

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet

Zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju

Skripta za vježbe iz kolegija

PRERADA GROŽĐA

**Ivana Generalić,
dipl. ing.**



**Danijela Skroza,
dipl. ing.**

dr. sc. Višnja Katalinić, izv. prof.

Split, 2010. g.

Recezeni:

Dr. sc. Tea Bilušić, izv. prof., Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilište u Splitu

Dr. sc. Josipa Giljanović, doc., Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilište u Splitu

SADRŽAJ

UVOD.	1
Analiza grozda	
Vježba 1: ODREĐIVANJE UDJELA VODE I SUHE TVARI U GROŽĐU	6
Vježba 2: MEHANIČKI SASTAV GROZDA	7
Analiza mošta	
Vježba 3: FIZIKALNE METODE ODREĐIVANJA ŠEĆERA U MOŠTU, TE RAČUNANJE POTENCIJALNOG UDJELA ALKOHOLA U VINU	10
Vježba 3a: IZRAVNO ODREĐIVANJE KOLIČINE ŠEĆERA MOŠTOMJEROM	11
Vježba 3b: ODREĐIVANJE KOLIČINE ŠEĆERA REFRAKTOMJEROM	12
Vježba 3c: PRERAČUNAVANJE KOLIČINE ŠEĆERA U MOŠTU I RAČUNANJE POTENCIJALNOG UDJELA ALKOHOLA U VINU	15
Vježba 4: ODREĐIVANJE KISELOSTI MOŠTA	18
Vježba 4a: ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI MOŠTA	18
Vježba 4b: ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH KISELINA U MOŠTU METODOM NEUTRALIZACIJE	19
Vježba 4c: ODREĐIVANJE KISELINA U MOŠTU TANKOSLOJNOM KROMATOGRAFIJOM	21
Vježba 5: ALKOHOLNO VRENJE MOŠTA	23
Analiza vina	
Vježba 6: DENZIMETRIJSKE METODE ODREĐIVANJA SPECIFIČNE TEŽINE, ALKOHOLA I EKSTRAKTA VINA	24
Vježba 6a: ODREĐIVANJE TEŽINE I VOLUMENA PIKNOMETRA	24
Vježba 6b: ODREĐIVANJE SPECIFIČNE TEŽINE VINA	26
Vježba 6c: ODREĐIVANJE KOLIČINE ALKOHOLA U VINU	27
Vježba 6d: ODREĐIVANJE EKSTRAKTA VINA.	30
Vježba 7: ODREĐIVANJE ALKOHOLA U VINU METODOM PO MARTINU-u I AGABLJANC-u	32
Vježba 8: ODREĐIVANJE DIREKTOG EKSTRAKTA VINA	34
Vježba 9: ODREĐIVANJE ŠEĆERA U VINU	35
Vježba 9a: LANE-EYNON-ova METODA	35
Vježba 9b: BERTRAND-ova METODA	37
Vježba 9c: ODREĐIVANJE SAHAROZE	41

Vježba 10: ODREĐIVANJE HLAPIVIH KISELINA U VINU	43
Vježba 11: ODREĐIVANJE SO ₂ U VINU	45
Vježba 11a: ODREĐIVANJE SLOBODNOG, UKUPNOG I VEZANOG SO ₂ U VINU	46
Vježba 11b: ODREĐIVANJE UKUPNOG, SLOBODNOG I VEZANOG SO ₂ U BIJELOM VINU RIPPER-ovom METODOM	48
Vježba 12: SENZORSKO DOKAZIVANJE PRISUTNOSTI SUMPORVODIKA I MERKAPTANA U VINU	51
Vježba 13: KOREKCIJA KISELOSTI VINA	53
Vježba 13a: DOKISELJAVANJE	53
Vježba 13b: ODKISELJAVANJE	54
Vježba 14: KOREKCIJE VINA KUPAŽOM	56
Vježba 15: BISTRENJE VINA	57
Vježba 15a: BISTRENJE VINA BJELANJCEM JAJETA	58
Vježba 15b: BISTRENJE VINA OBRANIM MLIJEKOM	59
Vježba 15c: BISTRENJE VINA ŽELATINOM	59
Vježba 15d: BISTRENJE VINA BENTONITOM	60
Vježba 16: ODREĐIVANJE INTEZITETA I NIJANSE BOJE VINA	62
Vježba 17: ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA U VINIMA	64
Vježba 17a: ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA FOLIN-CIOCALTEU METODOM	65
Vježba 17b: ODREĐIVANJE FLAVONOIDA I NEFLAVONOIDA	67
Vježba 17c: ODREĐIVANJE FLAVANA	68
Vježba 17d: ODREĐIVANJE ANTOCIJANA METODOM IZBJELJIVANJA S BISULFITOM	69
Vježba 18: ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI	71
Vježba 18a: METODA "GAŠENJA" SLOBODNOG RADIKALA	71
Vježba 18b: METODA TESTIRANJA REDUKCIJSKE SNAGE	73
Vježba 18c: BRIGGS-RAUSCHER OSCILIRAJUĆA REAKCIJA	75
Vježba 19: DEGUSTACIJA VINA	77
LITERATURA	81

UVOD

Vinarstvo i vinogradarstvo u svijetu su danas jako razvijene gospodarske grane. Zahvaljujući povoljnim uvjetima, umjerenj klimi i zemljišnoj raznolikosti uspješno se uzgajaju brojne sorte vinove loze od čijeg se grožđa proizvode vina svih kvaliteta, od stolnih preko kvalitetnih do vrhunskih.

O velikoj ulozi vinogradarstva i vinarstva kao gospodarske grane u Republici Hrvatskoj govori i činjenica da su te grane nekada bile treće po važnosti među granama poljoprivrede. Zahvaljujući povoljnim uvjetima (klima i tlo), te trudu vinogradara Hrvatska je zapazena vinogradarska zemlja. Prema procijeni nekih stručnjaka zauzima 12 mjesto u Europi, a spoj vinove loze, klime i tla osigurava proizvodnju i izvor prihoda za velik dio stanovništva. Smatra se da čak 10% stanovništva RH živi izravno ili neizravno od vinogradarstva.

Važnost razvoja vinogradarstva ne smije se promatrati samo sa stanovišta uzgoja vinove loze i grožđa, proizvodnje vina i drugih preradevina od grožđa i vina, već i postojanja autohtonih kultura koje nigdje drugdje ne uspijevaju, uzimajući u obzir činjenicu da loza uspješno raste tamo gdje ni jedna druga kultura ne uspijeva.

Definicija grožđa

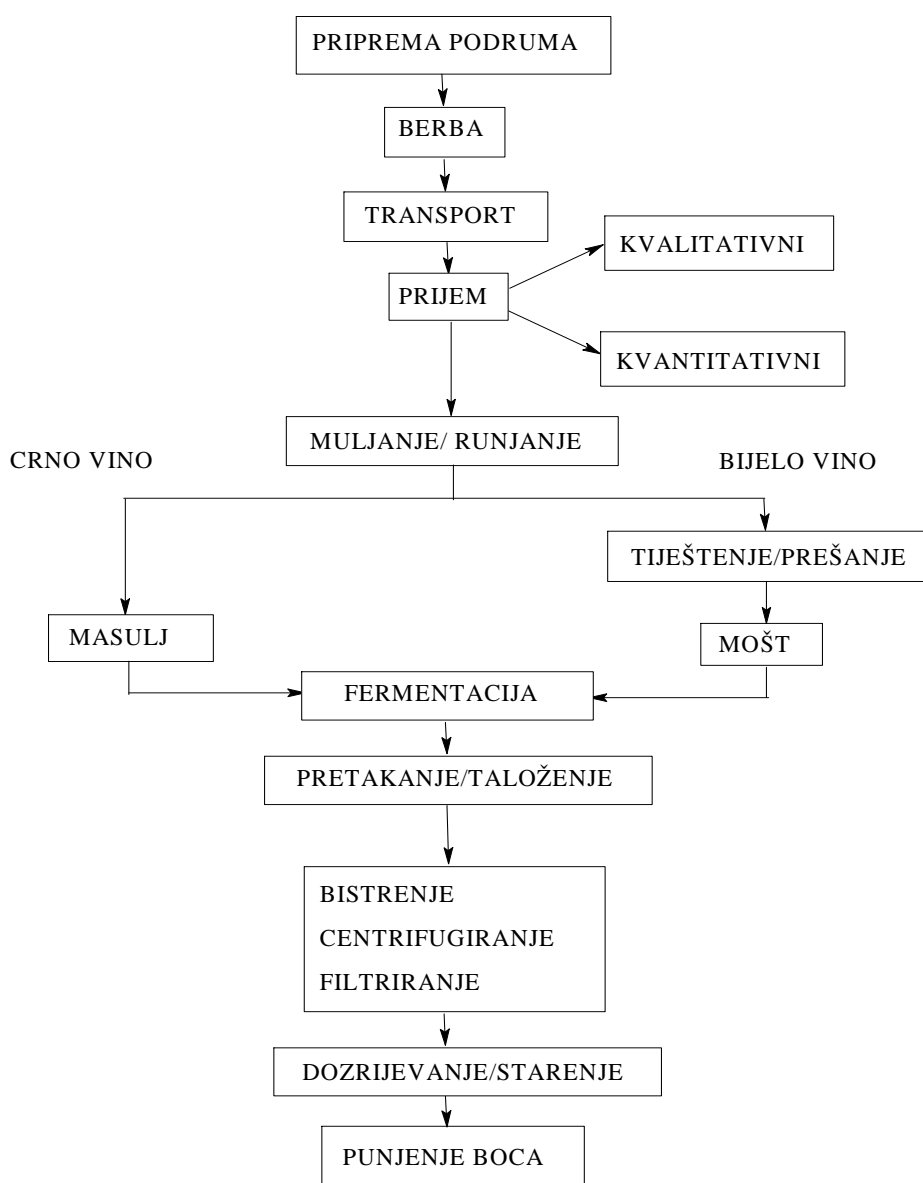
Pod *groždem* se podrazumijeva zdrav, zreo, prezreo, prosušen ili prirodno smrznut plod vinove loze priznatih kultivara namijenjen proizvodnji vina ili drugih proizvoda od grožđa i vina, a čiji sok sadrži minimalnu količinu šećera od 64°Oechsela.⁽¹⁾

Grožđe je plod vinove loze *Vitis vinifera* L. koji se zbog svojih fizioloških, kemijskih, senzorskih i drugih svojstava koristi za potrošnju u svježem neprerađenom stanju, kao sirovina za dobivanje vina, alkoholnih i bezalkoholnih pića, za proizvodnju kompota, džemova, suhica, meda i drugih proizvoda. Kemijski sastav grožđa je vrlo složen i ovisi o sorti, ekološkim čimbenici, primijenjenim organotehničkim mjerama, stupnju zrelosti, zdravstvenom stanju i brojnim drugim čimbenicima. Čak postoje razlike u kemijskom sastavu bobica istog grozda. Tijekom alkoholne fermentacije dio sastojaka grožđa se transformira u nove sastojke koji ulaze u sastav vina, dok dio sastojaka neizmijenjen prelazi u vino.

Najvažniji sastojci grožđa, odnosno grožđanog soka su: šećeri s kojim su u ravnoteži kiseline iz grožđa koje mu daju prijatan okus i osvježavajući miris (vinska i jabučna kiselina); polifenolni spojevi, aminokiseline, ioni metala (osobito važnog kalija)...

Vino je poljoprivredno prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnoga grožđa. Sorte vinove loze za proizvodnju vina moraju pripadati vrsti *Vitis vinifera* ili križancima *Vitis vinifera* s drugim vrstama roda *Vitis*.⁽¹⁾

Faze prerade grožđa u vino



Slika 1. Tehnološka shema procesa proizvodnje vina

Na kvalitetu grožđa, mošta i vina kao završnog proizvoda utječe:

- mehanički sastav grožđa,
- organoleptička svojstva,
- biološki čimbenici,
- ekološki čimbenici (sorta, ekološki uvjeti proizvodnje, vrijeme berbe, uvjeti transporta, način prerade grožđa, tehnologija dorade vina, čuvanje, njega i starenje vina).

Osim navedenih postupaka također postoji još velik broj postupaka koji se primjenjuju tijekom prerade grožđa u vino kao što su: primarna prerada grožđa, sumporenje, taloženje mošta, primjena pektolitičkih enzima, aeracija, bistrenje mošta, doslađivanje i koncentriranje mošta, zakiseljavanje i uklanjanje kiselina, te niz drugih postupaka.

Priprema podruma je prvi korak u proizvodnji vina. Ona podrazumijeva pripremu strojeva i uređaja koji se koriste u preradi grožđa, vinskog posuđa i pribora, selekcioniranih kvasca, koncentrata i drugih potrošnih materijala, te sanitaciju samog prostora vinarije.

Vrijeme **berbe** grožđa određuje se ovisno o stupnju zrelosti grožđa (tehnološka zrelost) i njegovoj namjeni. Najbolje je brati po suhu i toplu vremenu, u jutarnjim satima kada su temperature niže jer se na taj način dobiva kvalitetniji mošt, pospješuje početak procesa vrenja, a i sama je berba lakša i ugodnija. Tijekom berbe potrebno je odmah odvajati neupotrebljivo, zgnječeno i oštećeno grožđe. Do mjesta prerade grožđe se najčešće prevozi u drvenim (bačve, badnjevi) ili plastičnim posudama (kace i vreće), a do početka samog procesa prerade čuva se u hladnom, sjenovitom i prozračnom mjestu.

Transport grožđa, odnosno put od vinograda do podruma trebao bi biti vremenski što kraći, pri čemu je potrebno voditi računa da se grožđe što manje oštetiti. U uvjetima kada brz transport nije moguć, grožđe je potrebno sumporiti kako bi se spriječili nepoželjni procesi kvarenja. Primarna prerada grožđa bi trebala početi biti unutar 12 sati od same berbe.

Prijem grožđa u vinarijama ili podrumima može biti kvalitativni (određivanje kvalitete sirovine vizualno ili mjerenjem gustoće mošta), te kvantitativni (zaprimanjem određenih količina sirovine). Kvantitativni prijem može biti direktan (odvaga grožđa i masulja) i indirektan (odvaga grožđa na mosnoj vagi).

Muljanje/runjanje je početna faza prerade, a ona podrazumijeva gnječenje grožđa i uklanjanje peteljke strojevima tzv. muljačama i runjačama. Pri ovom postupku dolazi do odvajanje soka od čvrstih dijelova, disperzije kvasaca u tekućoj fazi, ravnomjernog raspoređivanja vinobrana, otapanja tvari boje, arome i taninskih sastojaka.

Odvajanjem peteljki tijekom gnječenja grožđa (runjanje) sprječava se ekstrakcija taninskih tvari, koje uzrokuju gorak i trpak okus vina, u mošt.

Tiještenje/prešanje je postupak koji slijedi nakon muljanja i runjanja. Čovjek je otkad je počeo prerađivati grožđe, koristio različite načine istiskivanja soka, a time i različite vrste uređaja. Danas se uglavnom upotrebljavaju preše koje su u odnosu na nekadašnje mnogo jednostavnije, manje i znatno učinkovitije (hidraulične preše).

Mošt je tekući proizvod odnosno groždani sok, proizveden odgovarajućim postupcima tiještenja i ocjeđivanja cijelog grožđa ili masulja, a sadrži minimalnu količinu šećera od 64°Oe⁽²⁾. **Masulj** je zgnječeno grožđe (tekuća faza: mošt; čvrsta faza ili komina: pokožice i sjemenke) s peteljkovinom ili bez nje.⁽²⁾

U proizvodnji bijelog vina mošt ne smije prevrijavati zajedno s kominom. Komina se što prije mora odijeliti cijedenjem i prešanjem. Proizvodnja crnog vina razlikuje se od proizvodnje bijelih vina po tome što je u proizvodnji bijelih vina proces fermentacije se odvija na moštu, dok kod crnih vina alkoholno vrenje se odvija u prisustvu čvrstih sastojaka masulja kako bi dužim kontaktom čvrste i tekuće faze došlo do što bolje ekstrakcije tvari boje iz pokožica grožđa u mošt (vino). Runjenje grožđa (odvajanje peteljki od bobica) obavezno je u proizvodnji crnih vina.

Fermentacija (alkoholno vrenje) je najvažniji, središnji biokemijski proces proizvodnje vina. To je proces transformacije groždanog soka u vino uz kvasce (prirodna ili inokulirana mikroflora) pri čemu treba voditi računa o temperaturi podruma ili prostorije u kojoj se ona odvija. Najpogodnija temperatura za ovaj proces je između 18-22°C. Temperature ispod i iznad ovih vrijednosti nisu povoljne za metabolizam kvasaca, pa veća odstupanja mogu dovesti čak i do prestanka vrenja. Kod vrenja razlikujemo tri glavne faze: početno, glavno (burno) i završno (tiho), a vrenjem se mijenja i sama temperatura mošta.

Pretakanje vina/taloženje je odvajanje relativno bistrog vina od taloga, koji se istaložio na dnu vinske posude. Kad se tiho vrenje približava kraju, vino se rashlađuje i započinje prirodni proces bistrenja vina. Nakon vrenja vina su mutna, bez razvijenog sortnog okusa i izraženog mirisa na kvasce. Pretakanjem vina se odvaja mlado vino od taloga čime se doprinosi njegovoj stabilnosti i kakvoći. Prvo se pretakanje preporuča u studenom, nastupom prvih hladnijih dana; drugo početkom siječnja, a treće početkom ožujka. Poslije tihog vrenja mladog vina i između pojedinih pretakanja, uslijed hlapljenja, snižavanja temperature i volumena vina, bačve se dijelom prazne, pa ih je potrebno nadolijevati. Ovim postupkom se izbjegava stvaranje praznog prostora u bačvi i izlaganje površine vina utjecaju zraka i uzročnicima bolesti.

Bistrenje/centrifugiranje/filtriranje su postupci koji se koriste u praksi kako bi se "očistilo" i izbistrilo vino. Sredstva koja se pri tome najčešće koriste su bistrila (želatina, tanin, agar, bjelance jajeta, bentonit), različite izvedbe filtara (pločasti i cjevasti), filter preša, membrana i centrifuga.

Starenje vina je proces **dozrijevanja** vina, pri čemu se mijenja njegova aroma-"bouquet". Vino stari u bocama, cisternama ili u drvenim hrastovim bačvama. Obilježja kvalitetno dozrelog vina su karakterističan "bouquet" i tekstura. Voćne arome i okusi mladog vina dozrijevanjem evoluiraju, dobivajući tamne, zemljane i kožnate note, dok tekstura vina postaje mekše i svilenkastija uslijed taloženja trpkih i gorkih taninskih sastojaka.

Punjenje vina u boce je posljednji korak proizvodnje vina, a sastoji se od dolijevanja stabilnog vina u čiste i sterilne boce, čepčenja, etiketiranja, te ambalažiranja boca u transportnu ambalažu ili skladištenja u posebnim podrumima (vinotekama).

Vježba 1: ODREĐIVANJE SADRŽAJA VODE I SUHE TVARI U GROŽĐU

Najzastupljenija tvar u svakom voću, pa tako i grožđu je voda koja čini 75% do 95% ukupnog sastava voća.⁽³⁾ Voda ima značajnu ulogu u bobici grožđa jer otapa produkte fotosinteze, a njena količina ovisi o stupnju zrelosti grožđa i čimbenicima njegova uzgoja. Sadržaj vode u bobici se kreće u širokim granicama, od 60-90% ili u prosjeku 80%.⁽⁴⁾

Sadržaj vode u bobi grožđa određuje se jednostavnom metodom sušenja u električnom sušioniku s automatskom regulacijom temperature i cirkulacijom zraka, na temperaturi 105°C do konstantne mase.

Pribor:

- o kuhinjski nožić, posudica za sušenje, pinceta, sušionik, analitička vaga, eksikator

Postupak:

Izvagane bobu grožđa nožićem usitniti u suhoj i čistoj posudici poznate mase u kojoj će izvoditi sušenje. Posudicu s uzorkom staviti u sušionik prethodno zagrijan na temperaturu 105°C. Uzorak sušiti do konstantne mase, te nakon hlađenja u eksikatoru izvagati.

Sadržaj vode izražen u postocima izračunati prema jednadžbi (1):

$$w (\text{H}_2\text{O} \%) = (a - b) / c \times 100 \quad (1)$$

w- maseni udio vode u uzorku (%)

a- masa posude s uzorkom prije sušenja (g)

b- masa posude s uzorkom poslije sušenja (g)

c- masa odvagane količine uzorka (bobe) (g)

Sadržaj suhe tvari u bobi izražen u postocima izračunati prema jednadžbi (2):

$$w (\text{suha tvar} \%) = 100 - w (\text{H}_2\text{O}) \quad (2)$$

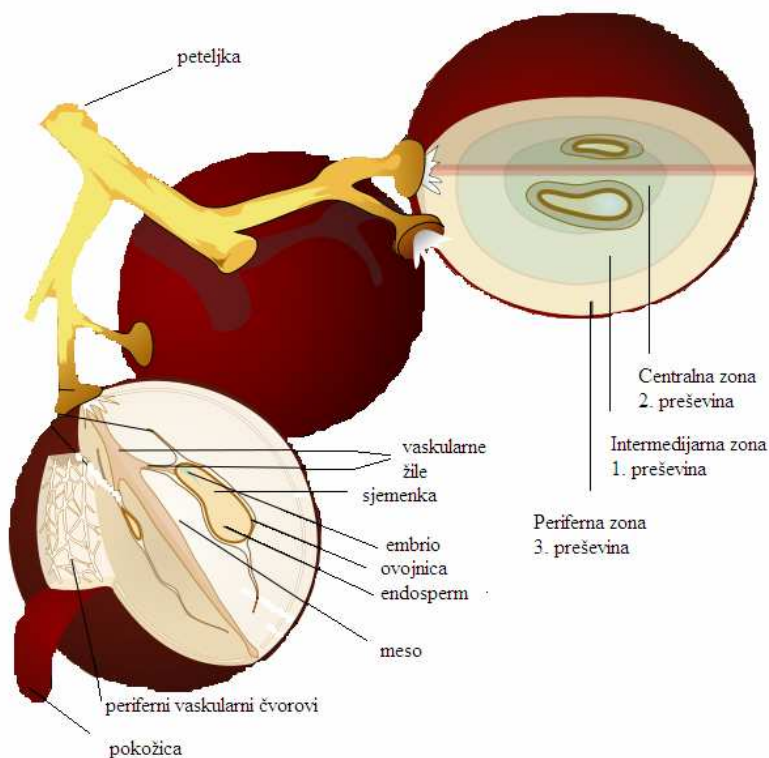
w- maseni udio suhe tvari u uzorku (%)

Vježba 2: MEHANIČKI SASTAV GROZDA

Podrumaru je *grožđe* polazni materijal, sirovina za proizvodnju vina. Zbog toga je potrebno pobliže upoznati sastavne dijelove grozda. Grožđe vinskih sorti u prosijeku sadrži od 3 do 5 posto *peteljkovine*, dok ostatak čine *bobice*. U 100 kg bobica na pokožice otpada oko 11, na sjemenke 3, dok na meso i sok otpada 86 kg.⁽⁵⁾

Određivanje sastava grozda važno je:

- za primjenu i uvjete rada pojedinih strojeva,
- odnos kapaciteta pojedinih strojeva u sustavu prerade,
- iskorištenje u pojedinom sustavu prerade,
- uvjete iskorištenja pojedinih strojeva.



