

Primjena bentonita u proizvodnji vina 'Malvazija istarska'

Radeka, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:674492>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Primjena bentonita u proizvodnji vina ´Malvazija istarska´

DIPLOMSKI RAD

Marko Radeka

Zagreb, lipanj, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Hortikultura –Vinogradarstvo i vinarstvo

Primjena bentonita u proizvodnji vina ´Malvazija istarska´

DIPLOMSKI RAD

Marko Radeka

Mentor: prof. dr. sc. Ana Jeromel

Zagreb, lipanj, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Marko Radeka**, JMBAG 0178106719, rođen/a 12.01.1997 u **Puli**, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Primjena bentonita u proizvodnji vina 'Malvazija istarska'

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Marko Radeka**, JMBAG 0178106719, naslova

Primjena bentonita u proizvodnji vina 'Malvazija istarska'

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof.dr.sc. Ana Jeromel mentor

2. Doc.dr.sc. Ana-Marija Jagatić Korenika član

3. Doc.dr.sc. Marin Mihaljević Žulj član

Zahvala

Ovime zahvaljujem ...

Mentorici prof. dr. sc. Ana Jeromel na utrošenom vremenu, pomoći i korisnim savjetima tokom izrade ovog rada.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj rada	2
2. Pregled literature	3
2.1. Bistrenje vina	3
2.2. Proteinska stabilnost vina	5
2.3. Utvrđivanje proteinske stabilnosti	5
2.4. Proteini	6
2.4.1. Mehanizam stvaranja proteinskog zamućenja	7
2.5. Bentonit	9
2.5.1. Utjecaj bentonita na proteine u moštu i vinu	11
2.5.2. Utjecaj bentonita na aromatske spojeve	13
2.6. Malvazija istarska	15
2.6.1. Aromatski profil Malvazije istarske	17
3. Materijali i metode	18
3.1. Prerada grožđa	18
3.2. Priprema bentonita	19
3.3. Dodatak bentonita u mošt	19
3.4. Dodatak bentonita tijekom fermentacije	20
3.5. Uklanjanje taloga	21
3.6. Osnovna analiza mošta i vina	22
3.6.1. Određivanje alkoholne jakosti	22
3.6.2. Određivanje ukupnog suhog ekstrakta	22

3.6.3.	Određivanje hlapljive kiselosti.....	22
3.6.4.	Određivanje ukupne kiselosti.....	23
3.6.5.	Određivanje pH.....	23
3.6.6.	Određivanje slobodnog i ukupnog sumpornog dioksida	23
3.6.7.	Određivanje pepela u vinu.	23
3.6.8.	Određivanje ukupnog sadržaja fenola i proteina.....	24
3.6.9.	Određivanje parametara boje	24
3.7.	Određivanje proteinske stabilnosti.....	25
3.8.	Senzorna analiza.....	25
4.	Rezultati i rasprava	26
4.1.	Rezultati fizikalno-kemijske analize vina	26
4.2.	Parametri boje	27
4.3.	Ukupni fenoli i protein.....	28
4.4.	Proteinska stabilnost.....	29
4.5.	Senzorno ocijenjivanje.....	30
5.	Zaključak	31
6.	Popis literature	32

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Marka Radeke**, naslova

Primjena bentonita u proizvodnji vina 'Malvazija istarska'

U vinogradarsko-vinskoj proizvodnji u posljednje vrijeme sve je češći problemi pojava visokih temperatura posebice u periodu dozrijevanja koje mogu utjecati na intenzivniju sintezu proteina u grožđu. Time se narušava kvaliteta vina u boci zbog pojave taloga i mutnoće kao rezultat denaturacije nestabilnih oblika proteina.

Stoga je cilj ovoga rada bio utvrditi utjecaj primjene bistrila, bentonita na bazi natrija u koncentracijama od 50 i 100 g/hl u različitim terminima aplikacije, odnosno izravnom aplikacijom u mošt te u 2/3 fermentacije zbog pretpostavke da će različite količine bentonita aplicirane u dva različita termina utjecati na osnovni fizikalno-kemijski sastav, koncentracije ukupnih proteina te proteinsku stabilnost vina. Istraživanje čiji su rezultati pokazali značajne razlike u intenzitetu, tonalitetu i pigmentu boje, ukupnom sadržaju fenola i proteina te proteinskoj stabilnosti u odnosu na kontrolni uzorak ne tretiran bentonitom provedena su na sorti 'Malvazija istarska' iz vinograda na području Radeki polja.

Ključne riječi: talog, mutnoća, proteinska stabilnost, bentonit, Malvazija istarska

Summary

Of the master's thesis – student **Marko Radeka**, entitled

Bentonite application in the production of Malvazija istarska wine

In viticulture and wine production high temperatures have recently become the most common problem especially during the ripening period which can often have an effect on intensive protein accumulation in grapes. This impairs the wine quality inside the bottle due to the appearance of precipitate and turbidity as a result of denaturation of unstable forms of protein.

Therefore, the aim of this study was to determine the effect of bentonite, sodium-based clay, in concentrations of 50 and 100 g/hl during different application periods that were applied directly to the must and at 2/3 of the fermentation with the assumption that different amounts of bentonite will have different impact on physico-chemical composition, total proteins concentrations and protein stability. The research results showed significant differences considering intensity, tonality, pigment color, total phenol and protein content and protein stability in relation to the control sample where bentonite application was omitted. The research was conducted on the Malvazija istarska variety within vineyards in Radeki polje.

Keywords: precipitate, wine turbidity, protein stability, bentonite, Malvazija istarska

1. Uvod

‘Malvazija istarska’ najzastupljenija je bijela sorta na području Istre, a također i sorta oko koje istarski vinari ulažu i najviše truda. Riječ je o sorti koja je posljednjih desetak godina probila lokalne okvire, obilježila vinarsku scenu cijele Hrvatske te je jedna od najsnažnijih izvoznih aduta.

No, kako se u vinogradarsko-vinarskoj proizvodnji kao sve češći problem javljaju visoke temperature ni Hrvatska Istra nije iznimka među vinogradarskim podregijama u Hrvatskoj. Visoke temperature u periodu dozrijevanja mogu utjecati na intenzivniju sintezu proteina u grožđu uslijed čega kvaliteta vina može biti značajno narušena. Prisutnost bjelančevina može dovesti do nestabilnosti vina koja se očituje kroz zamućenje i pojavu taloga kao rezultat denaturacije nestabilnih oblika proteina.

