Utjecaj primjene pektolitičkih enzima na sadržaj antocijana tijekom vinifikacije crnog grožđa

Ivandić, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:958703

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

UTJECAJ PRIMJENE PEKTOLITIČKIH ENZIMA NA SADRŽAJ ANTOCIJANA TIJEKOM VINIFIKACIJE CRNOG GROŽĐA

ZAVRŠNI RAD

LUKA IVANDIĆ

Matični broj: 1403

Split, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

STRUČNI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE

SMJER: PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

UTJECAJ PRIMJENE PEKTOLITIČKIH ENZIMA NA SADRŽAJ ANTOCIJANA TIJEKOM VINIFIKACIJE CRNOG GROŽĐA

ZAVRŠNI RAD

LUKA IVANDIĆ

Matični broj: 1403

Split, rujan 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

PROFFESIONAL STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

COURSE: FOOD TECHNOLOGY

INFLUENCE OF THE PECTOLYTIC ENZYMES ON ANTHOCYANIN CONTENT IN RED WINE DURING ITS PROCESSING

BACHELOR THESIS

LUKA IVANDIĆ

Parent number: 1403

Split, September 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Stručni studij kemijske tehnologije; smjer Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić
Pomoć pri izradi: Dr. sc. Ana Kokeza

UTJECAJ PRIMJENE PEKTOLITIČKIH ENZIMA NA SADRŽAJ ANTOCIJANA TIJEKOM VINIFIKACIJE CRNOG GROŽĐA

Luka Ivandić, 1403

Sažetak:
Posljednjih godina je sve više u porastu interes znanstvenika i stručnjaka za antocijanima, bilo zbog njihove upotrebe kao prirodna bojila ili dokazanom pozitivnom učinku na zdravlje. Pektolitički enzimi koji se učestalo koriste tijekom procesa prerade grožđa u vino imaju izravan utjecaj na ekstrakciju antocijana iz pokožice grožđa u mošt, a samim time i na koncentraciju antocijana u vinu. Njihovom primjenom povećava se randman mošta i vina, stabiliziraju tvari boje i tanini te se znatno olakšava dorada vina i njegovo bistrenje. U ovom završnom radu zadatak je bio pratiti i usporediti utjecaj dvaju pektolitičkih enzima, *Vinozym Vintage FCE* i *Sihazym Extro*, na koncentraciju antocijana tijekom vinifikacije sorti *Babica* i *Crljenak kaštelanski*. Kao referentni uzorci za usporedbu su korišteni uzorci grožđa čija vinifikacija se provodila bez dodatka enzimskog preparata. Za određivanja antocijana je korištena metoda bisulfitnog izbjeljivanja. Sadržaj antocijana u uzorcima se mijenjao tijekom vinifikacije, a u konačnici je očekivano rezultirao znatno većim udjelom ovih spojeva u usporedbi sa uzorkom s početka postupka. Sadržaj antocijana u svim uzorcima *Babice* bio je veći nego li u uzorcima *Crljenka kaštelanskog* bez obzira na tip vinifikacije, a najveći je bio kod vina proizvedenog primjenom pektolitičkog preparata *Sihazym Extro*. U slučaju *Crljenka kaštelanskog* najveći sadržaj antocijana je imao uzorak vina pripravljen korištenjem preparata *Vinozym Vintage FCE*.

Ključne riječi: antocijani, pektolitički enzimi, metoda bisulfitnog izbjeljivanja, spektofotometrija

Rad sadrži: 33 stranica, 14 slika, 8 tablica, 33 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Dr. sc. Mario Nikola Mužek, znan. sur.
2. Dr. sc. Danijela Skroza, znan. sur.
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić, viši znan. sur.

Datum obrane: 20. rujna 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Proffesional study of Chemical Technology; Course: Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 21.
Mentor: Assistant Professor Ivana Generalić Mekinić. Ph. D.
Technical assistance: Ana Kokeza. Ph. D.

INFLUENCE OF THE PECTOLYTIC ENZYMES ON ANTHOCYANIN CONTENT IN RED WINE DURING ITS PROCESSING

Luka Ivandić, 1403

Abstract:
In last few years there is increased interest of scientist and experts toward anthocyanins; due to their use as natural colorants or due to their positive biological effects on human health. Pectolytic enzymes that are usually used during winemaking have direct impact of the extraction of anthocyanins from grape berry skin into must, and therefore on antocyanin content in wine. Use of enzymes increase randman of must and wine, stabilise colour components and tanins, and also makes easier processes of wine fining. The aim of this work was to monitor and compare effect of two pectolytic enzymes, *Vinozym Vintage FCE* and *Sihazym Extro*, on anthocyanin content of wines from *Babica* and *Crljenak kaštelanski grapes*. As a blank wines produced without any enzymes were used. For antocyanin content determinations bisulphyte bleaching method was used. The anthocyanidin content in samples changed during the vinification, but as expected it resulted with significantly higher amounts of anthocyanins in wines than in samples from the first day of maceration. Antocyanin content in all *Babica* samples was higher than in samples of *Crljenak kaštelanski* irrespective to the used winemaking procedure, and it was highest in wine produced using *Sihazym Extro*. For *Crljenak kaštelanski* grapes the highest content of anthocyanins was detected in samples produced using *Vinozym Vintage FCE enzymes*.

Keywords: anthocyanins, pectolytic enzymes, bisulphyte bleaching method, spectrophotometry

Thesis contains: 33 pages, 14 figures, 8 tables, 33 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Mario Nikola Mužek
2. Ph. D. Danijela Skroza
3. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor

Defence date: September 20. 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić, u razdoblju od ožujka do rujna 2017. godine.

ZAHVALA

Prvenstveno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na stručnim savjetima, uloženom trudu, vremenu, strpljenju i pomoći bez čega ovaj rad ne bi bio moguć. Zahvaljujem joj se na podršci tijekom izrade ovog rada, kao i tijekom cijelog studija. Također, zahvaljujem se i dr. sc. Ani Kokezi na pomoći u izvođenju eksperimentalnog dijela rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na pomoći, razumijevanju i potpori koju su mi pružili tijekom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je odrediti koncentraciju antocijana koji se ekstrahiraju tijekom vinifikacije iz pokožice crnog grožđa autohtonih sorti kaštelanskog vinogorja; *Crljenka kaštelanskog* i *Babice* i usporediti sadržaj antocijana u uzorcima vina skupljenim tijekom vinifikacije u probi u kojoj se izvodila klasična vinifikacija sa probama kod kojih su u vinifikaciji korišteni enzimski preparati (*Vinozym Vintage FCE* i *Sihazym Extro*).

SAŽETAK

Posljednjih godina je sve više u porastu interes znanstvenika i stručnjaka za antocijanima, bilo zbog njihove upotrebe kao prirodna bojila ili dokazanom pozitivnom učinku na zdravlje. Pektolitički enzimi koji se učestalo koriste tijekom procesa prerade grožđa u vino imaju izravan utjecaj na ekstrakciju antocijana iz pokožice grožđa u mošt, a samim time i na koncentraciju antocijana u vinu. Njihovom primjenom povećava se randman mošta i vina, stabiliziraju se tvari boje i tanini, te se znatno olakšava dorada vina i njegovo bistrenje. U ovom završnom radu zadatak je bio pratiti i usporediti utjecaj dvaju pektolitičkih enzima, *Vinozym Vintage FCE* i *Sihazym Extro*, na koncentraciju antocijana tijekom vinifikacije sorti *Babica* i *Crljenak kaštelanski*. Kao referentni uzorci za usporedbu su korišteni uzorci čija se vinifikacija provodila bez dodatka enzimskog preparata. Sadržaj antocijana je određen metodm bisulfitnog izbjeljivanja. Udio antocijana u uzorcima se mijenjao tijekom vinifikacije, a u konačnici je očekivano rezultirao znatno većim udjelom ovih spojeva u usporedbi sa uzorkom sa početka postupka. Sadržaj antocijana u svim uzorcima *Babice* bio je veći nego li u uzorcima *Crljenka kaštelanskog* bez obzira na tip vinifikacije, a najveći je bio kod vina proizvedenog primjenom pektolitičkog preparata *Sihazym Extro*. U slučaju *Crljenka kaštelanskog* najveći sadržaj antocijana imao je uzorak vina pripravljen korištenjem preparata *Vinozym Vintage FCE*.

Ključne riječi: antocijani, pektolitički enzimi, metoda bisulfitnog izbjeljivanja, spektofotometrija

SUMMARY

In last few years there is increased interest of scientist and experts toward anthocyanins; due to their use as natural colorants or due to their positive biological effects on human health. Pectolytic enzymes that are usually used during winemaking have direct impact of the extraction of anthocyanins from grape berry skin into must, and therefore on antocyanin content in wine. Use of enzymes increase randman of must and wine, stabilise colour components and tanins, and also makes easier processes of wine fining. The aim of this work was to monitor and compare effect of two pectolytic enzymes, *Vinozym Vintage FCE* and *Sihazym Extro*, on anthocyanin content of wines from *Babica* and *Crljenak kaštelanski grapes*. As a blank wines produced without any enzymes were used. For antocyanin content determinations bisulphyte bleaching method was used. The anthocyanidin content in samples changed during the vinification, but as expected it resulted with significantly higher amounts of anthocyanins in wines than in samples from the first day of maceration. Antocyanin content in all *Babica* samples was higher than in samples of *Crljenak kaštelanski* irrespective to the used winemaking procedure, and it was highest in wine produced using *Sihazym Extro*. For *Crljenak kaštelanski* grapes the highest content of anthocyanins was detected in samples produced using *Vinozym Vintage FCE* enzymes.

Keywords: anthocyanins, pectolytic enzymes, bisulphyte bleaching method, spectrophotometry

SADRŽAJ

UVOD 1
1. OPĆI DIO 2
1.1. Povijest vinove loze 2
1.1.1. Rasprostranjenost vinove loze u svijetu 2
1.1.2. Vinogradarstvo u Republici Hrvatskoj 3
1.3. Crljenak kaštelanski 5
1.4. Tehnologija proizvodnje crnog vina 6
1.4.1. Berba i prijevoz grožđa 8
1.4.2. Primarna prerada grožđa 8
1.4.3. Alkoholna fermentacija 9
1.4.4. Maceracija 10
1.4.5. Otakanje 10
1.4.6. Tiještenje (prešanje) 11
1.4.7. Tiho vrenje 11
1.4.8. Malolaktična fermentacija 11
1.4.9. Dorada i njega vina 12
1.5. Upotreba pektolitičkih enzima 13
1.5.1. Vinozym Vintage FCE 13
1.5.2. Sihazym Extro 14
1.6. Antocijani (tvari boje) 14
2. EKSPERIMENTALNI DIO 16
2.1. Uređaji i kemikalije 16
2.2. Biljni materijal i postupak vinifikacije 16
2.3. Određivanje antocijana metodom bisulfitnog izbjeljivanja 18
3. REZULTATI 19
3.1. Rezultati određivanja sadržaja antocijana u uzorcima vina sorte Babica 19
3.2. Rezultati određivanja sadržaja antocijana u uzorcima vina sorte Crljenak kaštelanski 22
4. RASPRAVA 27
5. ZAKLJUČAK 30
6. LITERATURA 31

UVOD

Za proizvodnju grožđa i vina koriste se mnogobrojni kultivari vinove loze (*Vitis vinifera* L.), koja pripada porodici *Vitaceae*. Svaku pojedinu biljku odnosno jedinku vinove loze nazivamo trsom, panjom ili čokotom, a čine je različiti podzemni i nadzemni organi od kojih svaki ima svoju zadaću. Vegetativni organi su korijen, stablo, pupovi, mladice, itd., dok su generativni organi loze cvijet, cvat, grozd, vitica, bobica i sjemenka.[1]

Proizvodnja vina je složen tehnološki proces koji se može opisati u nekoliko osnovnih koraka; berba i primarna prerada grožđa, zatim alkoholno vrenje mošta ili masulja (fermentacija) te naposljetku dorada, stabilizacija i sazrijevanje vina.