Slika 2. Presjek bobice⁽⁷⁾

Mehanički sastav grozda je jedna od ampelografskih karakteristika svake sorte i najčešće je stalan za pojedinu sortu.⁽⁶⁾ Postotni odnos pojedinih dijelova grožđa ovisi o sorti grožđa, zdravstvenom stanju grožđa, ekološkim uvjetima uzgoja i vremenu berbe. Strukturni dijelovi zrele bobice grožđa prikazane su na *Slici 2*. Svaki dio bobice u sebi nosi kombinaciju tvari koje se među različitim sortama grožđa ne razlikuju samo u količini nego i u vrsti spojeva sadržanim u njima.

Na sjemenke grožđa može otpadati i do 6% ukupne mase bobice, a bobice mogu imati od nula do četiri sjemenke. Sjemenke sadrže oko 20-50% ukupnih fenolnih spojeva bobice grožđa s najvećom koncentracijom tanina. Na pokožicu otpada do 20% ukupne mase bobice, a ona sadrži zajedno s flavonolima i taninima, esencijalne antocijane nužne u proizvodnji crnih vina, te bitne sastojke arome. Pulpa grožđa je najveći dio bobice na koju otpada do 85% njene ukupne mase. Pulpa sadrži vrlo malo čvrstih sastojaka, ali ima visoku gustoću i sadržaj otopljenih tvari (šećeri, proteini, kiseline, minerali).⁽⁸⁾

Pribor:

- kuhinjski nožić, papirnati ručnici ili filter papir, analitička vaga, posudice za vaganje

Mehanička analiza:⁽⁶⁾

Pod mehaničkim sastavom grozda podrazumijevaju se količine pojedinih sastavnih dijelova grozda: peteljki, pokožica, sjemenki i grožđanog soka koji se izražavaju kao maseni udjeli izraženi u postocima.⁽⁶⁾

A) Opis grozda

- oblik grozda (cilindričan, kupast, krilast, razgranat)
- veličina grozda (dužina i širina grozda u centimetrima)
- struktura grozda (zbijen, umjereno rastresit, rastresit)
- oblik bobice (okrugao ovalan, jajast, izdužen)
- boja pokožice bobice (voštano-žuta, svijetlo-žuta, zelenkasto-žuta, zelena, ružičasta, tamnoplava)

Dužinu grozda mjeriti od dijela odakle počinju bobice pa sve do vrha, a širinu grozda u srednjem dijelu gdje je grozd najširi. Veličinu grozda izraziti terminima: krupan, umjereno velik i sitan.

B) Sastav grozda

- masa grozda (g)
- masa peteljke (g)
- masa bobice (g)
- ukupan broj bobica u grozdu

$$\text{Pokazatelj sastava grozda} = \frac{\text{masa bobice (g)}}{\text{masa peteljki (g)}}$$

(3)

C) Sastav bobica (na 10 boba)

- masa 10 bobica
- masa 10 sjemenki
- broj sjemenki u 10 bobica
- masa pokožice u 10 bobica
- masa mesa u 10 bobica
- masa mesa/težina pokožice

$$\text{Pokazatelj sastava bobica} = \frac{\text{masa pulpe (g)}}{\text{masa pokožice i sjemenki (g)}} \quad (4)$$

Masu pokožica i sjemenki odredit vaganjem. Razlika dobivene mase pokožica i sjemenki do ukupne mase bobica predstavlja masu pulpe (mesa). Pokožicu pažljivo odvojiti od pulpe i dobro posušiti kuhinjskim ili filter papirom. Na isti način odvojiti i posušiti sjemenke.⁽⁶⁾

D) Struktura grozda (odnos pojedinih dijelova grozda)

- % peteljki u grozdu
- % pokožica
- % sjemenki
- % mesa
- % čvrstog ostatka (peteljki, pokožice i sjemenki).

Vježba 3: FIZIKALNE METODE ODREĐIVANJA ŠEĆERA U MOŠTU, TE RAČUNANJE POTENCIJALNOG UDJELA ALKOHOLA U VINU

Najzastupljeniji šećeri u grožđu i moštu su glukoza i fruktoza. Mošt normalnog zrelog grožđa sadrži približno iste količine ovih šećera. Kod prezrelog grožđa ima nešto više fruktoze, a kod nedovoljno zrelog glukoze. Fruktoza ima slađi okus, ali ne fermentira toliko brzo kao glukoza.⁽⁸⁾ Količina ukupnog šećera u moštu ovisi prvenstveno o sorti i klimatskim uvjetima tijekom perioda sazrijevanja grožđa. Sorte za proizvodnju stolnih vina sadrže manje šećera od sorti koje se koriste u proizvodnji kvalitetnih i visokokvalitetnih vina pod istim uvjetima sazrijevanja.⁽⁶⁾ Koncentracija šećera u zreloom grožđu se kreće od 150-240 g L⁻¹.⁽⁸⁾

Količina šećera u grožđu i moštu se može određivati fizikalnim i kemijskim metodama. Fizikalne metode se zasnivaju na određivanju gustoće mošta koja prvenstveno ovisi o količini šećera sadržanog u njemu. Određivanje količine šećera u moštu bitno je zbog ocjene kvalitete mošta (vina) i određivanja pogodnog perioda berbe. Fizikalne metode su jednostavne i brze, ali su manje točne od kemijskih metoda. U praksi je određivanje ovih parametara fizikalnim metodama zadovoljavajuće za procjenu kvaliteta grožđa i mošta, kao i alkoholne jakosti budućeg vina.⁽⁶⁾

U vinarskoj praksi šećer u moštu određuje se:

- ručnim refraktometrom,
- Oechlovim moštomjerom,
- Klosternenburgerovom moštnom vagom ili Baboovim moštomjerom.

Vježba 3a: IZRAVNO ODREĐIVANJE KOLIČINE ŠEĆERA MOŠTOMJEROM

Tijekom berbe i prerade grožđa sadržaj šećera u moštu se najčešće određuje uporabom moštomjera. Moštomjeri su po konstrukciji najsličniji areometrima. Sastoje se od duge, tanke, zatvorene cijevi u kojoj se nalazi skala, dok je donji dio širi, valjkastog oblika i završava obično kuglastim dijelom u kojem se nalazi olovna sačma ili živa koja mu daje odgovarajuću težinu.⁽⁶⁾ Količina šećera u moštu se može određivati izravnim očitavanjem postotka šećera na skali moštomjera ili indirektno određivanjem gustoće mošta. Najčešće korišteni moštomjeri u vinarskoj praksi su moštomjer po Baboo-u i moštomjer po Oechsle-u. **Moštomjer po Baboo-u** pokazuje maseni udio šećera u moštu. Očitana vrijednost na moštomjeru izravno pokazuje količinu šećera (u kg) na 100 kg mošta.^(5,6)

Moštomjer po Oechsle-u pokazuje gustoću mošta iz koje se računskim putem dobiva količina šećera u moštu. Stupnjevi Oechsle (°Oe) pokazuju razliku između gustoće vode pri 4°C i gustoće mošta. Primjerice, vrijednost 80°Oe očitana sa skale moštomjera znači gustoću mošta 1,080 g cm⁻¹, što znači da je jedna litra mošta za 80 grama teža od jedne litre vode pri temperaturi 4°C.^(5,6)

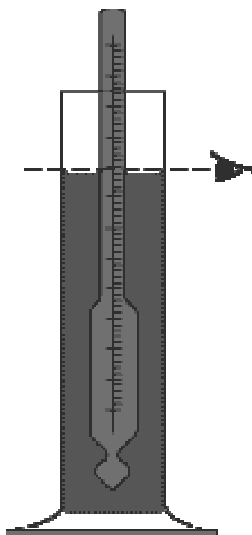
Postupak:

Udio šećera u moštu odrediti uranjanjem moštomjera u menzuru napunjenu moštom pazeći da se pri tome ne dodirnu stjenke menzure. Na presjeku donjeg meniskusa nivoa mošta i skale moštomjera izravno očitati specifičnu gustoću, udio alkohola i šećera (ili suhe tvari) mošta.

Ukoliko se mjeri gustoća mošta aerometrom iz dobivenog podatka izračunati količinu šećera u °Oe prema jednadžbi (5)⁽⁶⁾:

$$\text{šećer (°Oe)} = (D - 1) \times 1000 \quad (5)$$

D- očitana vrijednost gustoće mošta (kg L⁻¹)

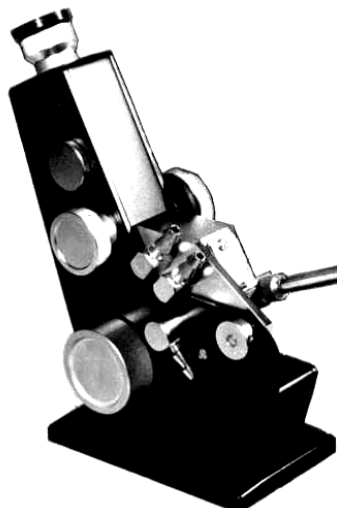


Slika 3. Moštomjer ⁽⁹⁾

Vježba 3b: ODREĐIVANJE KOLIČINE ŠEĆERA REFRAKTOMJEROM

Refrakcijom se mjeri promjena prijeloma zraka svjetla na granici dviju različitih tvari, a određena je odnosom između brzine svjetla prolaskom kroz zrak i brzine svjetla prolaskom kroz ispitivanu tekućinu.⁽⁵⁾ Pri određivanju šećera u moštu refraktometrom prelamanje svjetla je veće što je veća količina šećera u moštu, i obratno. Zraka svjetla iz rjeđe sredine (zrak) ulazi u gušću sredinu (mošt) te se na tome temelji rad refraktometra.

Najvažniji dijelovi refraktometra su staklena prizma, tubus i skala unutar tubusa. Skala je u odnosu na prizmu postavljena tako da se na njoj direktno odražava prelamanje svjetlosti u vidu tamnog i svijetlog polja.⁽⁶⁾ Lom svjetla očitava se na skali refraktometra u obliku stupca sjene, odnosno vrijednost koja se nalazi na granici svijetlog i tamnog polja. Ovim postupkom određuje se količina šećera u moštu temperature 20°C, dok kod mošta čija je temperatura veća ili manja, za svaka 3°C iznad 20°C očitavanju treba dodati 0,2%, a za niže temperature isti iznos oduzeti.

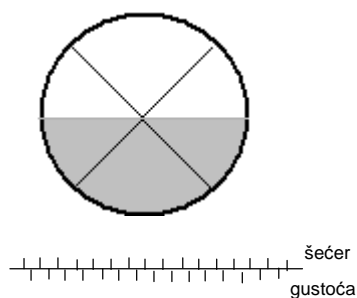


Slika 4. Stolni refraktometar⁽¹⁰⁾

Postupak:

Prije početka rada refraktometar baždariti destiliranom vodom, termostatiranom na temperaturu 25°C, tako da se par kapi vode stavi na površinu staklene prizme, prizma se poklopi i kroz okular se promatra skala unutar tubusa. Kad je skala u početnom položaju, oznaka "0" se nalazi na prijelazu svijetlog i tamnog polja, a ukoliko skala nije u položaju "0" potrebno ju je tako postaviti. Ako skala refraktometra ne počinje s nulom, baždarenje se radi vodenom otopinom šećera točno poznate koncentracije.⁽⁶⁾

Količinu šećera u uzorku mošta odrediti stavljanjem nekoliko kapi mošta na suhu i čistu staklenu prizmu refraktometra. Nakon poklapanja prizme kroz okular promatrati skalu refraktometra. Presjek sjene i svjetla namjestiti točno na sredinu kruga koji se vidi kroz okular, te sa skale očitati količinu šećera u moštu i gustoću mošta. Poslije svakog mjerenja staklenu prizmu oprati destiliranom vodom i obrisati suhom krpom.



Slika 5. Izgled polja i skale refraktomjera

Tablica 1. Preračunavanje količine šećera između %, °Oe, °Baboo, °suhe tvari, °Baume⁽⁶⁾

Šećer %	° Oe	° Baboo	° suhe tvari	° Baume
10,8	52	10,7	13,0	7,2
11,4	54	11,1	13,5	7,5
11,9	56	11,5	13,9	7,7
12,4	58	12,0	14,3	8,0
13,0	60	12,4	14,7	8,2
13,5	62	12,8	15,1	8,4
14,0	64	13,3	15,5	8,7
14,6	66	13,7	16,0	9,0
15,1	68	14,1	16,5	9,2
15,6	70	14,4	17,0	9,5
16,2	72	14,8	17,5	9,7
16,7	74	15,2	18,0	1,0
17,2	76	15,6	18,5	10,2
17,8	78	15,9	19,0	10,5
18,3	80	16,3	19,4	10,7
18,8	82	16,7	19,8	11,0
19,4	84	17,1	20,3	11,2
19,9	86	17,4	20,7	11,5
20,4	88	17,8	21,0	11,7
21,0	90	18,2	21,5	12,0
21,5	92	18,5	22,0	12,2
22,0	94	18,8	22,4	12,3
22,6	96	19,0	22,8	12,5
23,1	98	19,3	23,1	12,7
23,6	100	19,7	23,5	13,0
24,2	102	20,1	24,0	13,2
24,7	104	20,5	24,5	13,5
25,2	106	21,0	25,0	13,7
25,8	108	21,4	25,5	14,0
26,3	110	21,8	25,9	14,2
26,8	112	22,2	26,3	14,5
27,4	114	22,6	26,7	14,7
27,9	116	23,0	27,1	15,0
28,4	118	23,4	27,5	15,2
29,0	120	23,8	28,0	15,4

* ° Baboo- šećer u masenim %

Vježba 3c: PRERAČUNAVANJE KOLIČINE ŠEĆERA U MOŠTU I RAČUNANJE POTENCIJALNOG UDJELA ALKOHOLA U VINU

Zbog postojanja različitih izvedbi moštomjera i skala refraktometara potrebno je poznavati način preračunavanja i prebacivanja dobivenih vrijednosti iz jedinica jedne skale u drugu. Ovisno o količini šećera koju sadrži mošt moguće je odrediti očekivanu jakost vina koje se proizvodi, odnosno izračunati udio potencijalnog alkohola u njemu.

Oechsllovim moštomjerom mjeri se gustoća mošta te je potrebno preračunati dobiveni podatak u količinu šećera sadržanu u moštu. Maseni udio šećera u moštu na osnovu njegove gustoće, odnosno očitanih Oe° , računa se korištenjem jednadžbe (6)⁽⁶⁾:

$$\% \text{ šećera} = Oe^\circ / 4 - 3 \quad (6)$$

Prema Saleronovoj jednadžbi maseni udio šećera računa se preko jednadžbe (7)⁽⁶⁾:

$$\% \text{ šećera} = Oe^\circ \times 0,266 - 3 \quad (7)$$

Pri računanju šećera prema jednadžbi (7) oduzima se vrijednost 3 odnosno 30 g/L, jer se smatra da je tolika prosječna količina nešećernih tvari u moštu. Saleronovom jednadžbom se dobije zapreminski postotak šećera, tj. kilogrami šećera u 100 L mošta.⁽⁶⁾ Iz količine šećera u moštu može se odrediti potencijalni udio alkohola u vinu. Teoretski 180 g glukoze daje 92 g etanola (51,1%) i 88 g CO₂.⁽⁸⁾ Stvarna konverzija je nešto manja jer dio etanola ispari, a dio se troši za rast kvasaca. Najčešće se kao faktor konverzije u toplijim krajevima uzima vrijednost od 0,55 dok je u hladnijim krajevima faktor konverzije veći (0,55-0,63%).

Bioletti je predložio izračun na bazi Brix-a prema jednadžbi (8)⁽⁸⁾:

$$\text{Potencijalni alkohol (g/100 mL)} = 0,47 \times (\text{šećer \%} - 3,0) \quad (8)$$

Faktor 0,47 odgovara 97% konverziji 1 g šećera u 0,51 g etanola. 3 je vrijednost za koju se smatra da otpada na nešećerne sastojke. Dijeljenjem dobivene vrijednosti s 0,794 (gustoća alkohola) dobije se udio alkohola izražen na volumen vina⁽⁶⁾:

$$\text{Volumni udio potencijalnog alkohola (\%)} = 0,59 \times \% \text{ šećera} \quad (9)$$

Preračunavanje:

$$^{\circ}\text{Suha tvar} \quad \Longrightarrow \quad \text{Oe}^{\circ} = ^{\circ}\text{Suha tvar} \times 4,25 \quad (10)$$

$$^{\circ}\text{Suha tvar} \quad \Longrightarrow \quad \text{Kl}^{\circ} (\text{Baboo}) = ^{\circ}\text{Suha tvar} \times 0,85 \quad (11)$$

Dodavanje šećera u mošt ⁽¹¹⁾:

1) Na osnovu očitanih $^{\circ}\text{Oe}$:

$$X = \frac{(B - A) \times 0,24}{100} \times V \quad (12)$$

X - kg šećera koje je potrebno dodati moštu

B - željeni $^{\circ}\text{Oe}$

A - očitani $^{\circ}\text{Oe}$

V - volumen mošta

2) Na osnovu očitanih $^{\circ}\text{Kl}$ (Babo):

$$X = (B - A) \times 1,25 \times V \quad (13)$$

X - kg šećera koje je potrebno dodati moštu

B - željeni $^{\circ}\text{Kl}$

A - očitani $^{\circ}\text{Kl}$

V - volumen mošta

3) Na osnovu željenog % alkohola u vinu

$$X = (B - A) \times 1,7 \quad (14)$$

X - kg šećera koje je potrebno dodati moštu

B - željeni volumni % alkohola

A - volumni % alkohola izračunati iz sadržaja šećera u moštu

Primjer:

1) Na skali refraktometra je očitano 18° suhe tvari. Kako bi preračunali tu količinu šećera u $^\circ\text{Oe}$ rabimo izraz:

$$\begin{aligned}\text{Oe}^\circ &= \text{Suha tvar} \times 4,25 \\ &= 18 \times 4,25 = 76,50 \text{ }^\circ\text{Oe}\end{aligned}$$

Kako bi izračunali kolika je to količina šećera na 100 L mošta dobiveni rezultat se dijeli s 4 i oduzima mu se 3.

$$76,50 \text{ }^\circ\text{Oe} : 4 = 18,9 - 3 = 15,9 \text{ kg šećera / 100 L mošta}$$

2) $76 \text{ }^\circ\text{Oe}$ znači da je 1 litra mošta 76 g teža od 1 litre vode pa iz toga možemo vidjeti da gustoća mošta $1,076 \text{ g L}^{-1}$.

Zadatak 1.

- Na skali refraktometra očitana je količina suhe tvari u iznosu od 25° . Kolika je to količina šećera preračunata u $^\circ\text{Oe}$ i $^\circ\text{Baboo}$?
- Preračunajte dobiveni rezultat u količinu šećera na 100 L mošta te izračunajte kolika je specifična gustoća tog mošta?
- Izračunajte udio potencijalnog alkohola.

Zadatak 2.

- Ako mošt sadrži 22°Baboo šećera, koliko će vino nakon fermentacije sadržavati alkohola izraženog u %.
- Nakon što se računski odredi postotak alkohola, potrebno ga je korigirati jer na deklaraciji finalnog proizvoda postotak alkohola treba iznositi 14 volumnih %. Na koji način će se to uraditi?
- Pri proizvodnji 5000 L vina koliku količinu šećera treba dodati moštu?

Zadatak 3.

Proizvodi se 10 000 L predikatnog vina kasne berbe čiji mošt mora sadržavati najmanje $94 \text{ }^\circ\text{Oe}$ suhe tvari.

- Kolika je to količina šećera na 100 L mošta, te koliko se očekuje da će biti udio alkohola u tom vinu?
- Kada bi postojali zahtjevi za 17% alkohola u finalnom proizvodu koliko bi trebalo došeeriti mošt i da li bi takav proizvod odgovarao zakonskim normama?

Vježba 4: ODREĐIVANJE KISELOSTI MOŠTA

Poslije šećera u moštu i vinu, važan podatak je njegova ukupna kiselost koju predstavljaju sve kisele tvari sadržane u njemu.⁽⁵⁾ Organske kiseline grožđa se smatraju proizvodima nepotpune oksidacije šećera i kao takve zauzimaju jedno od centralnih mjesta u procesima disanja biljnih stanica.⁽⁴⁾ Vino sadrži više od 30 različitih kiselina, od kojih su najznačajnije vinska i jabučna. Kiseline u vinu možemo podijeliti na nehlapive i hlapive, a sve skupa ih označavamo kao ukupne kiseline koje izražavamo u gramima vinske kiseline po litri (g L^{-1}). Vinska kiselina u odnosu na ostale kiseline vina ima najjači stupanj disocijacije i odlučujuća je pri određivanju pH vrijednosti vina.

pH vrijednost mošta i vina najčešće se kreće između 2,7 i 3,9. Kiselijska vina imaju pH vrijednost ispod 3,5 dok je pH nedovoljno kiselih vina i do 4,0.⁽⁶⁾ Kiselost ima veliki utjecaj na kvalitetu vina kao i na niz fizičkih i biokemijskih procesa tijekom njegova sazrijevanja i starenja. Vina s nižim pH su kiselijeg, svježijeg ukusa i lako se čuvaju jer se teže razvijaju mikroorganizma koji uzrokuju njegovo kvarenje. Kiselijska vina se nakon vrenja brže bistre, a tokom čuvanja su stabilnija i oksidacijski procesi u njima su sporiji.⁽⁶⁾ Ukupna količina kiselina u vinu ne smije premašiti 1%, tj. ukupna kiselost vina u prometu mora biti najmanja $4,5 \text{ g L}^{-1}$ izraženo kao vinska kiselina, a najviše 14 g L^{-1} .⁽¹²⁾

Vježba 4a: ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI MOŠTA

pH vrijednost neke otopine je određena koncentracijom vodikovih iona sadržanih u njoj.⁽¹³⁾ Mjerenjem pH vrijednosti se utvrđuje razlika potencijala dviju elektroda. Potencijal jedne od elektroda u funkciji je pH vrijednosti otopine, dok druga elektroda ima stalan i poznat potencijal i predstavlja referentnu elektrodu.^(6,14) Tipični pH-metar se sastoji od specijalne sonde za mjerenje (staklene elektrode) spojene na elektronski metar koji mjeri i pokazuje izmjerenu vrijednost.

Pribor:

- laboratorijski pH-metar, kombinirana staklena elektroda, destilirana voda, čaše od 100 mL, boca štrcaljka, standardne puferske otopine za baždarenje pH-metra, papirnati ručnici

Baždarenje i postupak rada s pH-metrom:

Staklena elektroda pH-metra se čuva uronjena u otopinu kalijevog klorida, $c(\text{KCl})=3 \text{ mol L}^{-1}$, kako bi se spriječilo njeno sušenje, uslijed čega bi elektroda postala troma (tj. potencijal elektrode bi se sporo stabilizirao). Prije početka rada i paljenja uređaja potrebno je spojiti elektrodu s pH-metrom. Kada se elektroda izvadi iz otopine KCl potrebno ju je isprati destiliranom vodom i pažljivo obrisati papirnatim ručnicima ili filter papirom. Baždarenje elektrode pH-metra u dvije točke nužan je postupak svakog mjerenja i izvršava se prema uputama za rad s laboratorijskim pH-metrom. Nakon baždarenja elektrode prvom standardnom puferkom otopinom, elektrodu je prije uranjanja u drugu standardnu otopinu potrebno isprati destiliranom vodom i pažljivo obrisati filter-papirom.

Nakon završenog baždarenja elektrodu je potrebno još jednom isprati destiliranom vodom nakon čega je spremna za rad.

Postupak:

Elektrodu uroniti u mošt temperature između 20 i 25°C, a pH vrijednost direktno pročitati s displeja pH-metra. Svaki uzorak izmjeriti dva puta, a konačni rezultat prikazati kao aritmetičku sredinu dvaju mjerenja i izraziti na dva decimalna mjesta.

Vježba 4b: ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH KISELINA U MOŠTU METODOM NEUTRALIZACIJE

Količina ukupnih kiselina u moštu se kreće u širokim granicama, a najviše ovisi o sorti grožđa i klimatskim uvjetima tijekom njegova sazrijevanja. Količina ukupnih kiselina u moštu najčešće se kreće između 5 i 8 g po litri mošta izraženih preko vinske kiseline. Vina u pravilu sadrže manje kiselina nego li mošt, jer se dio vinske kiseline istaloži u obliku njenih soli (tartarata) tijekom alkoholne fermentacije. Princip ove metode se zasniva na neutralizaciji titribilnih kiselina i njihovih kiselih soli u moštu otopinom natrijeva hidroksida, pa se na temelju utroška ove otopine izračunava količina ukupnih kiselina. Ugljikov dioksid nije uključen u ukupnu kiselost pa ga je potrebno prethodno ukloniti kratkim zagrijavanjem mošta.⁽⁶⁾

Pribor:

- o kuhalo, bireta, lijevak, čaša od 50 mL, odmjerne tikvica od 1000 mL, Erlenmeyer tikvica od 250 mL, analitička vaga

Priprava reagensa:

- o **Otopina natrijeva hidroksida; $c(\text{NaOH})=0,1 \text{ mol L}^{-1}$:** 4 g NaOH otopiti u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 1000 mL do oznake.

Postupak:

Mošt koji analiziramo je prije određivanja ukupnih kiselina potrebno kratkotrajno zagrijati kako bi se oslobodio prisutni ugljikov dioksid. Kiseline u moštu odrediti titracijom 10 mL mošta otopinom NaOH uz indikator fenolftalein do pojave blago ljubičastog obojenja koje se zadržava nekoliko sekundi. Udio kiselina izraziti u g L^{-1} vinske kiseline koristeći se jednadžbom (15)⁽⁶⁾:

$$\gamma = V \times 0,75 \quad (\text{g L}^{-1}) \quad (15)$$

γ – masena koncentracija ukupnih titribilnih kiselina u moštu (g L^{-1})

V – volumen otopine NaOH utrošen za titraciju (mL)

0,75- konstanta

Faktor 0,75 se dobije iz gramekvivalenta vinske kiseline i natrijeva hidroksida. Molekulska masa NaOH je 40, pošto je to jednokiselinska baza i njen gramekvivalent je 40 grama.⁽⁶⁾

$$\text{mmol (vinska kiselina)} : \text{mmol NaOH} = 1 : 2$$

$$\text{mmol (vinske kiseline)} = 1/2 \text{ mmol NaOH}$$

$$\text{mg (vinske kiseline)} / M_r (\text{vinske kiseline}) = 1/2 \text{ mL NaOH} \times \text{koncentracija NaOH}$$

$$\text{mg (vinske kiseline)} = 1/2 \text{ mL NaOH} \times \text{koncentracija NaOH} \times M_r (\text{vinske kiseline})$$

$$\text{mg vinske kiseline} \quad \text{u} \quad 10 \text{ mL mošta}$$

$$X \quad \text{u} \quad 1000 \text{ mL mošta}$$

$$X = \text{mg vinske kiseline} \times 100$$

$$= (0,5 \text{ mL NaOH} \times \text{koncentracija NaOH} \times M_r (\text{vinske kiseline}) \times 1000) / (10 \times 1000)$$

$$= 0,5 \text{ mL NaOH} \times \text{koncentracija NaOH} \times 15 = \text{mL NaOH} \times \text{koncentracija NaOH} \times 7,5$$

$$X = \text{g/L vinske kiseline}$$

Vježba 4c: ODREĐIVANJE KISELINA U MOŠTU TANKOSLOJNOM KROMATOGRAFIJOM

Kromatografska analiza služi za odijeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka prisutnih u složenim smjesama. Kromatografiju je prvi razvio ruski botaničar Tswett početkom dvadesetog stoljeća primijenivši je za odijeljivanje otopine biljnih pigmenata klorofila i ksantofila prolazom kroz staklenu kolonu napunjenu sitnozrnatim kalcijevim(II)karbonatom (CaCO_3). Odijeljeni sastojci se vide na koloni kao obojene vrpce prema kojima je tehnika dobila i naziv (grč. *chroma*- boja; *graphein*- pisati).⁽¹⁵⁾ Odvajanje sastojaka smjese ovisi o brzinama kojima plinovita ili tekuća mobilna faza nosi sastojke kroz stacionarnu fazu, a temelji se na različitoj raspodjeli tvari smjese između faza.

Metoda tankoslojne kromatografije spada u metode plošne kromatografije kod kojih se kao stacionarna faza koristi ravan, relativno tanak sloj tvari tj. adsorbensa koji je samonosiv ili nanesen na staklenu, plastičnu ili metalnu površinu. Mobilna faza prolazi kroz stacionarnu pod utjecajem kapilarnih sila, gravitacije ili pak električnog potencijala. Kapljica otopine uzorka nanese se na jedan kraj ploče kapilaram. Mjesto na koje se nanosi uzorak se označi grafitnom olovkom i naziva se *start*, dok je *fronta* zona najveće udaljenosti mobilne faze (eluensa) od starta.

Brzina prolaska tvari po pločici je proporcionalna udaljenosti do fronte pa na brzinu ukazuje R_f vrijednost (eng. *related to front*) koja je omjer prijeđenog puta tvari od starta (x) i udaljenosti fronte od starta (y) tj. x/y ^(15,16).

$$R_f = x / y \quad (16)$$

Ukoliko komponente nisu obojene, da bi se izmjerile R_f vrijednosti potrebno ih je učiniti vidljivima. To se postiže pomoću UV-lampe, kristalića joda ili prskanjem razvijanjem (sumpornom kiselinom). Pločica s definiranim mjestima adsorbirane tvari se zove kromatogram.⁽¹⁷⁾

Priprava reagensa:

- **Smjesa standarda:** odvagati 0,03 g jabučne i 0,03 g vinske kiseline i otopiti u 10 mL destilirane vode uz intenzivno miješanje.
- **Smjesa za razvijanje kromatograma:** 10 mL octene kiseline, 40 mL *n*-butanola, 50 mL destilirane vode otpipetirati se u lijevak za odjeljivanje i dobro promiješati. Kao razvijlač koristiti gornju bistru fazu koja je potrebno odvojiti.
- **Otopina indikatora:** 100 mg brom fenol plavog otopiti u 100 mL 96%-tnog etanola. Pripravljenoj otopini dodati par kapi otopine NaOH, $c(\text{NaOH})=0,1 \text{ mol L}^{-1}$, kako bi se postigao blago lužnat medij.

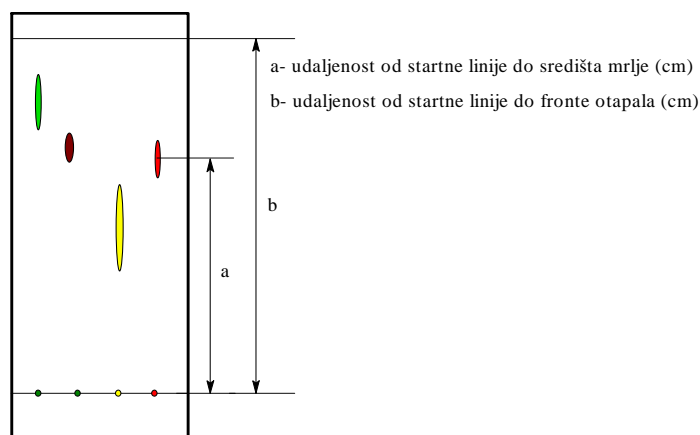
Postupak:

Papir za kromatografiju izrezati na dimenzije 55×200 mm. Grafitnom olovkom u dnu papira (2,5 cm od ruba) nacrtati startnu liniju na kojoj se označe 3 točke, međusobno jednako razmaknute. Na označene mjesta nanijeti 50 μL smjese standarda (jabučne i vinske kiseline), te uzorka bijelog i crnog vina. Mrlje osušiti na zraku ili u struji toplog zraka (fenom ili u sušioniku). Nakon nanošenja i sušenja uzorka, pločice položiti u kadu za razvijanje kromatograma u kojoj se nalazi smjesa otapala za razvijanje. Kromatograme razvijati 2-3 sata. Kad otapalo dođe pred vrh pločice, pločice izvaditi i grafitnom olovkom obilježiti frontu otapala. Pločice ostavit sušiti na zraku, nakon čega ih je potrebno uroniti u otopinu razvijlača ili njime prskati, te ponovno suše. R_f vrijednost računati prema jednadžbi (17):

$$R_f = \text{udaljenost sredine mrlje od starta/udaljenost fronte otapala od starta} \quad (17)$$

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

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



Slika 6. Izgled kromatograma

Vježba 5: ALKOHOLNO VRENJE MOŠTA

Ako se mošt ostavi dugo stajati, alkoholnim vrenjem prijeći će u vino, zbog čega će ishodna tekućina biti promijenjena izgledom, okusom i mirisom. Tu promjenu izazivaju nevidljiva jednostanična bića- *vinski kvasci*, koji se nalaze na mašku bobice. Kvasci se razmnožavaju vrlo brzo, jednostavnim pupanjem stanica. Nastalo mnoštvo posredstvom fermenta, uz oslobađanje toplinske energije, započinje pretvorbu jednostavnih šećera mošta u konačne proizvode ovog procesa: *etanol* i *ugljičkov dioksid*.^(5,16) Alkoholna fermentacija mošta predstavlja složen biokemijski proces pri kojem dolazi do fizikalno-kemijskih i kemijskih promjena u sastavu mošta.⁽⁴⁾ To je kompleksan proces transformacije šećera preko različitih reakcija koje se međusobno smjenjuju i u toku kojih se, pored etanola i CO₂, stvara i izvjestan broj sekundarnih produkata, više ili manje važnih za kvalitetu vina.⁽⁴⁾ Cilj ove vježbe je uočiti učinke stanične respiracije kvasaca, koristeći grožđe kao supstrat.

Pribor:

- 2 plastične vrećice za domaćinstvo, pH papirići, drvena štipaljka, analitička vaga

Postupak:

Za izvođenje vježbe potrebno je imati dvije plastične vrećice koje se koriste u domaćinstvu za zamrzavanje. U prvu vrećicu odvagati 5 g suhog pekarskog kvasca (*Saccharomyces spp.*) te se uvući u drugu. Oko 100 g bobica grožđa odvagati u vrećicu s kvascem iz koje je potrebno potpuno istisnuti zrak. U zatvorenoj vrećici zgnječiti bobe, pomiješati ih s kvascem i ostaviti neko vrijeme na sobnoj temperaturi. Tijekom dana bilježiti promjene u vrećici i izmjeriti pH vrijednost mošta. Vrećicu otvoriti nakon 7 dana kada je potrebno ponovno izmjeriti pH vrijednost, nakon čega se vrećica ostavi otvorenom ponovno 7 dana.

Kvasci koriste šećere iz grožđa za respiraciju i fermentaciju. U odsustvu kisika dolazi do fermentacije, a kao njen krajnji produkt nastaje alkohol. Od slatkog grožđa, koje sadrži oko 20% šećera u soku, fermentacijom nastaje alkohol u koncentraciji 11% koja uzrokuje ugibanje stanica kvasaca. Ukoliko se vrećica ostavi otvorenom nekoliko dana, bakterije roda *Acetobacter spp.* dovršavaju pretvorbu alkohola u vinski ocat.

Vježba 6: DENZIMETRIJSKE METODE ODREĐIVANJA GUSTOĆE, ALKOHOLA I EKSTRAKTA VINA

Vina, kao proizvodi alkoholne fermentacije mošta, sadrže velik broj sastojaka, od kojih se neki nalaze u moštu, dok drugi nastaju alkoholnom fermentacijom transformacijom šećera i drugih sastojaka. Svi ovi sastojci zajedno čine kemijski sastav vina, i na određen način se manifestiraju u organoleptičkim osobinama vina.

Alkohol etanol je najvažniji sastojak vina i njegova količina u vinu ovisi o količini šećera sadržanoj u moštu. Količina alkohola se izražava u volumnim postocima koji označavaju mililitre čistog alkohola u 100 mililitara vina.⁽⁶⁾ Udio etanola po završetku fermentacije obično se kreće od 7 do 24%.⁽⁸⁾ U vinu su osim etanola prisutni brojni monoalkoholi (metanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-heksanol, izobutilni alkohol i dr.) i polialkoholi (glicerol, 2,3-butandiol, D-sorbitol, D-manitol i dr.) koji potječu bilo iz početne sirovine- grožđa ili nastaju tijekom fermentacije.

Vježba 6a: ODREĐIVANJE MASE I VOLUMENA PIKNOMETRA

Količina alkohola u vinu može se odrediti uz pomoć piknometra i to s točnošću na dvije decimale. Istovremeno se piknometrom može odrediti gustoća vina, količina alkohola i ekstrakta u njemu. Ove metode su denzimetrijske jer se svi sastojci određuju na osnovu njihove gustoće. Piknometri se izrađuju od specijalnog kvalitetnog stakla. Donji dio piknometra je proširen dok se na gornjem dijelu se nalazi usko grlo na kojem se najčešće nalazi oznaka pripadajućeg volumena piknometra.

Pribor:

- piknometar, analitička vaga, aparatura za vodenu destilaciju, kotlić, kamenčići za vrenje, kuhalo, Erlenmeyer tikvica, odmjerna tikvica od 100 mL, filter papir, sušionik, kapaljka, lijevak, čaša od 50 mL, termometar, vodena kupelj

Postupak:

Prije upotrebe piknometra potrebno je utvrditi točnu masu i volumen piknometra. Taj postupak se naziva **baždarenje piknometra**.

Određivanje težine piknometra⁽⁶⁾:

Za određivanje točne mase i volumena piknometra potrebno je da on bude potpuno čist i suh, te ga treba temeljito očistiti kromsumpornom kiselinom. Kromsumporna kiselina sadrži 15% kalijeva dikromata u koncentriranoj sumpornoj kiselini. Sumporna kiselina razara organske tvari i ostale nečistoće, a kalijev dikromat je jako oksidacijsko sredstvo koje potpomaže njeno djelovanje. Piknometar napuniti kromsumpornom kiselinom i staviti u čašu napunjenu kiselinom tako da je cijeli uronjen u nju. Na ovaj način se temeljito očisti izvana i iznutra. Piknometar ostaviti u kiselini 24 sata, zatim isprazniti i isprati destiliranom vodom sve dok voda ne prestane pokazivati kiselu reakciju (kontrola lakmusom). Nakon ispiranja vodom, piknometar temeljito isprati etanolom i osušiti u sušioniku na temperaturi 140°C u do konstantne mase.

Određivanje volumena piknometra:

Volumen koji može zaprimiti piknometar se određuje mjerenjem mase destilirane vode koju može zaprimiti. Sva mjerenja izvoditi na temperaturi 20°C, pa se piknometar napunjen destiliranom vodom termostatira uranjanjem u vodenu kupelj zagrijanu na 20°C. Nakon 20-30 minuta piknometar napunjen destiliranom vodom izvaditi iz kupelji, obrisati i izvagati. Masu vode u piknometru odrediti računski iz razlike masa piknometra napunjenog destiliranom vodom i praznog, suhog piknometra.

Masa jednog mililitra vode pri 20°C je 0,9982 grama. Ako bi piknometar primao volumen od 50 mL, težina vode u njemu bi bila 49,9115 grama. Prema ovome se može izvršiti proračun za svaki volumen koji piknometar može zaprimiti.



Slika 7. Piknometar

Vježba 6b: ODREĐIVANJE RELATIVNE GUSTOĆE VINA

Relativna gustoća vina predstavlja odnos između mase određenog volumena vina pri temperaturi 20°C i mase istog volumena destilirane vode pri 4°C.⁽⁶⁾

Postupak:

Prije početka mjerenja ukloniti CO₂ iz vina kratkotrajnim zagrijavanjem ili filtriranjem vina. Pripravljeno vino termostatirati na 20°C u vodenoj kupelji. Piknometar prije punjenja isprati vinom koje se analizira, a zatim ga njime napuniti i staviti u vodenu kupelj na ponovno termostatiranje. Po završetku termostatiranja piknometar s vinom izvaditi iz kupelji, dobro obrisati i izvagati. Iz razlika masa piknometra napunjenog vinom i mase suhog, praznog piknometra izračunati gustoća vina prema jednadžbi (18)⁽⁶⁾:

$$\text{Relativna gustoća vina (g mL}^{-1}\text{)} = (m_2 - m_1) \times F \quad (18)$$

m_2 - masa piknometra s vinom (g)

m_1 - masa praznog piknometra (g)

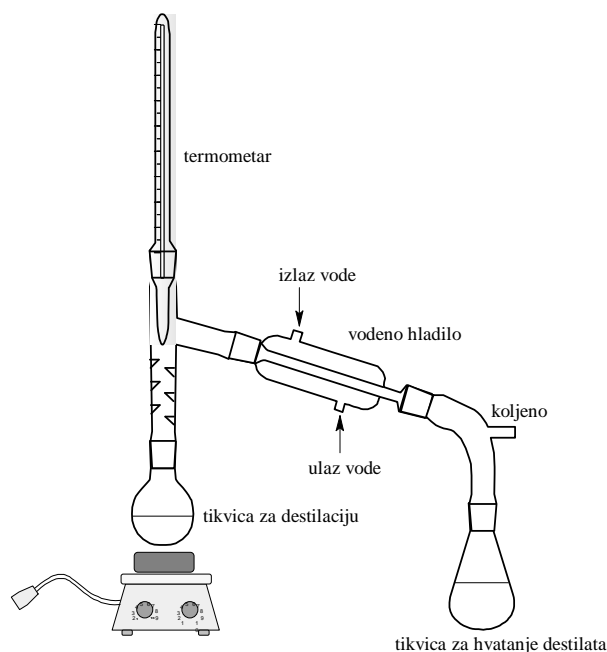
F- prevođenje mase volumena piknometra na jedan mililitar tj. 1/volumen piknometra

Brojčana vrijednost gustoće vina ovisi o količini alkohola i ekstrakta vina. Što je količina alkohola u vinu veća, gustoća vina je manja, dok ukoliko je veća količina ekstrakta vina, veća je i njegova gustoća. Bijela vina najčešće imaju gustoću manju od 1 (ukoliko se radi o suhim vinima s malim sadržajem neprevrelog šećera), dok crna vina imaju gustoću veću od 1 jer sadrže veću količinu ekstrakta.⁽⁶⁾

Vježba 6c: ODREĐIVANJE KOLIČINE ALKOHOLA U VINU

Postupak:

Alkohol se iz vina izdvaja destilacijom. U tikvicu za destilaciju otpipetirati 100 mL vina i staviti kamenčiće za vrenje. Vino destilirati sve dok 2/3 početnog volumena ne izdestiliraju. Nakon završenog postupka destilacije, destilat kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Udio alkohola u vinu izračunati u odnosu na početni volumen uzorka vina.



Slika 8. Aparatura za određivanje alkohola destilacijom

Dobiveni destilat prenijeti u piknometar koji se uroni u vodenu kupelj zagrijanu na 20°C. Nakon 20-30 minuta kada se uzorak termostatirao piknometar izvaditi iz kupelji, dobro obrisati i izvagati. Relativnu gustoću destilata izračunati prema jednadžbi (19)⁽⁶⁾:

$$\text{Relativna gustoća destilata (g mL}^{-1}\text{)} = (m_3 - m_1) \times F \quad (19)$$

m_3 - masa piknometra s destilatom (g)

m_1 - masa praznog piknometra (g)

F- prevođenje mase volumena piknometra na jedan mililitar tj. 1/volumen piknometra

Relativna gustoća destilata je uvijek manja od relativne gustoće vina i to ovisno o količini alkohola u njemu. Na osnovu relativne gustoće destilata u *Tablici 2* očitati količinu alkohola u vinu. Prvo vrijednost relativne gustoće destilata prevesti u grame alkohola po litri vina, a zatim dobivenu vrijednost preko *Tablice 3* prevesti u volumne postotke alkohola.⁽⁶⁾

Tablica 2. Preračunavanje količine alkohola (u g L⁻¹) na osnovu relativne gustoće destilata⁽⁶⁾

Specifična težina	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
	Grami alkohola u litri ekstrakta									
0,999	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,998	-	-	-	-	-	-	0,0	0,4	1,0	1,5
0,997	2,0	2,5	3,1	3,6	4,	4,7	5,2	5,7	6,3	6,8
0,996	7,3	7,8	8,4	8,9	9,4	10,0	10,5	11,1	11,6	12,2
0,995	12,7	13,3	13,8	14,4	14,9	15,5	16,0	16,6	17,1	17,7
0,994	18,2	18,7	19,3	19,8	20,4	21,0	21,5	22,1	22,7	23,2
0,993	23,8	24,4	24,9	25,5	26,1	26,5	27,2	27,8	28,3	28,9
0,992	29,4	30,0	30,6	31,2	31,8	32,4	32,9	33,5	34,1	34,7
0,991	35,3	35,9	36,4	37,0	37,6	38,2	38,8	39,4	40,0	40,6
0,990	41,2	41,8	42,3	42,9	43,5	44,1	44,7	45,3	45,9	46,5
0,989	47,1	47,7	48,3	48,9	49,5	50,2	50,8	51,4	52,0	52,6
0,988	53,2	53,9	54,5	55,1	55,7	56,3	56,9	57,6	58,2	58,8
0,987	59,4	60,0	60,7	61,3	61,9	62,6	63,2	63,8	64,5	65,1
0,986	65,7	66,3	67,0	67,6	68,2	68,9	69,5	70,1	70,8	71,4
0,985	72,1	72,8	73,4	74,0	74,7	75,4	76,0	76,6	77,3	77,9
0,984	78,6	79,3	79,9	80,6	81,3	81,9	82,6	83,3	83,9	84,6
0,983	85,2	85,9	86,6	87,2	87,9	88,5	89,3	89,9	90,6	91,3
0,982	92,0	92,7	93,4	94,0	94,7	95,4	96,1	96,8	97,4	98,1
0,981	98,8	99,5	100,2	100,9	101,6	102,3	103,0	103,7	104,4	105,1
0,980	105,8	106,5	107,2	107,9	108,7	109,4	110,1	110,8	111,5	112,3
0,979	113,0	113,7	114,4	115,1	115,9	116,6	117,3	118,0	118,8	119,5
0,978	120,2	121,0	121,7	122,4	123,2	123,9	124,6	125,4	126,1	126,8
0,977	127,6	128,3	129,1	129,8	130,5	131,2	132,0	132,8	133,5	134,2
0,976	135,0	135,7	136,4	137,2	137,9	138,6	139,4	140,1	140,9	141,6
0,975	142,3	143,1	143,8	144,5	145,3	146,0	146,7	147,5	148,2	149,0
0,974	49,7	150,4	151,2	151,9	152,6	153,4	154,1	154,8	155,6	156,3
0,973	157,0	157,8	158,5	159,2	160,0	160,7	161,4	162,2	162,9	163,6
0,972	164,3	165,1	165,8	166,5	167,3	168,0	168,7	169,5	170,2	170,9
0,971	171,7	172,4	173,1	173,8	174,6	175,3	176,0	176,7	177,4	178,2
0,970	178,9	179,6	180,3	181,0	181,7	182,4	183,1	183,8	184,5	185,2
0,969	186,0	186,7	187,4	188,1	188,8	189,5	190,2	190,9	191,6	192,3
0,968	193,1	193,8	194,5	195,1	195,8	196,5	197,2	197,9	198,6	199,3
0,967	200,0	200,7	201,4	202,1	202,7	203,4	204,1	204,8	205,5	206,2
0,966	206,8	207,5	208,2	208,9	209,5	210,2	210,9	211,6	212,3	213,0
0,965	213,6	214,3	214,9	215,6	216,2	216,9	217,6	218,2	218,9	219,6

Tablica 3. Pretvorba količine alkohola iz $g L^{-1}$ u volumne postotke alkohola ⁽⁶⁾

g alkohola u L		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Stotice	Desetice	Volumni postoci alkohola									
	0	0,0	0,13	0,25	0,38	0,51	0,64	0,76	0,89	1,01	1,14
	1	1,27	1,39	1,52	1,65	1,77	1,90	2,03	2,15	2,28	2,41
	2	2,53	2,66	2,79	2,91	3,04	3,17	3,29	3,42	3,55	3,57
	3	3,80	3,93	4,05	4,18	4,31	4,43	4,56	4,69	4,81	4,94
	4	5,04	5,19	5,32	5,45	5,57	5,70	5,83	5,95	6,08	6,21
	5	6,33	6,46	6,59	6,71	6,84	6,97	7,10	7,22	7,35	7,47
	6	7,60	7,73	7,85	7,98	8,11	8,24	8,36	8,49	8,61	8,74
	7	8,87	8,99	9,12	9,25	9,38	9,50	9,63	9,75	9,88	10,01
	8	10,13	10,26	10,39	10,51	10,6	10,77	10,89	11,02	11,15	11,27
	9	11,40	11,53	11,65	11,78	11,91	12,03	12,16	12,29	12,41	12,54
1	0	12,67	12,80	12,92	13,05	13,17	13,30	13,43	13,56	13,68	13,81
1	1	13,93	14,06	14,19	14,31	14,44	14,56	14,69	14,82	14,95	15,07
1	2	15,20	15,33	15,45	15,58	15,71	15,83	15,96	16,09	16,21	16,34
1	3	16,47	16,60	16,72	16,85	16,97	17,10	17,23	17,35	17,48	17,61
1	4	17,73	17,86	17,99	18,11	18,24	18,37	18,50	18,62	18,75	18,87
1	5	19,00	19,13	19,26	19,38	19,51	19,64	19,76	19,89	20,02	20,14
1	6	20,27	20,39	20,52	20,65	20,77	20,90	21,03	21,16	21,28	21,41
1	7	21,54	21,66	21,79	21,79	22,04	22,17	22,30	22,42	22,55	22,68
1	8	22,81	22,93	23,06	23,18	23,31	23,44	23,56	23,69	23,83	23,94
1	9	24,07	24,19	24,32	24,45	24,57	24,70	24,83	24,96	25,08	25,21
2	0	25,34	25,46	25,59	25,72	25,84	25,97	26,10	26,22	26,35	26,48
2	1	26,60	26,73	26,86	26,98	27,11	27,24	27,36	27,49	27,62	27,74

Vježba 6d: ODREĐIVANJE EKSTRAKTA VINA

Ekstrakt vina su neisparljivi sastojci vina koji ostaju u tikvici nakon destilacije. Metoda određivanja ekstrakta vina temelji se na mjerenju relativne gustoće ostatka nakon destilacije iz koje se preko Windisch-ove tablice (*Tablica 4*) preračuna količina ekstrakta vina.⁽⁶⁾

Postupak:

U odmjernu tikvicu od 100 mL se kvantitativno prenijeti ostatak nakon destilacije vina uz trostruko ispiranje tikvice za destilaciju vrućom destiliranom vodom. Sadržaj u tikvici nakon hlađenja nadopuniti do oznake destiliranom vodom, dobro izmiješati, te se prelići u piknometar. Piknometar napunjen pripremljenom otopinom uroniti u vodenu kupelj na termostatanje 20-30 minuta, nakon čega ga je potrebno izvaditi iz kupelji, dobro obrisati i vagati, a ekstrakt vina izračunati prema jednadžbi (20)⁽⁶⁾:

$$\text{Relativna gustoća ekstrakta (g mL}^{-1}\text{)} = (m_4 - m_1) \times F \quad (20)$$

m_4 - težina piknometra s ekstraktom (g)

m_1 - težina praznog piknometra (g)

F- prevođenje težine volumena piknometra na jedan mililitar tj. 1/volumen piknometra

Relativna gustoća ostatka nakon destilacije uvijek je veća od jedan jer je masa ekstraktivnih materija veća od mase vode kod istog volumena. Pri višoj gustoći veća je i količina ekstrakta sadržanog u njemu. Na osnovu gustoće ostatka nakon destilacije u Windisch-ovoj tablici (*Tablica 4*) se očita količina ekstrakta izražena u gramima po litri vina. Količina ekstrakta dobivena pomoću piknometra predstavlja ukupni ekstrakt i u njemu je sadržan šećer ukoliko ga ima u vinu.⁽⁶⁾

Količinu ekstrakta vina računati prema jednadžbi (21)⁽¹³⁾:

$$D = S - S' + 1 \quad (21)$$

D- gustoća dealkoholiziranog uzorka (g mL⁻¹)

S- gustoća vina (g mL⁻¹)

S'-gustoća destilata (g mL⁻¹)

**Tablica 4. Preračunavanje količine ekstrakta na osnovu gustoće ostatka nakon destilacije-
Windisch-ova tablica ⁽⁶⁾**

Specifična težina od 2. decimalna mjesta	Treće decimalno mjesto specifične težine									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	g ekstrakta u litri vina									
0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,00	4,6	7,1	9,7	12,3	14,9	17,5	20,1	22,7	25,3	27,9
1,01	30,5	33,1	35,7	38,3	40,9	43,5	46,1	48,7	51,3	53,9
1,02	56,5	59,1	61,8	64,3	66,9	69,5	72,1	74,7	77,3	79,9
1,03	82,6	85,2	7,87	90,4	93,0	95,6	98,2	100,8	103,4	106,1
1,04	108,7	111,3	113,9	116,5	119,1	121,8	124,4	127,0	129,6	132,2
1,05	134,9	137,5	140,1	142,7	145,3	147,9	150,6	153,2	155,8	158,4
1,06	161,1	163,7	166,2	168,9	171,6	174,2	176,8	179,4	182,1	184,7
1,07	187,3	190,0	192,6	195,2	197,9	200,5	203,1	205,8	208,4	211,0
1,08	213,7	216,3	218,9	221,6	224,2	226,9	229,5	232,1	234,8	237,4
1,09	240,0	242,7	245,3	248,0	250,6	253,3	255,5	258,5	261,2	263,8
1,10	26,5	269,1	271,8	274,4	277,1	279,7	282,4	285,0	287,7	290,3
1,11	293,0	295,6	298,3	300,9	303,6	306,2	308,9	311,5	314,2	316,9
1,12	319,5	322,2	324,8	327,5	330,2	332,8	335,5	338,1	340,8	343,5
1,13	346,1	348,8	351,5	354,1	356,8	359,4	362,1	364,8	367,5	370,1
1,14	372,8	375,5	378,1	380,8	383,5	386,2	388,8	391,5	394,2	396,9
1,15	399,5	402,2	404,9	407,6	410,3	412,9	415,6	418,3	421,0	423,7

Vježba 7: ODREĐIVANJE ALKOHOLA U VINU KEMIJSKOM METODOM PO MARTINU-u I AGABLJANC-u

Etanol je najzastupljeniji alkohol u vinu dok ostale alkohole (metanol, propanol, butanol, glicerol) nalazimo u vrlo malim količinama. Volumni udio alkohola u vinu se kreće od 7% do čak 24% u desertnim vinima.⁽⁸⁾ Količina nastalog etanola ovisi o: (a) količini fermentabilnog šećera, (b) vrsti kvasaca, (c) temperaturi fermentacije, (d) količini nutritivnih tvari u grožđu, te (e) općim uvjetima fermentacije.⁽¹⁶⁾ Metoda određivanja alkohola u vinu po Martinu i Agabljancu se zasniva na oksidaciji alkohola pomoću kalijeva dikromata ($K_2Cr_2O_7$) u kiselom mediju prilikom čega alkohol oksidira u octenu kiselinu, a krom se iz stupnja oksidacije +7 reducira u stupanj oksidacije +3 prema sljedećoj kemijskoj jednačini:



Destilat dobiven vodenom destilacijom vina se direktno uvodi u otopinu kalijeva dikromata zakiseljenu sumpornom kiselinom u kojoj dolazi do oksidacije.⁽⁶⁾

Pribor:

- odmjerna tikvica od 50 mL, kamenčići za vrenje, aparatura za destilaciju, Erlenmeyer tikvica od 300 mL, pipete

Priprava reagensa:

- **Otopina kalijeva dikromata, $c(K_2Cr_2O_7)=0,1151 \text{ mol L}^{-1}$:** 33,834 g $K_2Cr_2O_7$ se otopiti u 1 L destilirane vode. 1 mL ove otopine ekvivalentan je sa 0,01 volumnim % etanola i s 6,9 mL otopine natrijeva tiosulfata.
- **Otopina natrijeva tiosulfata, $c(Na_2S_2O_3)=0,1582 \text{ mol L}^{-1}$:** 25 g $Na_2S_2O_3$ otopiti u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 1 L uz dodatak 0,1-0,2 g kemijski čistog Na_2CO_3 kako bi otopina bila stabilnija. Otopina prije uporabe mora stajati u mraku 7 dana kako i se stabilizirala.
- **Otopina kalijeva jodida, $w(KI)=20\%$:** odvagati 20 grama kalijeva jodida, otopiti ga u manjoj količini destilirane vode i kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Otopina se čuva u tamnoj boci s brušenim čepom na sobnoj temperaturi.

- **Otopina škroba, w(škroba)=1%:** U tikvicu od 100 mL odvagati 1 g škroba i dodati 50-60 mL destilirane vode. Tikvicu potom staviti na kuhalo i otopinu se zagrijavati sve dok ne proključa. Nakon hlađenja otopine sadržaj u tikvici se nadopuniti destiliranom vodom do oznake.

Postupak:

Vino koje se analizira je prethodno potrebno razrijediti destiliranom vodom u omjeru 1:10. U odmjernu tikvicu od 50 mL se otpipetirati 5 mL vina, dopuniti destiliranom vodom do oznake i promiješati. 5 mL razrijeđenog vina otpipetirati u tikvicu za destilaciju, dodati 5-6 mL destilirane vode i neutralizirati otopinom NaOH (kontrola pH papirićima). Tikvicu spojiti na aparaturu za destilaciju tako da se kondenzirani destilat direktno uvodi u tikvicu od 300 mL u kojoj se nalazi 10 mL otopine kalijeva dikromata i 5 mL koncentrirane sumporne kiseline zbog intenzivnije oksidacije u kiseloj sredini. Erlenmeyer tikvicu uroniti u posudu s hladnom vodom jer je oksidacija alkohola egzoterman proces prilikom kojeg se oslobađa toplina, a porast temperature nije poželjan. Destilacija se odvija postepeno uz kontrolirano zagrijavanje, a traje dok se sadržaj u tikvici za destilaciju ne smanji na približno 3 mL, a za to vrijeme sav alkohol izdestilira. Cijev hladila isprati destiliranom vodom koja se također hvata u tikvicu s destilatom koju je po završetku postupka potrebno dobro promiješati. Prilikom oksidacije alkohola jedan dio kalijeva dikromata se utrošio, dok je jedan dio ostao u suvišku i potrebno ga je odrediti. U tikvicu je potom potrebno dodati oko 200 mL destilirane vode i 10 mL otopine kalijeva jodida, te ostaviti da odstoji 5 minuta. Dolazi do oksido-redukcije između kalijeva dikromata i joda, pri čemu se krom iz stupnja oksidacije +7 reducira u stupanj oksidacije +3, a jod iz stupnja oksidacije -1 prelazi u elementarni. Oslobođeni elementarni jod je ekvivalentan količini kalijeva dikromata zaostalog u otopini i njegova količina se odredi titracijom otopinom natrijeva tiosulfata sve dok tamna boja otopine dijelom ne posvijetli. Po završetku titracije otopini dodati 5 mL 1%-tne otopine škroba i titraciju nastaviti do pojave zelene boje čim iz otopine nestanu posljednje količine joda. Zeleno obojenje posljedica je prisustva trovalentnog kroma u otopini.⁽⁶⁾ Količinu alkohola izraženu u volumnim postocima izračunati prema jednadžbi (22)⁽⁶⁾:

$$\text{Udio alkohola (\%)} = (10 - a / 6,9) \times 2 \quad (22)$$

a- utrošak otopine Na₂S₂O₃ za titraciju joda u mL

6,9- ekvivalent 1 mL otopine K₂Cr₂O₇ s otopinom Na₂S₂O₃

2- faktor ekvivalencije kalij-bikromata, alkohola i količine vina

Vježba 8: ODREĐIVANJE DIREKTOG EKSTRAKTA VINA

Ukupni ekstrakt vina se može odrediti jednostavnim postupkom isparivanja vina u vodenoj kupelji zagrijanoj na temperaturu 100°C. Posude u kojima vino isparava su od platine, porculana ili stakla, a sam postupak ne traje dugo. Po završetku isparavanja mjeri se količina ostatka koji predstavlja neisparljive sastojke odnosno suhu tvar (suh ekstrakt).⁽⁶⁾ Kod ovog postupka dolazi i do manjih pogrešaka jer pri 100°C neki sastojci ekstrakta, kao što su glicerol i mliječna kiselina, ispare čime u izvjesnoj mjeri smanjuju dobivenu količinu ekstrakta. Tvari boje i tanini sklone su oksidaciji što povećava težinu ekstrakta, a dolazi i do procesa esterifikacije i karamelizacije šećera.

Pribor:

- porculanski lončić, pinceta, vodena kupelj, sušionik, analitička vaga

Postupak:

U čistu, suhu i prethodno izvagan porculanski lončić uliti 25 mL vina. Lončić uroniti u vodenu kupelj zagrijanu na 100°C gdje vino isparava sve do nastanka sirupaste smjese. Pred kraj isparavanja dobivenu smjesu okretanjem posude ravnomjerno rasporediti po njenom dnu. Lončić staviti u sušionik zagrijan na 100°C nekoliko minuta, a nakon hlađenja izvagati. Oduzimanjem mase praznog lončića od dobivene mase lončića s ekstraktom se dobije masa suhog ekstrakta sadržanog u 25 mL vina, a direktan ekstrakt vina izračunati preko jednadžbe (23)⁽⁶⁾:

$$\text{Sadržaj ekstrakta vina (g L}^{-1}\text{)} = (b - a) \times 40 \quad (23)$$

b- masa lončića s ostatkom nakon isparavanja (g)

a- masa praznog lončića (g)

Vježba 9: ODREĐIVANJE ŠEĆERA U VINU

Glavni šećeri u moštu i vinu su glukoza i fruktoza. Mošt normalnog, zrelog grožđa sadrži približno jednake količine ova dva šećera, kod prezrelog grožđa ima nešto više fruktoze, a kod nedovoljno zrelog više glukoze.

Prevela vina praktično nemaju šećera, to su tzv. suha vina kod kojih količina ukupnih reducirajućih šećera (uključujući i pentoze) može biti 1-2 g L⁻¹. Vino može imati manju ili veću količinu šećera bilo zbog nepotpunog previranja ili kasnijeg došećeravanja vina. Količina šećera u vinu određuje se kemijskim metodama koje se baziraju na oksido-redukcijskim reakcijama između Fehlingove otopine i šećera. Kemijske metode se koriste u kemijskim i enološkim laboratorijima, gdje su potrebni precizniji rezultati, dok se u proizvodnim pogonima šećer u moštu određuje isključivo fizikalnim metodama.⁽⁶⁾

Prema količini reducirajućeg šećera (g L⁻¹) sadržanog u vinu razlikujemo:

- suho vino (do 4 g L⁻¹),
- polusuho vino (4-12 g L⁻¹),
- poluslatko vino (12-50 g L⁻¹),
- slatko vino (preko 50 g L⁻¹) neprevrelog šećera.^(2,18)

Vježba 9a: LANE-EYNON-ova METODA

Lane-Eynonova metoda poznata je i pod nazivom brza Francuska metoda, a pogodna je za vina koja sadrže malu količinu šećera (5-10 g L⁻¹). Ako je sadržaj šećera u vinu veći ili se pak određuju u moštu, potrebno je uzorak razrijediti, a razrjeđenje uzeti u obzir pri proračunu.⁽⁶⁾ Reducirajući šećeri su šećeri koji u svojoj strukturi imaju aldo- ili keto-funkcionalnu skupinu⁽¹⁴⁾ i služe za utvrđivanje zrelosti grožđa. Lane-Eynonova metoda se zasniva na oksido-redukcijskim reakcijama između Fehlingove otopine i šećera, pri čemu se bakar stupnja oksidacije +2 reducira u stupanj oksidacije +1, a šećer se oksidira u odgovarajuću kiselinu.

Pribor:

- filter papir, bireta, čaša od 50 mL, lijevak, pipeta, kuhalo, Erlenmeyer tikvica

Priprava reagensa:

Otopina Fehlingova reagensa pripravlja se miješanjem jednakih količina otopina 1 i 2. Pripravljena otopina se čuva u tamnoj boci i ne smije biti starija od 2 mjeseca.

- **Fehling I:** 34,639 g bakar(II)sulfata pentahidrata otopiti u 500 mL destilirane vode.
- **Fehling II:** 173 g natrijeva kalij tartarata tetrahidrata i 50 g natrijeva hidroksida otopiti u 500 mL destilirane vode.⁽¹⁶⁾

Postupak:

Dodatkom 2-3 g aktivnog ugljena u 100 mL vina odstrane se taninske tvari, tvari boje i druge reducirajuće tvari, te nastalu suspenziju profiltrirati preko filter papira. Bezbojan i bistar filtrat uliti biretu i koristiti u daljnjim analizama.

U Erlenmeyer tikvicu otpipetirati 10 mL otopine Fehlinga (5 mL otopine Fehling I i 5 mL otopine Fehling II), koja je plave boje uslijed prisustva CuSO_4 . Tako pripremljenu otopinu zagrijati do vrenja i postepeno titrirati filtratom iz birete. Važno je otopinu Fehlinga tijekom cijelog postupka titracije održavati na temperaturi vrenja jer visoka temperatura ubrzava kemijsku reakciju. Kraj titracije je određen promjenom boje modre otopine u crvenu tj. dolazi do pojave crvenih kristala na dnu tikvice uslijed redukcije bakra i nastanka Cu_2O . Otopinu titrirati sve dok se ne izgube posljednji tragovi plave boje što je znak da se cijeli bakar reducirao.

Ako je utrošak filtrata vina manji od 5 mL, vino ima veću količinu šećera, pa ga je potrebno razrijediti zbog dobivanja točnijih rezultata, a faktor razrjeđenja uzeti u obzir prilikom izračuna. Količina šećera u vinu određuje se temeljem podataka:

1 mL Fehlingove otopine oksidira 0,005 g šećera

10 mL Fehlingove otopine oksidira 0,05 g šećera

Ako je za redukciju 10 mL otopine Fehlinga utrošeno A mL filtrata (vina), onda se količina šećera računa prema jednadžbi (24)⁽⁶⁾:

$$\mathbf{A : 0,05 = 1000 : X} \quad \mathbf{tj.} \quad \mathbf{X = 50 : A} \quad (24)$$

A - utrošeni mL filtrata vina za redukciju 10 mL Fehlingove otopine

X – količina šećera (g L^{-1})

Vježba 9b: BERTRAND-ova METODA

Bertrandova metoda se najčešće primjenjuje kod određivanja šećera u kemijskim i enološkim laboratorijima. Metoda se također temelji na oksido-redukcijskim reakcijama između Fehlingove otopine i šećera, postupak je malo složeniji od metode određivanja šećera po Lane-Eynon-u, ali su dobiveni rezultati točniji.

Pribor:

- o odmjerne tikvice od 100 mL, kapaljka, filter papir, Erlenmeyer tikvica od 250 mL, kuhalo, lijevak, bireta

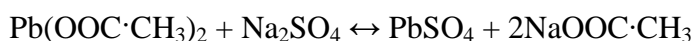
Priprava reagensa:

- o **Otopina kalijeva permanganata, $c(\text{KMnO}_4)=0,1 \text{ mol L}^{-1}$:** za pripravu 1 L otopine u toploj destiliranoj vodi otopiti 3,161 g KMnO_4 . Nakon hlađenja otopine sadržaj u tikvici nadopuniti do oznake destiliranom vodom.
- o **Zasićena otopina natrijeva sulfata:** u čašu uliti 500 mL destilirane vode i postepeno dodati Na_2SO_4 uz miješanje sve dok se otopina ne zasiti. Za otprilike 500 mL otopine utrošak Na_2SO_4 je oko 80-100 g.
- o **Zasićena otopina olovo acetata:** 600 g olovo acetata odvagati u čašu od 2 L, dodati 200 g PbO i 100 mL destilirane vode. Sadržaj u čaši dobro promiješati nakon čega čašu poklopiti satnim staklom i uroniti u vodenu kupelj na zagrijavanje uz konstantno miješanje sve dok smjesa ne postane crvenkasto-bijela. Otopinu zagrijavati 2 sata nakon čega joj se doda 1900 mL destilirane vode. Pripravljenu otopinu ostaviti taložiti 1-2 dana nakon čega je potrebno filtrirati.
- o **Otopina amonij željezo sulfata:** 120 g prethodno usitnjenih kristala soli otopiti u 300-400 mL destilirane vode. Pripravljenoj otopini dodati 100 mL koncentrirane sumporne kiseline nakon i kvantitativno je prenijeti u odmjernu tikvicu od 1 L i nadopuniti do oznake destiliranom vodom. Ovako pripravljena otopinu filtrirati i čuvati u tamnoj boci!

Postupak:⁽⁶⁾

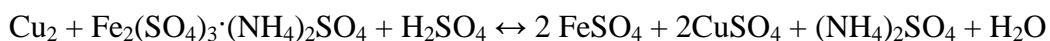
U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetirati 50 mL vina, dodati 5-20 mL zasićene otopine olovo acetata koja uklanja taninske, pektinske tvari, tvari boje i druge sastojke koji se ponašaju reducirajuće, ali nisu šećeri. Količina dodane otopine ovisi o vrsti vina; za bijela vina je dovoljno 5-10 mL otopina olovo acetata, a za obojena više.

Po dodatku olovo acetata, sadržaj tikvice dobro promiješati i sačekati 10-15 minuta. Bistroj otopini iznad taloga dodati još 2-3 kapi otopine olovo acetata i ako se pri tome ne stvara bijeli talog količina dodanog olovo acetata je dovoljna, a ako talog ne nastaje potrebno je dodati još 2-3 mL. Tikvicu nadopuniti do oznake destiliranom vodom i promiješati, a potom sadržaj filtrirati. 50 mL dobivenog filtrata otpipetirati u odmjernu tikvicu od 100 mL i dodati mu 3-5 mL zasićene otopine natrijeva sulfata, koji treba istaložiti višak olovo acetata u filtratu. Pri tome se odvija sljedeća kemijska reakcija:



Nakon što se istaložio bijeli talog olovo sulfata, dodavanjem par kapi natrijeva sulfata provjerava se da li je olovo potpuno istaloženo. Otopini dodati destiliranu vodu o oznake na tikvici i sadržaj ponovno filtrirati.

U Erlenmeyer tikvicu od 250 mL otpipetirati 50 mL smjese jednakih volumena Fehlingovih otopina koje se zagriju do ključanja, te dodati 25 mL filtrata. Boja u tikvici mora ostati plava tj. Fehlingove otopine mora biti u suvišku. Ukoliko plava boja izgubi potrebno je smanjiti količinu dodanog filtrata. Po dodatku filtrata, na tikvicu staviti stakleni lijevak da joj djelomično pokrije otvor i sadržaj zagrijati do vrenja. Dolazi do nastanka crvenog taloga bakar(I)oksida, dok se šećer oksidira u odgovarajuću kiselinu. Dobivenu otopinu filtrirati preko filter papira uz ispiranje tikvice vrućom destiliranom vodom. Lijevak sa filter papirom prebaciti na novu tikvicu i talog bakar(I)oksida se otopiti ispiranjem otopinom amonij željezo sulfata. Ovim postupkom dolazi do oksidacije bakra iz stupnja oksidacije +1 u stupanj oksidacije +2 (Cu_2O u CuSO_4), a željezo stupnja oksidacije +3 se reducira u željezo stupnja oksidacije +2 ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ u FeSO_4). Dobiveni filtrat je zelene boje uslijed nastanka željezo(II)sulfata (zelene galice).



Filtrat u boci odmah titirati otopinom KMnO_4 , sve dok zelenkasta boja ne nestane i dok se ne pojavi svijetlo-ljubičasta boja zbog viška kalijeva permanganata. Na osnovu utroška KMnO_4 izračuna se količina šećera u vinu. Tijekom ove titracije također dolazi do oksido-redukcijske reakcije. Željezo se oksidira iz stupnja oksidacije +2 u stupanj oksidacije +3, a mangan iz stupnja oksidacije +7 se reducira u stupanj oksidacije +2 prema jednadžbi:



Ako se pogleda tok reakcija ove analize, zapaža se:

- dodatkom određene količine šećera (filtrata) Fehlingovoj otopini stvara se ekvivalentna količina Cu_2O ;
- oksidacijom bakrova oksida s FeSO_4 reduciraju se ioni željeza(III) i stvara se ekvivalentna količina iona željeza(II);
- za oksidaciju željeza utroši se ekvivalentna količina otopine KMnO_4 ,

Količina šećera prema tome se računa na osnovu ovih pokazatelja:

- jedna molekula Cu_2O je ekvivalentna dvjema molekulama FeSO_4 ;
- jedan atom Cu ekvivalentan je jednoj molekuli FeSO_4 ;
- jedna molekula KMnO_4 ekvivalentna je pet molekula FeSO_4 , odnosno s pet atoma Cu;
- jedan atom Cu ekvivalentan je 1/5 molekule KMnO_4 ;
- 63,75 g Cu ekvivalentno je sa 158,03/5 g KMnO_4 ;
- 63,75 g Cu ekvivalentno je sa 31,606 g KMnO_4 ;
- otopina KMnO_4 koncentracije 0,1 mol L^{-1} sadrži 3,606 g KMnO_4 u litri, što je ekvivalentno sa 6,375 g Cu.

Iz ovog proizlazi da je 0,1 mL otopine KMnO_4 koncentracije 0,1 mol L^{-1} ekvivalentan s 0,006375 g Cu, odnosno 6,37 g Cu. Utrošak otopine KMnO_4 koncentracije 0,1 mol L^{-1} preračunava se na bakar pa se na osnovu količine bakra iz *Tablice 5* očitava količina šećera. Iz jednadžbe (26) se izračuna količina šećera u vinu u g L^{-1} :

$$\mathbf{A : B = 1,000 : x} \quad (26)$$

A- mL vina koji se nalaze u 25 mL filtrata dodanog smjesi Fehlingovih otopina nakon što se uzmu u obzir sva razrjeđenja (A=6,25 mL)

B- količina šećera iz tablice

x- količina šećera (g L^{-1})

Tablica 5. Određivanje količine šećera na osnovu utroška otopine KMnO_4 ⁽⁶⁾

0,1 M KMnO_4 mL	šećer mg	0,1 M KMnO_4 mL	šećer mg	0,1 M KMnO_4 mL	šećer mg	0,1 M KMnO_4 mL	šećer mg
4,0	12,4	10,0	32,2	16,0	53,5	22,0	76,4
4,2	13,0	10,2	32,9	16,2	54,2	22,2	677,2
4,4	13,6	10,4	33,6	16,4	55,0	22,4	78,0
4,6	14,3	10,6	34,3	16,6	55,7	22,6	78,7
4,8	14,9	10,8	35,0	16,8	56,4	22,8	79,5
5,0	15,5	11,0	35,6	17,0	57,2	23,0	80,3
5,2	16,2	11,2	36,4	17,2	57,9	23,2	81,1
5,4	16,8	11,4	37,0	17,4	58,7	23,4	81,9
5,6	17,5	11,6	37,7	17,6	59,4	23,6	82,7
5,8	18,1	11,8	38,4	17,8	60,1	23,8	83,5
6,0	18,8	12,0	39,1	18,0	61,0	24,0	84,4
6,2	19,4	12,2	39,7	18,2	61,6	24,2	85,2
6,4	20,1	12,4	40,5	18,4	62,4	24,4	86,0
6,6	20,7	12,6	41,2	18,6	63,2	24,6	86,7
6,8	21,4	12,8	42,0	18,8	64,0	24,8	87,5
7,0	22,0	13,0	42,6	19,0	64,8	25,0	88,4
7,2	22,7	13,2	43,3	19,2	65,4	25,2	89,2
7,4	23,4	13,4	44,1	19,4	66,2	25,4	90,0
7,6	24,1	13,6	44,7	19,6	67,1	25,6	90,9
7,8	24,7	13,8	45,5	19,8	67,8	25,8	91,6
8,0	25,5	14,0	46,3	20,0	68,7	26,0	92,5
8,2	26,1	14,2	47,0	20,2	69,3	26,2	93,3
8,4	26,8	14,4	47,6	20,4	70,1	26,4	94,1
8,6	27,5	14,6	48,4	20,6	70,9	26,6	95,0
8,8	28,1	14,8	49,1	20,8	71,6	26,8	95,8
9,0	28,8	15,0	49,8	21,0	72,4	27,0	96,6
9,2	29,5	15,2	50,5	21,2	73,2	27,2	97,3
9,4	30,1	15,4	51,3	21,4	74,1	27,4	98,2
9,6	30,8	15,6	52,1	21,6	74,9	27,6	99,1
9,8	31,5	15,8	52,7	21,8	75,6	27,8	99,9

Vježba 9c: ODREĐIVANJE SAHAROZE

Saharoza je disaharid čijom hidrolizom (inverzijom) nastaje jedna molekula glukoze i jedna molekula fruktoze, koje zajedničkim imenom nazivamo *invertnim šećerima*. Prema tome, hidrolizom saharoze dobiju se dva monosaharida, koji su inače prirodni i normalni sastojci grožđa i mošta. Količina saharoze u grožđu je relativno mala i kreće se u granicama od 3-5 g L⁻¹. Saharoza u grožđu je vrlo nestabilna, te se u prisustvu organskih kiselina postepeno hidrolizira. To je osobito izraženo tijekom fermentacije, kada invertaza iz kvasaca potiče njenu biokemijsku hidrolizu. Prema tome vina prirodnog porijekla gotovo ne sadrže saharozu. Saharoza u svojoj molekuli nema slobodnu aldehidnu grupu, te kao takva ne može reducirati Fehlingovu otopinu, na čemu se zasnivaju metode određivanja reducirajućih šećera. Saharozu se zbog toga ne određuje direktno već ju je potrebno prethodno razložiti na glukozu i fruktozu koje reduciraju Fehlingovu otopinu. Određivanje saharoze se upravo temelji na usporednom određivanju šećera prije i nakon hidrolize, a razlika u količini šećera dobivenoj ovim postupcima predstavlja količinu saharoze u vinu.⁽⁶⁾

Pribor:

- 3 odmjerne tikvice od 100 mL, vodena kupelj, filter papir, stakleni lijevci, pipeta 1-5 mL, kapaljka, staklena čaša od 100 mL, bireta

Priprava reagensa:

- **Otopine olovo acetata i natrijeva karbonata, $w(\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2)=w(\text{Na}_2\text{CO}_3)=15\%$:** pripremiti otapanjem 15 g pojedine kemikalije u 100 mL destilirane vode.

Postupak:

U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetirati količinu vina koja se dobije dijeljenjem vrijednost 2000 ukupnim ekstraktom vina izraženim u g L⁻¹ (npr. ako vino sadrži 50 g L⁻¹ ukupnog ekstrakta, uzeti se 40 mL za analizu). U tikvicu potom dodati zasićenu otopinu olovo acetata u količini 15% od količine uzetog vina, dobro promiješati i ostaviti 10 minuta da odstoji, te se nadopuniti destiliranom vodom do oznake i ponovno promiješati. Sadržaj tikvice profiltrirati, a 50 mL dobivenog filtrata kvantitativno prenijeti u tikvicu od 100 mL, ponovno nadopuniti do oznake destiliranom vodom i profiltrirati.

50 mL novog filtrata otpipetirati u odmjernu tikvicu od 100 mL i dodati 5 mL koncentrirane klorovodične kiseline. Tikvicu se prebaciti 5 minuta u vodenu kupelj zagrijanu na 70°C. U prisustvu kiseline i visoke temperature dolazi do hidrolize saharoze, ukoliko je ima. Sadržaj tikvice ohladiti i dodati kap metiloranža i dvije kapi fenolftaleina pri čemu otopina poprima crvenu boju uslijed prisustva kiseline. Otopinu titrirati otopinom Na₂CO₃ sve dok crveno obojenje otopine ne nestane, te nakon titracije pažljivo dodati zasićenu otopinu natrijeva karbonata dok se crvena boja ponovno ne pojavi uslijed lužnate reakcije. U početku reakcije se oslobađa velika količina CO₂ koji izlazi iz tikvice uz burno pjenjenje. U tikvicu se potom dodati 0,5 mL otopine Na₂CO₃, ostaviti da odstoji 10 minuta, a zatim dopuniti do oznake destiliranom vodom, promiješati i profiltrirati. U dobivenom filtratu se odrediti količinu šećera prema Lana-Eynon-ovoj ili Bertrand-ovoj metodi.

Količina šećera dobivena nakon hidrolize vina je uvijek veća od one u uzorku vina koji nije podvrgnut hidrolizi. Razlika između ove dvije količine u g L⁻¹ množi se s faktorom 0,95 i dobiva se količina saharoze u g L⁻¹ (95 g saharoze hidrolizom daje 100 g invertnog šećera, a pri tom se u molekulu saharoze ugrađuje molekula vode). Potrebno je također izvršiti korekciju jer djelovanjem klorovodične kiseline hidroliziraju dekstrani, pektinske i druge sluzave tvari, pri čemu oslobađaju male količine pentoza i heksoza koje reduciraju Fehlingovu otopinu. Kod vina koja sadrže do 50 g L⁻¹ ukupnih šećera, dobivena razlika se umanjuje za 2 g L⁻¹, a kod onih koja sadrže više za 4 g L⁻¹.

Količinu saharoze izračunati prema jednadžbi (27)⁽⁶⁾:

$$X \text{ (g L}^{-1}\text{)} = (a - b) \times 0,95 - 2 \text{ (ili 4)} \quad (27)$$

X- količina saharoze (g L⁻¹)

a- količina šećera dobivena inverzijom (g L⁻¹)

b- količina šećera bez inverzije (g L⁻¹)

0,95- faktor pretvorbe saharoze u invertni šećer

Vježba 10: ODREĐIVANJE HLAPIVIH KISELINA U VINU

Vino sadrži izvjesnu količinu hlapljivih kiselina u koje spadaju octena, mravlja, propionska i butanska, a od ukupne količine hlapljivih kiselina vina gotovo 95-99% otpada na octenu kiselinu. Količina hlapljivih kiselina u vinu najčešće se kreće u granicama od 0,4-0,8 g L⁻¹ izraženih kao octena kiselina.⁽⁶⁾

Hlapiva kiselost predstavlja homologe octene kiseline prisutnih u vinu u slobodnom obliku ili u obliku soli.⁽¹⁴⁾ Hlapiva kiselost, izražena kao octena kiselina, u vinu ne smije biti veća od:

- 0,8 g L⁻¹ u moštu u fermentaciji i mladom vinu;
- 1,0 g L⁻¹ u ružičastim i bijelim vinima;
- 1,2 g L⁻¹ u crnim vinima, u vinima kasne berbe i vinima izborne berbe, te
- 1,8 g L⁻¹ u desertnim vinima, vinima izborne berbe bobica, prosušenih bobica i ledenom vinu.^(2,12)

Metoda određivanja hlapljivih kiselina se temelji na njihovoj neutralizaciji nakon izolacije iz vina postupkom vodeno-parne destilacije. Aparatura za vodeno-parnu destilaciju sastoji se od generatora vodene pare, tikvice sa cijevi za dovod pare, kolone za destilaciju i hladila.

Pribor:

- aparatura za destilaciju vodenom parom, kuhalo, Erlenmeyer tikvica, bireta, stakleni lijevak

Priprava reagensa:

- **Otopina natrijeva hidroksida; c(NaOH)=0,1 mol L⁻¹:** otopiti 4 g NaOH u 1000 mL destilirane vode.

Postupak:

U tikvicu za destilaciju otpipetirati 50 mL uzorka vina iz kojeg je prethodno uklonjen CO₂ zagrijavanjem. Cjevčica kojom uvodimo vodenu paru iz kotlića u uzorak treba biti što više uronjena u vino. Hlapljive komponente isparavaju iz uzorka i zajedno s vodenom parom se kondenziraju u hladilu i sakupljaju u Erlenmeyer tikvici na kraju aparature. Sakupiti oko 200 mL destilata.

Dobivenom destilatu, prethodno zagrijanom do ključanja kako bi se uklonio CO₂, dodati se 2-3 kapi fenolftaleina i titrirati ga otopinom NaOH do pojave ljubičastog obojenja.

Utrošak otopine NaOH se množi faktorom 0,12 i kako bi se dobila količina hlapljivih kiselina vina izražena u gramima po litri kao octena kiselina⁽⁶⁾:

$$\text{Hlapive kiseline (octena kiselina g L}^{-1}\text{)} = a \times 0,12 \quad (28)$$

a- utrošak otopine NaOH (mL)

0,12- faktor ekvivalenata NaOH i octene kiseline

40 grama NaOH neutralizira 60 g octene kiseline

4 grama NaOH neutralizira 6 g octene kiseline, $c(\text{CH}_3\text{COOH})=0,1 \text{ mol L}^{-1}$

1 mL 0,1 M otopine NaOH neutralizira 0,006 grama octene kiseline.

Pošto se neutralizira destilat koji potječe od 50 mL vina, vrijednost 0,006 se prevodi na litru množenjem s 20 i dobije se faktor 0,12.⁽⁶⁾

Vježba 11: ODREĐIVANJE SO₂ U VINU

Najvažnija svojstva SO₂ u vinarstvu su njegovo antimikrobno i redukcijsko djelovanje. SO₂ sprječava oksidaciju uzrokovanu enzimima (osobito polifenoloksidaza kod zgnječenog grožđa), a vezivanjem s etanalom štiti aromu vina.⁽⁸⁾ Antioksidativno djelovanje SO₂ se očituje vezivanjem kisika čime se sprječava procesa oksidacije u vinu. Antiseptičko djelovanje SO₂ izraženo je u borbi protiv bakterija i divljih kvasaca (u količini od 50-100 mg L⁻¹), dok u količini od 200-600 mg L⁻¹ sprječava djelovanje "plemenitih" kvasaca. Sumpor se u vino dodaje u obliku elementarnog sumpora, sumpornih traka, plinovitog i otopine SO₂, te najčešće u obliku kalijeva i natrijeva metabisulfita.

Sumpor u otopinama se javlja u tri oblika: hidroliziran SO₂ (molekularni oblik) i u dva ionizirana oblika.⁽⁸⁾ Udio pojedinih oblika ovisi o pH, temperaturi i tlaku.



Slobodni SO₂ nalazi se molekularnom, disulfitnom i sulfitnom obliku, dok vezani SO₂ može biti vezan ireverzibilno (za acetaldehide) ili reverzibilno (rezerva slobodnom SO₂).

Kinetika vezivanja SO₂ :

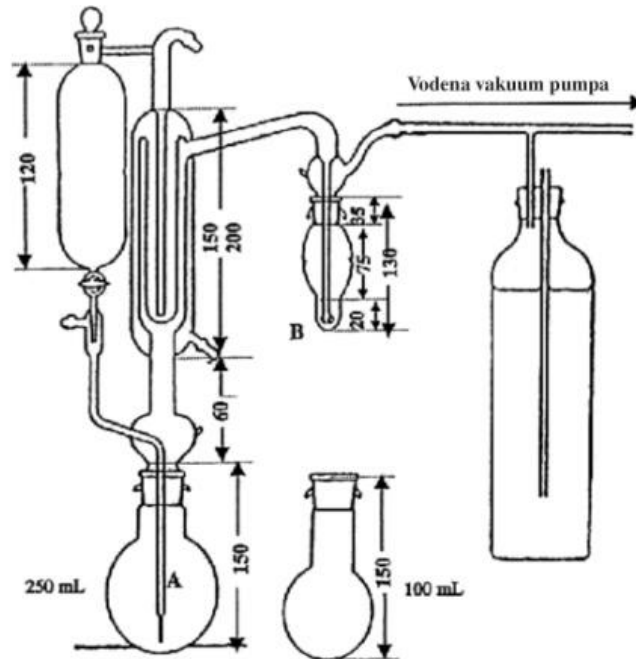
- najbrža u prva 24 sata
- s vremenom se smanjuje sadržaj slobodnog, a povećava sadržaj vezanog SO₂
- 4-5 dana do uspostave ravnoteže
- točan odnos varira od vina do vina.

Ukupni sumporov dioksid u vinu definiran je kao suma svih različitih oblika sumpornog dioksida, bilo u slobodnom stanju ili kombinirane sa sastojcima vina.

Zakonska ograničenja količina pojedinih sumpornih oblika u vinu ⁽²⁾:

- Ukupni SO₂: - MDK za crvena vina: 160 mg L⁻¹
 - MDK za bijela vina: 210 mg L⁻¹
 - MDK za vina kasne berbe: 300 mg L⁻¹.
- Slobodni SO₂: - MDK za crvena vina: 30 mg L⁻¹
 - MDK za bijela vina: 40 mg L⁻¹
 - MDK za vina kasne berbe: 50 mg L⁻¹.

MDK- minimalne dopuštene količine.



Slika 9. Aparatura za određivanje slobodnog i ukupnog SO_2 u vinu ⁽¹⁴⁾

Vježba 11a: ODREĐIVANJE SLOBODNOG, UKUPNOG I VEZANOG SO_2 U VINU REFERENTNOM METODOM

Sumporni dioksid se izdvaja iz vina strujom zraka ili dušika; veže i oksidira provođenjem kroz razrijeđenu i neutralnu otopinu vodikova peroksida. Nastala sumporna kiselina se određuje titracijom standardnom otopinom natrijeva hidroksida. ⁽¹⁴⁾

Pribor:

- o aparatura za određivanje SO_2 u vinu, kapaljka, bireta, lijevak, čaša od 50 mL, plamenik

Priprava reagensa:

- o **Otopina vodikova peroksida, $\gamma(\text{H}_2\text{O}_2)=9,1 \text{ g/L}$:** 1 mL 30%-tnog peroksida otpipetirati u odmjernu tikvicu od 100 mL. Sadržaj u tikvici nadopuniti do oznake destiliranom vodom.
- o **Otopina natrijeva hidroksida, $c(\text{NaOH})=0,01 \text{ mol L}^{-1}$:** 0,4 g NaOH otopiti u 1 L destilirane vode.

- Fosfatna kiselina, $w(\text{H}_3\text{PO}_4)=85\%$
- Otopina indikatora: 50 mg metilen-plavog i 100 mg metilen-crvenog otopiti u 100 mL 50%-tnog etanola.¹³⁾

A) Određivanje slobodnog SO_2

Postupak:

U tikvicu B otpipetirati 2-3 mL otopine vodikova peroksida i dodati dvije-tri kapi indikatora tako da otopina poprimi zelenu boju. Pripravljenu otopinu neutralizirati otopinom natrijeva hidroksida do pojave ružičaste boje nakon čega tikvicu B spojiti na aparaturu. U tikvicu A otpipetirati 50 mL vina i 15 mL fosfatne kiseline (20 mL vina i 5 mL fosfatne kiseline ukoliko je očekivana koncentracija ukupnog SO_2 u uzorku veća od 50 mg/L), te je postaviti na aparaturu. Tikvicu A je potrebno tijekom analize držati uronjenom u ledenu kupelj kako bi se spriječila disocijacija vezanog SO_2 .⁽¹⁶⁾ Mjehurići zraka se uvode u tikvicu A 15 minuta, dok se oslobođeni sumporov dioksid oksidira u sumpornu kiselinu u tikvici B. Otopinu u tikvici B titrirati otopinom natrijeva hidroksida do ponovne pojave zelenog obojenja.

Količinu slobodnog SO_2 u vinu izračunati preko jednadžbe (29a)^(13, 14, 16):

$$\text{Slobodni SO}_2 (\text{mg L}^{-1}) = V \times 6,4 \quad (29a)$$

V- utrošak NaOH za titraciju (mL)

B) Određivanje ukupnog SO_2

Postupak:

U tikvicu B staviti 2-3 mL otopine vodikova peroksida, dodati dvije-tri kapi indikatora te otopinu neutralizirati otopinom natrijeva hidroksida prema opisanom postupku kod određivanja slobodnog SO_2 . Nakon toga tikvicu B spojiti na aparaturu. U tikvicu A otpipetirati 50 mL vina i 15 mL fosfatne kiseline (20 mL vina i 5 mL fosfatne kiseline ukoliko je očekivana koncentracija ukupnog SO_2 u uzorku veća od 50 mg/L), te je postaviti na aparaturu. Mjehuriće zraka uvoditi u tikvicu A pri čemu sadržaj tikvice zagrijavati do vrenja plamenom, koji izravno dotiče dno tikvice, visine 4 do 5 cm. Unutar 15 minuta sav vezani SO_2 se oslobodi iz uzorka i oksidira. Nastalu sumpornu kiselinu titrirati otopinom 0,01 M NaOH.

Količinu ukupnog sumporova dioksida izračunati prema jednadžbi (29a) ukoliko se koristi volumen uzorka 50 mL, ili prema jednadžbi (29b) ukoliko se koristi 20 mL uzorka ⁽¹⁴⁾:

$$\text{Slobodni SO}_2 (\text{mg L}^{-1}) = V \times 16 \quad (29b)$$

Vježba 11b: ODREĐIVANJE UKUPNOG, SLOBODNOG I VEZANOG SO₂ U BIJELOM VINU RIPPER-ovom METODOM

Ovom metodom se usporedno određuje slobodni i ukupni SO₂, a količina vezanog SO₂ izračuna se iz njihove razlike. Dodatkom otopine joda SO₂ se oksidira, a jod reducira, pa se na osnovu utroška otopine joda izračunava količina SO₂ u vinu.⁽⁶⁾

Pribor:

- Erlenmeyer tikvica od 250 mL, bireta, stakleni lijevak, čaša, pipeta,

Priprava reagensa:

- **Otopina joda, c(KI)=0,02 mol L⁻¹:** 0,3320 g KI otopiti u destiliranoj vodi u tikvici od 100 mL nadopunjavanjem do oznake.
- **Otopina škroba, w(škroba)=1%:** u odmjernu tikvicu od 100 mL odvagati 1 g škroba i dodati 90 mL destilirane vode. Pripravljenu otopinu zagrijati do vrenja uz lagano miješanje, te nakon hlađenja nadopuniti do oznake destiliranom vodom.
- **Otopina natrijeva hidroksida, c(NaOH)=1 mol L⁻¹:** 20 g NaOH otopiti destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 500 mL do oznake.

A) Određivanje slobodnog SO₂**Postupak:**

U Erlenmeyer tikvicu s brušenim čepom otpipetirati 50 mL vina, dodati 10 mL otopine sumporne kiseline (1:4) i 3 mL otopine škroba. Sumporna kiselina se dodaje jer je oksidacija u kiseloj sredini intenzivnija, dok škrob služi kao indikator. Pripravljenu smjesu titrirati otopinom joda do pojave plave boje koja treba biti postojana oko pola minute. Iz volumena utrošene otopine joda izračunati količinu slobodnog SO₂ prema jednadžbi (30)⁽⁶⁾:

$$\text{Slobodni SO}_2 \text{ (mg/L)} = V \times 12,8 \quad (30)$$

V- utrošak standardne otopine joda za titraciju

Faktor 12,8 dobiva se na osnovu gramekvivalenata joda i SO₂.

126,9 g joda oksidira 32 g SO₂

2,5 g joda oksidira 0,64 g SO₂

1 mL otopine joda, c(KI)=0,02 mol L⁻¹ oksidira 0,64 miligrama SO₂.

Pošto se titrira 50 mL vina, vrijednost 0,64 se preračuna na litra množenjem s 20 (20×0,64 = 12,8).⁽⁶⁾

B) Određivanje ukupnog SO₂**Postupak:**

U tikvicu otpipetati 50 mL vina i dodati 25 mL otopine NaOH, te smjesu ostaviti da odstoji 10 minuta. NaOH stvara lužnatu sredinu u kojoj se vezani SO₂ oslobađa, tako da se nakon nekog vremena sav SO₂ nalazi u slobodnom obliku. Otopini dodati 15 mL otopine sumporne kiseline (1:4) i 3 mL otopine škroba, te potom titrirati otopinom joda do pojave plave boje. Količina SO₂ izračunati prema jednadžbi (30).

Vježba 12: SENZORSKO DOKAZIVANJE PRISUTNOSTI SUMPORVODIKA I MEREKAPTANA U VINU

Sumporovodik ($\text{H}_2\text{S}_{(g)}$) je plin neugodna mirisa koji podsjeća na miris pokvarenih jaja. Mirisni prag ovog spoja je vrlo nizak, od 50 do 80 $\mu\text{g/L}$.⁽¹³⁾ H_2S u vinu nastaje najčešće kao proizvod metabolizma kvasaca ili redukcijom elementarnog sumpora. Nastali H_2S lako stupa u reakcije s ostalim sastojcima vina pri čemu nastaju merkaptani koji imaju nepoželjna svojstva i teško se uklanjaju iz vina.

Količine H_2S u vinu ovise o:

- vrsti i količini elementarnog sumpora,
- stanicama kvasaca i njihovom fiziološkom stanju tijekom fermentacije,
- kemijskim karakteristikama mošta/vina: pH, iskoristivim količinama dušika, količini sulfita i sulfata, koncentraciji etanola,
- oksido-redukcijskom stanju mošta i vina,
- fizikalnim parametrima kao što su suspendirane čestice i temperatura fermentacije.⁽¹³⁾

Navedena metoda određivanja H_2S i merkaptana uključuje separaciju dviju grupa aroma temeljem senzorskog ispitivanja prije i nakon dodatka bakrovih ili kadmijevih spojeva. U slučaju korištenja bakra (u obliku bakar(II)sulfata) on reagira s sulfidima i merkaptanima pri čemu nastaju nehlapljivi produkti koji nemaju nikakav miris. Soli kadmija su kemijski reaktivnije prema sumporovodiku, ali imaju slab efekt prema merkaptanima. Ova metoda je brz, relativno jednostavan i jeftin test za vina za koja sumnjamo da imaju povećan sadržaj sumporovodika ili merkaptana.⁽¹³⁾

Napomena!

Uzorci vina ispitani ovom tehnikom se **ne smiju kušati!** Ovaj postupak je dizajniran isključivo za testiranje temeljeno na ispitivanju mirisa vina!

Pribor:

- 2 odmjerne tikvice od 100 mL, čaša, stakleni štapić, lijevak, analitička vaga, menzure ili stakleni cilindri od 100 mL

Priprava reagensa:

- **Otopina bakrova(II)sulfata/kadmij(II)sulfata, $w(\text{CuSO}_4/\text{CdSO}_4)=1\%$:** u čaši otopiti 1 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ($\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$) u 80-90 mL destilirane vode. Otopinu kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti do oznake destiliranom vodom.

Postupak:

U tri menzure ili staklena cilindra otpipetirati po 50 mL vina. Prvi cilindar označiti kao kontrolu i odvojiti od preostalih. U drugi cilindar dodati 1 mL otopine bakrova sulfata, a u treći cilindar 1 mL otopine kadmijeva sulfata nakon čega sadržaj u cilindrima je potrebno snažno promiješati.

Senzorska ocjena se temelji na usporedbi mirisa iz cilindara u koje smo dodali otopine sulfata u odnosu na miris kontrolnog cilindra. Očekivani rezultati i njihova interpretacija prikazani su u *Tablici 6*.

Tablica 6. Interpretacija rezultata senzorske ocjene vina tretiranih kadmijem i bakrom ⁽¹³⁾

Cilindar 1 (Kontrola)	Cilindar 2 (Bakar)	Cilindar 3 (Kadmij)	Interpretacija
Prisutnost neugodnog mirisa	Miris je nestao	Miris je nestao	H ₂ S prisutan
	Miris je nestao	Nema promjene	Merkaptani
	Miris je nestao	Miris je slabiji, ali nije nestao	H ₂ S i merkaptani
	Nema promjene	Nema promjene	<i>a</i>

a- Neugodnom mirisu nisu uzrok ni merkaptani ni H₂S, ili se metil-merkaptan oksidirao u dimetil disulfid.

Vježba 13: KOREKCIJA KISELOSTI VINA

Gledano kemijski vino je vodena otopina alkohola, organskih kiselina, ugljikohidrata, aldehida, estera, polifenola, dušičnih tvari, minerala i mirisa. Jedna od osnovnih okusnih karakteristika vina je kiselost. Količina kiselina u vinu značajno utječe na njegovu kvalitetu. Idealna ukupna kiselost vina trebala bi biti između 6 i 7 g L⁻¹, te bi svi vinogradari trebali težiti da proizvedu vina sadržaja ukupnih kiselina unutar tih granica. Ipak, zbog većih ili manjih količina ukupnih kiselina u moštu i vinu, korekcije tih vrijednosti nisu rijetkost.

Količina kiselina u grožđu direktno utječe na fermentaciju, ekstrakciju boje, mikrobiološku stabilnost, zrenje, stabilnost tartarata i proteina u vinu. U vinu postoje različite kiseline; one koje dolaze iz grožđa (vinska, malonska i limunska) i one koje nastaju procesom proizvodnje vina (mliječna, octena i druge).⁽⁸⁾

Dovoljno kisela vina su svježeg, harmoničnog okusa, dok se vina s nedovoljno kiselina teško čuvaju i podložnija su kvarenjima i manama, pogotovo ako uz to nemaju veći sadržaj alkohola. Vina koja sadrže preveliku količinu kiselina su oštrog i kiselog okusa. Zbog svih ovih čimbenika treba nastojati dobiti vina s umjerenom i dovoljnom količinom kiselina jer je u protivnom potrebno vršiti korekcije kiselosti. U praksi se češće pojačava kiselost, dok se otkiseljavanje vrši samo u rijetkim slučajevima. Istovremeno dokiseljavanje i otkiseljavanje istog vina nije dopušteno.⁽⁶⁾

Vježba 13a: DOKISELJAVANJE

Kiselost se može povećavati kupažom (miješanjem) slabo kiselog mošta/vina s moštom/vinom koje sadrži veću količinu kiselina. Ovaj način je najpogodniji sa gledišta kvalitete budućeg vina i sa gledišta ekonomičnosti.⁽⁸⁾

Dokiseljavanje se najčešće provodi dodatkom kiselina moštu/vinu. Tu se prvenstveno koriste kiseline koje su prirodni sastojci grožđa i mošta, a to su vinska, jabučna i limunska kiselina. Jabučna kiselina u vinu je nestabilna, vrlo skupa, pa se zato rijetko koristi. Vinska i limunska kiselina su dostupne u obliku sitnih, bijelih kristala, lako topljivih u vodi i vinu.

Vinska kiselina jače disocira od limunske te daje više slobodnih vodikovih iona.

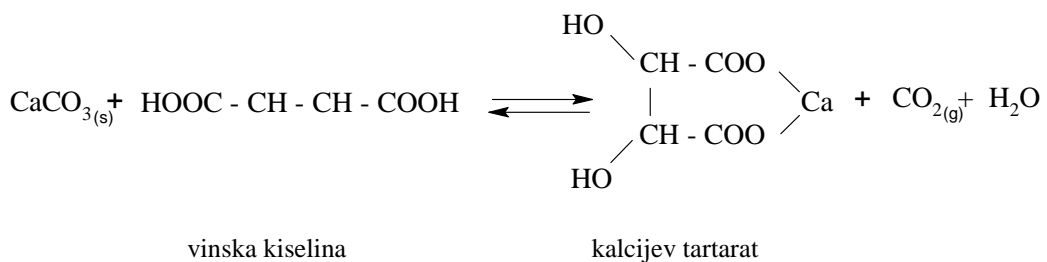
Dodavanjem veće količine vinske kiseline mošt postaje oštrog, kiselog okusa koji nakon nekog vremena omekša i harmonizira se, osobito kada se kiselina doda tijekom fermentacije jer se tada "stopi" s ostalim sastojcima vina (mošta).⁽⁶⁾

Međutim, postupak korekcije kiselosti dodatkom vinske kiseline ima manu jer često dolazi do taloženja vinske kiseline u vidu njenih soli, tartarata, ili poznatijeg vinskog kamena zbog njegove slabe topivosti u vinu (alkoholu). Talozenje je brže ukoliko je vino izloženo niskim temperaturama (od 0-5°C), dok se topivost vinskog kamena povećava ako vino sadrži veće količine jabučne kiseline. Obrada vina u cilju sprečavanja naknadnog taloženja vinskog kamena (vina s manjim sadržajem ukupnih kiselina) izvodi se filtriranjem ili dodavanjem metavinske kiseline. Kad se bijelom moštu doda 2 g L⁻¹ vinske kiseline, ukupna kiselost se poveća za 1 g L⁻¹. U proizvodnji crnih vina, dodatkom 4 g L⁻¹ vinske kiseline kiselost se poveća za 1 g L⁻¹ (u crnom masulju vinska kiselina se uglavnom veže na kalij izlučen iz kožice bobice). Kod bijelih moštova vinska kiselina se dodaje prije vrenja.

Dokiseljavanje vina može se provoditi do granice od 2,5 g L⁻¹ izraženo kao vinska kiselina.⁽²⁾

Vježba 13b: OTKISELJAVANJE

Prirodno smanjenje ukupnih kiselina u vinu vrši se taloženjem soli (tartarata, birse) vinske kiseline po stjenkama drvenih bačvi ili inoks posuda. Ovaj proces počinje vrenjem, a najizraženiji je pri niskim temperaturama od -5 do -7°C. Na ovaj način se ukupna kiselost vina može smanjiti od 1 pa čak do 3 g L⁻¹. Jedan od načina otkiseljavanja je i kupažiranje vina s manje kiselim vinom kako bi smanjili kiselost i popravili okus. Otkiseljavanje vina u praksi se najčešće izvodi dodatkom određene količine kalcijeva karbonata vinu. CaCO₃ na sebe veže vinsku kiselinu iz vina te se ona taloži u vidu soli prema kemijskoj jednadžbi:



Zakonom o vinu dozvoljeno je ukupnu kiselost smanjiti za najviše 1 g L^{-1} izraženo kao vinska kiselina⁽²⁾ za što je potrebno $1,3 \text{ g L}^{-1}$ kalcijeva karbonata.

Pribor:

- analitička vaga, čaša od 50 mL, stakleni štapić, metalna žlica

Postupak:

Odvaganu količinu CaCO_3 otopi se u manjoj količini vode u rijetku kašu, te uz miješanje dodati moštu ili vinu u posudi (bačvi, cisterni). Ovom reakcijom nastaje plin CO_2 koji se izdvaja u vidu mjehurića zraka i pjenjenja. Mošt pretočiti nakon 24 sata, dok se vino pretače 1 do 2 tjedna nakon otkiseljavanja.

Mol vinske kiseline (150 g) veže se s molom CaCO_3 (100 g) i nastaje po jedan mol kalcijeva tartarata (188 g), CO_2 (44 g) i vode (18 g), odnosno da bi se ukupna kiselost smanjila za 1 g L^{-1} potrebno je dodati $0,67 \text{ g L}^{-1}$ kalcijeva karbonata (CaCO_3).

$$150 : 100 = 1 : X \quad X = 0,67^{(6)} \quad (31)$$

Vježba 14: KOREKCIJE VINA KUPAŽOM

Kupažiranje, sljublivanje, križanje ili rezanje vina predstavlja postupak kojim se dva ili više moštova/vina miješaju u određenom odnosu radi dobivanja vina s izmijenjenim sastavom i organoleptičkim osobinama, te kako bi se održala ista kakvoća i tip vina u prometu. Kupažiranje se najčešće izvodi zbog tipiziranja vina (održavanja stalne kakvoće, marke vina), popravka kvalitete, osvježavanja starih vina i otklanjanja nedostataka.

Zadaci:

Zadatak 1.

1. Kupažirajte 3 vina s različitom količinom alkohola u njima, u svrhu dobivanja vina koje će imati sadržaj alkohola od 11,5 vol. %.
 1. vino 8,0 vol. % alkohola
 2. vino 10,5 vol % alkohola
 3. vino 12,5 vol. % alkohola.

Koje sve kombinacije kupaže vina koja imamo na raspolaganja postoje, koje su količine vina u L potrebne za pripravu 100 L pojedinih kupaža?

Zadatak 2.

2. Kupažirajte 3 vina s različitom količinom alkohola u njima: vino 8,5 vol. % alkohola; vino 11,0 vol % alkohola i vino 12,0 vol. % alkohola u svrhu dobivanja vina sa sadržajem alkohola od 10 vol. %. Imajući na raspolaganju navedena vina koje sve kombinacije kupaža su moguće, te napišite proračun za kupažiranje svih triju vina. U kojim omjerima bi vina miješali i koje bi to količine pojedinih vina bile kada bi pripravljali 100 L vina sa sadržajem alkohola od 10 vol. %?

Zadatak 3.

3. Na raspolaganju se 3 vrste vina sa sljedećim sadržajem kiselina: 13,8 g/L, 7,4 g/L i 5,8 g/L. Koje količine danih vina treba pomiješati kako bi pripravili 500 L vina sa sadržajem kiselina 6,5 g/L?

Zadatak 4.

4. Kupažiranjem po 100 L triju vrsta vina sadržaja alkohola: vino 1- 9,5 vol. %; vino 2- 11,5 vol. % i vino 3- 12,0 vol. %, dobije se vino određenog sadržaja alkohola. Izračunajte sadržaj alkohola u pripremljenom vinu.

Zadatak 5.

5. Potrebno je izračunati sadržaj alkohola vina dobivenog miješanjem dviju količina vina poznatih gradacija; 640 L vina s 12 vol.% alkohola i 320 L vina s 9,81 vol.% alkohola.

Zadatak 6.

6. Kupažirajte 3 vina: 1000 L vina s 9,0 vol. %; 2000 L vina s 11,0 vol. % i 3000 L vina s 12,0 vol. %. Koliki će sadržaj alkohola imati pripravljeno vino te koju količinu vina ćete pripremiti kupažom?

Vježba 15: BISTRENJE VINA

Pod bistrojenjem se podrazumijeva dodavanje odgovarajućih sredstava vinu kojima se odstranjuju čestice koje uzrokuju замуćenje, kao i tvari koje mogu izazvati замуćenje.⁽⁶⁾ Čestice mutnoće maskiraju okus i miris vina, pa ono bistrojenjem postaje izraženijeg i "čistijeg" okusa i mirisa, pogodnije za sazrijevanje i duže čuvanje. Sredstva koja se koriste za bistrojenje vina mogu se podijeliti na organska i mineralna. Organska sredstva su: želatin, tanin, bjelance jajeta, obrano mlijeko itd., a u mineralna spadaju bentonit, kaolin i dr.

Vino sadrži otopine mnogobrojnih čestice koje se prema svojoj veličini i topljivosti mogu svrstati u prave otopine (najmanje čestice), pseudo otopine (koloidne čestice) i čestica u suspenziji. Ako se stanje pojedinih tvari bliži ka pravim otopinama vino će biti bistrije, dok ako se bliži stanju suspenzije biti će manje bistro i mutno. Zamućenja i pojava taloga mogu biti posljedica poremećaja ravnoteže fizikalno-kemijskog stanja pojedinih sastojaka u vinu ili mogu biti biološke prirode kao posljedica rada mikroorganizama.

Proces bistrojenja zasniva se na povezivanju čestica bjelancevina koje nose pozitivni električni naboj s kemijskim spojevima koje nose negativni električni naboj. Uslijed grušanja dolazi do taloženja čestica, uzročnika замуćenja, te je vino već nakon 8 do 10 dana bistro i stabilno.

Vježba 15a: BISTRENJE VINA BJELANCEM JAJETA

Bjelancem kokošnjih jaja bistre se najčešće crna, ali i bijela vina. Za bistrojenje 100 litara crnog vina potrebno je 2-3 bjelanceta, a za bijela vina dovoljno je samo jedno.

Postupak:

Bjelanca svježih jaja pažljivo odvojiti od žumanjka te ih dobro izmutiti do stanja pjene. Zbog boljeg pjenjenja preporučeno je dodavanje male količine kuhinjske soli (oko 1 g soli na jedno bjelance). Izmućena bjelanca zajedno s vinom se par puta preliti iz jedne čaše u drugu čime se postiže dobro miješanje, te se takva smjesa ostavi neko vrijeme stajati. Sve čestice koje uzrokuju замуćenje vina zajedno s bjelancem istalože se na dnu suda, a bistro vino na površini odvojiti pretakanjem.

Vježba 15b: BISTRENJE VINA OBRANIM MLIJEKOM

Za bistenje vina često se koristi i obrano kravlje mlijeko. Kada se ono ulije u vino, kazein, bjelančevina u mlijeku, se zgrušava (koagulira) i taloži, povlačeći sa sobom čestice koje uzrokuju замуćenje. Obrano mlijeko se obično koristi za bistenje jače oksidiranih bijelih vina, koja imaju neprihvatljivu boju ili strani miris. Obično se koristi 0,25 do 0,40 litre mlijeka na 100 litara vina. Bistenje se izvodi na način opisan kod bistenja vina bjelancem.

Vježba 15c: BISTRENJE VINA ŽELATINOM

Želatina se dobiva kuhanjem životinjskih kostiju, hrskavica i kože uz odgovarajuća pročišćavanja. U trgovini se želatina prodaje u obliku listića ili samljevena. Bezbojna je, a jača žuta boja znak je njene nedovoljne čistoće.

Želatina se, obično, koristi za bistenje ružičastih, crnih i voćnih vina. Ukoliko se želi postići bistrina ovih vina, ona se tretiraju sa 10 do 15 g hL⁻¹ želatine, a ukoliko su jače oporna s 20 do 30 g hL⁻¹ želatine, pri čemu se oporne tvari eliminiraju i pored izrazite bistrine, postiže se pitkost i mekoća ukusa.

Želatina se najčešće kombinira s taninom jer su oba sredstva koloidne prirode. Želatina ima pozitivan, a tanin negativan električni naboj, ali mehanizam djelovanja im nije na principu međusobne koagulacije već tanin apsorbira želatinu i ona mijenja naboj iz pozitivnog u negativan. Do koagulacije želatine dolazi tek pod utjecajem kationa kalija, kalcija i magnezija. Višak želatine u bijelim vinima nakon bistenja naziva se sirkolaža, a uklanja se dodatkom tanina u količini od 2 do 3 g hL⁻¹.

Pribor:

- 6 staklenih cilindara, vodena kupelj, analitička vaga, čaša od 100 mL, stakleni štapić, odmjerna tikvica od 100 mL, pipeta

Postupak:

Da bi se točno ustanovila potrebna količina želatine za bistrenje, potrebno je postaviti "ogled u malom". U 6 čistih cilindara uliti 100 mL vina koje treba izbistriti, postaviti cilindre u vodenu kupelj da se temostatiraju na temperaturu od 40°C. 1%-tna otopinu želatine u destiliranoj vodi pripremiti najmanje 12 sati prije bistrenja kako bi nabubrila. Otopinu želatine prebaciti u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti vodom do oznake. Od ovako pripremljene otopine otpipetirati različite volumene otopine želatine (prema tablici) i dodati u cilindre s vinom koje treba izbistriti. Po dodatku otopine želatine, cilindre dobro izmiješati. Temeljem dobivenih pokazatelja bistrenja vina u cilindrima odabrati najmanju količinu želatine koja daje zadovoljavajuću bistrinu.

Cilindar	mL 1%-tne otopine želatine	odgovara g želatine
1	0,4	0,4
2	0,6	0,6
3	0,8	0,8
4	1,0	1,0
5	1,5	1,5
6	2,0	2,0

Vježba 15d: BISTRENJE VINA BENTONITOM

Bentonit je po svom sastavu vrsta gline koja se sastoji od više minerala od kojih je najvažniji montmorilonit. Primjena bentonita za bistrenje i stabilizaciju vina se temelji na njegovim adsorptivnim i elektrostatičkim svojstvima. Zahvaljujući svom negativnom električnom naboju bentonit taloži termolabilni dio bjelančevina i sprječava posmeđivanje. Eliminiranjem većeg dijela bjelančevina indirektno se smanjuje mogućnost pojave lomova u vinu, a bentonit djelomično blokira enzime i tako smanjuje prelazak aromatskih tvari u mošt i vino, pa ga se preporuča samo za prevrela vina. Bentonit se koristi u količini od 50 do 150 g hL⁻¹, a na efekt bistrenja bentonitom utječe kiselost vina, sadržaj tanina u vinu i njegova temperatura.

Pribor:

- Erlenmeyer tikvica, 6 staklenih cilindara, analitička vaga, čaša od 100 mL, stakleni štapić, filter papir, pipeta, vodena kupelj

Postupak:

Potrebna količina bentonita za bistrenje vina određuje se laboratorijskom metodom korištenjem 10%-tne koloidne suspenzije bentonita u destiliranoj vodi pripremljene 24 sata prije rada. U 6 cilindara s brušenim čepovima otpipetirati 100 mL vina te redom dodati količine suspenzije bentonita navedene u tablici.

Cilindar	mL 10 %-tne otopine bentonita	g suhog bentonita na 100 L vina
1	0,5	50
2	0,6	60
3	0,7	70
4	0,8	80
5	0,9	90
6	1,0	100

Odmah po dodatku otopine bentonita svaki cilindar dobro promiješati i ostaviti da se istaloži gruš (proteini). Vino potom profiltrirati i uraditi test njegove temperaturne stabilnosti.

Kontrola stabilnosti vina:

Po 10 mL filtriranog vina otpipetirati se u četiri epruvete, koje je potrebno uroniti u vruću vodu zagrijanu na 80°C tijekom 1 sata. Nakon toga epruvete izvaditi iz vode, ohladiti, obrisati i na bijeloj podlozi promatrati da li je došlo do naknadnog zamućenja. Treba se opredijeliti za onu dozu bentonita koja prethodi cilindru u kojem vino ostaje kristalno bistro (stabilno) poslije temperaturnog testa.

Vježba 16: ODREĐIVANJE INTEZITETA I NIJANSE BOJE VINA

Boja vina ovisi o količini antocijana u grožđu, pH vrijednosti, smanjenju količine antocijana tijekom fermentacije i količini sumpora.⁽⁸⁾ Tijekom čuvanja i starenja crnih vina tvari boje se postepeno mijenjaju uslijed kemijskih i fizikalnih procesa koji se odvijaju u vinu na samim tvarima boje odnosno antocijanima.⁽⁶⁾ Duljim čuvanjem i uslijed kontakta s zrakom antocijani oksidiraju, polimeriziraju ili se talože. Tanini naspram tome iako su u početku bezbojni, s vremenom tamne i postaju žute do smeđe boje. Karakteristike tvari boje crnih vina izražavaju se pomoću pokazatelja intenziteta i nijanse boje.

Mjerenjima apsorbancije (A) vina na valnoj duljini 280 nm mjeri se količina fenola, na 420 nm smeđi pigmenti, dok se na 520 nm mjere crveni pigmenti (antocijani) vina.

$$\text{Vidljiva boja} = A_{520} = A \times 10^{(8)} \quad (32)$$

$$\text{Smeđi pigmenti} = A_{420} = A \times 10^{(8)} \quad (33)$$

$$\text{Ukupni crveni pigment} = A_{520/HCl} = A \times 10^{(8)} \quad (34)$$

Intenzitet boje (A) predstavlja zbroj brojčanih vrijednosti apsorbancije A na valnim duljinama 420 i 520 nm.⁽⁶⁾

$$A = A_{420} + A_{520}^{(6,13)} \quad (35)$$

Starenjem crnih vina intenzitet boje se postepeno smanjuje. Apsorbancija pri 420 nm starenjem se povećava, a pri 520 nm se nešto brže smanjuje, tako da ukupno postepeno opada.

Nijansa boje (B) predstavlja odnos (omjer) između brojčane vrijednosti apsorbancije pri 420 i 520 nm.

$$B = A_{420} / A_{520}^{(6,13)} \quad (36)$$

Pribor:

- spektrofotometar, 2 staklene kivete, pipete

Postupak:

Za mjerenje apsorbancije pri 420 i 520 nm koriste se staklene kivete debljine 1 cm. U slučaju jako obojenog vina potrebno je uzorak razrijediti u omjeru 1:1 destiliranom vodom, a prilikom računanja intenziteta i nijanse boje potrebno je u obzir uzeti razrjeđenje uzorka. Kivete je potrebno prije svakog mjerenja isprati malom količinom vina koje analiziramo.

Brojčana vrijednost intenziteta boje (A) kod normalnih crnih vina se kreće oko 1,0 i više, dok se sa starenjem vina brojčana vrijednost intenziteta postepeno smanjuje. Brojčana vrijednost nijanse boje (B) crnih vina se kreće u rasponu od 0,4-0,6.⁽⁶⁾ Za određivanje ukupnog crvenog pigmenta vina u odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetirati 100 μ L uzorka vina i nadopuniti do oznake otopinom HCl. Tako pripremljenu otopinu ostaviti 3 sata na sobnoj temperaturi nakon čega na valnoj duljini 520 nm očitati apsorbanciju.

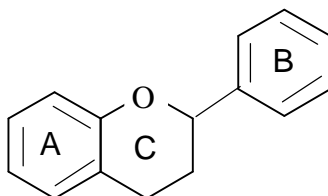
Vježba 17: ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA U VINIMA

Fenolni spojevi su treća najveća grupa spojeva u grožđu. Fenolni spojevi sudjeluju u kreiranju crvene pigmentacije, u procesu posmeđivanja, zaslužni su za okus gorčine i trpkosti grožđa i vina.⁽⁸⁾ Ove spojeve, vrlo rasprostranjene u biljnom svijetu nalazimo u namirnicama biljnog porijekla. Fenolni spojevi su od presudnog značaja za kvalitetu (posebno senzorska svojstva) i zdravstvenu vrijednost brojnih prehrambenih proizvoda.

Fenolne spojeve možemo podijeliti u dvije velike grupe: *flavonoide* i *neflavonoide*. Na flavonoide otpada oko 85% ukupnih fenola. U njih ubrajamo antocijane, 3-flavanole i tanin polimere. U neflavonoide spadaju fenolne kiseline, hidroksicinemati i hidroksibenzoati.⁽⁸⁾

Kemijski, fenoli mogu biti definirani kao tvari koje u svojoj strukturi posjeduju barem jedan aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa, uključujući i njihove funkcionalne derivate. Poznato je preko 8000 fenolnih spojeva biljnog porijekla koji se razlikuju po svojoj kemijskoj strukturi i po svojim kemijskim svojstvima.

Flavonoidni su polifenolni spojevi građeni od 15 atoma ugljika. Sastoje se od dva aromatska prstena (A i B) povezana preko heterocikličkog prstena s kisikom (prsten C). Skelet ili osnovna struktura flavonoida je C₆-C₃-C₆.



Slika 10. Kemijska formula flavonoida

Ovisno o stupnju oksidacije heterocikličkog prstena u sredini (C) razlikuju se različite podgrupe flavonoida (flavanoli, flavoni, antocijanidini, flavanoni...).

Vino može sadržavati različite količine ukupnih fenola, a najviše vrijednosti su za:

- bijelo vino 500 mg L⁻¹,
- ružičasto vino 2000 mg L⁻¹,
- crno vino 5500 mg L⁻¹.^(2,14)

Nekoliko faktora utječe na količinu ukupnih fenola u vinu, a to su vrijeme kontakta sjemenki i pokožica, koncentracija etanola, temperatura fermentacije, izmiješanost soka i pokožice, jakost prešanja, sorta grožđa i sadržaj fenola u njima.⁽¹⁶⁾

Vježba 17a: ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA FOLIN-CIOCALTEU METODOM

Ukupni fenoli određuju se Folin-Ciocalteu metodom ^(16,18) koja je spektrofotometrijska i temelji se na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa uz nastajanje obojenog produkta. Fenolne grupe oksidiraju do kinona dodatkom smjese molibdofosfatnih i volframofosfatnih aniona koji se reduciraju i daju plavo obojenje. Nereducirani Folin-Ciocalteu reagens je žute boje dok reducirani ima stabilnu plavu boju. Intenzitet obojenja mjeri se određivanjem apsorbancije kod 765 nm.

Pribor:

- 7 odmjernih tikvica od 25 mL, analitička vaga, pipeta, spektrofotometar, kivete

Priprava reagensa:

- **Priprava zasićene otopine natrijeva karbonata:** 200 g bezvodnog natrijeva karbonata otopiti u 1 litri destilirane vode kuhanjem. Nakon hlađenja dodati par kristala natrijeva karbonata i otopinu filtrirati nakon 24 sata.⁽¹⁶⁾ Tako pripremljena otopina se čuva u tamnoj boci.
- **Priprava otopine standarda za određivanje fenola:** 0,5 g prethodno osušene galne kiseline otopiti u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL

Izrada standardne krivulje ⁽¹⁶⁾:

Za izradu standardne krivulje potrebno je pripremiti otopine galne kiseline različitih koncentracija. Pipetirati 0 mL; 0,25 mL; 0,75 mL; 1,25 mL i 2,5 mL standardne otopine fenola u tikvice od 25 mL i nadopuniti do oznake s destiliranom vodom. Koncentracije fenola ovako pripremljenih otopina standarda su 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹. Iz svake tikvice otpipetirati po 0,25 mL otopine i prenijeti u zasebnu odmjernu tikvicu od 25 mL.

U svaku tikvicu dodati 15 mL destilirane vode i dobro promiješati, potom dodati 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa i ponovno dobro promiješati, a nakon jedne minute dodati i 3,75 mL otopine natrijeva karbonata, dobro promiješati i nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Tikvice ostaviti stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega izmjeriti apsorbanciju svake otopine kod 765 nm prema vodi u referentnoj kivetici. Baždarnu krivulju konstruirati mjerenjem apsorbancije u ovisnosti o pripadajućoj koncentraciji.



Slika 11. Otopine standarda (galne kiseline) za izradu baždarne krivulje

Tablica 7. Priprava standardnih otopina fenola za izradu baždarne krivulje ⁽¹³⁾

Volumen fenolnog standarda- (galna kiselina $c=5000 \text{ mg L}^{-1}$) (mL)	Konačne koncentracije (mg/L GAE) u odmjernoj tikvici od 100 mL
1	50
2	10
3	150
5	250
10	500

Postupak:

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirati 0,25 mL uzorka, dodati 15 mL destilirane vode i 1,25 mL reagensa Folin-Ciocalteu. Otopina promiješati i nakon 1 minute dodati 3,75 mL otopine natrijeva karbonata nakon čega otopinu nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Otopina ostaviti da odstoji 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega joj se očita apsorbancija na valnoj dužini od 765 nm. Rezultati se izražavaju u ekvivalentima galne kiseline (GAE) koja je korištena kao standard. Kod određivanja sadržaja neflavonoida u bijelim vinima uzorke nije potrebno razrjeđivati, dok se crna vina razrijede u omjeru 1:10. Prilikom računanja rezultata mora se uzeti u obzir faktor razrjeđenja uzorka.

Vježba 17b: ODREĐIVANJE FLAVONOIDA I NEFLAVONOIDA U VINU

Flavonoidi čine veliku skupinu spojeva i do danas ih je identificirano preko 5000. Nalaze se u voću, povrću te napitcima poput čaja, vina, kave i voćnih sokova. Žuta boja (lat. *flavus* = žut) prvih izoliranih spojeva dala je naziv cijeloj ovoj skupini, iako u nju ubrajamo i crveno-modro obojene antocijane. Temeljni kostur flavonoida je difenilpropanski (C₆-C₃-C₆) sa različitim stupnjem oksidacije središnjeg piranskog prstena.⁽¹⁹⁾

Flavonoidi se određuju metodom uz korištenje formaldehida.^(16,20) Formaldehid reagira s 6- ili 8- položajem na 5,7-dihidroksiflavonoidima formirajući metiol derivate koji se vežu na drugi 6- ili 8- položaj i tako dalje. Kondenzirani produkti se talože i moguće ih je ukloniti filtracijom. Zaostali neflavonoidni fenolni tanini se analiziraju Folin-Ciocalteu metodom.⁽¹⁶⁾

Pribor:

- 2 epruvete, pipete, filter papir, stakleni lijevak, spektrofotometar, kivete

Priprema reagensa:

- **Otopina formaldehida, $\gamma(\text{CH}_2\text{O})=8 \text{ mg mL}^{-1}$:** 2,08 mL formaldehida, w(CH₂O)=36%, otpipetirati u tikvicu od 100 mL i nadopuniti do oznake destiliranom vodom.

Postupak:

U epruvetu otpipetirati 1 mL uzorka, 1 mL 1:4 kloridne kiseline (HCl) i 0,5 mL otopine formaldehida. Otopina ostaviti stajati 24 sata na sobnoj temperaturi nakon čega se filtracijom odstrane kondenzirane molekule. Preostale fenolne spojeve u filtratu odrediti Folin-Ciocalteu metodom. Udio flavonoida izračunati iz razlike udjela ukupnih fenola i neflavonoida prema formuli (37) vodeći računa o faktoru razrjeđenja i načinu pripreme reakcijske smjese.

$$\text{Flavonoidi (mg GAE/L)} = \text{Ukupni fenoli (mg GAE/L)} - \text{Neflavonoidi (mg GAE/L)} \quad (37)$$

Vježba 17c: ODREĐIVANJE FLAVANA

Flavonoidi koji posjeduju zasićen C-lanac na kojem se nalaze hidroksilne grupe poznati su kao flavani; flavan-3,4-dioli i flavan-3-oli spadaju u ovu kategoriju. Nekoliko flavan-3-ola je izolirano i identificirano iz biljnog materijala, ali samo su četiri od njih pronađena u voću. Oni su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-galokatehin, (-)-epigalokatehin.⁽¹⁹⁾

Katehini i epikatehini, pronađeni u različitim biljkama, a u velikoj količini i u lišću zelenog čaja, slični su strukturom antocijanima; ali oni su bezbojni.⁽²¹⁾ Sadržaj ukupnih flavana je određen korištenjem *p*-dimetilaminocinamaldehyd metode (DMACA) razvijenom od *Arnousa i sur. (2001)*⁽²²⁾, koja ima znatnu prednost pred češće korištenom metodom s vanilinom, zbog toga što nema interferencija s antocijanima. Također ova metoda ima veću osjetljivost i specifičnost.⁽²²⁾

Pribor:

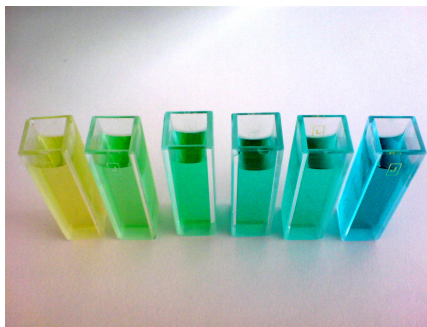
- kivete, pipeta, analitička vaga, spektrofotometar

Priprava reagensa:

- **Otopina HCl u MetOH ($c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol L}^{-1}$):** otpipetirati 8,58 mL 37%-tne kiseline (8,28 mL 38%-tne kiseline) HCl-a u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti metanolom do oznake.
- **Otopina *p*-dimetilaminocinomaldehida (DMACA):** 100 mg DMACA reagensa u 100 mL otopine HCl-a u MetOH.

Postupak:

Vino (0,2 mL) razrijediti metanolom (1:100), prebaciti u epruvetu ili kivetu u koju je dodano 1 mL otopine DMACA reagensa u HCl-u. Smjesu promiješati i ostaviti da reagira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Apsorbancija očitati kod 640 nm pri čemu je u referentnoj kiveti otopina HCl u metanolu. Koncentraciju ukupnih flavana odrediti iz kalibracijske krivulje, konstruirane mjerenjem apsorbancija na 640 nm otopina katehina poznatih koncentracija od 1-16 mg/L. Rezultate izraziti u mg L^{-1} katehin ekvivalenta.



Slika 12. Otopine standarda (katehina) za izradu baždarne krivulje

Vježba 17d: ODREĐIVANJE ANTOCIJANA METODOM IZBJELJIVANJA BISULFITOM

Antocijani su u vodi topivi biljni pigmenti koji se na svjetlu reflektiraju od tamno crvene do plavičaste boje te daju boju grožđu, borovnicama, kupinama, višnjama, brusnicama... Poznato je da su antocijani snažni antioksidansi koji vežu i neutraliziraju visoko reaktivne slobodne radikale, sprječavaju štetno djelovanje UV zračenja te imaju i dobra antibakterijska svojstva. U biljkama je identificirano 200 različitih antocijana. Antocijani se kiselim hidrolizom se razgrađuju na šećer i aglikonski dio. Pokožice crnog grožđa sadrže antocijane u velikoj količini, te su upravo ovi spojevi zaslužni za crvenu boju vina. Tiještenjem grožđa i fermentacijom oni prelaze u groždani sok ili vino, ali i meso bobice grožđa također može sadržavati male količine ovih spojeva.

Najčešće korištena metoda pri određivanju antocijana u vinu je metoda izbjeljivanja s disulfitom *Ribéreau-Gayon* (1958)⁽²³⁾.

Pribor:

- Erlenmeyer tikvica od 100 mL, pipeta, 2 epruvete, spektrofotometar, kivete

Priprava reagensa:

- **Otopina HCl u etanolu, w(HCl)=0,1%:** 1 mL koncentrirane HCl razrijediti etanolom do volumena 100 mL
- **Otopina HCl, w(HCl)=2%:** 5,714 mL 37%-tne HCl nadopuniti do volumena 100 mL destiliranom vodom (paziti na pravilo: KUV- DA, VUK-NE!!!)

- **Otopina natrijeva disulfita, $w(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5)=15\%$:** 15 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ otopiti do volumena 100 mL u prokuhanjoj destiliranoj vodi. Nakon hlađenja otopini dodati 0,2 g Na_2CO_3 zbog postojanosti. Otopinu čuvati se u tamnoj boci.

Postupak:

U odmjernoj tikvici od 50 mL pomiješati 1 mL vina, 1 mL 0,1%-tne otopine HCl u 96%-tnom etanolu i 20 mL 2%-tne otopine HCl. U dvije epruvete otpipetirati po 10 mL alikvota ove smjese. U prvu epruvetu dodati 4 mL otopine destilirane vode (A_1), a u drugu 4 mL otopine natrijeva disulfita (A_2). Apsorbanciju izmjeriti nakon 20 minuta prema referentnoj kivetu s vodom pri 520 nm i izračunati razliku u apsorbanciji ovih dviju otopina.⁽¹⁶⁾

$$A = A_1 - A_2 \quad (38)$$

Otopine standarda, cijanidin-3-glukozida, različitih koncentracija pripremiti istim postupku i služe za izradu baždarne krivulje. Rezultati za količinu antocijana (g L^{-1}) se izražavaju preko količine standarda prema jednadžbi (39)⁽¹⁶⁾:

$$c \text{ (g L}^{-1}\text{)} = \Delta A / e \times (\text{MW}) \times (\text{F}) \quad (39)$$

C- masena koncentracija pigmenta (g L^{-1})

ΔA - razlika u apsorbancijama slijepe probe i uzorka

e- vrijednost molarne apsorbancije

MW- molekulska težina pigmenta

F- faktor razrjeđenja

Vrijednosti molarne apsorbancije cijanidin-3,5-diglukozida iznosi 30,175; a njegova molarna masa je 646 g mol^{-1} ⁽¹⁶⁾, dok za cijanidin-3-glukozid eksperimentalnim putem je dobivena vrijednost $26,60 \text{ L cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, a molarna masa ovog spoja je $448,8 \text{ g mol}^{-1}$.

Vježba 18: ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VINA

U današnje vrijeme je poznato da su flavonoidi jedna od najjačih skupina antioksidansa s sposobnošću reakcije sa slobodnim radikalima. Slobodni radikali su atomi ili skupine atoma koji posjeduju nesporeni elektron u vanjskoj ljusci. Radikali su vrlo reaktivne čestice koje u organizmu uzrokuju oštećenja staničnih membrana, kao i DNA pri čemu dolazi do oštećenja stanice ili njenih funkcija koja može dovesti i do stanične smrti (apoptoze). Smatra se da slobodni radikali imaju značajnu ulogu u nastajanju velikog broja patofizioloških stanja kao što su upale, bolesti srca, procesi starenja pa čak i nastanka zloćudnih tumora. Antioksidansi su molekule koje reagiraju sa slobodnim radikalima i tako prekidaju lančane reakcije koje mogu oštetiti vitalne stanične molekule. Posljednjih desetljeća mnoga istraživanja su pokazala da su biljni flavonoidi vrlo važna skupina prirodnih antioksidansa.

Vježba 18a: METODA "GAŠENJA" SLOBODNOG RADIKALA

2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) je stabilan slobodni radikal koji ima jedan nesporeni valentni elektron na jednom atomu dušikovog mosta. "Gašenje" DPPH radikala je osnova vrlo popularne antioksidacijske metode DPPH.⁽²⁴⁾ Reakcijski mehanizam između antioksidansa i DPPH• ovisi o samoj strukturi antioksidansa. Neki spojevi vrlo brzo reagiraju s DPPH• smanjujući broj molekula radikala za količinu jednaku njihovom broju slobodnih hidroksilnih grupa, dok većina spojeva reagira sporije i mehanizmi tih reakcija su znatno složeniji.⁽²⁵⁾ Antioksidacijska sposobnost je mjera otpuštanja vodika iz molekule antioksidanta, odnosno sposobnosti vezivanja radikala na nju. Reakcija se može pratiti i vizualno zbog promjene boje otopine radikala dodatkom antioksidansa (uzorka vina) iz modro-ljubičaste u bijelo-žutu boju.

Pribor:

- Erlenmeyer tikvica od 250 mL, špatula, spektrofotometar, kivete, pipete

Priprava reagensa:

- **Otopina DPPH:** u 100 mL etanola otopiti 4 mg DPPH.

Postupak:

U kivetu otpipetirati 2 mL DPPH otopine i zabilježiti početnu apsorbanciju otopine radikala ($A_{C(0)}$). U kivetu potom dodati otopinu uzorka (50 μ L) tj. antioksidansa, smjesu dobro promiješati i pratiti promjenu apsorbancije otopine tijekom vremena na valnoj duljini 517 nm. Prvih 10 minuta bilježiti vrijednosti apsorbancije otopine svakih 30 sekundi, a kasnije, kako reakcija postiže ravnotežno stanje, sve rjeđe. Posljednje mjerenje izvoditi 1 sata nakon dodatka uzorka. Za baždarenje spektrofotometra i određivanje nule u referentnoj kiveti koristiti otopinu etanola.

Postotak inhibicije DPPH radikala uzorka izračunati prema jednadžbi (40)⁽²⁶⁾:

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100 \quad (40)$$

A_0 - apsorbancija u vremenu $t=0$

A_t - apsorbancija nakon 1 sata

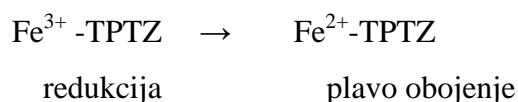
Za svaku vrijednost izmjerene apsorbancije izračunati odgovarajući postotak inhibicije. Stavljanjem dobivenih parametara u grafički prikaz x os (vrijeme)- y os (% inhibicije) konstruirati krivulju kinetike "gašenja" DPPH radikala.

Vježba 18b: METODA TESTIRANJA REDUKCIJSKE SNAGE

Ferric reducing/Antioxidant power, ili skraćeno FRAP metoda, je jednostavan, direktan test antioksidacijskih svojstava čistih spojeva, njihovih smjesa, biljnih ekstrakata ili bioloških uzoraka kao što su krvni serum ili plazma. Metodu su razvili *Benzie i Strain* (1996)⁽²⁷⁾ u cilju istraživanja antioksidacijskih svojstava krvne plazme.

Ne-enzimski antioksidansi (vitamin C, flavonoidi i dr.) mogu se smatrati reducensima i pomoću njih dolazi do inaktivacije oksidansa. Metoda se bazira na redoks-reakciji u kojoj se neka reaktivna vrsta (slobodni radikal) reducira pri čemu dolazi do oksidacije nekog drugog spoja. Prema ovom mehanizmu vidimo da se antioksidacijska sposobnost može opisati kao sposobnost redukcije.

Sumarna reakcija FRAPA:



U kiselom mediju (niski pH) ioni Fe^{3+} će se reducirati ione Fe^{2+} koji se vezuje s 2,4,6-tripiridil-s-triazin reagensom (TPTZ) u kompleks koji apsorbira svjetlo u VIS dijelu spektra. Mjerenja se vrše na valnoj duljini od 593 nm.

Pribor:

- kivete, spektrofotometar, Erlenmeyer tikvica od 150 mL, pipete

Priprava reagensa:

- **Acetatni pufer; 300 mmol L⁻¹, pH 3,6:** otopiti 3,1 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ u destiliranoj vodi po jednoj litri puferske otopine.
- **Otopina TPTZ, c(TPTZ)=10 mmol L⁻¹, c(HCl)=40 mmol L⁻¹:** u 50 mL pripravljene otopine HCl otopiti 159,4 mg TPTZ-a.
- **Otopina HCl, c(HCl)=40 mmol L⁻¹:** 40 mL 0,1 M HCl prenijeti u tikvicu od 100 mL i nadopuniti do oznake destiliranom vodom.
- **Otopina FeCl₃, 20 mmol L⁻¹:** 551,6 mg $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ se otopiti u 100 mL destilirane vode.

Priprava standarda

Kao standard koristiti vodene otopine poznatih koncentracija Fe^{2+} u rasponu od 100-1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Matičnu otopinu standarda pripremiti otapanjem FeCl_2 . Od matične otopine pripremiti standardne otopine niza koncentracija Fe^{2+} od 100-1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Priprava radnog reagensa:

Radni reagens FRAP-a potrebno je pripremiti neposredno prije početka rada na način da se pomiješa 25 mL pripremljenog acetatnog pufera; 2,5 mL otopine TPTZ i 2,5 mL otopine $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Postupak:

Svježe pripravljena radna otopina FRAP reagensa termostatirati na 37°C . U kivetu širine 1 cm otpipetirati se 2,25 mL FRAP reagensa i očitati mu apsorbanciju na 593 nm ($A_{0\text{min}}$). U kivetu s reagensom dodati 75 μL uzorka. Razrjeđenja uzoraka raditi s etanolom (najčešće u omjeru 1:100). Pratiti promjenu apsorbancije pri valnoj duljini 593 nm tijekom 4 minute, s početkom mjerenja od trenutka dodavanja uzorka u kivetu. Po dodatku uzorka stvara se plavo obojenje čiji je apsorpcijski maksimum upravo na 593 nm. Očitana vrijednost apsorbancije nakon 4 minuta označava se s $A_{4\text{min}}$.

Promjena apsorbancije za svaki uzorak izračunati iz izraza:

$$\Delta A_{\text{uzorka}} = A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}}$$

te se uspoređuje s promjenom apsorbancije nakon dodatka standardne otopine Fe^{2+} ($\Delta A_{\text{standarda}}$; za koncentraciju standarda od 1000 $\mu\text{mol/L}$).

FRAP uzorka se izračunati prema jednadžbi (41):

$$\text{FRAP } (\mu\text{mol/L uzorka}) = (\Delta A_{\text{uzorka}} / \Delta A_{\text{standarda Fe}^{2+}}) \times 1000 \times \mathbf{R} \quad (41)$$

R- faktor razrjeđenja uzorka

1000- koncentracija standardne otopine iona Fe^{2+} pripravljene s FeCl_2

Vježba 18c: BRIGGS-RAUSCHER OSCILIRAJUĆA REAKCIJA

Kombinacijom vodikova peroksida i jodata s malonskom kiselinom i manganovim ionima *Briggs* i *Rauscher* (1973) otkrili su zanimljivu oscilirajuću reakciju koja je po njima i nazvana. Oscilirajuće reakcije predstavljaju jedan od najzanimljivijih i najproučavanijih kemijskih fenomena, a Briggs-Rauscherova reakcija je izuzetno zanimljiva jer se može lako vizualno pratiti zbog vidljivih promjena boje reakcijske smjese iz bezbojne preko žute u modru. Po dodatku antioksidanata oscilacije se zaustavljaju te se na taj način može lako pratiti njihova učinkovitost. Efekt se sastoji u trenutačnom zaustavljanju oscilacije, vremenu inhibicije koje linearno ovisi o koncentraciji dodanog antioksidansa i ponovnoj regeneraciji oksidacije.⁽²⁸⁾

Pribor:

- 6 čašica od 50 mL, magnetna miješalica, miješalo, štoperica, pipeta

Priprava standarda

Kao standard koristiti galnu kiselinu pripremljenu otapanjem 0,1 g galne kiseline u tikvici od 100 mL. Tikvicu nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Od ovako pripravljene otopine galne kiseline koncentracije 1000 mg/L pripremiti otopine koncentracija 100, 200, 300 i 500. Stavljanjem u ovisnost koncentraciju standardne otopine (x os) i vremena zadržavanja oscilacije (y os) izraditi baždarne krivulje.

Priprava reagensa:

- **Otopina A:** 4,28 g KIO_3 otopiti u 50 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 100 mL. U čašici pomiješati 0,45 mL H_2SO_4 , $w(\text{H}_2\text{SO}_4)=96\%$, i 20 mL destilirane vode, te otopinu prebaciti u tikvicu s jodatom i nadopuniti do oznake destiliranom vodom.
- **Otopina B:** otopina peroksida, $w(\text{H}_2\text{O}_2)=15\%$, pripremiti netom prije korištenja, miješanjem istih volumena peroksida i destilirane vode (50 mL:50 mL)
- **Otopina C:** 1,561 g malonske kiseline i 0,338 g $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ otopiti u 50 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopinu škroba pripremiti otapanjem 0,03 g škroba u par kapi proključale vode uz trljanje štapićem uz rubove čašice, dodati 20 mL proključale vode, kuhati nekoliko minuta. Ohlađenu otopinu uliti u otopinu malonske kiseline i manganova sulfata, te se nadopuniti sadržaj destiliranom vodom do oznake.

Postupak:

Čašica u kojoj se nalazi magnetna miješalica postaviti na miješalo te se u nju otpipetirati po 10 ml otopina A i C, te uključiti miješanje koje mora biti konstantno tijekom cijele reakcije. Nakon toga dodati 10 mL vodikova peroksida koji inicira reakciju osciliranja. Po dodatku peroksida otopina koja je bezbojna naizmjenice mijenja boju preko žute u modru. Nakon treće pojave modrog obojenja u otopinu dodati 1 mL uzorka i početi mjeriti vrijeme zadržavanja oscilacije sve do ponovne pojave žutog ili plavog obojenja. Izmjereni vrijeme inhibicije oksidacije je pokazatelj jačine antioksidansa odnosno njegove koncentracije.

Vježba 19: ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE VINA

Kušanjem se nastoje ocijeniti organoleptička svojstva vina, tj. svojstva što se mogu upoznati pomoću ljudskih osjetila. Prema tome, ocjenjivati neko vino kušanjem znači ocijeniti njegovu kvalitetu, karakteristike ili nedostatke po izgledu, mirisu i okusu.⁽⁵⁾

Kušanje vina je čin koji u sebi sadrži krupan paradoks. Ocjenjivač se služi isključivo osjetima kojima ga je obdarila priroda, ali u uvjetima koji moraju omogućiti odsustvo svih ostalih utjecaja što mogu djelovati na ljudska osjetila. Situacija se može opisati kao nastojanje da se osjetima, dakle subjektivnim mjerilima, postigne maksimalno objektivna ocjena.

Čimbenici pripreme za organoleptičko ocjenjivanje vina:

- prostorija dobro osvijetljena i prozirna, bez buke i mirisa
- vlažnost zraka mora biti oko 60-70%, temperatura od 18-24°C⁽²⁹⁾
- jedini alat degustatora je čaša
- kruh, kisele jabuke ili sir se koriste za „presijecanje“ okusa
- neposredno prije kušanja nije poželjno jesti ni pušiti.

Prije organoleptičkog ocjenjivanja svakog uzorka ocjenjivačima se daju osnovni podaci o uzorku: godina berbe, podrijetlo proizvodnje, posebne informacije vezane za tehnologiju proizvodnje, informacija o predikatnoj kategoriji i osnovni analitički podaci. Uzorci se evidentiraju i ocjenjuju pod šifrom.⁽²⁹⁾

Posebnu pažnju pri ocjenjivanju vina kušanjem valja posvetiti temperaturi. Najpovoljnija temperatura ambijenta u kojem se kuša je 18 do 20°C, uz 80% relativne vlažnosti zraka. Najpovoljnija temperatura bijelih vina za kušanje je između 10-12°C, za opol i ružice 14 do 16°C, a za crna vina 16 do 18°C.⁽⁵⁾ Čaše za degustaciju moraju biti od prozirnog, tankog, nebrušenog stakla, bez ikakvih ukrasa i šara.

Kada se radi o kušanju više uzoraka, red kušanja treba biti: najprije bijela, pa ružičasta i na koncu crna vina. Prije se kušaju mlada, a zatim stara vina. Kod sličnih tipova, najprije se kušaju slabije alkoholna vina, potom jača. Mirisna vina (aromatična) uvijek se kušaju posljednja.⁽⁵⁾



Slika 13. Različite čaše za kušanje vina

Pribor:

- vadičep, čaša za degustaciju, kuhinjski ručnici, sir ili jabuke

Organoleptičko ocjenjivanje se dijeli u tri faze:

1. Ogledanje

Držeći čašu samo na stolu razgleda se disk (površina vina), da li je dovoljno blistav, osmotri se boja, njen intenzitet, prozirnost i bistrina uzorka. Potom se čaša podigne u razinu očiju i kružno pokreće, kako bi se lakše ocijenila boja sa svim njenim tonovima i nijansama, zatim bistroća i eventualno razvijanje sitnih mjehurića plina.⁽⁵⁾

S obzirom na **boju**, bijelo vino može biti: gotovo bezbojno, svijetlo-zelenkasto, zelenkasto-žuto, žuto, zlatnožuto, tamnožuto, smeđasto, smeđe i tamnosmeđe. Ružičasto vino može biti crvenkasto, svijetlocrveno (svjetlijih i tamnijih nijansi). Crveno vino može biti rubin-crveno, granat-crveno i tamnocrveno do ljubičasto. **Bistroća** vina može graduirati dosta široko, a može se obilježiti izrazima: kristal bistro, bistro, čisto, dosta čisto, maglušasto, maglovito, mutno i vrlo mutno.⁽⁵⁾

2. Njušenje

Njušenje se odvija u tri operacije; prvo je bez micanja površine vina. Ocjenjivač izdahne zrak, stavi nos u čašu i udane punim plućima. Zatim laganim kružnim gibanjem uzgiba vino i opet ga na isti način onjuši. Pri trećem njušenju na mahove se čaša okrene lijevo-desno i vino opet onjuši. Posljednje dvije operacije imaju za svrhu da se poveća površina vina i tako potakne hlapljenje, koje nosi mirise.

Često se pri ocjenjivanju vina njuhom čaša zahvati dlanom ruke, a vino se kružno pokreće kako bi omočilo što veću površinu čaše koju zagrijava toplina dlana. U tim se uvjetima povećava isparavanje mirisnih tvari. Čaša se primakne nosu i pri tom se vino njuši, najprije laganim, a zatim sve dubljim uzdisajima kroz nos. **Miris** vina potječe od velikog broja raznolikih mirisnih tvari i zbog toga varira u širokim granicama. Miris može biti normalan vinski, jače ili slabije razvijen, skladan ili nedostatno skladan. **Aroma** je miris vina tipičan za pojedine sorte grožđa, a može biti neizražena, izražena, slaba, dobra, puna, fina i izrazita. **Buke** (bouquet) vina stvara se tijekom vrenja, dozrijevanja i starenja i vinu daje određenju individualnost. Buke može biti neizražen, slab, umjeren, izražen po intenzitetu, a po kvaliteti neizgrađen, lagan, ljubak, fin i vrlo fin.⁽⁵⁾

3. Kušanje

Okus vina je kombinacija osnovnih osjeta slatkog, gorkog, kiselog i slanog u raznim intenzitetima s dojmovima opipa, osjeta boli topline.⁽⁵⁾ Najprije se u usta uzme malo vina, potisne se naginjanjem glave nazad prema grlu i prije nego će poteći u njega, pognete se naprijed da se vrati u usta. Tako nakon što mu se razbije kompaktnost pneumatskim putem i uhvate sve bitne karakteristike, vino se pusti niz grlo. Tako okušano na raskrižju usta, nosne šupljine i početka grla upotpunjava se dojam.

Vrlo je teško odgovarajućim riječima izraziti okusne dojmove vina u kompleksnom učinku. Stoga, s obzirom na glavne utjecajne sastojke vina, dojmove izražavamo ovim nazivljem:

- obzirom na sadržaj alkohola, vino može biti vrlo slabo, slabo, srednje jako, prilično jako i vrlo jako (iznad 15% alkohola);
- obzirom na ekstrakt, vino može biti prazno, slabo puno, prilično puno, jako puno i izvanredno puno;
- obzirom na sadržaj šećera, vino može biti "suho" kad se slatkoća ne osjeća, slatkasto, slatko i vrlo slatko;
- obzirom na sadržaj tanina (naročito kod crnih vina), ako trpkost posebno ne izbija, vino može biti ljupko, trpkasto ili trpko, odnosno jako trpko ako je trpkost neznatna ili pak jako naglašena;
- obzirom na odnose pojedinih okusnih sastojaka, vino može imati harmoničan ili neharmoničan okus, u većem ili manjem intenzitetu izražen u oba oblika. Neutralnim smatramo vino kod kojeg posebno ne izbija ni jedna od okusnih odlika.⁽⁵⁾

Nakon toga ocjenjivač ocjenjuje vino bilježeći ocjene za svaki uzorak odmah po završetku kušanja. Za boju i bistroću vino može najviše dobiti 15, za miris 30, za okus 44 za ukupan dojam 11 bodova. Maksimalan zbroj dakle može iznositi 100 bodova. Konačna ocjena nekog vina dobije se da se odbiju najniža i najviša ocjena, ostale ocjene degustatora se zbroje i podijele s brojem ocjenjivača.

OBRAZAC ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE ⁽²⁹⁾N^o KOMISIJEN^o OCJENJIVAČAN^o UZORKA

KATEGORIJA VINA

BERBA.....

		Odlično	Vrlo dobro	Dobro	Prolazno	Loše	Primjedbe
IZGLED	Bistroća	5	4	3	2	1	
	Boja	10	8	6	4	2	
MIRIS	Čistoća	6	5	4	3	2	
	Intenzitet	8	7	6	4	2	
	Kvaliteta	16	14	12	10	8	
OKUS	Čistoća	6	5	4	3	2	
	Intenzitet	8	7	6	4	2	
	Trajnost	8	7	6	5	4	
	Kvaliteta	22	19	16	13	10	
Harmonija/ Opći dojam		11	10	9	8	7	

LITERATURA

1. Narodne novine (96/03). *Zakon o vinu*. Zagreb, Narodne novine d.d. Dostupno i na http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2003_06_96_1219.html
2. Narodne novine (02/05). *Pravilnik o proizvodnji vina*. Zagreb, Narodne novine d.d. Dostupno i na http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_01_2_17.html
3. Trajković, J; Marić, M.; Baraš, J.; Šiler, S. (1983). *Analize živežnih namirnica*. Tehnološko-metalurški fakultet. Beograd: Univerzitet u Beogradu.
4. Radovanović, V. *Tehnologija vina*. (1986). Beograd: IRO Građevinska knjiga.
5. Tadijević, V. (2005). *Praktično podrumarstvo*. Split: Marjan tisak.
6. Daničić, M. *Tehnologija vina*. (1985). Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Praktikum, Beograd: Zemun.
7. www.elements4health.com
8. Jacobson, J.L. (2006). *Introduction to wine laboratory practise and procedures*, Springer.
9. www.vinopedia.hr
10. news.thomasnet.com
11. www.vinogradarstvo.hr
12. Narodne novine (57/00). *Pravilnik o vinu*. Zagreb, Narodne novine d.d. Dostupno i na http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1996_11_96_1912.html
13. Zoecklein, B.W.; Fugelsang, K.S.; Gump, B.H.; Nury, F.S. (1999). *Wine Analysis and Production*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
14. Narodne novine (106/04). *Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina*. Zagreb, Narodne novine d.d. Dostupno i na http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2004_07_106_2060.html
15. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J. (1999). *Osnove analitičke kemije*. Zagreb: Školska knjiga.
16. Amerine, M.A.; Ough, C.S. (1980). *Methods for Analysis of Musts and Wines*. New York: John Wiley & Sons.
17. Borčić, S.; Kronja, O. (1991). *Praktikum preparativne organske kemije*. Zagreb: Školska Knjiga, str. 16-54.

18. Singleton, V.L.; Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
19. Shahidi, F.; Naczk, M. (1995). *Food phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, Basel.
20. Kramling, T.A.; Singleton, V.L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20, 86-92.
21. Shahidi, F.; Naczk, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press LLC 1-14; 144-151; 272-288.
22. Arnous, A.; Makris, D.; Kefalas, P. (2001). Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4, 5736-5742.
23. Ribereau-Gayon, P.; Peynaud, E. *Analyses et Controle des Vins*, 2nd ed. Paris and Liege: Libraire Polytechnique.
24. Sharma, O.P.; Tej, K.B. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113, 1202-1205.
25. Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using DPPH• Free Radical Method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 30, 609-615.
26. Yen, G.C.; Duh, P.D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active oxygen species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 629-632.
27. Benzie, I.F.; Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
28. Cervellati, R.; Höner, K.; Furrow, S.D.; Neddens, C.; Costa, S. (2001). The Briggs-Rauscher as a Test to Measure the Activity of Antioxidants. *Helvetica Chimica Acta*, 84, 3533-3547.
29. Narodne novine (106/04). *Pravilnik o organoleptičkom (senzornom) ocjenjivanju mošta i vina*. Zagreb, Narodne novine d.d. Dostupno i na http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2004_07_106_2061.html