Do stvaranja zamućenja i sedimenta u vinu najčešće dolazi prilikom loših uvjeta skladištenja vina koje je već napunjeno i nalazi se u bocama. Jedan od tih uvjeta je temperatura. Prilikom visokih temperatura proteini se talože i uzrokuju zamućenje baš kao i kada su temperature preniske pa dolazi do stvaranja kristala kalijevog bitartarata. Tim pojavama negativno se utječe na potrošače prilikom izbora butelja stoga vinari kako bi to izbjegli posežu za raznim enološkim sredstvima kako bi stabilizirali vino spriječivši pojavu zamućenja. Stoga se može zaključiti da je stabilizacija proteina važna tehnološka operacija u proizvodnji vina te ima direktan utjecaj na kakvoću gotovog proizvoda.

Proteini su, u pravilu, pozitivno nabijene molekule, međutim njihov naboj ovisi o izoelektričnoj točki i pH vrijednosti mošta ili vina. Proteini s izoelektričnom točkom vrijednosti višom od pH mošta ili vina nose pozitivni naboj i reagiraju sa sredstvom za bistrenje negativnoga naboja, kao što je bentonit (Blade i sur., 1988). Dokazano je postojanje više frakcija proteina vina, a izoelektrična točka tih frakcija kreće se u rasponu 3,1 – 9,2 (Achaerandio i sur., 2001), dok se izoelektrična točka tih frakcija u vinima Malvazija istarska kreće u rasponu 2,5 – 8,7 (Blade i sur., 1988).

Jednom kada se bentonit pripremi on ima oblik kaše. Nakon što se pomiješa s vinom dolazi do flokulacije i sedimentacije te formiranja kompaktnog taloga koji se nakon određenog vremena odvaja pretakanjem. Taj proces veoma je jednostavan, ali ima nekoliko nedostataka. Bentonit nije specifičan samo za proteine, već na sebe veže i druge molekule pozitivnoga naboja. Velike količine dodanoga bentonita mogu utjecati na senzorska svojstva vina, mirisne i okusne komponente (Ribéreau-Gayon i sur., 2000) te dolazi do gubitka volumena vina od 3 do 10%.

1.1. Cilj rada

Zbog pretpostavke da će različite količine bentonita aplicirane u dva različita termina utjecati na osnovni fizikalno-kemijski sastav, koncentraciju ukupnih proteina te proteinsku stabilnost vina 'Malvazija istarska', cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj primjene bentonita u različitim koncentracijama te u različitim terminima aplikacije na osnovni fizikalno kemijski sastav te na ukupnu proteinsku stabilnost 'Malvazije istarske'.

2. Pregled literature

2.1 Bistrenje vina

Bistrenje vina jedan je od niza postupaka stabilizacije i pripreme vina za punjenje u boce. Većini potrošača prilikom odabira butelja bistroća je izrazito bitan faktor osobito kada je riječ o bijelim vinima. Zamućenje u bijelom vinu lako je uočljivo, vizualno je nepoželjno te se percipira kao mana. Do njegove pojave može doći uslijed neprikladnih uvjeta skladištenja i transporta, stoga je pojavu zamućenja nužno spriječiti jer predstavlja veliku prepreku prilikom stavljanja vina na tržište (Pocock i sur., 2011). Uobičajeni razlozi pojave zamućenja i taloga su narušavanje mikrobiološke, tartaratne i proteinske stabilnosti (Ribéreau-Gayon i sur., 2000)

Zadovoljavajuća bistroća vina ovisi o jačini proteinske stabilnosti vina, pa će tako vino s jačom odnosno većom stabilnošću proteina biti aromatski i vizualno poželjno izbalansirano, za razliku od vina čija je proteinska stabilnost slabija ili niža (Koch i sur., 2008). Da bi vino zadobilo odgovarajuću bistroću spontano, bez upotrebe različitih enoloških sredstava, taj bi proces bio suviše spor. Zato danas postoje različita sredstva organskog ili anorganskog podrijetla koja taj proces ubrzavaju. Vrlo je važno da sredstva koja se koriste u postizanju zadovoljavajuće stabilnosti proteina u vinu budu sukladne svim navedenim uvjetima Zakona o vinu i pripadajućim pravilnicima. Isto tako, u procesu spontanog bistrenja vina, osim što je ono dugotrajno također zbog promjena u kemijskoj ravnoteži gotovo se nikad ne dovrši u potpunosti (Herjavec, 2019).

Bistrenje se obavlja nakon prvog pretakanja vina, što ovisi o vrsti posuđa u kojem se vino čuva te o malolaktičnoj fermentaciji i pH vrijednosti vina (Weiss, 1985). Bistrenje je važno provesti najkasnije do ožujka, prije toplijih mjeseci. To se posebno odnosi na vina koja se čuvaju u inoks spremnicima u kojima vino, za razliku od drvenih, sporo dozrijeva, te ako je stabilnost vina slaba može dovesti do ponovnog zamućenja (Herjavec, 2019).

Svrha bistrenja je dodatkom bistrila istaložiti iz vina sve čestice mutnoće, ali i sastojke koji tijekom dozrijevanja mogu prouzročiti ponovno zamućenje vina. Navedene čestice mutnoće odnose se i na proteine (Boulton i sur., 1980), čija stabilnost ovisi o samom porijeklu proteina kao i kemijskom sastavu. Sarmento i sur. (2001) su utvrdili da na profil proteina i njihovu stabilnost u bijelim vinima utječe sorta grožđa, način uzgoja, područje uzgoja i metode vinifikacije.



Slika 1. Prikaz vina prije i poslije bistrenja

Stabilnost i bistroća vina mogu se postići tijekom dugog perioda odležavanja u bačvama ili odgovarajućim posudama uz primjenu odgovarajućih enoloških postupaka kao što su sumporenje i pretakanje, ali je taj proces izrazito spor. Postizanje proteinske stabilnosti znatno se brže može postići primjenom postupaka ultrafiltracije, pasterizacije i bistrenja bentonitom. Klasičnom filtracijom i centrifugiranjem iz vina se uklanjaju čestice mutnoće, ali se vino ne stabilizira. Tako može doći do naknadnog nastajanja i taloženja čestica mutnoće. Ultrafiltracijom se uklanjaju termolabilni proteini na principu veličine pora od 10^{-3} do 10^{-1} nm. Međutim, postupak ultrafiltracije pokazao je određene nedostatke jer je osim proteina uklonio i druge spojeve velike molekulske mase poput polisaharida koji doprinose kvaliteti vina (Herjavec, 2019).

