UTJECAJ FERMENTACIJE IMOBILIZIRANIM STANICAMA KVASCA NA PRISUTNOST BIOGNIH AMINA U NEKIM CRVENIM VINIMA VINOGORJA KUTJEVO

Jurčić, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:352010

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Anita Matijević, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij

Smjer: Vinogradarstvo i vinarstvo

UTJECAJ FERMENTACIJE IMOBILIZIRANIM STANICAMA KVASCA NA PRISUTNOST BIOGENIH AMINA U NEKIM CRVENIM VINIMA VINOGORJA KUTJEVO

Diplomski rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Anita Matijević, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij

Smjer: Vinogradarstvo i vinarstvo

UTJECAJ FERMENTACIJE IMOBILIZIRANIM STANICAMA KVASCA NA PRISUTNOST BIOGENIH AMINA U NEKIM CRVENIM VINIMA VINOGORJA KUTJEVO

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu diplomskog rada:

Doc. dr. sc. Vladimir Jukić, predsjednik

Prof. dr. sc. Borislav Miličević, mentor

Doc. dr. sc. Vesna Rastija, član

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

2. PREGLED LITERATURE **2**

2.1. Povijesni pregled proizvodnje i potrošnje vina 2
2.1.1. Proizvodnja i potrošnja grožđa i vina u svijetu 3
2.1.2. Proizvodnja i potrošnja grožđa i vina u RH 3

2.2. Zakonodavstvo o vinu i proizvodima od grožđa i vina 4
2.2.1. Razvoj zakonodavstva o vinu 4
2.2.2. Hrvatsko zakonodavstvo o vinu 4
2.2.2.1. Vinogradarska područja u Hrvatskoj 5
2.2.2.2. Preporučeni kultivari vinove loze podregiji Slavonija 6

2.3. Proizvodnja vina 7
2.3.1. Kakvoća grožđa i mošta za proizvodnju vina 7
2.3.2. Značaj i obilježja sorte 7
2.3.2.1. Pinot crni 8
2.3.2.2. Frankovka 8
2.3.2.3. Merlot 9
2.3.2.4. Syrah 9

2.3.3. Primarna prerada grožđa 10
2.3.3.1. Muljanje i runjenje 10
2.3.3.2. Maceracija 11

2.3.4. Izdvajanje soka 12
2.3.4.1. Dodavanje sumpor (IV) oksida 12
2.3.4.2. Cijeđenje, prešanje, taloženje, pretakanje, filtriranje 13

2.3.5. Fermentacija 14
2.3.5.1. Mikrobiološke osobine fermentacije 14
2.3.5.1.1. Rod *Saccharomyces* 15
2.3.5.1.2. Rod *Kloeckera* 15
2.3.5.1.3. Rod *Schizosaccharomyces* 16
2.3.5.1.4. Rodovi *Pichia* i *Hansenula* 16
2.3.5.1.5. Rod *Candida* 17
2.3.5.1.6. Rod *Brettanomyces* 17
2.3.5.2. Kemizam i tehnološke karakteristike fermentacije 18
2.3.5.2.1. Temperatura 18
2.3.5.2.2. Utjecaj kisika 19
2.3.5.2.3. Kiselost 19

2.3.5.2.4. Utjecaj fenolnih spojeva 20
2.3.5.3. Tiho vrenje 20
2.3.6. Bistrenje 21
2.3.6.1. Separacija 22
2.3.6.2. Filtracija 22
2.3.7. Stabilizacija 24
2.4. Biogeni amini 24
2.4.1. Prisutnost biogenih amina u vinu 25
2.4.2. Nastanak biogenih amina u vinu – mikroorganizmi 27
2.4.2.1. Čimbenici koji utječu na nastanak biogenih 29
2.4.3. Toksičnost biogenih amina 30

3. MATERIJALI I METODE 32
3.1. Materijali 32
3.1.1. Vino 32
3.1.1.1. Proces fermentacije klasičnim tehnološkim postupkom 32
3.1.1.2. Proces imobilizacije kvasaca kalcij-alginatom i postupak fermentacije 34
3.2. Metode 35
3.2.1. Fizikalno kemijske metode 35
3.2.2. HPLC 36

4. REZULTATI 37
4.1. Fizikalno kemijska analiza vina 37
4.2. Analiza vina primjenom HPLC metode 39

5. RASPRAVA 41
5.1. Fizikalno kemijske osobine vina 41
5.1.1. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na fizikalno-kemijske osobine vina Pinot crni 41
5.1.2. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na fizikalno-kemijske osobine vina Frankovka 41
5.1.3. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na fizikalno-kemijske osobine vina Merlot 42
5.1.4. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na fizikalno-kemijske osobine vina Syrah 43
5.2. HPLC analiza biogenih amina osobine vina 43
5.2.1. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na prisutnost biogenih amina u vinu Pinot crni 43
5.2.2. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima

na prisutnost biogenih amina u vinu Frankovka 44
5.2.3. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na prisutnost biogenih amina u vinu Merlot 44
5.2.4. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na prisutnost biogenih amina u vinu Syrah 45

6. ZAKLJUČAK 46

7. LITERATURA 47

8. SAŽETAK 50

9. SUMMARY 51

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 52

1. UVOD

Razvojem proizvodnje vina do izražaja dolaze tehnološki postupci kojima se izravno može utjecati na razinu pojedinih kemijskih tvari u vinu koje imaju učinak na ljudsko zdravlje. Svijest o prisutnosti biogenih amina u vinu postaje sve izraženija kod proizvođača vina, kao i kod potrošača zbog njihove potencijalne toksičnosti, ali i tržišnih implikacija.

Osim u području vinarstva, biogeni amini se koriste kao indikatori kvarenja drugih prehrambenih proizvoda. Biogeni amini u niskim koncentracijama važni su za metaboličke i fiziološke funkcije kod biljaka, životinja i mikroorganizama, ali povećanjem njihove količine može doći do različitih reakcija kod osjetljivih pojedinaca (Košmerl i sur., 2013.).

Brojna znanstvena istraživanja provođena su s ciljem utvrđivanja prisutnosti biogenih amina, kao i smanjenja njihovog sadržaja u vinu, a u budućnosti se očekuje daljnji razvoj tehnologije, ali i metoda detekcije biogenih amina. Do sada su prepoznati mnogi čimbenici koji mogu utjecati na formaciju biogenih amina, što se posebno odnosi na uvjete proizvodnje vina. Od posebne važnosti je uzeti u obzir sve faktore počevši od uzgoja vinove loze, alkoholne i malolaktične fermentacije, kemijske strukture vina, te odležavanja vina.

Cilj rada je utvrditi mogućnost primjene fermentacije s imobiliziranim kvascima u proizvodnji vina, te kako će to utjecati na prisutnost biogenih amina u crvenim vinima. Istraživanje se odnosi na kultivare Pinot crni, Frankovka, Merlot i Syrah s područja vinogorja Kutjevo.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. POVIJESNI PREGLED PROIZVODNJE I POTROŠNJE VINA

Vinova loza je vrlo stara kultura o čemu svjedoče brojni znanstveni dokazi. Biblija se smatra najranijim pisanim dokumentom iz vinogradarstva; u Starom zavjetu se navodi kako je Noa sadio vinograde i proizvodio vino. Postoje dokazi da kultiviranje vinograda i proizvodnja vina datira i do 6.000 godina pr. Kr. Uzgoj vinove loze počeo je oko Kaspijskog mora i na području Mezopotamije, a proširio se na istok prema Indiji, na jug prema Palestini i Egiptu, te na zapad prema Balkanskom poluotoku i zapadnoj Europi. Postoji mogućnost da su upravo Egipćani razvili prve metode branja i prerade grožđa, a arheološka iskapanja koja su otkrila mnogo lokaliteta s ukopanim vrčevima ukazuju na poznavanje utjecaja temperature na čuvanje vina.

U Europu vino stiže razvojem grčke civilizacije oko 1.600 godina pr. Kr. Grci su vrednovali potrošnju vina, smatrajući ga privilegijom viših slojeva, dok „obični“ ljudi nisu koristili vino. Rimljani su također bili značajni za razvoj i unapređenje vinarstva. Za vrijeme Rimskog carstva, proizvodnja vina proširila se Europom – vino je došlo u Francusku, Španjolsku, Italiju, te čak u dijelove Velike Britanije. Nakon raspada Rimskog carstva, kršćanski samostani su očuvali umijeće proizvodnje vina, a mnogi od njih su izravno povezani s razvojem današnjih najvažnijih vinskih regija Europe, kao što su Burgundija, Champagne i dolina Rajne.

Grčki pisac Atenaj (2. st. pr. Kr.) ostavio je dokaze o proizvodnji vina u našim krajevima i to u djelu „Gozba učenjaka“, gdje navodi: „na otoku Visu u Jadranskom moru proizvodi se vino koje je bolje od svih ostalih vina ako se s njim usporedi“. Upravo na Visu pronađeni su vrčevi iz 6. st. pr. Kr., te kovani novac na kojem je otisnut grozd i pehar. Tijekom vremena vinogradarstvo se proširilo po cijeloj obali Jadranskog mora, te postalo jedna od najvažnijih djelatnosti. Hrvati, iako nevični uzgoju vinove loze prihvaćaju je kao poljoprivrednu kulturu, posebno nakon pokrštavanja (8 – 9. st.). Od tada se vinogradarstvo snažno razvija, raste potražnja za vinima, nastaju nove, ali se zbog geoprometnog položaja i razvijenih veza sa svijetom introduciraju i strane sorte (Maletić i sur., 2009.).

2.1.1. Proizvodnja i potrošnja grožđa i vina u svijetu

Proizvodnja vina u svijetu za 2012. godinu prema OIV – u procijenjena je na 251,7 milijuna hektolitara, što predstavlja smanjenje od 6% u odnosu na 2011. godinu, a to je posljedica smanjenja površina pod vinogradima i loših vremenskih uvjeta.

Ovo smanjenje posebno je značajno u europskim zemljama koje slove kao najveći proizvođači vina. Francuska je u 2012. godini ostvarila proizvodnju od 41,4 milijuna hektolitara, slijedi ju Italija sa 40 milijuna hektolitara, te Španjolska sa 30,3 milijuna hektolitara.

Za razliku od njih, SAD bilježi visoku razinu proizvodnje koja iznosi 20,5 milijuna hektolitara, kao i Čile koji je u 2012. godini ostvario svoj proizvodni rekord u količini od 12,6 milijuna hektolitara. Nakon nekoliko godina stalnog rasta i povećavanja površina pod vinovom lozom, u Argentini je došlo do značajnog pada, tako da sadašnja proizvodnja vina iznosi 11,8 milijuna hektolitara, što predstavlja smanjenje od 24% u odnosu na proteklu godinu. (http://www.oiv.int/oiv/cms/index?lang=en)

2.1.2. Proizvodnja i potrošnja grožđa i vina u Republici Hrvatskoj

Hrvatska je zemlja duge tradicije proizvodnje grožđa i vina. U posljednjih desetak godina povećavaju se površine pod vinovom lozom, a time i proizvodnja vina. U sortimentu vinove loze prevladavaju tri sorte i to Graševina, Malvazija istarska i Plavac mali koje čine 45% ukupnog sortimenta. Preostali dio čine brojne sorte iz kojih se dobivaju vina malih serija, a veliki potencijal je postojanje čak 130 autohtonih sorata koje danas nemaju posebnog gospodarskog značenja (Grgić i sur., 2011.).

Prosječna potrošnja vina u Hrvatskoj procijenjena je na 28 l po stanovniku, čime se Hrvatska izjednačila s prosječnom potrošnjom u EU (HGK, 2011.).

2.2. ZAKONODAVSTVO O VINU I PROIZVODIMA OD GROŽĐA I VINA

2.2.1. Razvoj zakonodavstva o vinu

U starim pisanim dokumentima mogu se pronaći podaci o upotrebi vina, piva i drugih alkoholnih pića. Najraniji poznati zakon o alkoholu je Hamurabijev zakonik iz Babilona (oko 2.000 godina pr. Kr.) u kojemu je regulirana prodaja piva i vina, te propisana odgovornost onih koji konzumiraju i prodaju alkohol.

Na području Hrvatske, prva regulativa o vinu pod nazivom „Istarski razvod“ potječe iz 1025. godine, a govori o dužnostima kmeta, te se spominje vino koje kmet mora odvojiti i predati gospodinu knezu i crkvi.

Vinodolskim zakonom iz 1288. godine uređuje se pudarija (straža) nad vinogradima, te propisi o vinu, konobi i kašteladu (podrumaru). Proizvodnju vina u Dubrovačkoj Republici (1335. – 1808.) uređuju odredbe senata, kojima se utvrđuje način podizanja vinograda, proizvodnja vina, trgovanje vinom i određivanje cijena (Zoričić, 1996.).

2.2.2. Hrvatsko zakonodavstvo o vinu

U Republici Hrvatskoj na snazi je Zakon o vinu koji je donio Sabor RH i koji je objavljen u NN br. 96/03., a kojim se uređuje:

- proizvodnja, promet i prerada grožđa za vino
- destilacija
- označavanje
- zaštita zemljopisnog podrijetla
- proizvodnja i promet voćnih vina
- zadaće Hrvatskog centra za poljoprivredu, hranu i selo
- izrada i vođenje vinogradarskog katastra
- regionalizacija vinogradarskih područja
- registracija proizvođača

- inspekcijski nadzor

Na temelju članka 56. stavka 1. Zakona o vinu donesen je Pravilnik o vinu (NN 96/96) kojim se potanje proisuje regionalizacija vinogradarskih područja, zaštita proizvoda s oznakom kontroliranog podrijetla, registracija proizvođača grožđa, mošta, vina i drugih proizvoda od grožđa i vina, stručna sprema radnika koji rukovode proizvodnjom vina, dopušteni postupci, radnje i sredstva u proizvodnji mošta, vina i drugih proizvoda od grožđa i vina.

Nadalje se propisuju uvjeti koje moraju ispunjavati proizvodi od grožđa i vina, proizvodnja i promet grožđa za vino, proizvodnja i promet vina, te drugih proizvoda od grožđa i vina, način označavanja vina, način vođenja evidencije u proizvodnji i prometu mošta, vina i drugih proizvoda od grožđa i vina, zatim postupak uzimanja uzoraka grožđa, mošta i vina, te enološka sredstva u inspekcijskom postupku, kao i postupak obavljanja poslova u području vinogradarstva i vinarstva za koje je nadležan Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo (NN 96/96).

2.2.2.1. Vinogradarska područja u Hrvatskoj

Brežuljkasti i strmi tereni sjeverne Hrvatske te oskudna, kamenita i pjeskovita tla hrvatskog priobalja i otoka zahvaljujući brojnim čimbenicima među kojima treba istaknuti specifičnosti klime, tla, reljefa i nadasve raznolikog sortimenta daju grožđe od kojih se proizvode crna, bijela i ružičasta vina različite kvalitete.

Vinogradarsko područje Hrvatske dijeli se na tri regije:

- Istočna kontinentalna Hrvatska
- Zapadna kontinentalna Hrvatska
- Primorska Hrvatska

Vinogradarska regija Istočna kontinentalna Hrvatska dijeli se na podregije:

- Hrvatsko Podunavlje
- Slavonija

U podregiji Slavonija nalaze se sljedeća vinogorja: Đakovo, Slavonski Brod, Nova Gradiška, Požega – Pleternica, Kutjevo, Daruvar, Pakrac, Feričanci, Orahovica – Slatina i Virovitica (NN 74/12).

2.2.2.2. Preporučeni kultivari vinove loze u podregiji Slavonija

Sorte vinove loze koje su tradicijski vezane za naša vinogradarska područja, kao i kultivari koji nisu kod nas autohtoni, nego se uzgajaju u nekim drugim krajevima u svijetu, zbog svojih karakteristika označeni su kao preporučeni kultivari prema Pravilniku o Nacionalnoj listi dopuštenih kultivara vinove loze u RH (NN 159/04).

U podregiji Slavonija to se odnosi na sljedeće kultivare: Graševina, Pinot bijeli, Pinot sivi, Chardonnay, Sauvignon, Traminac crveni, Traminac bijeli, Silvanac zeleni, Rizling rajnski, Rizvanac, Manzoni bijeli, Muskat ottonel, Kerner bijeli, Ranfol, Moslavac, Zelenac slatki, Frankovka crna, Pinot crni, Zweigelt, Merlot, Cabernet sauvignon, Cabernet franc, Portugizac i Syrah.

2.2.2.3. Definicija vina i proizvoda od grožđa i vina

Vino je poljoprivredno prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnoga grožđa.

Grožđem se podrazumijeva zdrav, zreo, prezreo, prosušen ili prirodno smrznut plod vinove loze priznatih kultivara namijenjen proizvodnji vina ili drugih proizvoda od grožđa i vina, a čiji sok sadrži minimalnu količinu šećera od 64 º Oechsla (NN 96/03).

2.3. PROIZVODNJA VINA

Proizvodnja vina iz tehnološki zrelog grožđa podrazumijeva pravilan izbor osnovnih postupaka obrade grožđa i mošta što u konačnici rezultira visokim kvalitetom finalnog proizvoda.

2.3.1. Kakvoća grožđa i mošta za proizvodnju vina

U proizvodnji vina postoji mnogo faktora biološkog i ekološkog karaktera koji utječu na njegovu kvalitetu, a to su: sorta grožđa, ekološki uvjeti proizvodnje grožđa, vrijeme berbe, uvjeti transporta, prerade i dalje tehnologije vina. Cijeđenjem svježeg masulja dobijemo mošt – samotok, a nakon tiještenja iscijeđenog masulja dobijemo prešavinu. Mošt se najvećim dijelom sastoji od vode (75 do 80%), šećera (grožđani – glukoza i voćni – fruktoza) i kiselina (vinska, limunska, jabučna, jantarna itd.). Ostali sastojci prisutni u vinu su: dušične tvari, mineralne tvari, tvari boje, tvari arome i vitamini (Zoričić, 1996.).

2.3.2. Značaj i obilježja sorte

Sorta vinove loze je značajan čimbenik kvalitete grožđa, a u konačnici i vina. Svaka sorta ima svoje specifičnosti u pogledu sadržaja šećera, kiselina, tvari arome, boje i drugih komponenata, te zastupljenosti pojedinih dijelova grozda kao što su peteljkovina, pokožica ili sjemenke. Primjerenim tehnološkim postupcima i dobrim izborom kultivara moguće je postići visoku kvalitetu finalnog proizvoda (Muštović, 1985.).

Danas u svijetu, u kulturnom uzgoju postoji veliki broj sorata vinove loze, prema nekim podacima čak 20.000. U Hrvatskoj je na Nacionalnoj listi priznatih kultivara 196 sorata vinove loze namijenjenih za proizvodnju vina i drugih proizvoda od grožđa i vina.

2.3.2.1. Pinot crni

Pinot crni nalazimo u svim vinorodnim zemljama, a najzastupljeniji je u velikim francuskim pokrajinama Burgundiji i Champagni, dok se kod nas najviše uzgaja u regiji Kontinentalna Hrvatska, te u Istri. Istoznačnice za ovaj kultivar su : Pinot noir, Blauer spätburgunder, Burgundac crni itd. (Zoričić, 1998.).

Srednje je bujan, redovitih i relativno niskih priroda, no izvrsne kakvoće, čemu i duguje svoju veliku popularnost (Mirošević i Karoglan – Kontić, 2008.). Dozrijeva u I. razdoblju. Količina šećera u moštu kreće se od 19 – 22%, a sadržaj ukupnih kiselina od 5,5 do 8 g/L. Redovito je visoke kakvoće, osebujna mirisa svojstvena sorti, puna okusa. Boja mu je tamnorubin crvena, a starenjem poprima ciglasto crveni ton. Pogodan je za proizvodnju pjenušca, a prerada grožđa obavlja se tehnološkim postupkom dobivanja bijelih vina.

2.3.2.2. Frankovka

Sinonimi su joj Blaufränkisch, Modra frankinja, Blauer limberger. Podrijetlo tog kultivara nije razjašnjeno, a njemački navodi ukazuju na mogućnost da potječe s područja Donje Austrije ili Hrvatske. Rasprostranjena je u većini europskih vinorodnih zemalja, a veće površine zauzima u Njemačkoj, Austriji, Mađarskoj, Slovačkoj i Hrvatskoj gdje se najpoznatija Frankovka nalazi u feričanačkom vinogorju (Mirošević, 1996.).

Vrlo je bujna i pouzdana glede visine i stabilnosti prinosa. Dozrijeva u II. razdoblju. Dobre je kvalitete, a u pojedinim godinama i na određenim položajima daje vrhunsko vino. Srednje je jako vino od 10,7 do12 vol.% alkohola, ukupne kiseline od 5,8 do 8,2 g/L. Kod mladog vina ukupna kiselina dolazi više do izražaja, ali starenjem postaje zaokruženo, blago, tako da njen kvalitet dolazi do izražaja u drugoj ili trećoj godini. Vino ove sorte redovito se odlikuje rubin crvenom bojom, svjetlijih i tamnijih tonova. U okusu je vino puno, skladno, osvježavajuće i specifičnog mirisa svojstvenog sorti (Zoričić; 1998.).

2.3.2.3. Merlot

Merlot je porijeklom iz Francuske, provincije Gironde, šireg područja Bordeauxa. Sinonimi su: Merlot noir, Nero, Blauer, Bigney, Plant Medoc. Merlot je sorta širokog areala, tako da se uzgaja u gotovo svim vinogradarskim zemljama. U Hrvatsku je ovu sortu introducirao Institut za VVV, Zavod za vinogradarstvo. U Francuskoj na području Bordeauxa, Merlot je neizostavan sastojak poznatih bordoških vina. Kod nas je proširen najviše u Istri, zatim ponegdje u Dalmaciji i Slavoniji (Zoričić, 1998.).

Srednje je bujan, dobre i stabilne rodnosti. Kakvoća mu znatno ovisi o položaju, iako daje dobre rezultate i na lošijim položajima krških polja Dalmacije (Mirošević i Karoglan – Kontić, 2008.). Sadržaj šećera u moštu Merlota kreće se od 18 – 22%. Vino sadrži 11 – 13 vol.% alkohola sa 5,5 do 7,5 g/L ukupne kiseline. Vino je rubin crvene boje, duljim odležavanjem u bačvi poprima tamni ton, okus mu se zaokruži i smekša. Miris mu je tada čisti vinski, u kojem se izdvaja aroma svojstvena sorti. Merlot doseže zrelost u drugoj – trećoj godini, kada mu se odležavanjem u hrastovoj bačvi oblikuje osebujan bouquet.

2.3.2.4. Syrah

Syrah se danas uzgaja u mnogim vinogradarsko – vinarskim zemljama diljem svijeta, a najviše ga nalazimo u Francuskoj, Australiji i SAD – u. Njegove istoznačnice su Shiraz, Sirac, Sirah, te Balsamina. Ovaj kultivar je uvezen kod nas iz Francuske, zbog dobre rodnosti, ali i zbog kakvoće vina (jaka obojenost, ugodna aroma, visok sadržaj ekstrakta), zbog čega se rabi za sljubljivanje s vinima kojima ta svojstva nedostaju. Kod nas se najviše uzgaja na lokaciji Nadin u Zadarskom vinogorju (Zoričić, 1998.).

Tipična je vinska sorta koja daje vina osrednje do visoke kakvoće, što ovisi o okolinskim uvjetima. Nakuplja 18 do 25% sladora, s ukupnom kiselošću od 6,0 do 8,0 g/L. Nalazimo ga često u kupaži s Cabernet sauvignonom i Merlotom što rezultira ukusnim, jakim, zrelim i mirisnim vinom (Simon, 2004.)

2.3.3. Primarna prerada grožđa

Vrijeme koje proteče od berbe do početka prerade grožđa ima veliki utjecaj na kvalitetu budućeg vina. Zbog toga je potrebno ubrati samo toliko grožđa koliko smo u mogućnosti preraditi toga dana. Grožđe treba brati u sanduke zapremnine 20 – 30 kg i ravnomjerno ih prevoziti u podrum kako grožđe ne bi bilo izloženo oksidaciji i patogenoj mikroflori što se može dogoditi kod ostalih neadekvatnih načina prijevoza grožđa. Prerada grožđa predstavlja prvu fazu tehnologije vina u podrumu, jer dok su bobice cijele, alkoholna fermentacija ne može nastupiti tj. kvasci ne mogu obavljati svoju funkciju, a to je da razlažu šećer na alkohol i CO_2 (Muštović, 1985.).

2.3.3.1. Muljanje i runjenje

Ova faza predstavlja radnju s kojom zapravo počinje prerada grožđa. Obavlja se na strojevima runjača – muljača gdje se odvaja bobica od peteljke runjenjem u bubnju s rupicama, a zatim se na valjcima mulja (gnječi) bobica tako da se dobiva smjesa soka i krutih dijelova bobice (sjemenka i kožica) koja se zove masulj.

Korist od runjenja očituje se u kakvoći finalnog proizvoda – vina, jer je odvajanjem peteljkovine vino oslobođeno gorčine i trpkosti koju daje peteljkovina, a time do većeg izražaja dolaze mirisna svojstva sorte. Korist od peteljkovine kod vrenja masulja crnog grožđa očituje se u ravnomjernijem vrenju, drugim riječima, ne dolazi do burnog vrenja. Prilikom tiještenja (prešanja) od prevrelog tropa, peteljkovina predstavlja kapilarni prolaz za djelomice odavreli mošt kroz tiještenu smjesu, a time se postiže veći randman budućeg vina (Zoričić, 2003.).

Muljanjem se grožđe gnječi kako bi se iz njega oslobodio grožđani sok – mošt i započelo izrazito važno međudjelovanje mošta i kožica. U ovoj fazi bitno je izbjeći ekstremno kidanje ili drobljenje bobica, jer to može rezultirati brzim oslobađanjem prekomjerno gorkih i oštrih tanina iz kožica i sjemenki (Law, 2006.).

2.3.3.2. Maceracija

Kod proizvodnje crnih vina od posebnog je značaja prelazak nekih sastojaka iz čvrstih dijelova grožđa u vino. To se najvećim dijelom odnosi na fenolne spojeve, tanine, tvari boje, dušične, aromatične, mineralne tvari itd. Temeljno svojstvo obojenim vinima daju crvena boja i tanin. Intenzitet i količina boje, kao i količina tanina, uvjetovani su trajanjem maceracije kao i učestalošću remontaže – prelijevanja mošta u vrenju s donjeg dijela cisterne u gornji. Najveća količina boje prelazi između 4. i 6. dana kada se odvija burna fermentacija, a od 8. do 10. dana nastaje stagnacija. Količinski pad boje kao i pad njenog intenziteta uvjetovan je apsorpcijom – upijanjem boje čvrstih dijelova grozda, ali i kvasaca (oko 2%), a dio antocijana zbog oksidoredukcijskih reakcija prelazi u netopljivo stanje pa se taloži. Alkohol i CO_2 u tijeku vrenja masulja utječu na ekstrakciju antocijana. Učinak maceracije u pogledu sadržaja antocijana ovisi o kultivaru, te o zrelosti i zdravstvenom stanju grožđa. Samo od zreloga i zdravoga grožđa možemo u tijeku maceracije očekivati maksimalnu ekstrakciju svih tvari koje sadržavaju kožice, meso i sjemenke bobica (Muštović, 1985.).

Taninske tvari, za razliku od antocijana, prelaze iz komine u vino tijekom cijele fermentacije, tako da su vina duže držana na masulju u okusu trpkija i opora, a samim tim i manje harmonična (Radovanović, 1986.). Na proces maceracije utječe i način muljanja grožđa. Ako se ovim postupkom više razara struktura čvrstih dijelova grožđa doći će do povećane ekstrakcije fenolnih spojeva, posebno taninskih tvari.

Temperatura je također jedan od čimbenika koji utječu na uspješnost maceracije, a njene vrijednosti bi se trebale kretati između 20 i 25 °C. Tretiranje sumpornim dioksidom kod masulja proizvedenog od zdravog grožđa isto djelomice utječe na ekstrakciju polifenola. Međutim, djelovanje sumpornog dioksida na masulj proizveden od pljesnivoga grožđa u tijeku maceracije svodi se na zaštitu antocijana od djelovanja enzima laktaze koju sintetizira i u grožđe izlučuje plijesan *Botritys cinerea*. Enzim laktaza katalizira oksidaciju polifenola, pa tako i antocijana. Polifenoli uz biokatalitičko djelovanje enzima laktaze prelaze u peroksidni nestabilni oblik, izazivajući promijene koje nazivamo prijelomima vina (Zoričić, 2003). Maceracija crvenog vina namijenjenog ranoj konzumaciji traje 3 – 5 dana, dok se vina namijenjena dužem dozrijevanju maceriraju i do 3 tjedna. Kod procesa maceracije važno je

naglasiti i njen utjecaj na formiranje biogenih amina gdje prilikom dužeg kontakta vina sa kožicom bobice dolazi i do povećanja sadržaja biogenih amina.

2.3.4. Izdvajanje soka

Odvajanje soka bitan je postupak u proizvodnji vina koji ovisi o vrsti i željenim obilježjima finalnog proizvoda zbog čega je važno kada i na koji način će se provesti.

2.3.4.1. Dodavanje sumpor(IV) oksida

Sumpor i njegovi spojevi su sredstvo koje je našlo najširu primjenu u poizvodnji vina. Bez primjene sumpor(IV) oksida za vrenje mošta, masulja i u tijeku njege vina nemoguće je proizvesti zdravo vino i sačuvati vrhunsku kakvoću. Osim toga što djeluje kao antiseptik u suzbijanju raznih nepoželjnih mikroorganizama koji se nalaze na grožđu i u vinu, također djeluje i antioksidacijski tako što ne dopušta prijenos kisika na pojedine sastojke masulja, mošta i vina posredstvom katalizatora enzima, osobito onih koji kataliziraju oksidaciju polifenola, a nazivaju se polifenoloksidaze (Muštović, 1985.).

Jedno od svojstava sumpor(IV) oksida je i koagulacijsko djelovanje na taloženje koloidnih čestica mutnoće, bjelančevina i oksidacijskih enzima mošta i vina. Sumpor(IV) oksid u vinu postoji u slobodnoj i vezanoj fromi. Slobodni sumpor(IV) oksid štiti vino od patogene mikroflore (posebno bakterija uzročnika bolesti), ali i sprječava posmeđivanje, te pospješuje taloženje koloida (Radovanović, 1986.).

Važno je da se prije svakog sumporenja vodi računa o optimalnoj količini sumporova(IV) oksida koju je potrebno dodati, a proizlazi iz ostalih parametara analize vina, kao što su količina alkohola, ukupne kiseline, šećera, hlapljive (octene kiseline). Sumpor(IV) oksid dodan u vino u bilo kojem obliku djelomično se veže na glukozu, acetaldehid, ta na ostale spojeve (pirogrožđana kiselina, glukuronska kiselina, a-ketoglutarna kiselina i ksilokson). (Zoričić, 2003.).

2.3.4.2. Cijeđenje, prešanje, taloženje, pretakanje, filtriranje

Cijeđenje je faza u preradi grožđa koja nastupa nakon muljanja, gdje prirodnom gravitacijom dolazi do oslobađanja grožđanog soka. Mošt koji smo dobili iz ocjeđivača naziva se samotok i daje vino znatno bolje kvalitete od vina dobivenog prešanjem. U tijeku prerade grožđa 40 – 70% mošta dobijemo postupcima koji prethode prešanju (muljanje, cijeđenje), a preostali sok u masulju oslobađa se prešanjem. Postoje preše različite izvedbe - mehaničke, hidraulične, pneumatske. Utjecaj vrste preše, te primjena određenog tlaka na kvalitetu prešanja, a time i vina je različit. U principu prešanje bi trebalo obaviti pod manjim pritiskom, kako bismo dobili veću kvalitetu mošta. Također je poznato da preše koje rade brzo i sa velikim pritiskom, daju mošt sa znatno većim talogom ukoliko se ne vrši odvajanje pojedinih frakcija, odnosno prve i druge prešavine (Muštović, 1985.). Sam postupak prešanja treba izvoditi tako da prešanje ne traje duže nego što je neophodno, jer bi zbog dužeg zadržavanja masulja u preši moglo doći do prevelike ekstrakcije taninskih tvari u mošt, što bi moglo negativno utjecati na okus budućeg vina.

Slijedeća faza u proizvodnji vina je taloženje. Nakon prešanja mošt se sumpori, a uloga sumpornog dioksida je da osim što sprječava rad štetnih bakterija i kvasaca, pospješuje i taloženje nečistoća u moštu: čestica zemlje, plijesni, sitnih ostataka lišća, sredstava za prskanje vinove loze itd. Osim toga, djeluje i kao antiseptik i kao takav određeno vrijeme odgađa početak alkoholne fermentacije, te koagulira koloide kako bi se ubrzao postupak taloženja. Da bi taloženje bilo efikasno, pored sumporenja potrebno je sniziti i temperaturu mošta koja bi trebala iznositi od 6 – 10 °C, te na vrijeme provesti pretakanje kako bi se izbjegle neželjene promjene na moštu. Ovakav vid prirodnog taloženja uglavnom se primjenjuje u malim i srednjim vinarijama, dok se kod velikih proizvođača proces pročišćavanja vina može ubrzati strojevima kao što su centrifuge, filteri, flotatori ili kombinacija spontanog taloženja i strojeva (Muštović, 1985.).

2.3.5. Fermentacija

Mnogi znanstvenici prošlih stoljeća bavili su se procesom fermentacije počevši od Stahla, Lavoisera Gay – Lyssaca, Justusa von Liebiga i Louisa Pasteura koji postavlja teoriju da je nositelj procesa alkoholnog vrenja kvasac kao živo jednostanično biće, čiji promjer iznosi 0,004 – 0,014 μm. Konačno, Buchner je 1895. utvrdio da kvasac sadržava tvar koja izaziva vrenje i nazvao je zimaza. Riječ je o smjesi različitih enzima, bez koje ne bi bilo pretvorbe šećera u alkohol i drugih procesa koji kataliziraju procese u masulju, moštu i vinu.

2.3.5.1. Mikrobiološke osobine fermentacije

Alkoholno vrenje mošta izazivaju kvasci koji u moštu razlažu šećer na etanol, CO_2 i druge sastojke. *Saccharomyces* konvertira glukozu i fruktozu u piruvat, koji se dekarboksilacijom prevodi u acetaldehid, a njegovom redukcijom nastaje etanol. Jedna molekula glukoze daje dvije molekule etanola i ugljičnog dioksida (Boulton i sur., 1996.).

Kvasac koristi energiju iz mošta (šećera) putem respiracije i fermentacije. Disanjem kvasac razlaže šećer u prisutnosti kisika i to koristi prilikom svog razmnožavanja. Pri fermentaciji koja se odvija bez prisutnosti kisika kvasac koristi samo šećer i energiju. Za svoje potrebe kvasac koristi kisik iz šećera prilikom njegovog razlaganja. Kvasac u prisutnosti kisika puno bolje koristi energiju, nego kad se vrenje odvija u anaerobnim uvjetima. Obje reakcije se smjenjuju u ovisnosti o prisutnosti kisika, broja kvasaca i njihove vitalnosti i uvjeta pod kojima se odvija vinifikacija. Prva faza – disanje nastupa uglavnom prije i u početku alkoholne fermentacije, a značajna je za razmnožavanje kvasaca, dok druga faza – fermentacija bez prisutnosti kisika nastupa kasnije tj. kad su se kvasci namnožili, a mošt i posuda u kojoj se odvija vrenje su prezasićeni ugljičnim dioksidom, uslijed čega su stvoreni anaerobni uvjeti za kvasce. U takvim uvjetima, kvasci da bi si osigurali uvjete za život moraju razlagati mnogo veće količine šećera (Muštović, 1985.)

2.3.5.1.1. Rod *Saccharomyces*

Ovaj rod obuhvaća najveći broj kvasaca značajnih za alkoholnu fermentaciju, među kojima se nalaze i vrste koje su glavni nosioci ovoga procesa. *Saccharomyces* posjeduje visoku fermentacijsku aktivnost, te dobro podnosi različite ekstremne uvjete okoline (Grba, 2010.) Predstavnici ovoga roda su okruglog, ovalnog ili izduženog oblika. Razmnožavaju se multipolarnim pupanjem i formiraju 1 – 4 spore. U pogledu stvaranja alkohola postoje velike razlike između pojedinih vrsta ovoga roda. Od svih vrsta važnih u fermentaciji, mogu se izdvojiti sljedeće:

Saccharomyces cerevisiae

U procesu alkoholne fermentacije, ova vrsta je najviše zastupljena. Ovisno o soju kojem pripada može stvoriti do 16,8% alkohola i 0,7 – 1,53 g/L hlapljivih kiselina. Nakon završene fermentacije brzo izumire, tako da se rijetko susreće u vinu i nema velikog značaja za pojavu naknadne fermentacije u slatkim i poluslatkim vinima (Radovanović, 1986.).

Saccharomyces oviformis

S.oviformis otporniji je prema većim koncentracijama alkohola, a i sam tijekom fermentacije stvara više alkohola. Može se razmnožavati i u prisutnosti od 17 vol.% alkohola, a također je otporan i prema sumpor(IV) oksidu. Zahvaljujući ovim svojstvima, *S. oviformis* je posebno značajan u moštovima sa većim sadržajem šećera gdje *S. cerevisiae* ne može provesti fermentaciju do kraja. Primjenjuje se i u slučaju kada želimo izazvati naknadnu fermentaciju što nalazi primjenu npr. kod procesa šampanjizacije (Radovanović, 1986.).

2.3.5.1.2. Rod *Kloeckera*

Ovaj rod obuhvaća četiri vrste, među kojima je za tehnologiju vina najznačajnija vrsta:

Kloeckera apiculata

Ovaj kvasac je najbrojniji u spontanoj mikroflori grožđa, a posjeduje osobine koje se negativno odražavaju na kvalitetu vina, tako da se *K. apiculata* ubraja u „divlje“ kvasce. Po

obliku to je kvasac s malo izduženim polovima i podsjeća na limun, a za njega je karakteristično da je vrlo osjetljiv na alkohol (podnosi najviše 2,5 vol.%), a u fermentaciji stvara veće količine hlapljivih kiselina, pa je njegovo sudjelovanje u fermentaciji uglavom nepoželjno. Ovaj kvasac je osjetljiv i na sumpor(IV) oksid, tako da ga se lako može ukloniti sumporenjem mošta prije fermentacije (Radovanović, 1986.).

2.3.5.1.3. Rod *Schizosaccharomyces*

Predstavnici ovog roda su sporogeni kvasci koji se razmnožavaju vegetativno dijeljenjem. Ovaj rod obuhvaća tri vrste: *Schizosacch. pombe, Schizosacch. octosporus i Schizosacch. versatilis*. Među spomenutim vrstama od posebnog značaja je *Schizosacch. pombe* čiji sojevi vrlo intenzivno fermentiraju glukozu, fruktozu, kao i saharozu, a mogu producirati 10 – 15 vol.% alkohola i veće količine glicerola.

Pod anaerobnim uvjetima, pored šećera, fermentira i jabučnu kiselinu i iz nje stvara etanol i ugljični dioksid. Ovisno o soju kvasaca sadržaj jabučne kiseline se može smanjiti za 65 – 80% od ukupne količine u moštu. Zanimljivo je da ovaj kvasac troši jabučnu kiselinu samo dok traje alkoholna fermentacija, a kada nestane šećera, onda prestaje i fermentacija jabučne kiseline. Otporniji je prema sumpor(IV) oksidu od *S. cerevisiae*, tako da pojačanim sumporenjem mošta možemo suzbiti sve ostale kvasce, tako da će ostati samo *Schizosaccharomyces* koji će bez poteškoća fermentirati jabučnu kiselinu (Radovanović, 1986.).

2.3.5.1.4. Rodovi *Pichia i Hansenula*

Predstavnici jednog i drugog roda pripadaju grupi sporogenih kvasaca. Međusobno su vrlo slični, a odlikuju se time što na površini vina stvaraju navlaku i stvaraju veće količine etilacetata uz relativno malo octene kiseline. Fermentativna aktivnost im je slaba, a karakteristični su po tome što izazivaju pojavu vinskog cvijeta. U okviru roda *Pichia* poznate su dvije vrste: *Pichia membranefaciens i Pichia fermentans*. Predstavnici prve vrste su ovalnog ili izduženog oblika, na površini vina stvaraju naboranu navlaku, a fermentacijska

aktivnost im je vrlo slaba. Pod anaerobnim uvjetima u moštu stvaraju 1,8 – 3,0 vol.% alkohola i 0,4 – 1,04 g/L hlapljivih kiselina. *Pichia fermentans* je više izduženog oblika, iako ima i malih eliptičnih stanica. Za razliku od prve vrste stvara više alkohola (5,1 – 9,3 vol.%), a hlapljivih kiselina (0,52 – 0,73 g/L). (Radovanović, 1986.).

Rod *Hansenula* obuhvaća više vrsta, ali je za vino značajna samo *Hansenula anomala*, koja također na površini vina stvara navlaku koja se penje uz stjenke posuda. Predstavnici ove vrste su izduženo – elipsastog oblika, a u fermentaciji stvaraju 2,6 – 5,3 vol.% alkohola i 0,52 – 1,68 g/L hlapljivih kiselina. Ova vrsta kvasca se odlikuje sposobnošću da stvara dosta etilacetata, čak 416 – 870 mg/L (Radovanović, 1986).

2.3.5.1.5. Rod *Candida*

Predstavnici ovog roda su glavni izazivači pojave vinskog cvijeta u vinu. Razmnožavaju se pupanjem i ne formiraju spore. Za tehnologiju vina značajne su samo dvije vrste koje otežavaju fermentaciju:

Candida mycoderma

Na površini vina brzo stvara suhu i naboranu navlaku, žuto – bijele boje. Ova vrsta kvasca ne pokazuje gotovo nikakvu fermentacijsku aktivnost, a za izvor ugljika koristi alkohol.

Candida pulcherima

Ova vrsta je mnogo manje prisutna u procesu fermentacije. Ima slabu fermentacijsku aktivnost, a fermentirajući glukozu može stvoriti tek 0,8 – 2,4 vol.% alkohola (Radovanović, 1986.).

2.3.5.1.6. Rod *Brettanomyces*

Ovo su također predstavnici kontaminirajuće mikroflore mošta i vina. Iako se odlikuju relativno visokom fermentacijskom aktivnošću jer mogu stvoriti 11 – 13 vol.% alkohola, za proces alkoholne fermentacije nisu od značaja. Za pripadnike ovog roda od posebnog značaja

je to da u vinu stvaraju karakterističan miris na acetamid (miris na miševe). Najčešće vrste koje uzrokuju ovu pojavu jesu, *Brettanomyces vini* i *Brettanomyces schanderli* koje imaju stanice eliptičnog oblika, više ili manje izdužene, vrlo sporo se razmnožavaju i ne stvaraju spore (Radovanović, 1986.).

2.3.6.2. Kemizam i tehnološke karakteristike fermentacije

Na tijek alkoholne fermentacije može utjecati niz čimbenika kao što su: temperatura, sastav mikroflore mošta, aerobni i anaerobni uvjeti, sadržaj SO_2, izvori dušika, ugljika, vitamina, mikroelemenata, fenolnih spojeva, kiselosti, te vrsti i soju mikroorganizama (Rose i Harrison, 1993.).

2.3.6.2.1. Temperatura

Temperatura je od velikog utjecaja na tijek, dinamiku i kemijske procese alkoholne fermentacije. Previsoka, kao i preniska temperatura može biti jedan od razloga zastoja fermentacije. Mnogi sojevi kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* mogu fermentirati relativno dobro do 12 °C, ali niže temperature sprječavaju pravilno vođenje fermentacije, jer je metabolička aktivnost kvasca usporena pri nižim temperaturama (Rosi, 2000.). Poznato je da se pri višim temperaturama formiraju veće količine viših alkohola, koji su glavni predstavnici tzv. sekundarnih aroma vina. Smatra se da količina od 400 mg/L pozitivno utječe na aromu, dok iznad te količine mogu ispoljavati i negativne karakteristike vina. S druge strane, pri nižim temperaturama stvaraju se finije aromatske karakteristike vina. Za razvoj bouqueta, boje, ekstrakta, optimalna temperatura vrenja kod bijelih vina je 15 – 18 °C, a kod crnih 25 – 30 °C. Za najkvalitetnija bijela vina (kod sorata sa mnogo primarnih aromatičnih tvari) poželjne su i niže temperature, tj. 10 – 14 °C uz upotrebu selekcioniranih kvasaca za hladnu fermentaciju (Muštović, 1985.).

2.3.6.2.2. Utjecaj kisika

Kisik ima važnu ulogu u fermentaciji jer je potreban za pravilan razvoj i održavanje kvasaca, što je preduvjet da se fermentacija provede do kraja. Kisik je uključen u sintezu lipida kao što su steroli i nezasićene masne kiseline od kojih je izgrađena stanična membrana kvasaca i koji joj osiguravaju bolju otpornost na alkohol. Minimalne potrebe za O_2 u cilju optimalnog provođenja fermentacije su između 5 – 10 mg/L (Sablayrolles i sur., 1986.). Idealno vrijeme dodavanja kisika je u sredini fermentacije, a to je vrijeme kada je kvasac došao do kraja svoje faze razmnožavanja i fermentativna aktivnost je najviša. Tada je rizik od oksidacije mošta minimalan, a korištenje kisika od strane enzima zanemarivo. Ako je dodatak O_2 pažljivo kontroliran, u smislu dodavanja u pravom trenutku i u optimalnoj količini, može se spriječiti predugačka fermentacija ili čak njen potpuni prekid.

2.3.6.2.3. Kiselost

Kiselost mošta i vina potječe od raznih organskih kiselina kao što su vinska, jabučna, limunska, mliječna, jantarna, itd. Optimalna kiselost za rad vinskog kvasca je kod pH=4 – 6, a mošta od 2,8 – 3,8. Vinska i jabučna kiselina pogoduju vrenju ukoliko se nalaze u normalnim uvjetima i količinama. Veća kiselost mošta ne šteti kvascima, ali zato šteti nekim nepoželjnim mikroorganizmima, posebno bakterijama, što znači da kiseline indirektno pomažu kvascima u provođenju pravilne fermentacije. Kvasci su vrlo osjetljivi na octenu kiselinu koja se počinje stvarati već u ranoj fazi fermentacije, iako je djelomično proizvode i sami kvasci. *Saccharomyces* obično proizvodi octenu količinu u granicama od 100 do 200 mg/L, na što utječe soj kvasca, temperatura vrenja i sastav mošta (Boulton i sur., 1996.).

Količina hlapivih kiselina koja može prouzročiti poteškoće u vrenju mošta kreće se oko 2 g/L, dok pri 4 – 5 g/L vrenje potpuno prestaje. Osim octene, fermentaciju mogu narušiti ili potpuno prekinuti i mravlja kiselina u količini od 2 g/L, te maslačna već pri sadržaju od 1 g/L (Muštović, 1985.).

2.3.6.2.4. Utjecaj fenolnih spojeva

Fenolni spojevi se nalaze u manjim količinama u moštu i vinu, te uglavnom nemaju značajniji utjecaj na fermentaciju. Fenoli u crnom grožđu, a to se posebno odnosi na antocijanine mogu stimulirati vrenje, dok procijanidini u bijelom grožđu mogu djelovati inhibirajuće. Veće količine tanina, tvari boje i ostalih polifenola ometaju rad kvasaca. Ovo se objašnjava time što se fenolni spojevi kao pozitivno nabijen koloid spajaju sa stanicama kvasaca koje nose suprotan naboj i na taj način narušavaju njihovu aktivnost. Utvrđeno je da 3 g/L taninskih tvari uzrokuje neznatne smetnje u fermentaciji, dok je pri sadržaju od 6 – 10 g/L poremećaj fermentacije značajan (Muštović, 1985.).

2.3.6.3. Tiho vrenje

Tiho vrenje je od velikog značaja za vino, jer se osim završetka fermentacije odigravaju i drugi procesi važni za buduća svojstva vina. Smanjena aktivnost kvaščevih stanica rezultat je povećanog sadržaja alkohola i smanjenog sadržaja šećera. U toj fazi značajan broj kvaščevih stanica izumire (20 – 30%) što također rezultira opadanjam intenziteta fermentacije. Veliki dio grubih čestica vina kao i izumrle kvaščeve stanice počinju sedimentirati, tako da se počinju zapažati i prvi znaci spontanog bistrenja vina (Muštović, 1985.).

Poslije izumiranja uslijed autolize, iz kvaščevih stanica u vino prelaze dušični spojevi, među kojima su od posebnog značaja aminokiseline. Također, u ovom periodu se odigrava, a velikim dijelom i završava proces malolaktične fermentacije. U procesu biološkog smanjenja kiselosti vina, mliječno – kisele bakterije u njima povoljnim uvjetima, metaboliziraju neužitnu i oporu jabučnu kiselinu u blažu i okusno kvalitetniju mliječnu kiselinu i ugljični dioksid. Spontane bakterije (*Oenococcus oeni, Lactobacillus i Pediococcus*) prisutne su u vinu nakon alkoholnog vrenja, a tu su dospjele iz grožđa – mošta. One neće u svim uvjetima provesti jabučno – mliječno vrenje, posebno ne u teškim uvjetima kada je pH vrijedost manja od 3,2, količina alkohola veća od 13 vol.%, ukupni SO_2 veći od 30 mg/L i temperatura vrenja 16 °C. Kod pH nižeg od 3,0 degradacija kiseline teže nastupa, zato se moraju koristiti selekcionirane bakterije. Što je veća raznolikost populacije bakterija kod spontanog vrenja, to je jabučno -

mliječno vrenje nesigurnije, jer dolazi do pojave neželjenih nusprodukata metabolizma bakterija.

U optimalnim uvjetima kada je pH vrijednost 3,5, a sadržaj alkohola niži, dolazi do bržeg razmnožavanja bakterija *Lactobacillus* i *Pediococcus* što ih čini dominantnima u vinu, a kao posljedica javlja se nepoželjan miris i okus. Produkt rada nekih bakterija može biti pojava većih količina biogenih amina, etil karbamata, mirisa na miševinu, a vina postaju sluzava (Zoričić, 2003.).

Istraživanja su dokazala da povećani sadržaj biogenih amina u vinima kod viših pH vrijednosti može uzrokovati zdravstvene tegobe kod osjetljivih osoba. Zbog izbjegavanja svih spomenutih negativnih pojava, koriste se selekcionirane bakterije i to uglavnom heterofermentativni sojevi *Leuconostoc oenos*. Osim sigurnog provođenja jabučne kiseline u mliječnu, selekcionirane bakterije osiguravaju mirisno – okusnu osobitost i punoću vina (Zoričić, 2003.).

2.3.7. Bistrenje

Prilikom bistrenja vinu dodajemo organsko, mineralno ili sintetski proizvedeno bistrilo u prikladnom obliku i u potrebnoj količini, kako bi se fizikalno - kemijskim ili mehaničkim djelovanjem utjecalo na izdvajanje nestabilnih tvari vina. Najveći broj bistrila djeluje na elektrostatičkom principu što znači da o električnom naboju nekih tvari vina i električnom naboju bistrila ovisi hoće li doći do gubitka elektrona, do neutralizacije tih čestica i samim time do njihove koagulacije, flokulacije i precipitacije (Sokolić, 2004.).

Važno je da je bistrilo drugog naboja (pozitivnog ili negativnog) u odnosu na čestice mutnoće koje su u vinu uglavnom pozitivnog naboja. Sva sredstva koja se koriste za bistrenje vina mogu se podijeliti na organska i mineralna. Od organskih sredstava široko je rasprostranjena uporaba želatine i tanina, a ostala organska bistrila su bjelanjak jajeta, albumin, mlijeko, kazein, riblji mjehur itd. Među mineralnim sredstvima za bistrenje najčešće su u upotrebi bentonit, silicijev dioksid i soli silicijeve kiseline. Sredstvo za bistrenje treba biti takvo da njegov talog poslije koagulacije bude veće specifične težine od one koju ima vino koje želimo

bistriti. Uspjeh kod bistrenja vina bilo kojim sredstvom u velikoj je mjeri pod utjecajem kiselosti vina. Vina sa višim pH vrijednostima se lakše bistre, iako se problemi u bistrenju mogu javiti i kod previše kiselih vina (Sokolić, 2004).

Temperatura pri kojoj će se izvršiti bistrenje vina od bitnog je utjecaja na brzinu i efekte primijenjenoga postupka bistrenja. Kod laboratorijskog određivanja količine bistrila treba nastojati da temperatura vina u kojem se vrši „proba na malo“ bude što bliža temperaturi vina u podrumu gdje će biti obavljen glavni zahvat. Također je bitan i pravovremeni pretok vina sa stvorenog taloga kako bi se uspješno završio proces bistrenja (Radovanović, 1986.). Bez obzira na napredak u razvoju bistrila njihova primjena manje ili više utječe na kakvoću vina jer uz uklanjanje zamućenja, kao i nepovoljnog okusa i mirisa kod vina, bistrilo istovremeno djeluje na tvari boje i mirisa, posebno kod visokokvalitetnih vina čija svojstva koja označavamo kao sortnost bivaju umanjena.

2.3.7.1. Separacija

Odvajanje čvrstih čestica od bistrog vina može se obaviti i pomoću centrifuga ili separatora pri čemu se umjesto gravitacije koristi višestruko veća centrifugalna sila. Centrifuga ili separator je stroj s velikim brojem okretaja koji je sposoban u kratkom vremenu preraditi veliku količinu mošta ili vina. Mogu biti otvorene, poluzatvorene ili zatvorene koje su i najpogodnije jer onemogućuju pristup zraku i manje se gubi ugljični dioksid. Kapacitet centrifuga ovisi o stupnju bistroće koji želimo postići, specifičnoj težini čestica mutnoće i viskozitetu mošta ili vina. Negativna posljedica separacije je razbijanje vina koje se javlja zbog visoke turbulencije u cilindrima separatora (Muštović, 1985.).

2.3.7.2. Filtracija

Filtracija je postupak odstranjivanja nečistoća iz vina zadržavanjem čestica na filtracijskom sloju kroz koji prolazi vino. Odvajanje čestica kod filtriranja postiže se na dva načina: zadržavanjem (efekt sita) i apsorpcijom. Do pročišćavanja zadržavanjem dolazi kada su pore filtra manje od čestica, pa se one zadržavaju na površini i u unutrašnjosti filtra. Apsorpcijom

se čestice zadržavaju zbog privlačenja (apsorpcije) uslijed razlike električnog naboja. Prema načinu rada filtre možemo podijeliti u tri grupe:

- naplavni filteri
- pločasti filteri
- membranski filteri

Princip rada naplavnog filtera sastoji su u nanošenju na metalnu rešetku ili vrećicu s vinom izmiješane infuzorijske zemlje, koja čini porozni sloj za filtriranje. Taj će se sloj u tijeku filtriranja povećavati naplavljivanjem nečistoća vina, pa se nakon određenog vremena prekida filtriranje, filter se pere, a zatim ponovno nastavlja filtriranje. Uglavnom se upotrebljavaju za filtraciju vina s većim zamućenjem.

Kod pločastih filtera filtracijske komore za mutno i bistro vino čine naizmjenično postavljeni okviri sa ulošcima (filtar ploče) koji se postavljaju između njih. Okviri su izrađeni od legura metala ili plastike, a filtar ploče koje su između njih imaju otvore i služe kao dovodni i odvodni kanali za vino. Filtar slojnice su istih dimenzija kao i okviri, napravljene su od celuloze, a postoje razne vrste ovisno o stupnju bistroće koji želimo postići. Pločasti filteri se većinom upotrebljavaju za filtracije vina s manjim zamućenjima (Zoričić, 2003.).

Membranski filteri imaju sposobnost da na svojim stjenkama zadrže ne samo kvasce, već i bakterije koje su deseterostruko manje od kvasaca, a promjer im se kreće od 0,3 – 1,5 μm (Sokolić, 2004.). Membranske ploče koje se umeću u tzv. čahuru izrađene su iz acetatne celuloze i drugih polimera (PVC – poliamida, Ca – titanata i nitratne celuloze). Učinak filtracije ovisi o promjeru i visini čahure, te o promjeru kapilara na membranskim pločama. Rad ovog filtra potrebno je uskladiti s brzinom punjenja vina u boce na punilici.

2.3.8. Stabilizacija

Cilj stabilizacije vina je spriječiti mutnoću i taloženje pojedinih sastojaka vina koje mogu uzrokovati dušične tvari, bjelančevine, polifenoli – boje i tanini, mikroflora, kiseline i soli kiselina. Termolabilne bjelančevine se utvrđuju toplotnim testom, a nestabilnost vina uzrokuju promjenom temperature. Njihovo uklanjanje iz vina provodi se bentonitom jer ima vrlo veliku sposobnost apsorpcije bjelančevina. Polifenoli u vinu postoje kao tvari boje antocijani i tanini (leukoantocijani i katehini) , a podložni su oksidaciji, pa time dolazi do nestabilnosti vina koja se očituje u promjeni boje od svijetložute do smeđe. Tu pojavu zovemo posmeđivanje vina, a sprječavamo ju upotrebom sumporova(IV) oksida (Sokolić, 2004.).

Kovine kao što su željezo, cink i bakar mogu uzrokovati sivi i crni lom vina, a željezo se uklanja „plavim bistrenjem“. Biološku nestabilnost vina mogu uzrokovati mikroorganizmi, kao što su kvasci i bakterije koje možemo preventivno ukloniti iz vina pravilnom primjenom sumporova(IV) oksida kod prerade grožđa i taloženja. Najvažniji uzročnici fizikalne nestabilnosti vina su kalcijevi tartarati i kalijevi bitartarati. Kako bi se pospješilo njihovo taloženje, vino se izlaže niskim temperaturama od - 4 do - 6 °C tijekom 5 – 7 dana, dakle vino se pothlađuje na temperaturu blizu točke smrzavanja ovisno o količini alkohola i ukupnog ekstrakta vina (Zoričić, 1996.).

2.4. BIOGENI AMINI

Biogeni amini su skupina organskih dušičnih spojeva koji nastaju u organizmima ljudi, životinja, biljaka i mikroorganizama. Do nastanka biogenih amina može doći u svim prehrambenim proizvodima kod kojih tijekom proizvodnje, zriobe i čuvanja dolazi do mikrobioloških promjena bjelančevina. U velikoj mjeri može ih se naći u prehrambenim proizvodima koji nastaju uz pomoć mikrobioloških procesa, ali i u pokvarenim proizvodima bogatim bjelančevinama. Konzumiranje biogenih amina u normalnim uvjetima ne predstavlja neposrednu opasnost za zdravlje, budući da ljudski organizam posjeduje nekoliko kontrolnih mehanizama za interne, ali i za strane amine nastale izvan organizma. Kod viših koncentracija biogenih amina može pod određenim uvjetima doći do zakazivanja tih kontrolnih mehanizama, što dovodi do neželjenih efekata za zdravlje organizma (Lemperle, 2009.).

2.4.1. Prisutnost biogenih amina u vinu

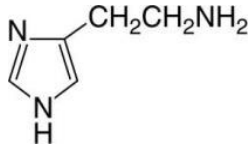
Vinifikacija grožđa sastoji se od dva glavna tehnološka procesa – alkoholne i malolaktične fermentacije. Alkoholna fermentacija mošta uglavnom se provodi pomoću kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a uključuje pretvorbu grožđanog šećera u etanol i CO_2. Malolaktična fermentacija provodi se u crvenim i nekim bijelim vinima pomoću bakterija mliječne kiseline (rodovi *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* i *Oenococcus*) što omogućava pretvorbu jabučne kiseline u mliječnu, osigurava određeni stupanj mikrobiološke stabilnosti vina, te modificira njegove senzorne karakteristike.

Osim osnovnih proizvoda metabolizma i mnogih tvari arome nastalih tijekom fermentacije, pojedini mikroorganizmi stvaraju sekundarne produkte koji mogu utjecati na zdravstveno stanje vina, a jedni od njih su biogeni amini. Za nastajanje biogenih amina u vinu dolaze u obzir tri moguće reakcije:

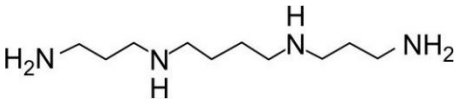
- dekarboksilacija aminokiselina
- aminiranje (dodavanje NH_2 – grupe) aldehida i ketona
- razgradnja dušičnih spojeva (Lemperle, 2009.)

Većina primarnih amina nastaje dekarboksilacijom aminokiselina, sekundarni amini nastaju aminiranjem aldehida i ketona, dok razgradnjom dušičnih spojeva nastaju metil - , etil - , dimetil – i etanolamin. Najzanimljiviji su i – amilamin i etilamin koji nastaju kao nusproizvod alkoholnog vrenja. Osim njih javljaju se i ostali biogeni amini poput histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina, kadaverina, spermidina, spermina, agmatina i triptamina (Lemperle, 2009).

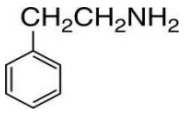
Biogeni amini mogu imati alifatsku (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatsku (tiramin, feniletilamin) ili heterocikličnu kemijsku strukturu (histamin, triptamin), (Karovičova, 2003.).



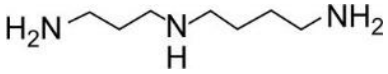
histamin



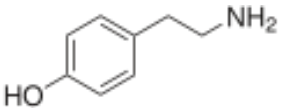
spermin



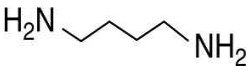
2 – feniletilamin



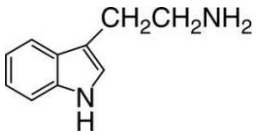
spermidin



tiramin



putrescin



triptamin



kadaverin

Slika 1. Kemijska struktura biogenih amina (Flamini, 2008.)

Pojedini biogeni amini prisutni su već na samom grožđu – npr. putrescin, kadaverin, spermidin, dok svježi mošt uglavnom sadržava nisku razinu biogenih amina i to većinom

spermidina i putrescina. Uobičajeno je da se u vinu nalazi mnogo više biogenih amina nego u moštu, isto kao što im je u crvenom vinu znatno viša koncentracija u usporedbi s bijelim vrstama vina. To možemo zahvaliti činjenici da proces proizvodnje crvenih vina uključuje i malolaktičnu fermentaciju u kojoj između ostalog, dolazi i do stvaranja biogenih amina (König i sur., 2009.). Osim toga, prisutnost biogenih amina u vinu ovisi i o trajanju maceracije, vremenu odležavanja vina na talogu, te o mikroflori koja sudjeluje u fermentaciji sačinjenoj od različitih vrsta kvasaca i bakterija.

2.4.2. Nastanak biogenih amina u vinu – mikroorganizmi

U procesu proizvodnje vina pojavljuje se niz različitih mikroorganizama koji utječu na formiranje biogenih amina. Generalno je prihvaćeno da kvasci imaju manji utjecaj na ukupni udio biogenih amina u vinu u odnosu na bakterije mliječne kiseline, te da ove dvije grupe mikroorganizama stvaraju različite vrste biogenih amina. U prilog tome ide i činjenica da postoji mnogo više podataka da bakterije mliječne kiseline doprinose nastanku biogenih amina u usporedbi s dostupnim podacima o djelovanju kvasaca. Do povećanja sadržaja amina dolazi i djelovanjem gljivice *Botritys cinereae* koja može utjecati na promjene u sastavu grožđa (Košmerl i sur., 2013.).

U provođenju alkoholne fermentacije sudjeluju različite vrste autohtonih kvasaca zajedno s komercijalnim sojevima *Saccharomyces cerevisiae*. Nekoliko istraživanja je provedeno o utjecaju kvasaca na stvaranje biogenih amina u vinu u kojima su uspoređivane različite vrste kvasaca. Pojedini autori su utvrdili da ne dolazi do značajnog porasta koncentracije biogenih amina tijekom alkoholne fermentacije, te da kvasci nisu odgovorni za produkciju većine amina pronađenih u industrijskim crvenim vinima. U jednom istraživanju je čak utvrđeno smanjenje biogenih amina (posebno putrescina) tijekom alkoholne fermentacije (Smit i sur, 2008.).

Suprotno tome, dokazana je mogućnost povećanja koncentracije biogenih amina u vinu i to direktnim utjecajem kvasaca tijekom spontane i pobuđene fermentacije. Također je istraživana koncentracija biogenih amina koje su proizveli različiti sojevi *S.cerevisiae* u rosé vinima i utvrđen je blagi porast putrescina, spermina, spermidina, feniletilamina i tiramina

ovisno o soju. Nadalje, došlo se do zaključka da inokulirani mošt daje vina sa višim koncentracijama biogenih amina u usporedbi sa spontanom fermentacijom provedenom pomoću autohtonih kvasaca (Smit i sur., 2008.). Od pet različitih rodova kvasaca izoliranih iz grožđa i vina, *B. bruxellensis* stvorio je najvišu koncentraciju biogenih amina, potom *S. cerevisiae*, dok ostali nisu proizveli značajnije količine.

Pojava biogenih amina u vinu dugi niz godina isključivo je povezivana sa lošim higijenskim uvjetima u vinariji, te je promatrana kao posljedica mane vina uzrokovane raznim sojevima bakterija mliječne kiseline koje pripadaju rodovima *Pediococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Ove bakterije stvaraju biogene amine u prisutnosti njihovih prekursora aminokiselina, što se posebno odnosi na rod *Pediococcus* koji je najzastupljeniji u proizvodnji histamina. Međutim, došlo se do zaključka da vrsta *Oenococcus oeni* koja se najčešće dovodi u vezu s malolaktičnom fermentacijom također provodi dekarboksilaciju histidina u histamin (König i sur., 2009.).

Provedena su brojna istraživanja koja su potvrdila da produkcija amina pomoću bakterija mliječne kiseline ovisi o soju bakterija, a ne o specifičnim obilježjima vrste. Također je potvrđeno da inokulacija vina selekcioniranim bakterijama može smanjiti pojavu biogenih amina u usporedbi sa spontanom malolaktičnom fermentacijom.

Gljivica *Botritys cinerea* može uzrokovati biotički stres kod vinove loze što dovodi do povećanja sadržaja amina već u samom grožđu. Njena karakteristika je da prodire u kožicu bobice i značajno mijenja sastav i zastupljenost aminokiselina, ugljikohidrata i amina povećavajući njihovu koncentraciju, dok se udio vode smanjuje (Smit i sur., 2008.). Tu pojavu nalazimo kod predikatnog vina kao što je slučaj sa vinom Tokaj iz Mađarske koje se proizvodi posebnom tehnologijom. Posebnost ovog načina proizvodnje je da se zdravom grožđu dodaje određena količina grožđa sa plemenitom plijesni. Istraživanje je potvrdilo da je koncentracija biogenih amina u takvom predikatnom vinu znatno viša u usporedbi s normalnim vinom dobivenim od istog kultivara. Metabolička aktivnost gljiva direktno doprinosi formaciji biogenih amina (što se posebno odnosi na izoamilamin), te potiče aktivnost bakterija koje su nepoželjne u vinu.

2.4.2.1. Čimbenici koji utječu na nastanak biogenih amina

Razina biogenih amina u vinu uvelike ovisi o količini prekursora aminokiselina, budući da s povećanjem sadržaja aminokiselina raste i sadržaj biogenih amina. Brojni čimbenici mogu utjecati na zastupljenost aminokiselina u vinu, kao što su metoda vinifikacije, sorta grožđa, geografski položaj i godina berbe (Košmerl i sur., 2013.).

Pojedini amini kao što su putrescin i spermidin mogu biti prisutni već u samom grožđu. U sorti Cabernet sauvignon pronađena je visoka koncentracija putrescina, kadaverina i spermidina i to u perikarpu bobice, te u sjemenkama. Koncentracija putrescina u vinu više je uvjetovana geografskim položajem i sortom grožđa, nego postupkom proizvodnje vina. Stupanj zrelosti grožđa i vrsta tla također mogu utjecati na razinu amina u finalnom proizvodu, kao i gnojidba dušikom koja utječe na povećanje aminokiselina i amina u grožđu (Smit i sur., 2008.).

Značajne razlike postoje i između određenih kultivara gdje se može izdvojiti primjer Pinota crnog kod kojega je u nekoliko različitih istraživanja utvrđena viša koncentracija biogenih amina u odnosu na ostala crvena vina (Soleas i sur., 1999.). Godina berbe i proizvodna regija mogu imati utjecaj na sadržaj biogenih amina u moštu i vinu jer koncentracija prekursora aminokiselina može znatno varirati od godine do godine kao i različite vrste kvasaca i bakterija prisutnih na grožđu.

Jedan od važnih postupaka kod proizvodnje vina je maceracija koja potpomaže ekstrakciju raznih komponenata iz grožđa kao što su fenoli, proteini, polisaharidi i aminokiseline. Utvrđeno je da trajanje maceracije bitno utječe na sadržaj biogenih amina u vinu jer mošt koji je duže stajao u kontaktu s kožicom bobice sadržava veću količinu amina, a to se posebno odnosi na maceraciju pri nižim temperaturama gdje se vrijeme ekstrakcije znatno produžuje. Koncentracija nekih amina kao što su metilamin i putrescin je bila veća u vinima koja su odležavala na talogu. Uzrok tome je činjenica da se proteini hidroliziraju do peptida različite molekularne težine, te se potom razgrađuju do aminokiselina i amina (Košmerl i sur., 2013.).

U procesu nastanka biogenih amina pH je važan čimbenik jer utječe na biološku aktivnost i različitost bakterija. pH djeluje selektivno na mikroorganizme u vinu, tako da je pri višem pH bakterijska mikroflora raznovrsnija, te dolazi do povećane produkcije biogenih amina.

Tijekom alkoholne i malolaktične fermentacije također dolazi do promjene udjela biogenih amina u vinu, s tim da kod alkoholne fermentacije uglavnom ne dolazi do značajnijeg povećanja količine amina (König i sur., 2009.). Suprotno tome, smatra se da je produkcija većih količina biogenih amina povezana s malolaktičnom fermentacijom, te je zbog toga od iznimne važnosti da se spriječi aktivnost bakterija mliječne kiseline odmah po završetku malolaktične fermentacije kako bi se reduciralo formiranje biogenih amina tijekom odležavanja vina.

2.4.3. Toksičnost biogenih amina

Prisutnost biogenih amina je od velike važnosti u alkoholnim pićima, a posebno vinu jer etanol može pospješiti njihovo djelovanje inhibirajući enzime potrebne za detoksifikaciju tih tvari. Zbog prekomjernog unosa biogenih amina može doći do negativnih posljedica za zdravlje iako kod ljudi postoje razlike u osjetljivosti na intoksikaciju. Nakon što je utvrđeno fiziološko djelovanje histamina (snižavanje krvnog tlaka, povećanje protočnosti krvnih žila, povraćanje, osjećaj mučnine, konstrikcija bronhija, ubrzavanje rada srca i dr.) tom spoju su pripisivani svi negativni utjecaji nakon konzumacije vina kao što su glavobolja i migrena (Lemperle, 2009.).

Danas se sa sigurnošću može potvrditi direktno djelovanje histamina, feniletilamina i serotonina na ljudski organizam. Osim njih, važni su i spermidin, putrescin, agmatin, kadaverin i ostali koji ne djeluju direktno, ali mogu pojačati djelovanje histamina, feniletilamina i serotonina (Lemperle, 2009.). Osim alergijskih reakcija, amini mogu uzrokovati i druge ozbiljne patološke probleme što uključuje neurološke poremećaje, stvaranje kancerogenih nitrozamina, hipertenziju, Parkinsonovu bolest, shizofreniju i promjene raspoloženja (Smit i sur., 2008.).

Alkohol i SO_2 pojačavaju djelovanje biogenih amina, a problematičnom se pokazala i konzumacija vina sa proizvodima koji sadrže dodatne amine poput sira, orašastih plodova ili čokolade. Toksična količina u alkoholnim pićima je između 8 i 20 mg/L za histamin, 25 – 40 mg/L za tiramin, ali već mala količina feniletilamina od 3 mg/L može uzrokovati negativne posljedice (Smit i sur., 2008.).

Relativno nizak udio biogenih amina može se osigurati kontroliranim vrenjem uz pomoć selekcioniranih kvasaca, te kod procesa jabučno – mliječnog vrenja korištenjem selekcioniranih bakterija. Za smanjenje biogenih amina u vinu jedna od najboljih opcija je bistrenje koje se može provesti upotrebom fizičkih metoda – sedimentacije, flotacije, centrifugiranja i filtracije, pomoću bistrila (želatina, albumin, kazein), ili dodatkom pektolitičkih enzima. Neka istraživanja su potvrdila da je bentonit najučinkovitiji u smanjenju sadržaja biogenih amina osobito ako se tretiranje obavi na moštu. Dodatkom bentonita u količini od 80 g/hl došlo je do smanjenja sadržaja histamina u crvenom vinu za 60% (Košmerl i sur., 2013.).

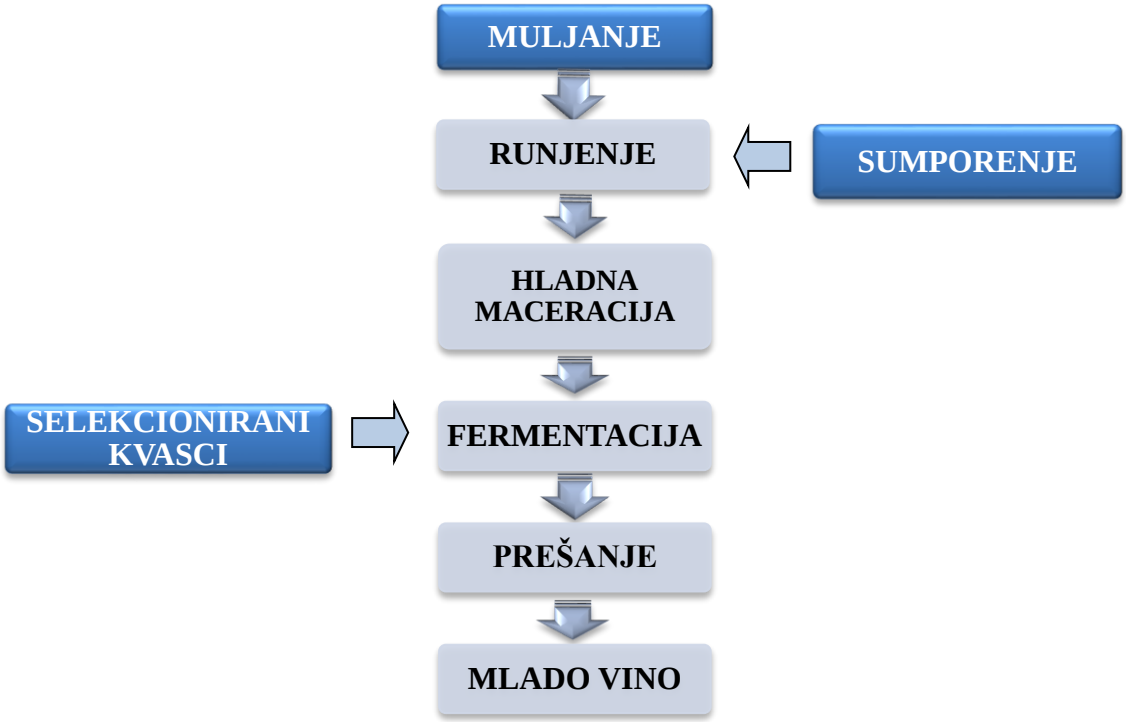
3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Vino

Vina Pinot crni, Frankovka, Merlot i Syrah proizvedena su primjenom klasičnog tehnološkog postupka. Fermentacija je rađena sa selekcioniranim kvascem Feromol – bouquet 125 pod kontroliranim temperaturnim uvjetima, na način kako je prikazano na slici br. 2.

3.1.1.1. Proces fermentacije klasičnim tehnološkim postupkom

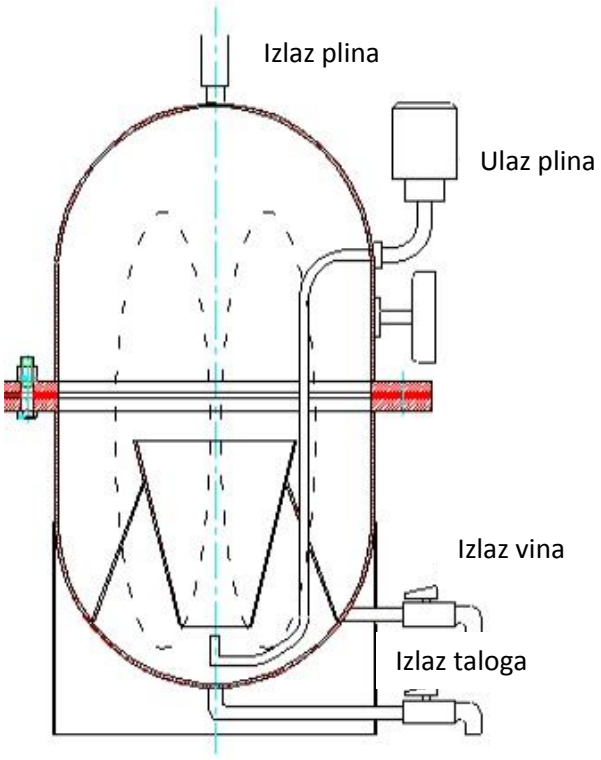


Slika 2. Blok shema proizvodnje crvenog vina

Kao što vidimo iz priložene sheme nakon runjenja i muljanja grožđa, uslijedilo je prebacivanje grožđa u tankove za hladnu maceraciju, uz dodatak SO_2. Hladna maceracija je provedena u 4 dana, pri temperaturi nižoj od 15 ºC. Fermentacija je provedena klasičnim fermentacijskim postupkom, sa selekcioniranim kvascem Feromol – bouquet 125 uz kontrolu termičkog režima. Nakon toga vino je odvojeno od kože i ostalih čvrstih dijelova, te ostavljeno da završi fermentaciju. Temperatura je postignuta hlađenjem fermentora s tekućom vodom, a tijekom fermentacije kretala se u intervalu od 16 – 22 ºC. Prosječno trajanje fermentacije svih sorata pod ovim uvjetima bilo je 40 dana.

3.1.1.2. Proces imobilizacije kvasaca kalcij – alginatom i postupak fermentacije

Vina Pinot crni*, Frankovka*, Merlot* i Syrah* proizvedena su primjenom tehnološkog postupka imobilizacije kvasaca Ca – alginatom. Prvi korak u postupku imobilizacije kvasaca je dodatak 9 g kalcij alginata u 300 ml vode, kojeg je potrebno miješati dok se u potpunosti ne otopi. Dobivena otopina sadrži 3% alginata. Nakon toga slijedi formiranje mikro – kapsula dodavanjem otopine kalcij – alginata i kvasaca u pripremljenu otopinu vode i 0,05M $CaCl_2$. Postupak se provodi pomoću dizne za kapanje sa visine od 20 cm. Prilikom pada kapljice sa otopinom kalcij – alginata i kvasaca u otopinu dolazi do formiranja mikrokapsule u obliku kuglice promjera 0,5 – 2 mm. Nakon 1 – 2 sata kuglice sa kalcij alginatom i kvascem u potpunosti očvrsnu i spremne su za fermentaciju u fermentoru (slika br. 2.). Fermentacija je provedena u kontroliranim temperaturnim uvjetima gdje se fermentor rashlađivao tekućom vodom s ciljem da se prosječna temperatura fermentacije zadrži u intervalu od 16 – 22 ºC. Prosječno trajanje fermentacije pod tim uvjetima bilo je 14 dana.



Slika 3. Tank za fermentaciju s imobiliziranim kvascima

3.2. Metode

3.2.1. Fizikalno – kemijske metode

Za procjenu kvalitete vina primjenjene su temeljne analitičke metode koje u industrijskim kontrolnim laboratorijima predstavljaju osnovu za određivanje parametara kakvoće. U svim uzorcima vina određivani su sljedeći parametri:

- specifična težina (20/20 ºC) – piknometrijski
- alkohol (% vol.) – piknometrijski na 20 ºC
- ukupni ekstrakt (g/L) – uparavanjem u vodenoj kupelji i sušenjem na 105 °C, do konstantne mase
- ukupni šećer (g/L) – gravimetrijski
- ukupne kiseline (g/L) – titracijom s 0,1 mol/L (NaOH) uz fenolftalein kao indikator
- pepeo (g/L) – spaljivanjem i mineralizacijom, pri 525 ± 25 ºC
- slobodni SO_2 (mg/L) – titrimetrijskom metodom po OIV – u
- ukupni SO_2 (mg/L) – titrimetrijskom metodom po OIV – u
- ukupni dušik (mg/L)

3.2.2. HPLC

Sadržaj biogenih amina određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti – metodom HPLC objavljenom u radu Proestosa i sur., 2008. Biogeni amini su izdvojeni upotrebom tekućinskog kromatografa HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) sa samouzorkivačem i UV/VIS detektorom promjenjive valne duljine te fluorescentnim detektorom. Separacija nakon Danzil klorid (Dns – Cl) derivatizacije provedena je na koloni ZOR – Bax Eclipse XDB C8 (150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5 μm), s Meta Guard Inertsil C 18. zaštitnom kolonom. Standardi biogenih amina nabavljeni su od tvrtke Sigma – Aldrich, Steinheim, Njemačka, kao i (Dns – Cl), a analitički kitovi korišteni na fluorescentnom detektoru kupljeni su od tvrtke Merck, Darmstadt, Njemačka. U uzorcima vina utvrđen je sadržaj sljedećih biogenih amina:

- putrescin
- kadaverin
- 2 – feniletilamin
- spermidin
- triptamin
- serotonin
- tiramin
- histamin

4. REZULTATI

4.1. FIZIKALNO – KEMIJSKA ANALIZA VINA

Tablica 1. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka vina Pinot crni i Frankovka

PARAMETAR KAKVOĆE	**Pinot crni**	**Pinot crni***	**Frankovka**	**Frankovka***
Specifična težina (20/20 °C) (g/mL)	09918 ± 0,10	0,9914 ± 0,30	0,9940 ± 0,20	0,9930 ± 0,25
Alkohol (%vol.)	13,22 ± 0,15	13,47 ± 0,25	12,76 ± 0,20	12,83 ± 0,30
Ukupni ekstrakt (g/L)	19,60 ± 0,05	19,30 ± 0,25	24,62 ± 0,42	22,10 ± 0,40
Ukupni šećeri (g/L)	2,75 ± 0,10	2,53 ± 0,30	3,40 ± 0,32	2,30 ± 0,35
Ukupne kiseline (g/L)	5,30 ± 0,08	5,10 ± 0,35	6,08 ± 0,35	5,88 ± 0,40
Pepeo (g/L)	1,64 ± 0,10	1,74 ± 0,18	2,10 ± 0,40	1,80 ± 0,25
Slobodni SO_2 (mg/L)	7,24 ± 0,18	7,74 ± 0,25	5,90 ± 0,18	6,60 ± 0,10
Ukupni SO_2 (mg/L)	118,55 ± 0,20	119,40 ± 0,20	115,60 ± 0,10	116,33 ± 0,18
Ukupni dušik (mg/L)	260,50 ± 0,20	250 ± 0,10	240,50 ± 0,10	220,00 ± 0,10

***uzorci proizvedeni fermentacijskim postupkom s imobiliziranim stanicama Ca – alginata**

Tablica 2. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka vina Merlot i Syrah

PARAMETAR KAKVOĆE	**Merlot**	**Merlot***	**Syrah**	**Syrah***
Specifična težina (20/20 ºC) (g/mL)	09928 ± 0,10	0,9918 ± 0,20	0,9940 ± 0,20	0,9930 ± 0,20
Alkohol (%vol.)	12,50 ± 0,15	12,73 ± 0,10	13,20 ± 0,10	13,50 ± 0,15
Ukupni ekstrakt (g/L)	26,60 ± 0,05	26,30 ± 0,25	26,00 ± 0,42	25,50 ± 0,40
Ukupni šećeri (g/L)	2,75 ± 0,10	2,53 ± 0,30	2,40 ± 0,32	2,30 ± 0,35
Ukupne kiseline (g/L)	5,50 ± 0,25	5,55 ± 0,15	5,60 ± 0,15	5,70 ± 0,25
Pepeo (g/L)	1,66 ± 0,10	1,75 ± 0,18	2,10 ± 0,40	1,95 ± 0,25
Slobodni SO_2 (mg/L)	17,24 ± 0,18	17,74 ± 0,25	15,90 ± 0,18	16,60 ± 0,10
Ukupni SO_2 (mg/L)	96,05 ± 0,20	97,05 ± 0,30	96,20 ± 0,40	97,20 ± 0,20
Ukupni dušik (mg/L)	250,5 ± 0,20	255 ± 0,10	245,50 ± 0,10	235,00 ± 0,10

***uzorci proizvedeni fermentacijskim postupkom s imobiliziranim stanicama Ca - alginata**

4.2. ANALIZA VINA PRIMJENOM HPLC METODE

Tablica 3. HPLC analiza biogenih amina uzoraka vina Pinot crni i Frankovka

BIOGENI AMINI (mg/L)	**Pinot crni**	**Pinot crni***	**Frankovka**	**Frankovka***
Putrescin	0,41 ± 0,19	0,39 ± 0,08	0,41 ± 0,06	0,40 ± 0,04
Kadaverin	0,35 ± 0,05	0,34 ± 0,05	0,42 ± 0,05	0,40 ± 0,05
2 – Feniletilamin	2,37 ± 0,15	2,33 ± 0,15	2,64 ± 0,18	2,30 ± 0,18
Spermidin	0,58 ± 0,11	0,53 ± 0,09	0,65 ± 0,09	0,61 ± 0,09
Triptamin	1,74 ± 0,10	1,63 ± 0,12	1,89 ± 0,17	1,69 ± 0,17
Serotonin	0,18 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,05	0,13 ± 0,05
Tiramin	0,23 ± 0,06	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,20 ± 0,02
Histamin	3,36 ± 0,06	3,25 ± 0,09	3,49 ± 0,06	3,21 ± 0,06
∑ Biogeni amini	**9,22**	**8,81**	**9,91**	**8,94**

***uzorci proizvedeni fermentacijskim postupkom s imobiliziranim stanicama Ca - alginata**

Tablica 4. HPLC analiza biogenih amina uzoraka vina Merlot i Syrah

BIOGENI AMINI (mg/L)	**Merlot**	**Merlot***	**Syrah**	**Syrah***
Putrescin	0,43 ± 0,20	0,39 ± 0,10	0,44 ± 0,06	0,43 ± 0,05
Kadaverin	0,45 ± 0,05	0,44 ± 0,05	0,48 ± 0,05	0,46 ± 0,05
2 – Feniletilamin	2,40 ± 0,15	2,35 ± 0,15	2,50 ± 0,20	2,40 ± 0,20
Spermidin	0,56 ± 0,11	0,54 ± 0,10	0,66 ± 0,10	0,62 ± 0,10
Triptamin	1,80 ± 0,10	1,65 ± 0,15	1,91 ± 0,15	1,65 ± 0,15
Serotonin	0,20 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,15 ± 0,05
Tiramin	0,25 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,25 ± 0,05	0,20 ± 0,02
Histamin	3,38 ± 0,05	3,25 ± 0,10	3,39 ± 0,10	3,21 ± 0,05
∑ *Biogeni amini*	**9,47**	**8,97**	**9,88**	**9,12**

***uzorci proizvedeni fermentacijskim postupkom s imobiliziranim stanicama Ca - alginata**

5. RASPRAVA

5.1. FIZIKALNO - KEMIJSKE OSOBINE VINA

5.1.1. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na fizikalno – kemijske osobine vina Pinot crni

U tablici 1. prikazani su rezultati fizikalno – kemijske analize vina Pinot crni. Dobiveni rezultati se odnose na različite postupke fermentacije što uključuje klasični način alkoholnog vrenja i fermentaciju s imobiliziranim kvascima. U uzorku vina proizvedenog postupkom s imobiliziranim kvascima sadržaj alkohola je nešto veći u odnosu na klasičan način fermentacije. Važno je naglasiti da imobilizirane stanice daju vina s nižim sadržajem ukupnog ekstrakta što je potvrđeno i u ovoj analizi, a razlog tome je kraće trajanje fermentacije. Sadržaj reducirajućih šećera od 2,75 g/L bio je veći u vinu proizvedenom klasičnim tehnološkim postupkom u odnosu na dobivene vrijednosti vina proizvedenog imobiliziranim stanicama kvasca (Ca - alginatom) gdje udio šećera iznosi 2,53 g/L. Udio ukupnih kiselina u vinu dobivenom postupkom imobilizacije kvasaca bio je manji i iznosio je 5,10 g/L, za razliku od klasičnog načina gdje su ukupne kiseline zastupljene s 5,30 g/L, što je slično rezultatima koje su proveli Yajima i Yokotsuka (2001.). Iz provedene analize oba uzorka može se utvrditi neznatna razlika u količini pepela koja iznosi oko 0,10 g/L. Analiza sadržaja slobodnog i ukupnog SO_2 također ne pokazuje značajna odstupanja, s tim da su nešto veće vrijednosti zabilježene kod uzorka s imobiliziranim stanicama kvasca. Količina ukupnog dušika bila je veća u uzorku proizvedenom klasičnim fermentacijskom postupkom.

5.1.2. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na fizikalno – kemijske osobine vina Frankovka

Rezultati sadržani u tablici 1. prikazuju fizikalno - kemijska svojstva vina Frankovka. U uzorku vina proizvedenog klasičnim tehnološkim postupkom može se zamijetiti nešto veća specifična masa. Udio alkohola u vinu s imobiliziranim stanicama kvasca iznosi 12,83 vol.%,

dok vino proizvedeno klasičnim načinom sadrži 12,76 vol.% alkohola. Vrijednost ukupnog ekstrakta pri klasičnom načinu proizvodnje vina je znatno veća i iznosi 24,62 g/L u odnosu na količinu od 22,10 g/L koju sadržava uzorak proizveden postupkom imobilizacije Ca – alginatom. Prilikom analize vina s imobiliziranim kvascima utvrđena je manja količina neprevrelog šećera iz čega proizlazi da primjenom imobiliziranih kvasaca dolazi do njegove bolje razgradnje što ima za posljedicu i veći sadržaj alkohola. Kao i u prethodnom uzroku, udio ukupnih kiselina veći je u uzorku dobivenom klasičnim postupkom fermentacije. Također je utvrđena nešto veća količina pepela čija vrijednost između ova dva uzorka odstupa za 0,30 g/L u korist vina s klasičnim tehnološkim postupkom. Rezultati pokazuju da se količina slobodnog sumpora u uzorcima Pinota crnog i Frankovke kreće u granicama od 5,90 do 7,74 mg/L što je slično rezultatima Antonellia i sur. (1999.). Udio ukupnog dušika veći je u vinu s klasičnim načinom vinifikacije.

5.1.3. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na fizikalno – kemijske osobine vina Merlot

Tablica 2 . prikazuje rezultate fizikalno – kemijske analize vina Merlot. Iz rezultata je vidljiva veća specifična masa u uzorku gdje je primijenjen klasični način fermentacije. Sadržaj alkohola povećan je kod uzorka s imobiliziranim kvascima, što je bio slučaj i kod prethodnih vrsta vina. Time dolazimo do zaključka da postupak vinifikacije uz pomoć imobiliziranih kvasaca (Ca – alginatom) u kratkom vremenu dovodi do stvaranja veće količine alkohola u vinu (Yajima i Yokotsuka, 2001.). Veći udio ukupnog ekstrakta, kao i neprevrelog šećera zabilježen je u vinu dobivenom klasičnim fermentacijskim postupkom. Ukupne kiseline zastupljenije su u uzorku s imobiliziranim kvascima, a iznose 5,55 g/L, dok su u drugom uzorku 5,50 g/L što predstavlja gotovo zanemarivu razliku. Dobivena količina pepela je malo veća kod vina proizvedenog imobilizacijom kvasaca i iznosi 1,75 g/L. U ovim uzorcima također nije zabilježena značajnija razlika u sadržaju sumpora, kao i ukupnog dušika.

5.1.4. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim kvascima na fizikalno – kemijske osobine vina Syrah

U tablici 2. dani su rezultati fizikalno – kemijske analize vina Syrah. Količina alkohola u vinu proizvedenom postupkom imobilizacije kvasaca iznosi 13,50 vol.%, a u vinu dobivenom klasičnim tehnološkim postupkom 13,20 vol.%. Posljedica dužeg trajanja fermentacije je veći sadržaj ukupnog ekstrakta od 26 g/L u vinu s klasičnom vinifikacijom. Udio reducirajućih šećera je i u ovom slučaju veći kod klasične metode što rezultira manjim udjelom etanola u vinu (Delfini i sur., 2001.), za razliku od ukupnih kiselina koje su malo izraženije u uzorku s imobiliziranim kvascima. Nešto veći udio pepela zabilježen je kod vina dobivenog klasičnim načinom, što nije bio slučaj u dosadašnjim uzorcima. Rezultati pokazuju neznatne razlike u količini sumpora, dok je sadržaj ukupnog dušika veći kod uzorka s klasičnim fermentacijskim postupkom. Iz obavljenih analiza vidljivo je da postoje dosta izražene razlike između mjerenih parametara.

5.2. HPLC ANALIZA BIOGENIH AMINA U VINU

5.2.1. Utjecaj fermentacije imobiliziranim kvascima na prisutnost biogenih amina u vinu Pinot crni

U tablici br. 3. nalaze se podaci koji prikazuju analizu prisutnosti biogenih amina u vinu Pinot crni. Analiza je provedena upotrebom HPLC metode – tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Najzastupljeniji biogeni amini u ovom uzorku vina su histamin – 3,36 mg/L, slijedi ga 2 – feniletilamin – 2,37 mg/L i triptamin – 1,74 mg/L, a rezultati se odnose na vino proizvedeno klasičnim fermentacijskim postupkom, dok kod uzoraka dobivenih imobilizacijom kasaca Ca – alginatom ove vrijednosti su niže za oko 0,4 – 0,9 mg/L. Ostali biogeni amini se nalaze u znatno manjim količinama od gore navedenih, s tim da sadržaj putrescina i kadaverina neznatno odstupa s obzirom na primjenjeni način vinifikacije. Ukupni biogeni amini kod vina Pinot crni proizvedenog klasičnim tehnološkim postupkom imaju veći sadržaj za razliku od uzorka kod kojeg je primjenjena fermentacija pomoću imobiliziranih kvasaca.

5.2.2. Utjecaj fermentacije imobiliziranim kvascima na prisutnost biogenih amina u vinu Frankovka

Količina biogenih amina u vinu Frankovka prikazana je u tablici br. 3. U ovim uzorcima također su najviše prisutni histamin, 2 – feniletilamin i triptamin, s tim da se nalaze u još većim koncentracijama nego u vinu Pinot crni. Zanimljivo je da su razlike u sadržaju ovih biogenih amina kod uzorka proizvedenog klasičnim tehnološkim postupkom i upotrebom imobiliziranih kvasaca znatno veće nego što je bio slučaj kod prethodne vrste vina. Količina 2 – feniletilamina u vinu Frankovka proizvedenog klasičnom fermentacijom najviša je od svih analiziranih uzoraka i iznosi 2,64 mg/L. Iako se nalazi u okviru dozvoljenih vrijednosti, bitno je naglasiti da već mala količina od 3 mg/L 2 – feniletilamina može negativno utjecati na ljudski organizam (Smit i sur., 2008.). Ostali biogeni amini prisutni su u manjim količinama, iako i ovdje možemo vidjeti da je njihov udio manji kod uzorka proizvedenog vinifikacijom uz pomoć imobiliziranih kvasaca (Ca – alginatom). Ukupan sadržaj biogenih amina u vinu proizvedenom klasičnim fermentacijskim postupkom iznosi 9,91 mg/L, što predstavlja veliku razliku u odnosu na njihov sadržaj od 8,94 mg/L kod vina dobivenog imobilizacijom kvasaca.

5.2.3. Utjecaj fermentacije imobiliziranim kvascima na prisutnost biogenih amina u vinu Merlot

U tablici br. 4. nalaze se rezultati koji prikazuju sadržaj biogenih amina u vinu Merlot. Rezultati pokazuju da je histamin i u ovom uzorku najzastupljeniji, a njegov udio iznosi 3,38 mg/L u vinu dobivenom klasičnim fermentacijskim postupkom, dok se kod vina proizvedenog imobilizacijom kvasaca nalazi u količini od 3,25 mg/L. Slijede ga 2 – feniletilamin i triptamin čije su vrijednosti također manje kod upotrebe fermentacijskog postupka s imobiliziranim kvascima u odnosu na klasični način. U ovom vinu putrescin i kadaverin nalaze se u malo većoj količini od prethodnih uzoraka, a njihov sadržaj se i ovdje smanjuje upotrebom imobiliziranih kvasaca Ca – alginatom. Važno je naglasiti da ovi biogeni amini iako sami nisu toksični, pogoršavaju negativno djelovanje histamina, tiramina i 2 – feniletilamina (Košmerl i sur., 2013.). U vinu Merlot dobivenom klasičnim tehnološkim postupkom sadržaj

biogenih amina iznosi 9,47 mg/L, za razliku od uzroka s imobiliziranim kvascima gdje je udio biogenih amina manji i iznosi 8,97 mg/L.

5.2.4. Utjecaj fermentacije imobiliziranim kvascima na prisutnost biogenih amina u vinu Syrah

Tablica 4. prikazuje rezultate HPLC metode na sadržaj biogenih amina u vinu Syrah. U uzorku dobivenom klasičnom fermentacijom zabilježene su najveće vrijednosti histamina – 3,39 mg/L, 2 – feniletilamina – 2,50 mg/L, te triptamina – 1,91 mg/l, kao i u ostalim analiziranim vinima (Gloria i sur., 1998.). Njihova količina se i u ovom slučaju smanjuje primjenom postupka imobilizacije kvasaca Ca – alginatom. Putrescin, kadaverin i spermidin se nalaze u nešto većoj količini u odnosu na ostala analizirana vina, dok se tiramin i serotonin ni ovdje ne nalaze u značajnijim količinama. Možemo utvrditi da se sadržaj ukupnih biogenih amina u vinu Syrah proizvedenom klasičnim vinifikacijskim procesom nalazi u većoj količini od 9,88 mg/L u odnosu na uzorak dobiven imobilizacijom kvasaca gdje udio biogenih amina iznosi 9,12 mg/L.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

- Kod postupka fermentacije provedene primjenom klasičnog tehnološkog procesa ili imobilizacijom kvasaca (Ca – alginatom) pojavljuje se signifikantna razlika glede fizikalno – kemijskih parametara, a samim time i kvalitete vina.

- Vina proizvedena upotrebom tehnološkog postupka fermentacije sa imobiliziranim stanicama kvasca imaju lagano povišen sadržaj alkohola u usporedbi s klasičnom fermentacijom. Suprotno tome, količina ukupnog ekstrakta je redovito manja u vinu dobivenom imobilizacijom kvasaca Ca – alginatom.

- Metoda vinifikacije ima signifikantan utjecaj na koncentraciju nekih biogenih amina. Utvrđeno je da je histamin najzastupljeniji biogeni amin pronađen u vinu, a mogućnost nastanka histamina može biti razmatrana unutar mnogih enoloških čimbenika.

- Udio biogenih amina kod svih uzoraka smanjio se primjenom fermentacijskog postupka s imobiliziranim kvascima u odnosu na klasični tehnološki postupak.

- U vinu Frankovka zabilježen je najveći sadržaj ukupnih biogenih amina kod uzorka proizvedenog klasičnim načinom fermentacije, a time i najveće smanjenje količine biogenih amina primjenom tehnologije s imobiliziranim kvascima.

- Fermentacija s imobiliziranim stanicama kvasca predstavlja obećavajući pristup u proizvodnji vina kojim se postiže smanjeni sadržaj biogenih amina, što je pozitivno budući da njihova veća zastupljenost u vinu može uzrokovati negativne posljedice za ljudski organizam.

7. LITERATURA

Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., Carnacini, A. (1999.): Yeast influence on volatile composition of wines, Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 1139 – 1144.

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

Delfini, C., Cocito, C.H., Bonino, M., Schellino, R., Gaia, P., Baiocchi, C. (2001.): Definitive evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of neutral precursors of grape aromas, Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 1789 – 1798.

Flamini, R. (2008.): Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd, England.

Gloria, M.B.A., Watson, B.T., Simon – Sarkadi, L., Daeschel, M.A. (1998.): A survey of biogenic amines in Oregon Pinot Noir and Cabernet Sauvignon wines, Am. J. Enol. Vitic. 49, 279 – 282.

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

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

http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_07_74_1723.html

http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2004_11_159_2780.html

http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2003_06_1219.html

http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/265401.html

http://www.oiv.int/oiv/cms/index?lang=en

Karovičova, J., Kohajdova, Z. (2005.): Biogenic amines in food, Chemical Papers 59(1), 70 – 79.

König, H., Unden, G., Fröhlich, J. (2009.): Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg.

Košmerl, T., Šućur, S., Prosen, H. (2013.): Biogenic amines in red wine: The impact of technological processing of grape and wine, Acta agriculturae Slovenica 101, 249 – 261.

Law, J. (2006.): Od vinograda do vina, Veble commerce, Zagreb.

Lemperle, E. (2009.): Mane vina, ITD Gaudeamus d.o.o., Požega.

Maletić, E., Pejić, I., Karoglan – Kontić, J. (2009.): Plavac mali, Grozd Plavac mali d.o.o., Zagreb.

Mirošević, N. (1996.): Vinogradarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb.

Mirošević, N., Karoglan – Kontić, J. (2008.): Vinogradarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb.

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

Proestos C., Loukatos P., Komaitis M. (2008.): Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection, Food Chemistry 106 1218–1224.

Radovanović, V. (1986.): Tehnologija vina, Građevinska knjiga, Beograd.

Rose, A.H., Harrison, J.S. (1993.): The yeast, Academic Press, London

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

Smit, A.Y., du Toit, W.J., du Toit, M. (2008.): Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache, S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 29, No. 2.

Sokolić, I. (2004.): Vino, sunca i čovjeka rod, vlast. nakl. Ivan Sokolić, Novi Vinodolski.

Sokolić, I. (2006.): Veliki vinogradarsko – vinarski leksikon, vlast. nakl. Ivan Sokolić, Novi Vinodolski.

Sablayrolles, J., Barre, P. (1986.): Evaluation des besoins en oxygene de fermentations alcooliques en conditions oenologiques simulees, Sci. Alim. 6, 373 – 383.

Soleas, G.J., Carey, M., Goldberg, D.M. (1999.): Method development and cultivar – related differences of nine biogenic amines in Ontario wines, Food Chem.64, 49 – 58.

Yajima, M., Yokotsuka, K., (2001.): Volatile Compound Formation in White Wines Fermented Using Immobilized and Free Yeast, Am. J. Enol. Vitic. 52(3), 210 – 218.

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

Zoričić, M. (1998.): Crna i ružičasta vina, Gospodarski list, Zagreb.

Zoričić, M. (2003.): Domaće vino: bijelo, ružičasto, crno, Gospodarski list, Zagreb.

8. SAŽETAK

Biogeni amini su dušični spojevi male molekularne težine, a važni su jer u višim koncentracijama mogu uzrokovati zdravstvene probleme kod ljudi. Većinom nastaju u vinu procesom dekarboksilacije prekursora aminokiselina. Biogene amine uglavnom proizvode kvasci tijekom alkoholne fermentacije, te bakterije mliječne kiseline u procesu malolaktične fermentacije.

Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati mogućnost primjene imobiliziranih kvasaca u postupku fermentacije kako bi se smanjio sadržaj biogenih amina u crnom vinu. Istraživanje se odnosi na kultivare Pinot crni, Frankovka, Merlot i Syrah koji se nalaze u grupi preporučenih i dopuštenih sorti vinogorja Kutjevo smještenog u istočnom dijelu kontinentalne Hrvatske.

Količina biogenih amina utvrđena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti - HPLC. U svim uzorcima vina histamin je bio najzastupljeniji biogeni amin, a slijedili su ga 2 – feniletilamin i triptamin.

Sadržaj ukupnih biogenih amina kod uzoraka vina dobivenih klasičnim fermentacijskim postupkom kretao se od 9,22 do 9,91 mg/L, za razliku od vina na kojima je primijenjen postupak imobilizacije kvasaca Ca – alginatom, gdje je udio biogenih amina iznosio od 8,81 do 9,12 mg/L.

Iz dobivenih rezultata možemo utvrditi da primjena tehnologije s imobiliziranim kvascima može utjecati na nastanak biogenih amina.

9. SUMMARY

Biogenic amines are nitrogenous low molecular weight compounds and at high concentrations they might have influence for human health. Biogenic amines are mainly produced in wine from amino acid precursors by decarboxylation. Biogenic amines may be produced by yeast during alcoholic fermentation and by lactic acid bacteria during malolactic fermentation.

The aim of this research was to study the prospects of using fermentation method with immobilized yeast cells to decrease the content of biogenic amines in red wines. The object oft this research are grape varieties Pinot noir, Frankovka, Merlot and Syrah, wich are included in group of recommended and permitted varieties of Kutjevo vineyards, located in the east part of continental Croatia.

Biogenic amines were quantified using a high performance liquid chromatography – HPLC. In all wine samples, histamin was the most abundant biogenic amine followed by 2 – phenylethylamine and tryptamine.

Total amount of biogenic amines in wines made in classical fermentation process ranged from 9.22 to 9.91 mg/L, and in wines produced with immobilized yeast cells it was 8.81 to 9.12 mg/L.

From the results obtained in this study, it can be concluded that immobilized yeast cells technology can influence on the formation of biogenic amines.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J.J. Strossmayera

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Diplomski rad

UTJECAJ FERMENTACIJE IMOBILIZIRANIM STANICAMA KVASCA NA PRISUTNOST BIOGNIH AMINA U NEKIM CRVENIM VINIMA VINOGORJA KUTJEVO

Anita Matijević

Sažetak

Biogeni amini su dušični spojevi male molekularne težine, a važni su jer u višim koncentracijama mogu uzrokovati zdravstvene probleme kod ljudi. Većinom nastaju u vinu procesom dekarboksilacije prekursora aminokiselina.

Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati mogućnost primjene imobiliziranih kvasaca u postupku fermentacije kako bi se smanjio sadržaj biogenih amina u crnom vinu. Istraživanje se odnosi na kultivare Pinot crni, Frankovka, Merlot i Syrah koji se nalaze u grupi preporučenih i dopuštenih sorti vinogorja Kutjevo smještenog u istočnom dijelu kontinentalne Hrvatske.

Količina biogenih amina utvrđena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti - HPLC. U svim uzorcima vina histamin je bio najzastupljeniji biogeni amin, a slijedili su ga 2 – feniletilamin i triptamin.

Iz dobivenih rezultata možemo utvrditi da primjena tehnologije s imobiliziranim kvascima može utjecati na nastanak biogenih amina.

Ključne riječi: biogeni amini, fermentacija, imobilizirane stanice kvasca

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of J.J. Strossmayer

Faculty of Agriculture in Osijek

Final thesis

EFFECT OF FERMENTATION BY IMMOBILIZED YEAST CELLS ON THE PRESENCE OF BIOGENIC AMINES IN SOME RED WINES WINEYARD KUTJEVO

Anita Matijević

Summary:

Biogenic amines are nitrogenous low molecular weight compounds and at high concentrations they might have influence for human health. Biogenic amines are mainly produced in wine from amino acid precursors by decarboxylation.

The aim oft this research was to study the prospects of using fermentation method with immobilized yeast cells to decrease the content of biogenic amines in red wines. The object oft this research are grape varieties Pinot noir, Frankovka, Merlot and Syrah, wich are included in group of recommended and permitted varieties of Kutjevo vineyards, located in the east part of continental Croatia.

Biogenic amines were quantified using a high performance liquid chromatography – HPLC. In all wine samples, histamin was the most abundant biogenic amine followed by 2 – phenylethylamine and tryptamine.

From the results obtained in this study, it can be concluded that immobilized yeast cells technology can influence on the formation of biogenic amines.

Key words: biogenic amines, fermentation, immobilized yeast cells