U fazi berbe i primarne prerade grožđa još uvijek imamo organoleptička i kemijska svojstva sirovine jer u toj fazi grožđe nije podvrgnuto nikakvim kemijskim i biološkim promjenama već dominiraju fizikalni odnosno mehanički postupci. Alkoholna fermentacija je faza u kojoj tek počinje nastajati vino, jer se pod utjecajem kvasaca za vrenje odvija biokemijski proces razlaganja šećera u moštu na etanol, CO_2 i ostale sastojke. U proizvodnji crnog vina nakon maceracije i fermentacije slijede faze dorade i formiranja finalne kvalitete vina.[2]

Jedni od važnijih sastojaka crnog vina su antocijani koji daju crvenu do crnu boju grožđu, a nalaze se primarno u pokožici bobe grožđa. Tijekom postupaka tiještenja, maceracije i fermentacije ove komponente prelaze u vino i zaslužne su za njegovu boju. Osim toga, antocijani su poznati i kao snažni antioksidansi koji vežu i neutraliziraju slobodne radikale, sprječavaju štetno djelovanje UV zračenja te imaju dobra antibakterijska svojstva.[3] Iz ovog razloga antocijani su vrlo važni u samom grožđu kojeg štite od negativnih utjecaja, ali i u vinu jer se smatra da doprinose njegovom pozitivnom učinku na ljudsko zdravlje.

1. OPĆI DIO

1.1. Povijest vinove loze

Povijest vinogradarstva i vinove loze seže daleko u prošlost pa tako već u arheološkim nalazima postoje brojni dokazi o razvijenom vinogradarstvu i proizvodnji vina. Smatra se da kultivari *Vitis vinifera* izvorno potječu s područja oko Kaspijskog mora i Male Azije[4], dok su najstariji dokazi o proizvodnji vina nađeni na području današnjeg sjevernog Irana gdje su pronađeni vrčevi za piće za koje se smatra da su stari oko 5000-5400. g. pr. Krista. Oko 4000 g. pr. Krista uzgoj vinove loze bio je razvijen na području Mezopotamije, Sirije i Egipta. Vino je bilo piće povlaštenih (faraona, plemstva, svećenstva) što pokazuju razni zapisi i crteži koji krase faraonske grobnice. Jedan od najstarijih pisanih zakona u kojem se spominju propisi za vino i vinogradarstvo je Hamurabijev zakonik iz 1700. g. pr. Krista. Za daljnje širenje vinove loze prema zapadu zasluge se pripisuju antičkoj Grčkoj, a za pojavu vinove loze u državama Novog svijeta zaslužni su doseljenici iz Europe.[1]

1.1.1. Rasprostranjenost vinove loze u svijetu

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) autohtona je biljna vrsta Europe i zapadne Azije, a otkrićem i naseljavanjem novih kontinenata prenesena je i na to područje.[1] Danas je uzgoj vinove loze raširen na svim kontinentima osim na Antarktici, ali se uspješno uzgaja samo u regijama koje imaju odgovarajuću klimu odnosno na područjima toplih i suhih ljeta te relativno blagih zima s dovoljnom količinom kiše.[4] Upravo zbog toga, neke zemlje ili njihove pokrajine (Francuska, Španjolska, Kalifornija,...) razvile su vinogradarstvo kao snažnu granu gospodarstva, njegujući ne samo poljoprivredu već i turizam, po čemu su postale prepoznatljive u svijetu.[1]

Danas je vinova loza najrasprostranjenija voćna vrsta na svijetu, a od nje se ne proizvodi samo vino već i brojni drugi proizvodi kao što su: sok od grožđa, stolno grožđe, suhice, itd. Najveće površine pod vinogradima nalaze se u Europi i zauzimaju oko 60% ukupnih svjetskih površina iako se posljednjih godina broj vinograda u Europi smanjuje. Nasuprot europskom trendu smanjivanja površina pod vinogradima na drugim

kontinentima se te površine znatno povećavaju. Osobito se u povećanju broja vinograda ističu SAD, Čile, Argentina, Australija pa čak i Kina.[5]

1.1.2. Vinogradarstvo u Republici Hrvatskoj

Zemljopisni položaj, burna povijest, veze s raznim narodima i kulturama omogućili su našoj zemlji introdukciju brojnih stranih sorti, ali zasigurno je da je veliki broj sorti i nastao ovdje. Introdukcija je započela s grčkom kolonizacijom Jadrana što se smatra početkom uzgoja vinove loze na ovim prostorima. Vrlo je malo sačuvanih zapisa o sortama i njihovim imenima, a spominju se tek *Malvasija dubrovačka* u 14. stoljeću i *Crljenak kaštelanski* (*Tribidrag* ili *Zinfandel*) u 16. stoljeću.[5] Polovinom 20. stoljeća vinogradarstvo je bila važna gospodarska grana u Hrvatskoj s oko 62000 ha površine pod vinogradima.[1]

Danas se vinogradarsko područje Hrvatske dijeli na dvije regije; Kontinentalnu i Primorsku regiju s pripadajućim podregijama. Kontinentalnoj Hrvatskoj pripadaju: Podunavlje, Slavonija, Moslavina, Prigorje-Bilogora, Plešivica, Pokuplje i Zagorje-Međimurje, dok Primorskoj Hrvatskoj regiji pripadaju Istra, Hrvatsko Primorje, Sjeverna Dalmacija, Dalmatinska Zagora i Srednja i Južna Dalmacija.[6]



Slika 1. Vinogradarska područja Republike Hrvatske[7]

Iako su se danas površine pod vinogradima znatno smanjile, to ne umanjuje gospodarski značaj vinogradarstva osobito zbog biološkog značaja vinove loze koja se uzgaja na površinama gdje druge kulture ne mogu opstati, a to su brežuljkasti i strmi tereni Kontinentalne Hrvatske te oskudna, kamenita i pjeskovita tla Primorske Hrvatske.[1]

Prema statističkim podatcima, danas, u Hrvatskoj ima 28000 ha vinograda iako struktura vinogradarskih parcela nije povoljna zbog njihove veličine. Stoga je najveći problem hrvatskog vinogradarstva usitnjenost parcela odnosno površina na kojima se loza uzgaja.[8]

1.2. *Babica* [8, 9]

Drugi naziv: *Kaštelanka*



Slika 2. Grozd *Babice* [10]

Podrijetlo i rasprostranjenost: Sorta *Babica* se smatra relativno mladom sortom jer se ne nalazi u Dalmatinskoj ampelografiji Stjepana Bulića koja daje detaljan osvrt na sorte vinove loze u prijelazu iz 19. u 20. stoljeće. *Babica* je direktni potomak *Plavca malog*, a uzevši u obzir da je uglavnom nalazimo na području Kaštela, pretpostavljamo da je tamo i nastala. Sorta se uzgaja uglavnom u vinogorjima Trogir-Kaštela koja spadaju u podregiju Srednja i Južna Dalmacija. Uz *Plavac mali* crni najznačajnija je sorta navedenog područja i uglavnom je osnova za proizvodnju tradicionalnog kaštelanskog ružičastog vina Opola.

Botanički opis: Grozd sorte *Babica* je srednje velik, srednje zbijen do zbijen, koničan, često s jednim ili dva krilca. Bobice su srednje veličine i okrugle, a kožica tamno modre boje s obilnim maškom. Meso bobice je sočno i ukusno.

Praktična iskustva: Za njeno širenje u proizvodnim nasadima zaslužni su stabilna i redovita rodnost, vrlo dobra kakvoća i povoljne uzgojne karakteristike. Od sorte *Babica* se mogu proizvesti laganija crna vina koja se mogu piti kao mlada. Vinificira se obično u kombinaciji s nekim drugim lokalno važnim sortama koja pridonose kakvoći takvih vina.

1.3. *Crljenak kaštelanski* [8, 9]

Drugi naziv: *Tribidrag, Zinfandel, Pribidrag, Primitivo, Kratošija*



Slika 3. Grozd *Crljenka kaštelanskog* [11]

Podrijetlo i rasprostranjenost: Podaci o njegovom uzgoju na Hvaru i Visu sežu u 15. stoljeće, međutim krajem 20. stoljeća ova sorta je gotovo izumrla, a tek poneki trs je pronađen na kaštelanskom i omiškom području. Daljnjim genetičkim analizama utvrđeno je da je *Crljenak kaštelanski* roditelj najznačajnijoj dalmatinskoj sorti, *Plavcu malom* crnom te da se pod imenom *Primitivo* uzgaja u Italiji, pod imenom *Zinfandel* u Kaliforniji i pod imenom *Kratošija* u Crnoj Gori. Danas se sorta ponovno intenzivno uzgaja na području srednje i južne Dalmacije, priobalju te na otocima i ponovno postaje gospodarski važna.

Botanički opis: Grozd *Crljenka kaštelanskog* je velik, srednje zbijen do zbijen, različitih oblika (cilindričan ili blago konusan, često s krilcima). Bobica je srednje velika i okrugla, kožica tamnomodra, a meso sočno i neutralno.

Praktična iskustva: Iskustva pokazuju da je sorta prikladna za proizvodnju vrhunskih crnih vina dobre obojenosti, a s obzirom na ranije dozrijevanje i visok sadržaj sladora, prikladan je i za proizvodnju desertnih vina.

1.4. Tehnologija proizvodnje crnog vina

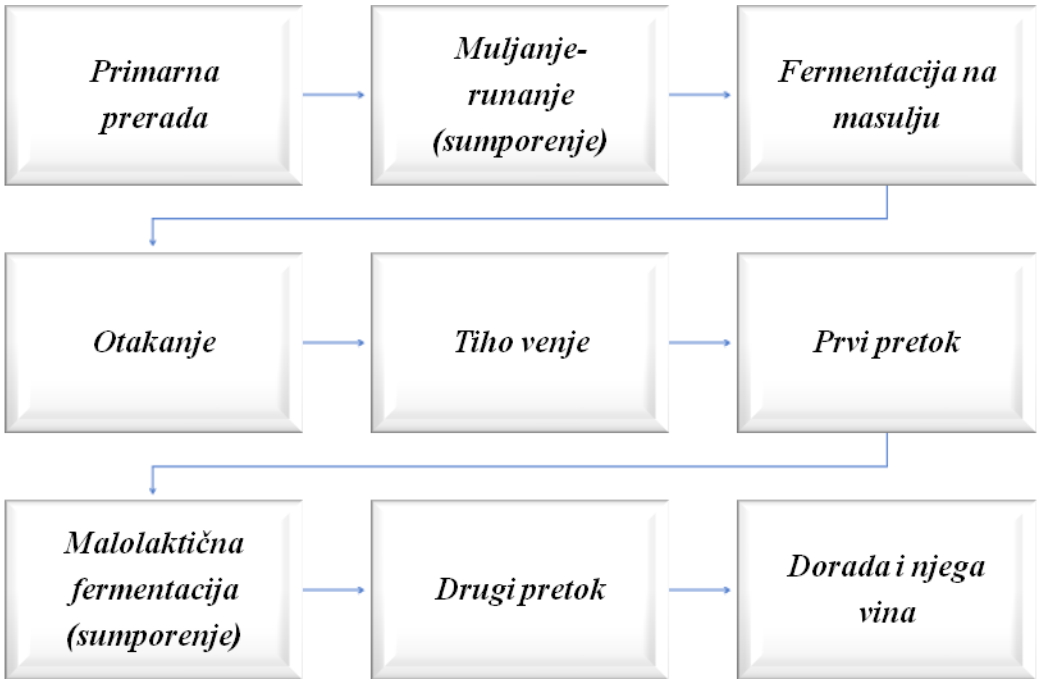
Berba i prerada grožđa su najznačajniji postupci za vinogradare i vinare jer tada vinogradari privode kraju svoj mukotrpan posao oko proizvodnje grožđa, a vinari počinju svoj vrlo složen posao oko prerade grožđa i proizvodnje vina. Da bi se dobilo kvalitetno i zdravo grožđe, pored niza prirodnih faktora, mora se vršiti pravilna vinogradarska praksa te održavati zaštita vinove loze od bolesti i štetočina. Osim toga, za dobivanje kvalitetnog i zdravog vina potrebno je pravilno i pravovremeno obaviti berbu grožđa, pravilno rukovati s grožđem do mjesta prerade odnosno podruma i uraditi preradu, postupak vinifikacije, ali i pravilno njegovati i čuvati vino sve do njegove konzumacije.[2]

Proizvodnja crnih vina obuhvaća primarnu preradu (berba i prijevoz), muljanje-runjanje, alkoholno vrenje, otakanje, tiještenje krutog dijela masulja, tiho vrenje, malolaktičnu fermentaciju (ne nužno) i doradu i njegu vina (slika 4.).

Crno vino se proizvodi postupkom fermentacije masulja crnog grožđa, tj. smjese čvrste i tekuće faze dobivene gnječenjem grožđa. Postupkom muljanja i runjenja, tj. gnječenjem bobica i uklanjanjem peteljki se dobije masulj.[12] Kako mošt (grožđani sok, tekuća faza masulja) nije dovoljno obojen jer postupkom muljanja ekstrakcija tvari boje iz pokožice grožđa nije toliko učinkovita, pristupa se postupku maceracije. Maceracija je ostavljanje masulja neko vrijeme da odstoji kako bi došlo do postupnog izdvajanja sastojaka iz čvrstih dijelova grožđa, prvenstveno tvari boje iz pokožice grožđa, ali i ostalih komponenata kao što su ostali fenolni spojevi, tvari arome, tanini... Tijekom maceracije koja se odvija paralelno s postupkom fermentacije kod crnih vina, pod utjecajem enzima (iz kvasaca ili iz dodanih), topline stvorene vrenjem, ugljičnog dioksida i stvorenog alkohola iz stanica pokožice grožđa se izdvaja glavnina tvari boje.[12,13]

Pod klasičnim postupkom vinifikacije crnog grožđa podrazumijeva se vrenje masulja u drvenim sudovima, tzv. kacama. Kod ovog postupka se uslijed uzgona ugljičnog dioksida prema vrhu posude krute čestice dižu na površinu tekućeg dijela masulja formirajući klobuk koji se tijekom frementacije mora povremeno potapati kako zbog prisustva zraka ne bi došlo do razvoja patogenih mikroorganizama, a pogotovo octenih bakterija. Potapanje klobuka se obično provodi 3-4 puta dnevno ili se isti drži stalno uronjen u mošt postavljanjem drvene rešetke otprilike 20 cm ispod površine masulja. Maceracija klasičnim postupkom obično traje 7-8 dana, a može i do 15 dana. Maksimum izdvajanja antocijana događa se između trećeg i petog dana, a pojačana ekstrakcija tanina od osmog dana nadalje. Nakon djelomične fermentacije masulja provodi se otakanje.[13, 14]

Vinimatici (vinifikatori) su uređaji za brzo provođenje postupka vrenja, ekstrakcije boje, tanina, mirisnih komponenti i drugih tvari iz kožice bobice crnog grožđa. Za svaku sortu i za svaki tip vina kojeg se želi proizvesti vrijeme potrebo da grožđe provede u vinifikatoru je različito.[13]



Slika 4. Tehnološka shema proizvodnje crnog vina.

1.4.1. Berba i prijevoz grožđa

Organizacija berbe jedan je od čimbenika koji utječe na daljnji proces prerade grožđa i proizvodnju mošta. Berba mora biti organizirana tako da dnevno ubrana količina grožđa odgovara kapacitetu podruma u kojem se vrši njegova prerada. Pravilno određeno vrijeme berbe jedan je od nužnih uvjeta za proizvodnju vrhunskih vina. Podrumar mora pratiti procese sazrijevanja grožđa tijekom 15 dana prije berbe, a optimalan termin berbe ovisi o brojnim čimbenicima među kojima su najznačajniji stupanj zrelosti i zdravstveno stanje grožđa te vremenske prilike u razdoblju berbe. Hoće li berba početi ranije ili kasnije ovisi o samoj sorti, količini uroda i površini vinograda u kojem treba obaviti berbu do određenog roka. Grozdove nakon branja treba prebaciti u sanduke ili letvarice volumena 20-30 kg i neoštećeno dovesti do mjesta prerade, s tim da je i prijevoz grožđa do podruma potrebno obaviti u što kraćem roku.[14,15]

1.4.2. Primarna prerada grožđa

Runjanje i muljanje su prve radnje u procesu primarne prerade grožđa. Ove radnje predstavljaju odvajanje bobice od peteljke (runjanje) i potom gnječenje bobica (muljanje) kako bi se oslobodio grožđani sok - mošt.[16]

Runjača-muljača je uređaj čijom primjenom se objedinjuju ova dva postupka, a sastoji se od lijevka za prihvat grožđa, rupičastog cilindra (valjka) za odvajanje bobica od peteljkovine i valjaka koji gnječi bobice grožđa. Prvobitni način dobivanja masulja bio je gnječenje ili muljanje grožđa nogama ili na muljači bez odvajanja peteljkovine, a danas se na modernim strojevima odvajanjem peteljkovine dobije smjesa soka (mošta) i krutih dijelova bobice (sjemenka i kožica), odnosno masulj.[13] Također treba paziti da ne dođe do velikog kidanja i gnječenja kožice i sjemenki jer su ti dijelovi grožđa bogati taninskim tvarima koje daju gorčinu, trpkost i opornost moštu i vinu, a sjemenke sadrže čak i ulja. U ovakvom stanju mošt podliježe alkoholnoj fermentaciji, a čvrsti dijelovi maceraciji.[17] Tijekom muljanja, u svrhu privremenog zaustavljanja aktivnosti nepoželjnih kvasaca dok se koristan kvasac ne počne razmnožavati, preporučuje se dodavanje SO_2 (zdravom grožđu otprilike 10 mg/L vinobrana).[18]

1.4.3. Alkoholna fermentacija

Proces alkoholne fermentacije je zapažen vrlo davno, ali se tumačio na razne načine, zavisno o vremenu razvoja ljudskog društva. Istraživanjem fermentacije bavili su se mnogi znanstvenici, među kojima su: Stahl, Lavosier, Gay-Lussac, Leuwenhook, Cagnard de la Tour, Schwan, von Liebig, Pasteur i brojni drugi. Na kraju, 1985. godine Buchner u stanicama kvasaca pronalazi pravog izazivača fermentacije kojeg naziva zimaza. Danas je dokazano da zimaza predstavlja smjesu enzima bez koje ne bi bilo pretvorbe šećera u alkohol što je zapravo sami temelj procesa.[17]

Nositelj procesa alkoholnog vrenja je kvasac, živo biće svrstano u carstvo gljiva. Iako postoji velik i raznolik broj rodova, vrsta i sojeva kvasaca za vinarstvo su najznačajnije vrste iz roda *Saccharomyces*. Kvasci iz vinograda (sa rozgve i bobice) kada dođu u mošt uzrokuju vrenje koje nazivamo *spontanim vrenjem*. Takvi „divlji" kvasci nisu u stanju udovoljiti svim zahtjevima proizvodnje kvalitetnog vina, pa se u mošt dodaje selekcionirani vinski kvasac i on uzrokuje poželjno vrenje koje nazivamo *dirigirano vrenje*.[13]

Kao i svakom živom biću i kvascu je za život potrebna energija. On energiju dobiva putem procesa disanja i fermentacije. U prvom slučaju kvasac koristi šećer u prisutnosti kisika iz zraka, a u drugom samo šećer. Jedan i drugi proces se smjenjuju ovisno o tome koliko kisika kvasac ima na raspolaganju. Pri aerobnim uvjetima kvasac na račun kisika koristi relativno velike količine energije, a najveći dio troši na razmnožavanje pri čemu se kao krajnji proizvod disanja razvijaju voda i ugljikov dioksid, što znači da u ovom slučaju transformacija šećera ide do kraja. Pod anaerobnim uvjetima reakcija teče po tipu fermentacije. Pri takvim uvjetima transformacija šećera ne ide do kraja već se zadržava na nivou razvijanja alkohola i ugljikovog dioksida. Da bi si osigurao najnužniju energiju za opstanak, kvasac mora fermentirati velike količine šećera u odnosu na svoju masu, a to je od velikog praktičnog značaja jer se tada stvaraju alkohol i CO_2.