Kao najučinkovitiji postupak postizanja proteinske stabilnosti odnosno sprječavanja замуćenja vina pokazala se primjena bentonita. Bentonit se primjenjuje u moštu i vinu gdje zbog velike moći adsorpcije na sebe veže pozitivno nabijene čestice mutnoće. Pri tome dolazi do flokulacije i sedimentacije te formiranja kompaktnog taloga koji se nakon određenog vremena odvaja pretakanjem (De Bruijn i sur., 2009). No, kako je bentonit vrlo agresivno bistrilo jer nije strogo selektivan, uz pozitivno nabijene čestice može ukloniti i druge komponente vina kao što su aminokiseline, tvari boje te aromatske spojeve. Stoga se ne smije primjenjivati istodobno s dodatkom enzimskih preparata jer će ih inaktivirati.

2.2 Proteinska stabilnost vina

Stabilno je svako vino koje u boci ili nekoj drugoj posudi, unatoč različitim uvjetima čuvanja i vremenu čuvanja ostaje nepromijenjeno s obzirom na bistroću, boju, miris i okus. Stabilnost vina odnosno bistroća ovisi o topljivosti različitih tvari u istom. Koloidne skupine vrlo sitnih čestica tvari koje se u vinu sporo talože, a uzrokuju замуćenje vina jesu proteini, neki fenoli, teški metali i dr. (Zoričić, 2013). No, kao glavni uzrok nestabilnosti vina ipak se navode proteini

odnosno bjelančevine. Hoće li se navedene čestice otopiti ovisi o njihovim karakteristikama, ali i o samoj osjetljivosti vina. Primjerice, proteini su vrlo osjetljivi na temperaturu. Takvi termolabilni proteini vina vrlo su nestabilni i kao takvi uzrokuju zamućenje u mladim vinima uslijed promjene temperaturnih uvjeta (Herjavec, 2019).

Koja će količina proteina biti u samom grožđu ovisi o vremenskim uvjetima za vrijeme dozrijevanja. Ako su u periodu dozrijevanja vremenski uvjeti bili suhi i topli, tada će u grožđu biti veća količina proteina. Suprotno navedenom, ako su vremenski uvjeti bili hladniji uz odsustvo sunca s povećanom vlagom, tada će koncentracija proteina u grožđu biti smanjena (Siebert i sur., 1996). Navedenu proteinsku stabilnost vina potrebno je ispitati prije nego li se mlado vino pretoči u boce. Postoji više mogućnosti utvrđivanja proteinske stabilnosti vina kao što su: test zagrijavanjem, test s kemijskom denaturacijom i test topljivosti u alkoholu. Ako se pokaže da vino ima neodgovarajuću stabilizaciju, tada prolazi kroz proces postizanja stabilnosti proteina odnosno kroz stabilizaciju.

2.3 Utvrđivanje proteinske stabilnosti vina

Postoje različiti postupci kojima se može utvrditi stabilnost proteina u vinu. Najčešće su ti postupci jednostavni, jeftini, brzi i predviđaju kakva je stabilnost vina i kakva će ta stabilnost ostati nakon pretakanja istog. Međutim, ti testovi nekad nisu apsolutno točni jer zamućenje ne dolazi isključivo utjecajem proteina već kompleksom proteina, fenola i polisaharida. Dakle, zamućenje nije posljedica samo termolabilnih proteina nego i stvaranja netopljivih veza tanina i proteina. Smatra se da je otprilike polovina proteina vezana za fenole koji potom stvaraju već spomenuto zamućenje (Zoecklein, 2005).

Kao najkorišteniji test među vinarima navodi se test zagrijavanjem. Predikcija stabilnosti proteina u vinu u testu zagrijavanjem ovisi o visini temperature kao i o vremenskom periodu u kojem je vino izloženo određenoj temperaturi. Primjerice, ako uzorak vina izložen na 40 °C u vremenskom periodu od 24h, tada je istaloženo tek 40% proteina, dok na temperaturi od +60 °C istaloženost proteina iznosi 95-100%. Neki vinari nakon samog testa zagrijavanjem, vino podvrgavaju i hlađenju. Berg i Akiyoshi (1971.) predlažu uzorak ostaviti 4 dana na temperaturi od +49 °C, a nakon zagrijavanja isti uzorak odmah izložiti temperaturi od -5 °C na 24h kako bi se ohladio. S druge strane, Ribéreau-Gayon i Peynaud (1961.) smatraju da se izlaganjem uzorka vina na +80 °C u vremenskom periodu od 10 minuta može već utvrditi stabilnost vina. Nadalje, vino je stabilno ako se u neposrednom procesu hlađenja ne pojavi zamućenje (Mesquita i sur., 2001). Kao test za utvrđivanje stabilnosti proteina u vinu, može se koristiti i test s kemijskom denaturacijom. Kako i samo ime kaže, u uzorak se unosi određena lužina ili kiselina poput etanola, amonijevog sulfata, trikloroctena kiselina, fosfomolibdenska kiselina i dr. koje potiču denaturaciju proteina i taloženje razorenih proteina iz koji se potom iščitava stabilnost proteina u vinu (Zoecklein, 1991).

2.4 Proteini

Proteini su dušični spojevi koji u vino dolaze iz grožđa te odumiranjem i razgradnjom stanica kvasaca pod kraj alkoholne fermentacije uslijed autolize njegovih stanica. Takvi proteini poznati su kao manoproteini i oni mogu biti u interakciji sa spojevima arome i tako utjecati na profil aroma konačnog proizvoda (Chalier i sur., 2007).

Sinteza proteina u bobicama počinje ubrzo nakon šare paralelno s nakupljanjem šećera, a najveću razinu dostiže u doba berbe. Obično grožđe iz toplijeg i sušeg klimata ima veći sadržaj proteina, stoga je veća koncentracija proteina i ukupnog dušika povezana s manje vlage u vinogradu (Herjavec, 2019). Grožđe sadrži proteine osjetljive i neosjetljive na toplinu, a njihova količina varira od 100 do 800 mg/L. Prelaskom mošta u vino, alkoholnom fermentacijom, njihova se količina smanjuje jer se talože uslijed denaturacije s alkoholom i vezanjem s taninima u vinu čime dolazi do promjena u njihovom profilu koji se na kraju proizvodnje znatno razlikuje od početnog profila iz grožđa (Ferreira i sur., 2002).

Topivost proteina vina bitno ovisi o temperaturi, koncentraciji alkohola i pH vrijednosti. Stoga govorimo o termolabilnim proteinima. Promjena u bilo kojem od tih parametara mogu dovesti do nestabilnosti odnosno taloženja proteina u vinu koja se očituju kao zamućenje (Herjavec, 2019). Proteini koji najviše doprinose proteinskoj nestabilnosti pripadaju skupinama hitinaza, taumatinu sličnih proteina (TL proteini) te β -glukanazama koji se i u malim koncentracijama mogu taložiti i stvarati zamućenje. Zbog toga je stabilizacija proteina važna tehnološka operacija u proizvodnji vina te ima direktan utjecaj na kakvoću gotovoga proizvoda (Hsu i sur., 1987).

Takvi proteina imaju kompaktnu globularnu strukturu, malu molekulsku masu do 35 kDa, imaju pozitivan naboj pri pH vrijednosti vina i otporni su na uvjete niskog pH u moštu i vinu (Waters i sur., 2005). Zbog otpornosti na proteolizu i kisele pH uvjete smatra ih se stabilnima tijekom vinifikacije, ali u uvjetima više temperature mogu denaturirati i stvoriti agregate koji raspršuju svjetlost čime vino čine mutnim (Van Sluyter i sur., 2015).

Proteini povezani sa stvaranjem zamućenja identificiraju se još i kao proteini za koje se povijesno smatralo da su proteini povezani s patogeneзом grožđa (PR) jer neki autori tvrde kako je njihova pojačana proizvodnja dodatno inducirana situacijama patološke naravi u kojima ih loza proizvodi za svoju obranu (Pocock i sur., 2000).

Stabilni proteini iz kvasca i grožđa kao što su glikoproteini, invertaze te manoproteini velike molekulske mase s druge strane mogu utjecati na kvalitetu vina djelujući zaštitno na potencijal zamućenja vina pri višim temperaturama. Shodno tome, možemo zaključiti da potencijal zamućenja ovisi o sastavu proteina odnosno omjeru nestabilnih i stabilnih proteina (Vincenzi i sur., 2011).

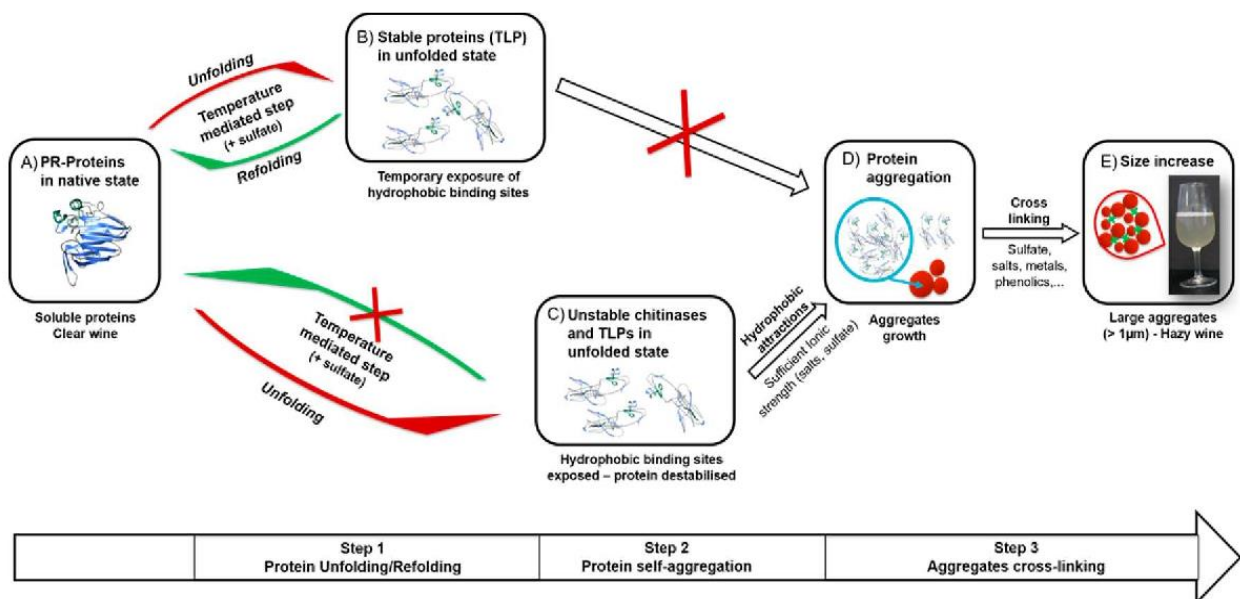
2.4.1. Mehanizam stvaranja proteinskog zamućenja u vinima

Mehanizmi povezani sa stvaranjem zamućenja u vinima nisu još dovoljno dobro istraženi. Obično se navodi kao proces koji se odvija u tri faze. U prvoj fazi, stvaranje zamućenja uključuje odmatanje strukture nestabilnih proteina kao odgovor na podražaje poput povišene temperature tijekom skladištenja, prilikom čega se otkrivaju hidrofobna mjesta vezanja dostupna za interakcije koja se obično nalaze unutar jezgre proteina.

Smatra se da nestabilni TL proteini u svojoj strukturi imaju izraženu petlju stabiliziranu disulfidnom vezom koja ako se destabilizira toplinom može otkriti susjedno proteinsko područje (Waters i sur., 1995). U termolabilnim proteinima susjedno područje koje postaje izloženo na redukciju disulfinih veza smještenih u izraženoj petlji je hidrofobno. Djelovanjem uvjeta pogodnih za reduciranje tih veza poput topline u prisustvu sulfita dolazi do interakcije s hidrofobnom petljom čime dolazi do agregacije. Suprotno tome, stabilni taumatinu slični proteini ne talože se zbog hidrofilne prirode izloženih područja koja nisu povoljna za agregaciju te se uslijed hlađenja ponovo namataju u početni prirodni oblik (Van Sluyter i sur., 201.).

U drugoj fazi stvaranja zamućenja nestabilni se proteini nakon odmatanja i otkrivanja hidrofobnih područja počinju samoagregirati hidrofobnim interakcijama. U ovoj fazi vinske komponente mogu modificirati ionsku snagu otopine jer soli i sulfati mogu pogodovati vezivanju odmotanih proteina koji dalje potiču njihovu agregaciju što je posebno slučaj kod TL proteina (Marangon i sur., 2011).

U trećoj i posljednjoj fazi agregacije, proteinski agregati postupno postaju unakrsno povezani djelovanjem sulfata i polifenola koji rastu u sve veće agregate dok ne dosegnu veličinu koja ih čini vidljivim golim okom ($\geq 1 \mu\text{m}$) nakon čega dolazi do njihove agregacije i taloženja. Prisutnost sulfata i soli također može neutralizirati proteinsku mrežu naboja i smanjiti prirodnu elektrostatsku odbojnost između slično nabijenih proteina, međutim vjerojatnije je da polifenoli putem hidrofobnih interakcija unakrsno povezuju agregate proteina.

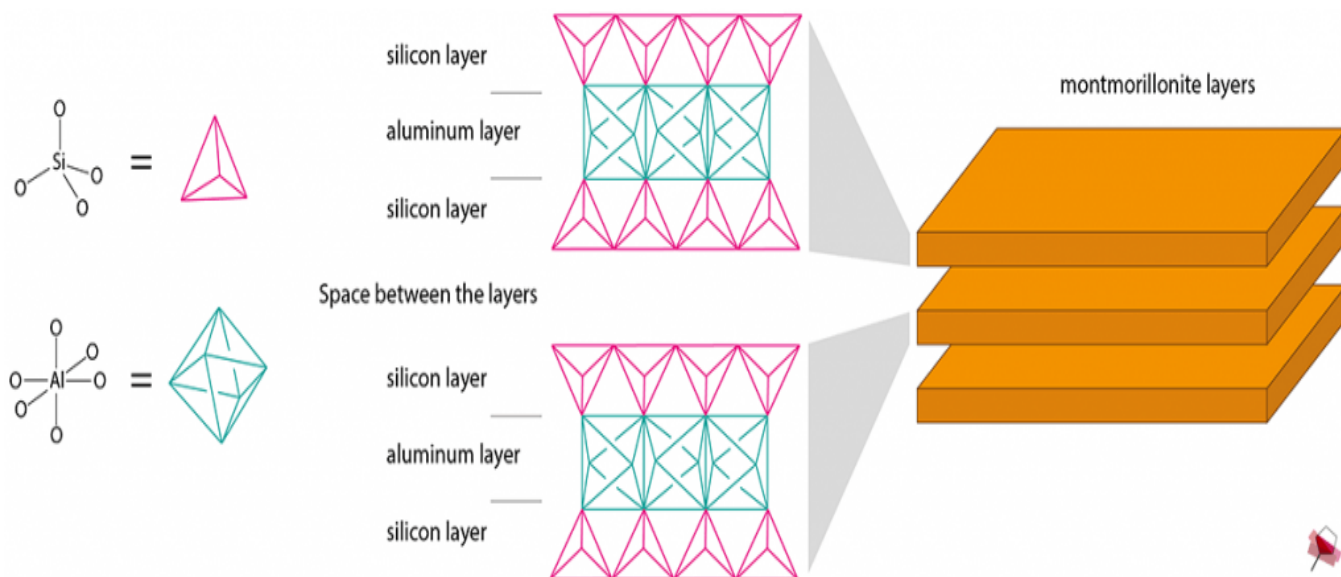


Slika 2. Prikaz mehanizma razmatanja i agregiranja termolabilnih proteina u vinu (Van Sluyter i sur., 2015)

2.5. Bentonit

Bentonit se smatra jednim od najučinkovitijih i najčešće korištenih sredstava u svrhu sprječavanja pojave zamućenja koja se javlja kao posljedica proteinske nestabilnosti vina. Međutim, nisu svi bentoniti prikladni za upotrebu u vinarstvu. Neki nemaju dovoljnu sposobnost adsorpcije dok neki zbog grube strukture u vinu mogu ostaviti nepoželjni *aftertaste* (Ribéreau-Gayon i sur. 2000). Bentoniti namijenjeni za vinarstvo u prodaju dolaze u obliku praha i granula kao natrijev i kalcijev bentonit te kao kombinirani bentonit pod trgovačkim nazivima kao Pentagel, Bistrina, Klarol i sl.

Bentonit je prirodna glina ili alumosilikat koji se milijunima godina taložio u širokim slojevima da bi vremenom prešao iz krhkog staklastog stanja u mineralno. Uglavnom je sastavljen od minerala montmorilonita. Montmorilonit je laminarne strukture koju čine zasebni tetraedarski i oktaedarski slojevi u omjeru 2:1. U praksi to znači da se struktura montmorilonita sastoji od dva sloja atoma silicija (Si) vezanih za kisik (O) između kojih se nalazi jedan sloj atoma aluminija (Al) koji je također vezan za kisik. Slojevi su poredani u prilično pravilnom uzorku te se između dva tetraedarska nalazi jedan oktaedarski sloj što mu daje iznimna koloidna svojstva. Kakvo će biti svojstvo površine minerala gline ovisi o kemijskom sastavu, površinskim atomima, količini i vrsti naboja te vrsti izmjenjivih kationa (Lambri i sur., 2016).



Slika 3. Prikaz laminarne strukture montmorilonita
(https://winescience.org/wine_cellar/bentonite-disadvantages/ - pristupljeno 20.05.2021)

Hidrofobnost i hidrofilnost površine pod utjecajem su atoma metala vezanih na kisik. Kada nema izomorfne supstitucije, Si-O veze prevladavaju u tetraedarskom sloju, a Al-O veze u oktaedarskom sloju i površina je hidrofobna. Kad u tetraedrima dolazi do supstitucije Si^{4+} trovalentnim kationima, odnosno u oktaedrima do supstitucije Al^{3+} divalentnim kationima, površina postaje hidrofilna. Negativan naboj koji preostaje nakon takvih supstitucija uravnotežen je prisutnim izmjenjivim kationima (npr. Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} i K^+) u prostoru između slojeva i na vanjskim površinama čestica gline odnosno bentonita koji se mogu otpuštati u medij kao što je vino (Lambri i sur., 2015).

Molekule vode koje se okupljaju oko izmjenjivih kationa povezuju se s bentonitom, vodikovim vezama, dipolnim privlačenjem i Van der Waalsovima silama čime utječu na proširenje prostora između slojeva lamelarne strukture bentonita i njegovog svojstva bubrenja, modelirajući interkalaciju vode u unutarnje slojeve (Catarino i sur., 2008). Ekspanzija ili bubrenje ovise o prisutnim kationima, ionskoj jakosti medija i drugim čimbenicima. Molekule vode se negativnim dijelom dipola okreću prema kationu i pritom oslabljuju elektrostatske interakcije s nabijenim slojem čime se povećava razdvajanje između dva sloja, tako se kationi s površine mogu zamijeniti s kationima u okolnom mediju (Bergaya i sur., 2012).

Hassan i Abdel-Khalek (1998) godine bentonit su prema mogućnostima bubrenja podijelili na dva tipa, a to su: prirodni kalcijev i prirodni natrijev. Kalcijev bentonit zbog višeg sadržaja $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ kationa ima niži kapacitet bubrenja u vodi stoga je još poznat i kao ne bubreća glina. S druge strane, natrijev bentonit zbog višeg sadržaja $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kationa jače bubri i češće mu dolazi do raspada strukture jer se u prostor između slojeva lamelarne strukture bentonita tijekom namakanja u vodi u prisutnosti natrijevih kationa može umetnuti veći broj molekula vode nego u prisustvu kalcijevih kationa. Kako bi se postigla što bolja svojstva bubrenja i poboljšala adsorpcija proteina iz vina pomoću bentonita na bazi kalcija često se provodi aktivacija ionima natrija (natrijev karbonat) čime se izvorni kalcijevi kationi izmjenjuju natrijevim kationima. Vlažna bentonitna suspenzija zagrijava se na $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u prisutnosti Na_2CO_3 pri čemu se Ca^{2+} ioni talože u obliku CaCO_3 te se dio međuslojnih i površinskih Ca^{2+} zamjenjuje s Na^+ ionima (Catarino i sur., 2008). Ovakav proces naziva se mineralna aktivacija, a bentoniti su nakon aktivacije poznati kao aktivirani bentoniti.

Do razlike u bubrenju može doći i zbog tvrdoće vodovodne (tvrde) i destilirane (meke) vode odnosno može doći do zamjene Na^+ kationa iz bentonita s Ca^{2+} kationima iz tvrde vode čime se pojačavaju veze među lamelama bentonita odnosno smanjuje se njegovo širenje (bubrenje) (Kawatra, 2003) što ima za posljedicu manju sposobnost vezivanja proteina, veću potrebnu dozu i manje taloga (Plavša i sur., 2011).

Preporučene količine bentonita za bistrenje mošta i vina kreću se u širokom rasponu od 30 do 200 g/hL, ovisno o vrsti preparata. Iako mnogi vinari empirijski primjenjuju jednake količine bentonita, svake godine obavezno treba probom na malo utvrditi količinu potrebnu za bistrenje jer sastav grožđa odnosno mošta i vina variraju ovisno o godini. U sušnim godinama grožđe sadrži više termolabilnih proteina te se za postizanje proteinske stabilnosti vina koristi veća količina ovog bistrila (Herjavec, 2019).

2.5.1 Utjecaj bentonita na proteine u moštu i vinu

Kao što je već navedeno, za postizanje proteinske stabilnosti u proizvodnji bijelih vina gotovo se uvijek koristi bentonit. Kapacitet vezanja proteina na površinu bentonita ograničen je učinkom fizikalnih svojstava bentonita odnosno gustoćom njegovog naboja po jedinici površine, indeksom bubrenja te njegovom specifičnom površinom, pH vrijednosti vina, temperaturi te sadržaja volumnog udjela etanola u vinu (Lambri i sur., 2016).

Do adsorpcije proteina dolazi kao posljedica kationske izmjenjivačke sposobnosti koju posjeduje ova glina. Noseći negativni naboj u odnosu na pH vina, bentonit elektrostatički djeluje s pozitivno nabijenim vinskim proteinima stvarajući njihovu flokulaciju. Odnos između pH vina i izoelektrične točke proteina upravlja kationskom prirodom proteina u vinu i time njihovom tendencijom da se elektrostatski adsorbiraju pomoću negativno nabijene površine bentonita. Znači da su proteini čija je izoelektrična točka viša od pH vina pozitivno nabijeni te da se mogu adsorbirati zamjenom s kationima na površini bentonita (Boulton i sur., 1996). Međutim, bentonit nije jednako učinkovit u uklanjanju svih proteina iz vina. Razna ispitivanja pokazala su da različite proteinske frakcije mogu zahtijevati različite koncentracije bentonita kako bi ih se uklonilo (Murphey i sur., 1989).

Dokazano je postojanje više frakcija proteina vina, a izoelektrična točka tih frakcija kreće se u rasponu 3,1 – 9,2 (Achaerandio i sur., 2001) dok se izoelektrična točka tih frakcija u vinima 'Malvazija istarska' kreće u rasponu 2,5 – 8,7 (Blade i sur., 1988) što je potvrdila i Anelli (1977) kada je ustanovila da je upravo u uzorku mošta 'Malvazije istarske' bilo prisutno 33% negativno nabijenih proteina zbog izoelektrične točke niže od pH vrijednosti.

Tablica 1. Zastupljenost proteina u 'Malvaziji istarskoj' prema vrijednostima njihovih izoelektričnih točaka u odnosu na Rizling bijeli (Anelli, 1977).

sorta	izoelektrična točka (pH)	udio proteina (%)
Malvazija istarska	2,5	18
	2,8	11
	3,1	4
	4,6	30
	6,5	13
	7,1	5
	8,3	9
	8,7	10
Bijeli rizling	3,6	19
	3,9	53
	6,7	17
	7,1	11

Povećani adsorpcijski kapacitet bubrenja bentonita vjerojatniji je pri višim temperaturama jer kod nižih temperatura dolazi do promjena konformacije proteina.

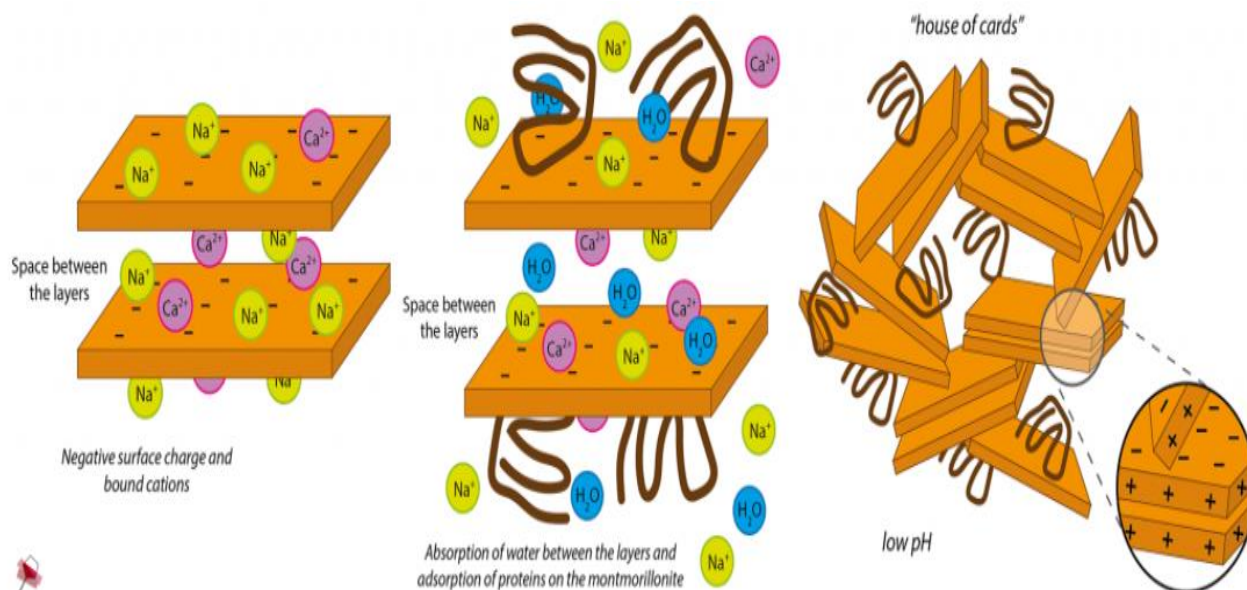
Međutim, kako je bentonit vrlo agresivno bistrilo jer nije strogo selektivno osim pozitivno nabijenih proteina na sebe može vezati i druge komponente vina pozitivnog naboja kao što su aminokiseline, tvari boje te aromatske spojeve čime značajno može utjecati na senzorna svojstva vina te mirisne i okusne komponente (Ribéreau-Gayon i sur., 2000). Proteini adsorbirani na bentonit se zajedno s njim talože te uklanjaju iz vina (Van Sluyter i sur., 2015).

Kontaktno vrijeme ili vrijeme potrebno za završetak reakcije između dodanog bentonita i pojedinog vina može varirati. Ribéreau-Gayon i sur. (2000) navodi kako je uobičajena praksa ostaviti vino nekoliko dana u kontaktu s bentonitom, međutim neki autori navode da se već nakon dvadeset do trideset minuta kontakta s vinom postiže maksimalna adsorpcija proteina na bentonit u laboratorijskim uvjetima, stoga je najsigurnije učestalo kontroliranje vina tretiranog bentonitom kako bi se ustanovilo vrijeme završetka reakcije (Herjavec, 2016).

Kao jedan od značajnih faktora adsorpcije proteina na bentonit ističe se pH vrijednost vina. Njegova vrijednost može utjecati na naboj proteina i učinkovitost izmjene kationa na bentonitu. Proteini su najmanje topivi kada pH vrijednost vina odgovara njihovoj izoelektričnoj točki jer im je tada ukupan naboj jednak nuli. Vino ima pH vrijednost koja je blizu izoelektrične točke većine frakcija proteina u njemu. Ipak, većinu proteina u vinu karakteriziraju vrijednosti izoelektrične točke više od uobičajenog pH vina tako da je njihov ukupan naboj pozitivan (Zoecklein, 1991). Smatra se da promjena pH vrijednosti u rasponu od 3,0 do 3,6 ima značajan utjecaj na proteine srednje i velike molekulske mase tijekom adsorpcije na bentonit (Dordoni i sur., 2015).

Volumni udio etanola u vinu također je jedan od važnijih faktora adsorpcije proteina na bentonit. Molekule etanola mogu uzrokovati jače bubrenje bentonita jer mogu zamijeniti molekule vode između njegovih slojeva čime dolazi do povećanja broja izmijenjenih kationa. Povećana izmjena kationa rezultira povišenjem adsorpcijskog kapaciteta međutim, razdvajanje slojeva bentonita molekulama etanola ide do određene granice i moguća je adsorpcija samo onih proteina koji su dovoljno mali da uđu u strukturu bentonita (Achaerandio i sur., 2001).

Optimalno djelovanje bentonita uključuje uklanjanje termolabilnih proteina odgovornih za zamućenje. Međutim, moštovi i vina s visokim sadržajem proteina trebaju relativno velike količine bentonita da bi postigli proteinsku stabilnost u usporedbi sa moštovima i vinima s manje proteina iako veza između potreba za bentonitom i koncentracije proteina nije strogo linearna (Mesquita i sur., 2001). Ukupan sadržaj proteina je koristan podatak, ali ne daje informaciju o riziku pojave zamućenja. Za to su važniji podaci o vrsti proteina i njihovim relativnim koncentracijama (Lambri i sur., 2012).



Slika 4. Mehanizam djelovanja bentonita na proteine mošta i vina
(https://winescience.org/wine_cellar/bentonite-disadvantages/ - pristupljeno 22.05.2021)

2.5.2. Utjecaj bentonita na aromatske spojeve

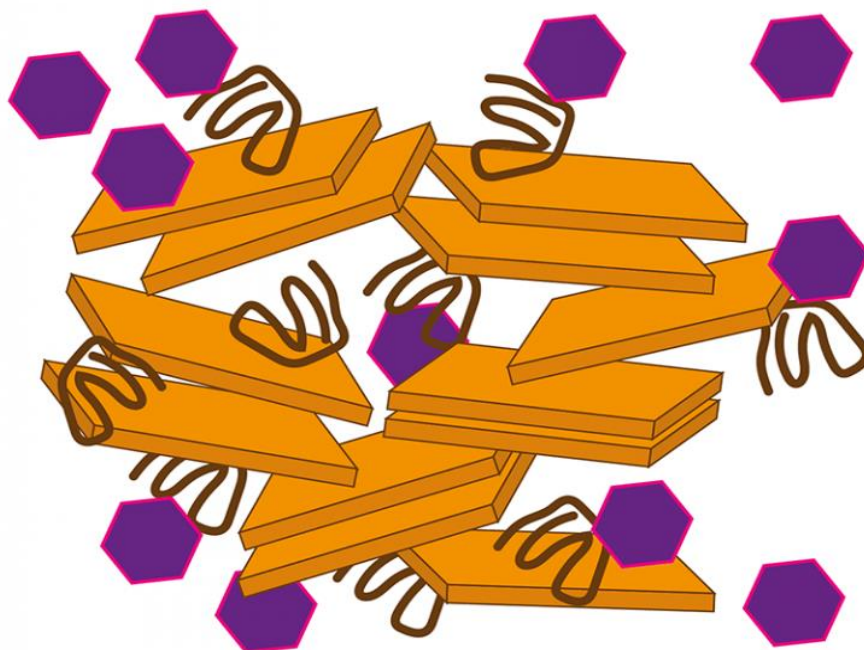
Aroma vina je vrlo kompleksno svojstvo koje je rezultat međudjelovanja kemijskih spojeva u vinu te osjeta mirisa i okusa. Aromu čine aromatski spojevi iz grožđa kao i spojevi koji se formiraju tijekom i/ili nakon alkoholne fermentacije. Do sada je identificirano nekoliko stotina aromatskih komponenti sa širokim rasponom malih koncentracija koje se izražavaju u mg/L pa sve do ng/L (Rapp, 1988).

Zbog slabe selektivnosti osim pozitivno nabijenih proteina bentonit može uzrokovati i gubitak tvari boje i arome u vinu jer ih adsorbira montmorilonit ili se taloženjem vezani na termolabilne proteine izvlače iz vina, čime se značajno može utjecati na senzorna svojstva te mirisne i okusne komponente vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2000).

Da bi se taj gubitak ograničio, poželjno je koristiti bentonit što manje i što učinkovitije. Toplinskim testom ili bento testom mogu se odrediti potrebne količine bentonita, međutim teže je odrediti najbolje vrijeme upotrebe bentonita tijekom vinifikacije. Trenutak dodavanja (prije, tijekom ili nakon fermentacije) nije važan samo za učinkovitost bentonita već može imati različit učinak na senzorna svojstva vina.

Uz to, bentonit također veže dušikove spojeve što utječe na količinu prisutne hrane za kvasce. Smatra se kako je korištenje bentonita u sredini i pred kraj alkoholne fermentacije najučinkovitije te ujedno ima i najmanji učinak na arome vina. Nakon završene alkoholne fermentacije ili neposredno prije punjenja vina u bocu ne preporučuje se njegova upotreba jer se vino tada teško može oporaviti od gubitka aroma (Herjavec, 2019).

Idealan trenutak za upotrebu bentonita kao i odabir njegove količine razlikuje se ovisno o sorti grožđa i tipu vina jer svako grožđe i vrsta vina (pjenušavo, bijelo, narančasto) ima jedinstveni sastav aroma i proteina. Stoga, njegov učinak na spojeve arome vina bitno ovisi o kemijskim svojstvima i početnim koncentracijama hlapljivih spojeva te količini i vrsti proteina u vinu (Lambri i sur., 2015).



Slika 5. Prikaz gubitka aromatskih spojeva i tvari boje (ljubičasti heksagon) vezanjem na termolabilne proteine i montmorilonit (https://winescience.org/wine_cellar/bentonite-disadvantages/ - pristupljeno 24.05.2021)

2.6. Malvazija istarska

Malvazija istarska tipična je autohtona sorta istarskog poluotoka. Poznata je i pod nazivima 'Malvazija', 'Malvazija bijela', 'Malvasia istriana', 'Malvasia', 'Istarska Malvazija', 'Istrian Malvasia', 'Malvasia d'Istria', 'Malvasia bianca' (Maletić i sur., 2015) Iako neutvrđenog porijekla smatra se kako su Malvaziju s grčkog poluotoka Peloponeza u Istru donijeli venecijanski trgovci vinom. Za vrijeme Austro-Ugarske vino 'Malvazija istarska' dobija tržišnu važnosti nakon što je filoksera poharala vinograde što potvrđuju i prve pisane informacije iz 1891. kada se vino takvog naziva pojavljuje na izložbi vina u Zagrebu (Herjavec , 2019). Danas je Malvazija istarska treća gospodarski važna vinska sorta u Hrvatskoj i vodeća je sorta po proizvodnji u Istri te je ujedno i jedan od gotovo kulturoloških pojmova koji definira ovu regiju.

'Malvazija istarska' s vegetacijom počinje kasno i dozrijeva u III. razdoblju. Bujnog je rasta, pogotovo u uvjetima dubokih i plodnih tala s većom dostupnošću vode. Ima jak trs s dugim mladica i internodijima. Tijekom cvatnje sklona je jačem osipanju ako nastupe kišni i hladni uvjeti (Maletić i sur., 2015). Cvijet je morfološki i funkcionalno dvospolan, a grozd je srednje velik, rastresit do umjereno zbijen, obično s jednim krilom. Bobica je srednje velika do krupna, okrugla, zelenožute boje, a u punoj zrelosti i na osunčanoj strani zlatnožute. Kožica je pokrivena sivim maškom s izraženom vršnom točkom. Meso je sočno i ugodnog slatkog okusa. U prosjeku akumulira 17 – 22 % šećera i 5 – 7 g/L ukupnih kiselina (www.vinistra.com – pristupljeno 26.05.2021.). Odrasli list je pentagonalan do okruglast, nešto izraženije širine u odnosu na duljinu, nejednoličan, velik i obično trodijelan (Maletić i sur., 2008). Plojka lista je glatka i svijetlozelene boje.



Slika 6. Malvazija istarska

'Malvazija istarska' ima visoku gospodarsku vrijednost budući da objedinjuje dobru rodnoš s visokom kvalitetom grožđa i vina, a osim toga ima i izraženu tipičnost i prepoznatljivost vezanu za područje Istre i okolice (Maletić i sur. 2015).

Vino 'Malvazija istarska' srednje je jako do jako sa sadržajem alkohola između 11,5 i 14 vol%. Umjerenog je sadržaja kiselina, između 5,0 i 6,5 g/L ukupne kiselosti. Puno je, zaobljeno i harmonično vino s 18 do 22 g/L ekstrakta. Raspon kvalitete vina varira ovisno o specifičnim svojstvima vinogradskih položaja. