgrc=0Bf8cwNYyfcfn-M, pristupljeno 25.09.2017.

WEB 7

https://www.google.hr/search?hl=hr&biw=1517&bih=735&tbm=isch&sa=1&q=limunska+kiselina+formula&oq=limunska+kiselina+&gs_l=psy-ab.1.2.0j0i30k1l3.16708.16708.0.18668.1.1.0.0.0.125.125.0j1.1.0....0...1.1.64.psy-ab..0.1.123....0.eHtzqCaX8so#imgrc=srimNpVfFOSUNM;, pristupljeno 25.09.2017.

WEB 8

http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Tehnologija_vina/kemijski%20sastav%20vina.pdf, pristupljeno 8.09.2017.

WEB 9

https://www.google.hr/search?hl=hr&biw=1517&bih=735&tbm=isch&sa=1&q=octena+kiselina+strukturna+formula&oq=Okiselina+formula&gs_l=psy-ab.1.1.0i7i30k1j0i8i7i30k1j0i13i5i30k1l2.78668.78668.0.81691.1.1.0.0.0.157.157.0j1.1.0....0...1.1.64.psy-ab..0.1.155....0.yXHNO7D-b0w#imgrc=yntytiO4BxP9MCM; pristupljeno 25.09.2017.

WEB 10

http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Tehnologija_vina/Tehnologija_vina/Tehnologija_vina/mehanički%20sastav%20grozda+bijela%20vina.pdf, pristupljeno 19.09.2017.

WEB 11

https://www.google.hr/search?q=runja%C4%8Da-mulja%C4%8Da+za+gro%C5%BE%C4%91e&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiRsJPSpsHWAhUEG5oKHbiFC2EQ_AUICigB&biw=1517&bih=735#imgrc=MZa2DFmCpg55FM; pristupljeno 25.09.2017.

WEB 12

https://www.google.hr/search?q=runja%C4%8Da-mulja%C4%8Da+za+gro%C5%BE%C4%91e&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiRsJPSpsHWAhUEG5oKHbiFC2EQ_AUICigB&biw=1517&bih=735#imgrc=pjaOv3sy5kS0_M; pristupljeno 20.09.2017.

WEB 13

http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski_studij/Kontrola_kakvoce_hrane/predavanja/III%20PARC%20ISPIT/Kromatografske%20metode.pdf, pristupljeno 20.09.2017.

WEB 14 <https://worldsbestwines.eu/grapes/bouvier/>, pristupljeno 18.09.2017

WEB 15 http://www.wikiwand.com/cs/Bouvier%C5%AFv_hrozen, pristupljeno 27.09.2017

Zhang Z, Pawliszyn J: Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 64:1843-1852, 1993.

Zoričić M: *Podrumarstvo*. Globus, Zagreb, 1996.