Za tehnologiju vina od velikog su značaja i disanje i fermentacija. Disanjem se kvasac razmnožava čime se osigurava dovoljan broj stanica koje će pod anaerobnim uvjetima kod fermentacije prevesti šećer u alkohol i CO_2.[17]

Kod procesa alkoholne fermentacije vrlo je važno obratiti pažnju na temperaturu vrenja. Fermentacija je egzoterman proces, što znači da se postupkom vrenja stvara energija i dolazi do povišenja temperature. Pri proizvodnji crnih vina fermentacija može početi već pri 20ºC i rasti preko 30ºC. Ali kako se temperatura povisuje, tako kvasci koji

uzrokuju vrenje sve sporije rade i na temperaturi od oko 35ºC prestaju s radom. Zato je potrebno pratiti temperaturu i po potrebi hladiti mošt.[19]

1.4.4. Maceracija

Kod proizvodnje crnih vina od posebnog značaja je faza maceracije odnosno kontakt krute i tekuće faze prilikom čega dolazi do prelaska pojedinih sastojaka iz čvrstih dijelova grožđa u vino. Među tim sastojcima najvažnije su tvari boje i tanini, a zatim i druge tvari kao npr. polisaharidi, proteini, peptidi koji potječu iz grožđa i iz stanične stjenke kvasaca.[20] Pri muljanju grožđa dolazi do većeg ili manjeg oštećenja pokožice čime se omogućava prelazak tanina i tvari boje iz pokožice grožđa u vino. Proces ekstrakcije tvari iz čvrstog dijela grožđa u vino nazivamo *maceracija*.[17] Složenost ovog procesa proizlazi iz toga što žive stanice pokožice pri normalnim uvjetima ne otpuštaju antocijane, već to čine samo pri uvjetima koji ometaju njihovo disanje kao npr. atmosfera bez kisika ili atmosfera zasićena CO_2. Također, topljivost antocijana i njihovu ekstrakciju iz pokožice pomaže visoka temperatura i prisutnot alkohola. To su uvjeti koji se javljaju kod alkoholne fermentacije, tako da maceracija teče paralelno s fermentacijom.[17, 19]

Proces maceracije možemo izazvati i stavljanjem cijelog grožđa u atmosferu zasićenu ugljikovim dioksidom, bez muljanja i runjanja, pri čemu dolazi do asfikcije (gušenja) stanica pokožice, a s time i do otpuštanja bojenih tvari.[2]

Ovisno o vrsti vina koja se proizvodi, količini tanina, boje i okusa pojedinog vina, maceracija može trajati od 2-3 dana pa sve do 28 dana. Sve dok se željene tvari iz pokožice ne ekstrahiraju u vino.[19]

1.4.5. Otakanje

Otakanjem odvajamo tekuću fazu, znači mlado vino ili djelomično prevreli masulj (mošt) od krutih dijelova. Kožica i ostale krute tvari koje su zaostale u kaci (posudi za vrenje) bit će prebačene u prešu gdje će se iz njih iscijediti preostali tekući dio tj. vino. Vrijeme otakanja ovisi o tipu crnog vina kojeg se želi proizvesti. Vino koje prilikom

otakanja slobodno iziđe iz kace se naziva samotokom i smatra se najkvalitetnijom frakcijom vina.[13, 19]

1.4.6. Tiještenje (prešanje)

Prešanje se vrši nakon otakanja, kada se grožđani sok ne odvaja odnosno otače pod utjecajem gravitacije iz masulja, već je za njegovo odvajanje potrebno koristiti mehaničku silu. Postupak prešanja se može izvoditi više puta, ali svakim prešanjem vino sve više ima oporniji okus pošto sok oslobođen prešanjem ima veći sadržaj tanina i tvari boje. Stoga, prešanje treba izvoditi tako da ne traje duže nego je potrebno, jer bi zbog dužeg zadržavanja masulja u preši moglo doći do prevelike ekstrakcije taninskih tvari u mošt što bi moglo loše utjecati na organoleptičke karakteristike budućeg vina. Postoji više vrsta preša, a najjednostavnija podjela je na kontinuirane i diskontinuirane (šaržne) preše.[2, 19]

1.4.7. Tiho vrenje

Tiho vrenje je posljednja faza fermentacije kod koje dolazi do snižavanja temperature mošta, vino se smiruje, intezitet stvaranja CO_2 znatno opada, dolazi do taloženja tartarata i izumrlih stanica kvasaca. Tiho vrenje nastupa iza perioda burnog vrenja i ne bi trebalo trajati dulje od mjesec dana. U fazi tihog vrenja se nastavlja složena pretvorba grožđanog šećera u etanol i ostale produkte, a velikim dijelom se odvija i proces malolaktične fermentacije nakon koje slijedi pretok vina.[2, 14]

1.4.8. Malolaktična fermentacija

Malolaktična fermentacija (MLF) je biološki proces pretvorbe jabučne kiseline u mliječnu, a vinari diljem svijeta tradicionalno je koriste u proizvodnji bijelih i crnih vina. Općepoznato je da vina s visokom ukupnom kiselosti u pravilu sadrže veće koncentracije jabučne kiseline, koje im daje grubi, dominantno kiseli i neharmonični okus.

Malolaktično vrenje pojačava okus u ustima, vino čini podatnijim i smanjuje potrebu za filtriranjem. Prilikom malolaktičnog vrenja, bakterije mliječne kiseline dodaju se u vino kako bi jabučnu kiselinu pretvorile u mliječnu kiselinu i CO_2. Na tržištu postoje mnoge vrste ovih bakterija, a preporuča ih se dodavati u vino odmah po završetku alkoholnog vrenja.[18,21]

U procesu biološkog smanjenja kiselosti vina, mliječno-kisele bakterije vrste *Leuconostoc oenos*, u njima povoljnim uvjetima metaboliziraju neužitnu i oporu jabučnu kiselinu u blažu i okusno kvalitetniju mliječnu kiselinu i ugljični dioksid. Tako po završetku razgradnje jabučne kiseline vino postaje znatno pitkije i harmoničnije, a smanjenje koncentracije ukupnih kiselina može iznositi 1-3 g/L pa i više. Međutim, u gotovo svim hrvatskim vinarijama malolaktičnoj fermentaciji ne pridaje se posebno značenje te ona često u vinima protječe spontano i nekontrolirano ili se sprječava jakim sumporenjem. Danas malolaktičnu fermentaciju treba uvažavati i primjenjivati kao proces koji nam omogućuje da u znatnoj mjeri utječemo na stil vina koje proizvodimo.[13, 21]

Malolaktična fermentacija može završiti u tihom vrenju mladog vina ili do trenutka prvog pretakanja i proteći gotovo neprimjetno. U nekim vinima nastupa pak u proljeće ili tijekom ljetnih mjeseci, vezano za više temperature i kretanje vinove loze. Kod crnih vina, posebice onih vrhunskih, koja optimum kakvoće postižu duljim dozrijevanjem, malolaktična fermentacija dovodi do vrlo pozitivnih promjena. Aroma vina se iz grožđane mijenja u vinoznu, a boja vina postaje smirenija i manje živahna.[13]

1.4.9. Dorada i njega vina

Nakon završene fermentacije mlada vina su mutna, bez razvijenog sortnog okusa, a izraženog mirisa na kvasac. Tada započima dozrijevanje vina, vino se bistri te se formira okus i miris. Ova faza se odvija u sudovima, najčešće su to drvene ili bačve od inoxa i u tom periodu vino se nadolijeva, sulfitira, bistri , filtrira, odrađuje se drugi pretok i na kraju se puni u boce odnosno flašira.

1.5. Upotreba pektolitičkih enzima

Dodavanje pektolitičkih enzima je učestala praksa u proizvodnji vina kako bi se povećao sastav fenolnih komponenti u vinu, a osobito antocijana.[22] Koriste se još od 1950.-ih radi poboljšanja prinosa grožđanog soka i većeg iskorištenja pri prešanju.[23]

Pektolitički enzimi su organski katalizatori, bjelančevine, koji pospješuju razne biokemijske procese. Oni djeluju samo u određenim uvjetima pH i temperature. Pektolitički enzimi obuhvaćaju jednu grupu enzima, gdje svaka grupa enzima zasebno ima svoje specifično svojstvo i enzimatsko djelovanje:

- Pektopektinaza razlaže protopektin u pektin;
- Pektinmetilesteraza ili pektaza razlaže pektin u pektinske kiseline;
- Endopoligalakturonaza ili pektinaza razlaže pektinske kiseline u poligalakturnsku kiselinu;
- Ekspoligalakturonaza razlaže poligalakturonsku kiselinu u galakturonsku kiselinu.

Dakle, pektolitički enzimi razlažu, odnosno razgrađuju molekule pektinskih spojeva na jednostavnije te se njihovom primjenom u vinarstvu postiže da se učinkovitije razgradi pokožica bobice grožđa koja je izgrađena od celuloze i pektina. Na taj način se sadržaj pektinskih i gumoznih tvari u moštu i vinu smanjuje na minimum, a randman mošta i vina se povećava i do 10%. Također, pektolitički enzimi pospješuju izlučivanje boje iz pokožice bobice, taloženje pektinskih tvari koji otežavaju bistrenje vina, djeluju na smanjenje viskoziteta vina olakšavajući na taj način njegovu filtraciju.[2, 23, 24]

1.5.1. Vinozym Vintage FCE

Vinozym Vintage FCE je visoko pročišćeni enzim namijenjen za primjenu kod maceracije crnih sorta vina. Djeluje tako da oslobađa polisaharide, tanine i antocijane u ranom razdoblju maceracije. Povećava ekstrakciju boje iz pokožice i poboljšava njenu stabilnost te omogućuje stvaranje okusne punoće vina i održavanje arome vina.[25, 26]

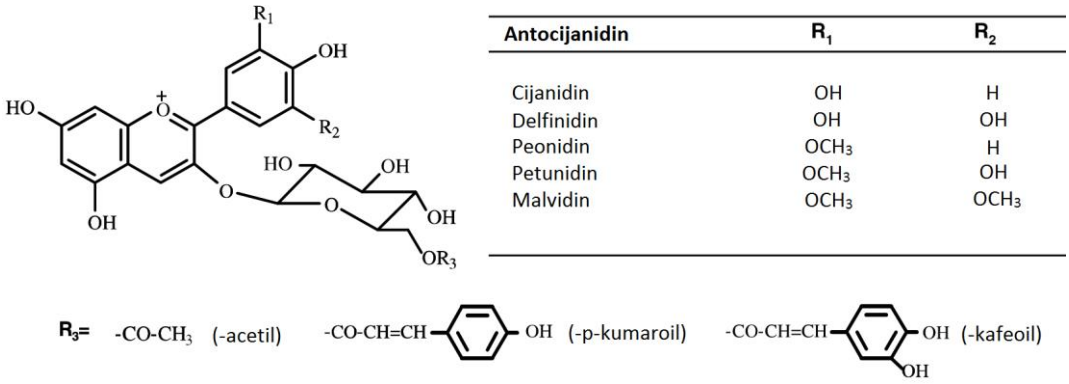
1.5.2. Sihazym Extro

Sihazym Extro je pektolitički enzimski pripravak, visoko koncentriran, pročišćen i granuliran. Uglavnom sadrži pektinazu, poligalakturonazu i hemicelulazu. Selektivno degradira polisaharide iz pokožice te stoga pospješuje otpuštanje soka iz zgnječenog grožđa. Kod primjene na crnim sortama grožđa izlučuje manje agresivne tanine, antocijane i osigurava stabilnost boje, a razgradnjom pektina smanjuje viskoznost mošta.[27]

1.6. Antocijani (tvari boje)

Antocijani su biljni pigmenti, topivi u vodi, koje nalazimo u bobičastom voću, kupusnjačama, grožđu i ostalim pigmentiranim biljkama, voću i povrću.[28] Također, antocijani svojim bojama uvelike utječu na estetski izgleda pojedinih proizvoda i na njegova organoleptička svojstva, a osobito vina.[29] Kemijski gledano, ukratko, antocijanidini pripadaju grupi spojeva koja se naziva flavonoidima, a njihova temeljna molekulska struktura je 2-benzil-1- benzopirilium kation (flavilium ion) na koji je vezana molekula šećera.[28]

Po svojoj građi su srodni, ali se međusobno razlikuju po broju i rasporedu funkcionalnih skupina u bočnom fenilnom prstenu. Najčešće identificirani antocijani u pokožici grožđa i vinu iz porodice *Vitis vinifera* su 3-O-monoglukozidi i 3-O-acilirani monoglukozidi sastavljeni od 5 najčešćih antocijanidina, a to su delfinidin, cijanidin, petunidin, peonidin i malvidin.[2,30]


Antocijanidin	R_1	R_2
Cijanidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Peonidin	OCH_3	H
Petunidin	OCH_3	OH
Malvidin	OCH_3	OCH_3
R_3= $-CO-CH_3$ (-acetil) $-CO-CH=CH-C_6H_4-OH$ (-p-kumaroil) $-CO-CH=CH-C_6H_3(OH)_2$ (-kafeoil)

Slika 5. Kemijska struktura antocijana[31]

Antocijani se akumuliraju tijekom sazrijevanja crnog grožđa, pretežno u pokožici bobice, ali kod nekih vrsta pigment se javlja i u mesu bobice, a u jesen i u lišću. Njihova količina u pokožici grožđa varira i na nju utječu mnogi faktori, kao što su sorta grožđa, klima, tlo, agrokulturna praksa i postupci primjenjeni u vinogradu te brojni drugi čimbenici.[2,32]

Interes za antocijane se zadnjih godina itekako povećao zbog njihovog dokazanog pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Ispitivanja pokazuju da imaju ulogu u prevenciji kod bolesti srca te da posjeduju antioksidacijska i antikancerogena svojstva. Također imaju velik potencijal i u prehrambenoj industriji kao sigurna i učinkovita bojila za hranu.[4]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Uređaji i kemikalije

- Spektrofotometar, UV-VIS Lambda EZ 201, Perkin-Elmer, SAD
- Klorovodična kiselina, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etanol, p.a., T.T.T. d.o.o., Sv. Nedjelja, Hrvatska
- Natrijev disulfit, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska

2.2. Biljni materijal i postupak vinifikacije

U ovom radu korišteni su uzorci grožđa vrste *Babica* i *Crljenak kaštelanski* iz istog vinograda smještenog u Kaštelima, koja se nalaze u vinskoj podregiji Srednja i Južna Dalmacija.

U svrhu ovog istraživanja provedeni su različiti postupci vinifikacije za obje vrste grožđa. Tradicionalni postupak kao ogledni i kontrolni primjer i dva postupka za svaku vrstu grožđa u kojem su dodani različiti tipovi enzimskih preparata. Enzimi korišteni za postupke vinifikacije su *Vinozym Vintage FCE* (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Danska) i *Sihazym Extro* (Eaton Begerow Product Line, Njemačka). Za svaki eksperiment odnosno vinifikaciju, korišteno je po 100 kg grožđa izrunjanog i izmuljanog s MIO MGM – 940 runjačom-muljačom (MIO, Osijek, Hrvatska) koje je raspoređeno u fermentacijske tankove. Uzorci su nakon toga tretirani kalijevim metabisulfitom u koncentraciji od 10 g/100 L. Svi uzorci su inokulirani sa suhim aktivnim kvascima SIHA®, Aktiv Hefe 8 (Burgundy Yeast) (E. Begerrow GmbH & Co., Langenlonsheim, Germany).

Maceracijski dio fermentacije odvijao se u PVC kacama, a klobuci su bili potopljeni korištenjem mehaničkih barijera. Maceracija je trajala šest dana, a uzorci su uzimani svaki dan tijekom maceracije. Nakon maceracije uzorci su prebačeni u inox tankove s plutajućim poklopcima i parafinskim uljem kao zaštitom od oksidacije. Također, nakon svakog od dva pretoka, uzeti su uzorci za analizu. Do same analize uzeti uzorci su čuvani na temperaturi od -20ºC.

Tablica 1. *Uzorkovanje Babice*

Vrijeme uzimanja Uzorka	**Vinificirano grožđe sorte *Babica* (B) Opis uzorka**			
	Bez enzima **A**	**Enzim** *Vinozym Vintage FCE* **B**	**Enzim** *Sihazym Extro* **C**	**Opis faze**
Prvi dan	BA 1	BB 1	BC 1	Maceracija
Drugi dan	BA 2	BB 2	BC 2	Maceracija
Treći dan	BA 3	BB 3	BC 3	Maceracija
Četvrti dan	BA 4	BB 4	BC 4	Maceracija
Peti dan	BA 5	BB 5	BC 5	Maceracija
Peti dan	**Razdvajanje čvrste i tekuće faze- dignuto s masulja**			Inox posude zatvorene s vrenjačom
Nakon tjedan dana	BA 6	BB 6	BC 6	Prvi pretok
Nakon tri mjeseca	BA 7	BB 7	BC 7	Drugi pretok

Tablica 2*. Uzorkovanje Crljenka kaštelanskog*

Vrijeme uzimanja uzorka	**Vinificirano grožđe sorte *Crljenak kaštelanski* (Z) Opis uzorka**			
	Bez enzima **A**	**Enzim** *Vinozym Vintage FCE* **B**	**Enzim** *Sihazym Extro* **C**	**Opis faze**
Prvi dan	ZA 1	ZB 1	ZC 1	Maceracija
Drugi dan	ZA 2	ZB 2	ZC 2	Maceracija
Treći dan	ZA 3	ZB 3	ZC 3	Maceracija
Četvrti dan	ZA 4	ZB 4	ZC 4	Maceracija
Peti dan	ZA 5	ZB 5	ZC 5	Maceracija
Peti dan	**Razdvajanje čvrste i tekuće faze- dignuto s masulja**			Inoks posude zatvorene s vrenjačom
Nakon tjedan dana	ZA 6	ZB 6	ZC 6	Prvi pretok
Nakon tri mjeseca	ZA 7	ZB 7	ZC 7	Drugi pretok

2.3. Određivanje antocijana metodom bisulfitnog izbjeljivanja [33]

Za određivanje monomernih antocijana u uzrocima korištena je metoda bisulfitnog izbjeljivnja.

Priprava reagensa:

- Otopina HCl, w(HCl)=2% : 28,55 mL 37%-tne HCl nadopuniti do volumena 500 mL destiliranom vodom (paziti na pravilo KuV- kiselina u vodu).
- Otopina HCl u etanolu, w(HCl)=0,1%: 5 mL prethodno napravljene otopine HCl-a (2%-tne) razrijediti etanolom do volumena od 100 mL.
- Otopina natrijeva disulfita, w($Na_2S_2O_5$)=15%: 15 g $Na_2S_2O_5 \times 5H_2O$ otopiti do volumena od 100 mL u destiliranoj vodi. Otopina se čuva u tamnoj boci.

Postupak:

Od ispitivanog uzorka vina otpipetira se 0,5 mL i prelije u epruvetu. Tome se doda 0,5 mL 0,1%-tne klorovodične kiseline u 95%-tnom etanolu i 10 mL 2%-tne klorovodične kiseline. Epruveta se dobro zatvori i promućka. Od tako pripravljene otopine uzorka uzme se po 1 mL i prebaci u druge dvije epruvete. U jednu epruvetu se doda 0,4 mL destilirane vode, a u drugu 0,4 mL 15%-tne otopine natrijevog bisulfita. Epruvete se zatvore, promućkaju i ostave stajati 20 minuta nakon čega im se izmjeri apsorbancija na spektrofotometru pri 520 nm, ponavljanja su urađena po tri puta radi preciznosti i točnosti mjerenja. Rezultati za količinu antocijana se izražavaju preko količine standarda (M-3-gl) u miligramima po litri (mg/L) prema jednadžbi:

$$\mathbf{c\ (g/l) = A/e \times (MW) \times (F)}$$

c- masena koncentracija pigmenta (mg/L)

A- razlika apsorbancije slijepe probe i uzorka

e- molarna apsorbancija 1 M otopine malvidin-3-glukozida = 28,000

MW- molarna masa pigmenta (malvidina) = 529

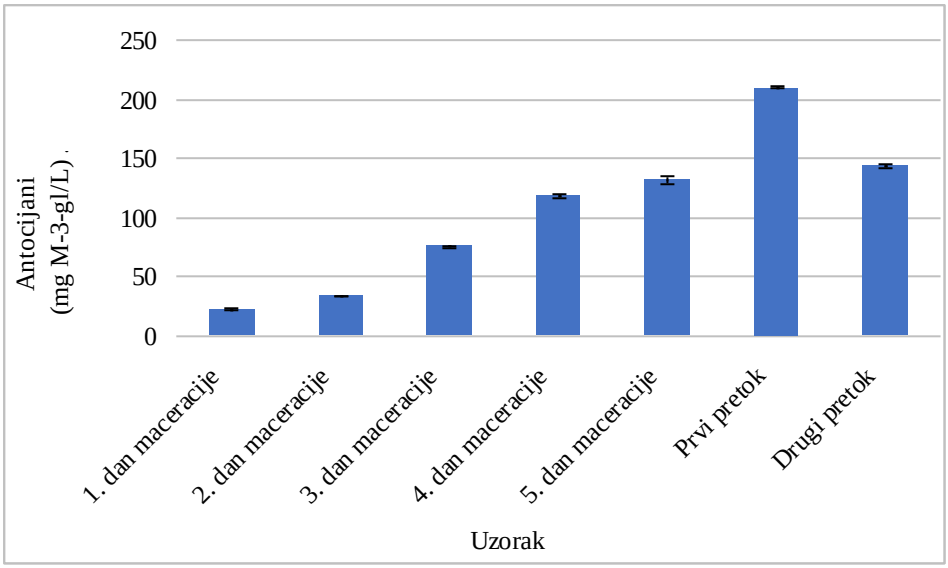
F- faktor razrjeđenja = 30,8.

3. REZULTATI

3.1. Rezultati određivanja sadržaja antocijana u uzorcima vina sorte *Babica*

Tablica 3. *Promjene koncentracije antocijana u uzorcima vina sorte Babica tijekom vinifikacije grožđa bez dodatka enzima*

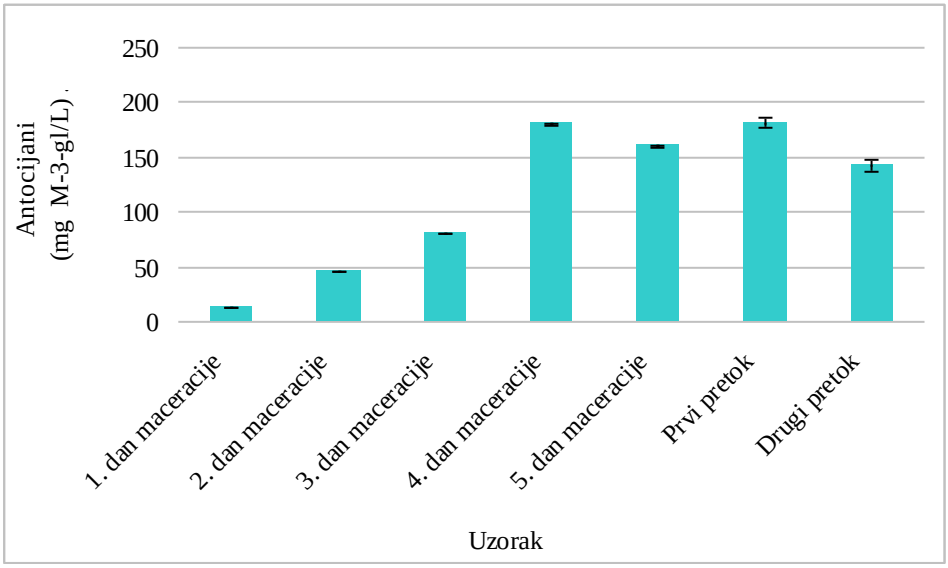
Uzorak	**Antocijani (mg M-3-gl/L)**
1. dan maceracije	22,50 ± 1,34
2. dan maceracije	34,14 ± 0,34
3. dan maceracije	75,84 ± 0,89
4. dan maceracije	118,32 ± 1,21
5. dan maceracije	131,90 ± 2,93
Prvi pretok	210,07 ± 1,16
Drugi pretok	143,73 ± 1,01



Slika 6. *Grafički prikaz sadržaja antocijana u uzorcima vina sorte Babica tijekom vinifikacije grožđa bez dodatka enzima*

Tablica 4. *Promjene koncentracije antocijana u uzorcima vina sorte Babica tijekom vinifikacije grožđa uz korištenje enzima Vinozym Vintage FCE*

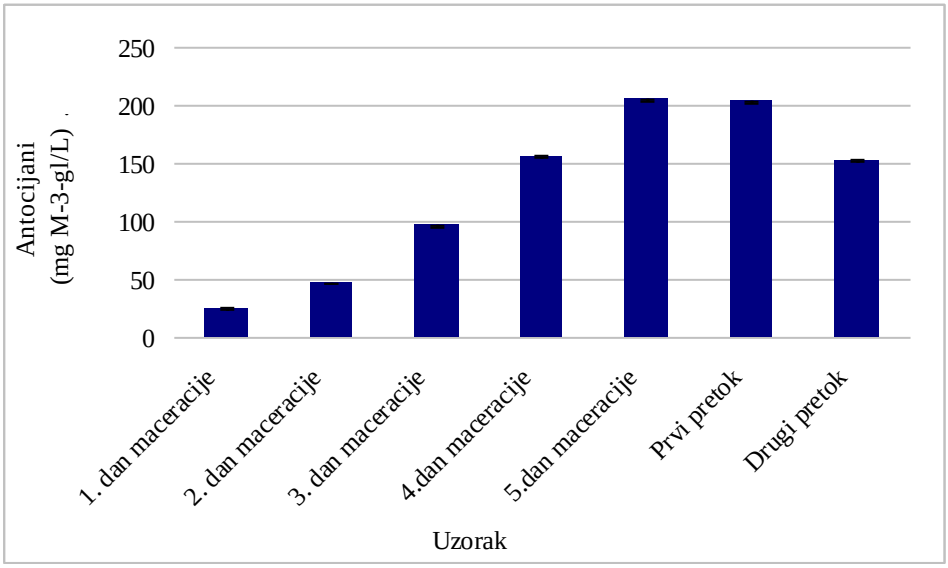
Uzorak	**Antocijani (mg M-3-gl/L)**
1. dan maceracije	13,19 ± 0,34
2. dan maceracije	46,16 ± 0,34
3. dan maceracije	79,91 ± 0,34
4. dan maceracije	180,00 ± 1,46
5. dan maceracije	159,83 ± 1,21
Prvi pretok	188,34 ± 16,18
Drugi pretok	141,98 ± 5,55



Slika 7. *Grafički prikaz sadržaja antocijana u uzorcima vina sorte Babica tijekom vinifikacije grožđa uz korištenje enzima Vinozym Vintage FCE*

Tablica 5. *Promjene koncentracije antocijana u uzorcima vina sorte Babica tijekom vinifikacije grožđa uz korištenje enzima Sihazym Extro*

Uzorak	**Antocijani (mg M-3-gl/L)**
1. dan maceracije	24,83 ± 0,34
2. dan maceracije	46,36 ± 0,34
3. dan maceracije	95,82 ± 0,34
4. dan maceracije	155,95 ± 1,01
5. dan maceracije	204,63 ± 0,34
Prvi pretok	202,89 ± 0,89
Drugi pretok	152,46 ± 1,01

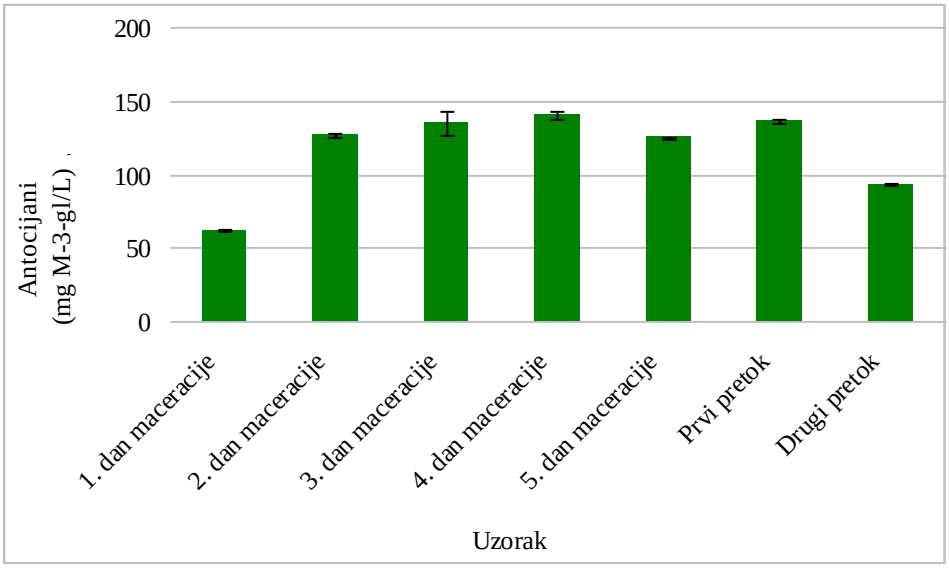


Slika 8. *Grafički prikaz sadržaja antocijana u uzorcima vina sorte Babica tijekom vinifikacije grožđa uz korištenje enzima Sihazym Extro*

3.2. Rezultati određivanja sadržaja antocijana u uzorcima vina sorte *Crljenak kaštelanski*

Tablica 6. *Promjene koncentracije antocijana u uzorcima vina sorte Crljenak kaštelanski tijekom vinifikacije grožđa bez dodatka enzima*

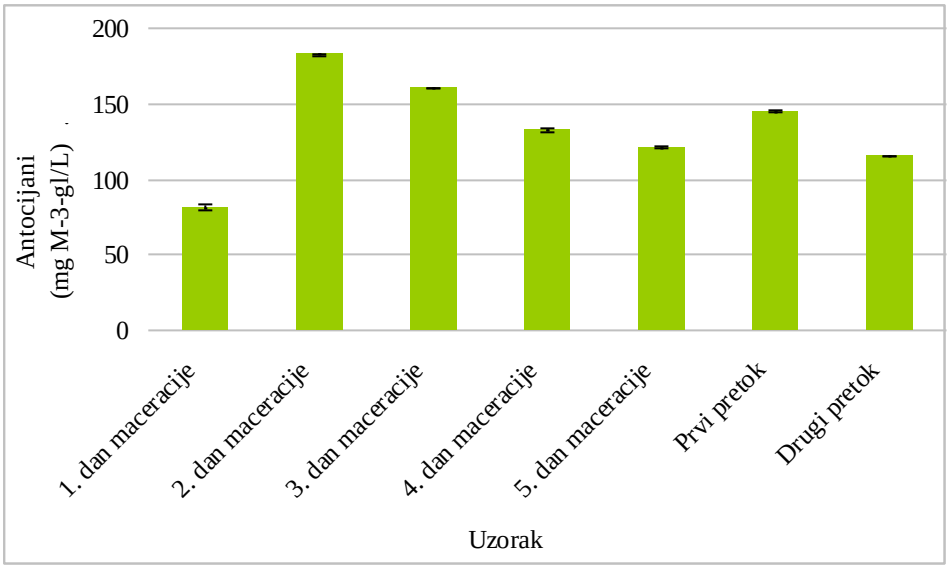
Uzorak	**Antocijani (mg M-3-gl/L)**
1. dan maceracije	61,49 ± 0,67
2. dan maceracije	126,47 ± 0,89
3. dan maceracije	138,30 ± 14,42
4. dan maceracije	140,24 ± 2,54
5. dan maceracije	124,91 ± 0,89
Prvi pretok	135,58 ± 1,16
Drugi pretok	92,91 ± 0,67



Slika 9. *Grafički prikaz sadržaja antocijana u uzorcima vina sorte Crljenak kaštelanski tijekom vinifikacije grožđa bez enzima*

Tablica 7. *Promjene koncentracije antocijana u uzorcima vina sorte Crljenak kaštelanski tijekom vinifikacije grožđa uz korištenje enzima Vinozym Vintage FCE*

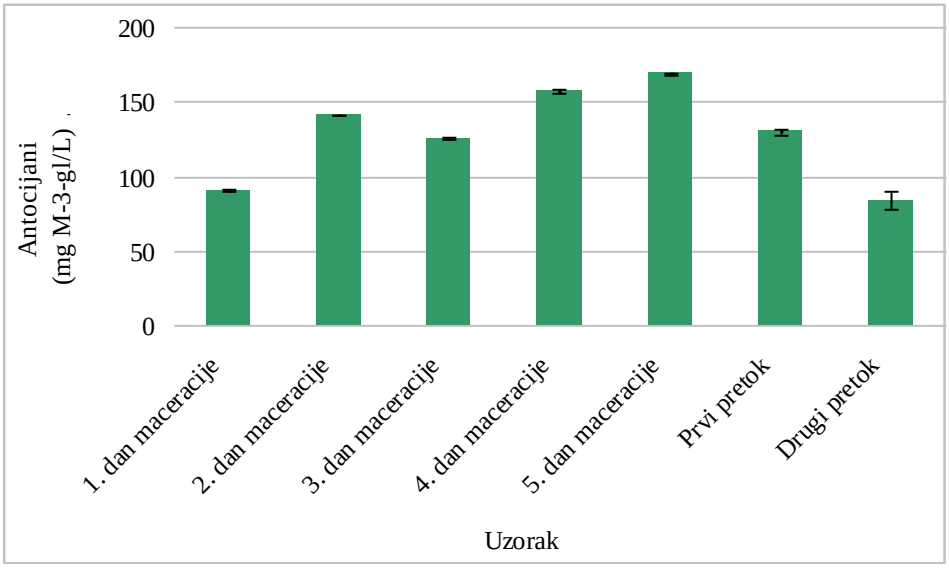
Uzorak	**Antocijani (mg M-3-gl/L)**
1. dan maceracije	81,27 ± 2,20
2. dan maceracije	182,52 ± 0,89
3. dan maceracije	160,22 ± 0,34
4. dan maceracije	132,29 ±1,21
5. dan maceracije	120,84 ± 0,67
Prvi pretok	144,51 ± 0,67
Drugi pretok	115,22 ± 0,58



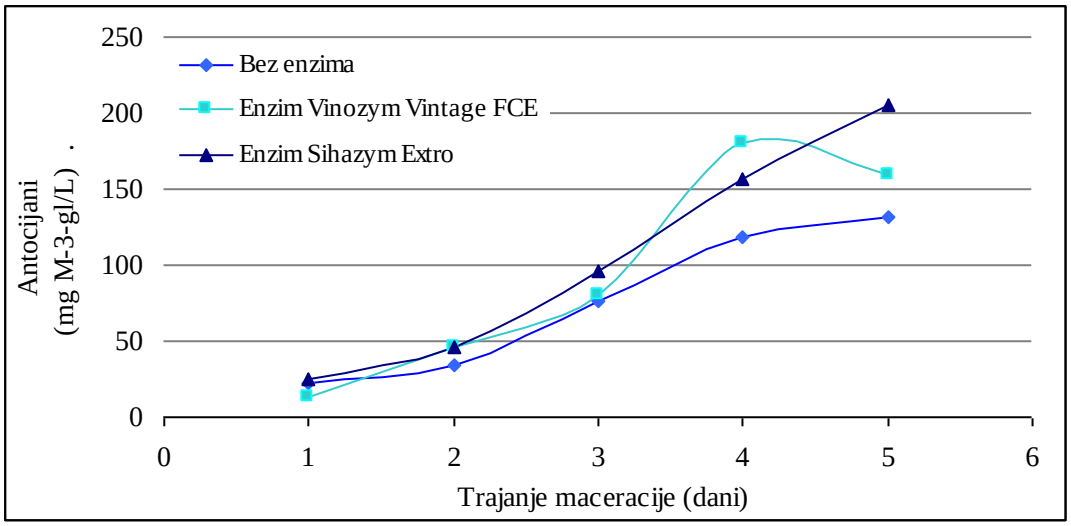
Slika 10. *Grafički prikaz sadržaja antocijana u uzorcima vina sorte Crljenak kaštelanski tijekom vinifikacije grožđa uz korištenje enzima Vinozym Vintage FCE*

Tablica 8. *Promjene koncentracije antocijana u uzorcima vina sorte Crljenak kaštelanski tijekom vinifikacije grožđa uz korištenje enzima Sihazym Extro*

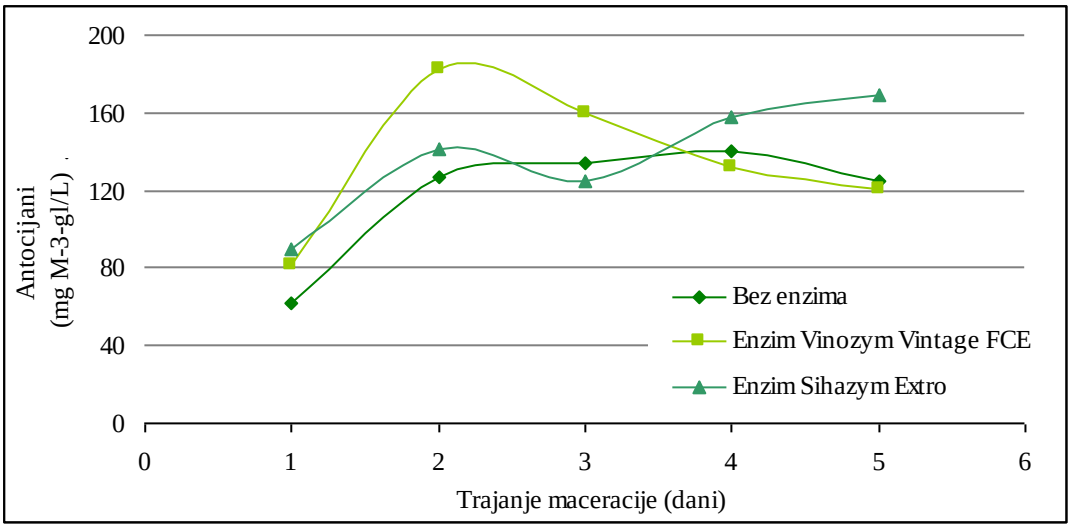
Uzorak	**Antocijani (mg M-3-gl/L)**
1. dan maceracije	90,00 ± 0,67
2. dan maceracije	140,82 ± 0,00
3. dan maceracije	125,11 ± 0,58
4. dan maceracije	157,31 ± 1,48
5. dan maceracije	168,75 ± 0,58
Prvi pretok	129,96 ± 2,04
Drugi pretok	83,79 ± 6,56



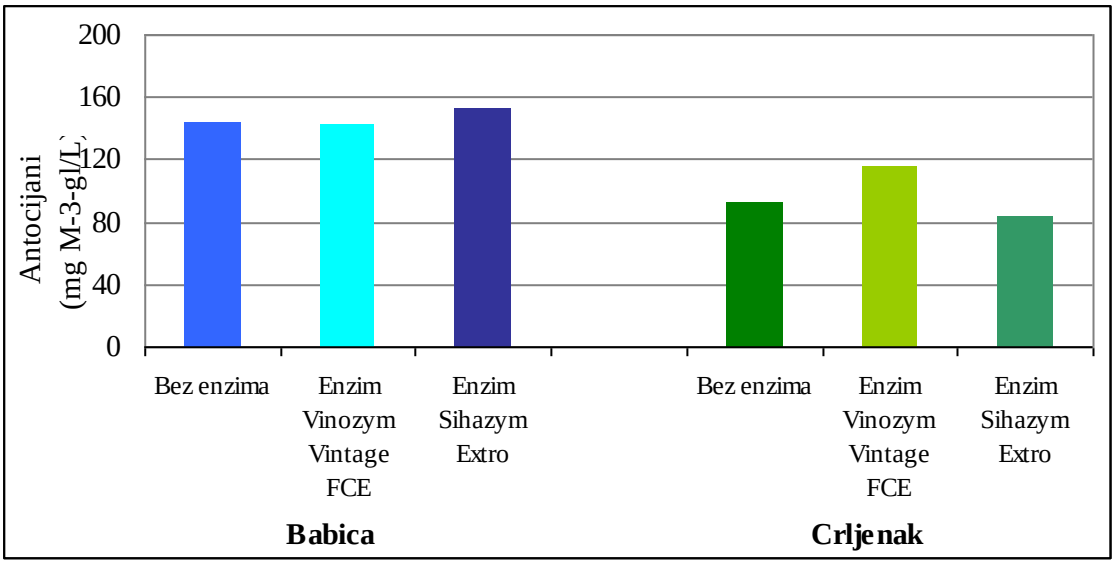
Slika 11. *Grafički prikaz sadržaja antocijana u uzorcima vina sorte Crljenak kaštelanski tijekom vinifikacije grožđa uz korištenjem enzima Sihazym Extro*



Slika 12. *Usporedni prikaz promjene sadržaja antocijana tijekom petodnevne maceracije kod Babice u različitim tipovima vinifikacije*



Slika 13. *Usporedni prikaz promjene sadržaja antocijana tijekom petodnevne maceracije kod Crljenka kaštelanskog u različitim tipovima vinifikacije*



Slika 14. *Usporedni prikaz sadržaja antocijana u vinima Babica i Crljenak kaštelanski proizvedenim različitim tipovima vinifikacije*

4. RASPRAVA

Antocijani su biljni pigmenti topivi u vodi i oni su glavni nosioci boje crnih vina. U crnom grožđu se ovi spojevi akumuliraju tijekom procesa sazrijevanja grožđa (od perioda šarka) i pretežno se nalaze u pokožici grožđa. Važnost antocijana nije samo u tome što su glavni i odgovorni za boju vina, već im se pridaje važnost i zbog njihovog utjecaja na zdravlje što je dokazano u brojnim istraživanjima (antioksidacijsko djelovanje na organizam, utjecaj na kardiovaskularni sustav, inhibicija rasta pojedinih tumorskih stanica, itd.).

Kako bi ekstrakcija antocijana iz pokožice grožđa u mošt bila što učinkovitija, uobičajeno je u vinarskoj praksi da se u masulj dodaju pektolitički enzimi. Kako enzimi pospješuju ekstrakciju boje jednostavno je opisao dr. sc. Marin Mihaljević Žulj u svom članku u Gospodarskom listu, a on kaže: „Enzimi koji se primjenjuju u svrhu većeg i lakšeg izlučivanja tvari boje nazivaju se pektolitički enzimi (pektinaze). Njihova primjena ima ulogu razgradnje pektina koji se nalazi u sastavu stanične stijenke. Razgradnjom pektina, a samim time i stanične stijenke dolazi do olakšanog izlučivanja boje i arome iz kožice bobice u mošt i postiže se veći randman mošta.

U ovom je radu istraživan utjecaj dodatka dvaju pektolitičkih enzima (*Vinozym Vintage FCE* i *Sihazym Extro*) na povećanje sadržaja antocijana kod dviju autohtonih kaštelanskih sorti, *Babica* i *Crljenak kaštelanski*. Isto tako, kao kontrola, kod obje sorte proveden je i postupak vinifikacije bez dodataka enzima. U konačnici je urađena usporedba koncentracije antocijana u vinu proizvedenom vinifikacijom s dodatkom enzima u odnosu na koncentraciju antocijana u vinu proizvedenom bez dodatka enzima. Osim toga, uspoređen je sadržaj antocijana u vinima istraživanih sorti grožđa Kaštelanskog vinogorja proizvedenim različitim postupcima vinifikacije.

U uzorcima prikupljenim tijekom vinifikacije grožđa sorti *Babica* i *Crljenak kaštelanski*, provedenom bez dodatka i uz dodatak enzima (*Vinozym Vintage FCE* i *Sihazym Extro*), određena je koncentracija antocijana (izražena u mg malvidin-3-glukozida po 1 L, mg M-3-gl/L) korištenjem metode bisulfitnog izbjeljivanja. Dobiveni rezultati su prikazani u tablicama 3-8 i na slikama 6-14.

Koncentracija antocijana kod sorte *Babica*, u vinifikaciji bez dodatka enzima, u prvom danu maceracije iznosila je 22,50 mg M-3-gl/L i svakim danom maceracije je

postepeno rasla sve do prvog pretoka kada je iznosila 210,07 mg M-3-gl/L. Nakon prvog pretoka koncentracija antocijana se smanjila i nakon drugog pretoka iznosila je 143,73 mg M-3-gl/L. Kod vinifikacije iste sorte, ali uz korištenje enzima *Vinozym Vintage FCE* koncentracija antocijana u prvom danu maceracije iznosila je 13,19 mg M-3-gl/L. Ponovno imamo rast količine antocijana u narednim danima maceracije s tim da je kod ove sorte ipak zabilježen blagi pad s četvrtog na peti dan (s 180,00 na 159,83 mg M-3-gl/L). U konačnici nakon drugog pretoka udio antocijana iznosi 141,98 mg M-3-gl/L. Uz primjenu enzima *Sihazym Extro* kod vinifikacije za sortu Babica koncentracija antocijana postepeno raste te za prvi dan maceracije iznosi 24,83, a petog dana 204,63 mg M-3-gl/L. Ponovno bilježimo pad koncentracije antocijana nakon pretoka, a nakon drugog pretoka ona iznosi 152,46 mg M-3-gl/L. Rezultati određivanja koncentracije antocijana za sortu *Babica*, uz i bez dodatka enzima, prikazani su u tablicama 3-5 i na slikama 6-8.

Za sortu *Crljenak kaštelanski* koncentracija antocijana tijekom vinifikacije, bez dodatka enzima, postepeno raste od prvog pa sve do četvrtog dana maceracije kada iznosi 140,24 mg M-3-gl/L. Kod ovih uzoraka ponovno imamo blagi pad sadržaja antocijana koji se nakon prvog pretoka ponovno povećavaju, da bi nakon drugog pretoka koncentracija opet pala te iznosila 92,91 mg M-3-gl/L. Kod vinifikacije sorte *Crljenak kaštelanski* uz enzim *Vinozym Vintage FCE* koncentracija antocijana naglo raste od početnih 81,27 mg M-3-gl/L u prvom danu maceracije na 182,52 mg M-3-gl/L u drugom danu maceracije, a zatim u sljedeća 3 dana lagano opada. Nakon prvog pretoka koncentracija raste do 144,51 mg M-3-gl, a zatim opet lagano pada nakon drugog pretoka (115,22 mg M-3-gl/L). Vinifikacija *Crljenka kaštelanskog* uz dodatak enzima *Sihazym Extro* ima najviše odstupanja od polaganog rasta i pada koncentracije i nepovezano se povisuje i snižava. Koncentracija antocijana od prvog do drugog dana maceracije raste, zatim za treći dan maceracije pada te opet raste za četvrti i peti dan maceracije. Na kraju, nakon prvog i drugog pretoka se vidi lagani pad i u konačnici nakon drugog pretoka iznosi 83,79 mg M-3-gl/L. Rezultati određivanja koncentracije antocijana za sortu *Crljenak kaštelanski*, uz i bez dodatka enzima, prikazani su u tablicama 6-8 i na slikama 9-11.

U svrhu olakšanog praćenja promjena u sadržaju antocijana tijekom petodnevne maceracije kreirane su slike; slika 12 za sortu *Babica* i slika 13 za sortu *Crljenak kaštelanski* iz kojih je vidljiva usporedba između uzoraka pripremljenih bez dodatka

enzima, uzoraka vinifikacije uz dodatak enzima *Vinozym Vintage FCE* te enzima *Sihazym Extro*. Sa slike je vidljivo da 5. dan maceracije najmanji udio antocijana ima uzorak vina u koje se nije dodao niti jedan enzim što je bilo i očekivano, a najveći udio je imao uzorak proizveden korištenjem enzima *Sihazym Extro*. Kod sorte Crljenak kaštelanski najveći udio antocijana je imao opet uzorak proizveden korištenjem enzima *Sihazym Extro,* dok kod ostala dva uzorka razlika i nije bila nešto značajna.

Sadržaj antocijana u finalnom vinu nakon dvaju pretoka prikazan je na slici 14. Sa slike je vidljivo da su svi uzorci *Babice* pokazali veći sadržaj antocijana nego li uzorci *Crljenka kaštelanskog*. Uzorak Babice kod kojeg je korišten enzim *Sihazym Extro* u konačnici je imao nešto veći sadržaj antocijana, dok je kod sorte *Crljenak kaštelanski* taj isti uzorak imao najmanje antocijana; čak manje nego li vino *Crljenka kaštelanskog* proizvedeno bez dodatka enzima. Enzimski preparat *Vinozym Vintage FCE* kod *Crljenka kaštelanskog* dao je najveći sadržaj antocijana u vinu.

Negativne promjene odnosno pad koncentracije antocijana u uzorcima tijekom procesa proizvodnje je vjerojatno rezultat složenih promjena koje ovi spojevi doživljavaju tijekom fermentacije. To mogu biti oksido-redukcijske reakcije koje dovode do obezbojavanja ili posmeđivanja pigmenata te reakcija koopikmentacije i polimerizacije koje izazivaju njihovo taloženje.

5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobivenih u ovom radu možemo zaključiti da se tijekom postupka vinifikacije crnog grožđa sorti *Babica* i *Crljenak kaštelanski* udio antocijana tijekom vinifikacije mijenja. U svim su uzorcima, kao što je i očekivano, tijekom maceracije iz pokožice grožđa ekstrahirani antocijani te je njihov udio u vinu bio znatno veći nego li onaj inicijalni na početku vinifikacije. Prema prikazanim rezultatima lako je zaključiti da je antocijanski potencijal grožđa sorte Babica znatno veći nego li sorte *Crljenak kaštelanski* pošto je u svim slučajevima udio antocijana u vinima ove sorte bio veći. Usporedbom utjecaja primjene korištenih pektolitičkih preparata zaključujemo da je uzorak sorte *Babica* kod kojeg je korišten enzim *Sihazym Extro* imao najveću količinu antocijana, u usporedbi s uzorkom bez enzima i uzorkom kod kojeg je korišten enzimski preparat *Vinozym Vintage FCE.* U potpunosti suprotan utjecaj je zabilježen kod sorte *Crljenak kaštelanski* gdje je uzorak kod kojeg je korišten *Sihazym Extro* imao manje antocijana nego li vino proizvedeno u potpunosti bez dodatka enzima. Kod ove sorte enzimski preparat *Vinozym Vintage FCE* je dao vino s najvećim sadržajem antocijana. Pošto su postupci vinifikacije svih uzoraka bili kontrolirani i razlike su među njima svedene time na minimum, možemo pretpostaviti da se razlike u djelovanju pojedinih preparata mogu prepisati specifičnostima prisutnih antocijana u uzorcima, odnosno zastupljenosti pojedinih derivata.

6. LITERATURA

1. Mirošević N., Karoglan-Kontić J. (2008): „Vinogradarstvo“, Nakladni zavod Globus, Zagreb
2. Muštović S., (1985): „Vinarstvo sa enohemijom i mikrobiologijom“, Privredni pregled, Beograd
3. Ribereau-Gayon P., Peynaud E. (1958): „Analyse et controle des vins“, Librairie polytechnique, Paris and Liege
4. Lardos A., Kreuter M.H. (2006): „Red wine leaf“, R i D Department Flanchsmann AG, Zurich
5. Maletić E., Karoglan-Kontić J., Pejić I. (2008): „Vinova loza“, Školska knjiga, Zagreb
6. Narodne novine, Pravilnik o vinu 96/96
7. ; Pristupljeno: 21.06.2017.
8. Maletić E., Karoglan-Kontić J., Pejić I., Preiner D. Zdunić G., Bubola M., Stupić D., Andabaka Ž., Marković Z., Šimon S., Žulj-Mihaljević M., Ilijaš I., Marković D. (2015): „Zelena knjiga- Hrvatske izvorne sorte vinove loze“, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb
9. Ozimec R., Karoglan-Kontić J., Maletić M., Matotan Z., Strikić F. (2015): „Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije“, Tiskara Zelina d.d.
10. http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=babi%C4%87_crni; Pristupljeno: 21.06.2017.
11. http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=crljenak_ka%C5%A1telanski:; Pristupljeno: 21.06.2017.
12. http://morewinemaking.com/public/pdf/wredw.pdf; Pristupljeno: 21.06.2017.
13. Zoričić M. (2013): „Vinogradarsko vinarski priručnik“, Slobodna Dalmacija, Split
14. Renduluć I., Rubeša V., Puhelek N. (2010): „Vinogradarstvi i vinarstvo- Priručnik za polaganje ispita“, Zagreb
15. Ivandić L. (2013): „Vino- maturalni rad“, Zdravstvena škola Split
16. Grgić M. (2015): „Procesi fermentacija u proizvodnji bijelih vina- diplomski rad“, Poljoprivredni fakultet Osijek
17. Radovanović V. (1978): „Tehnologija vina“, Građevinska knjiga, Beograd
18. Law J. (2006): „Od vinograda do vina“, Veble Commerce, Zagreb

19. Grainger K., Tattersall H. (2005): „Wine production- Vine to bottle“, Blackwell publishing LTD
20. Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Fred.S.Nory (1999): „Wine Analysis and Production“ SPRINGER Science +Business Media, LLC
21. https://www.agroklub.com/vinogradarstvo/malolakticna-fermentacija/2517/; Pristupljeno: 21.06.2017
22. Cabaroglu A., Selli T. (2007): „Improvement in antocyanin content in the Öküzgözü wines by using pectolytic enzymes“, Food chemistry
23. Main G.L., Morris J.R. (2007): „Effect of macerating enzymes and postfermentation grape seed tanin on the color of Cyntihana wines“: American journal of enology and viticulture
24. Romero-Cascales I., Fernández-Fernández J. I., Ros-García J. M., López-Roca J. M., Gómez-Plaza E. (2008): „Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes“, International Journal of Food Science and Technology
25. http://www.vinarskyraj.cz/katalog/pripravky-a-merici-pomucky/enzymy/enzymy-lamothe-abiet/vinozym-vintage-fce-bte; Pristupljeno: 21.06.2017.
26. http://www.gusmerwine.com/catalog/enzymes/maceration-and-extraction-enzymes/vinozym-vintage-fce/; Pristupljeno: 21.06.2017
27. http://www.metrob.si/Catalog/Brskaj/Sok-Sihazym-Extro; Pristupljeno: 21.06.2017.
28. Qin C., Li Y., Niu W., Ding Y., Shang X., Xu C. (2011): „Composition analysis and structural identification of anthocyanins in fruit of waxberry“, Faculty of life science , Northwestern, Polytechnical University, Xi'an, Shaanxi, P.R. China
29. He F., He J.J., Pan Q.H., Duan C.Q. (2014): „Mass-spectrometry evidence comfirming the presence of pelargonidin-3-O glukozide in the berry skins of Cabernet Sauvignon and Pinot Noir (*Vitio Vinifera L.*)“, College of food science and nutritional engineering, China Agricurtural University Beijing, China
30. Bašić M., Vibovec H. (2013): „Usporedba učinkovitosti ekstrakcije antocijana i tanina iz pokožice grožđa Plavac mali ionskim tekućinma i klasičnim postupcima ekstrakcije“, Prehrambeno biotehnološki fakultet Zagreb

31. Moreno-Arribas V.M., Polo M.C. (2009): „Wine chemistry and biochemistry“, Springer
32. Dimitrovska M., Dimitrovski D., Bocevska M., Murković M. (2011): „Anthocyanin composition of Vranec, Cabernet Sauvignon, Merlot and Pinot Noir grapes as indicator of their varietal differentation“
33. Amerine M.A., Ough C.S. (1980): „Methods for analysis of musts and wines“, John Wiley & Sons, New York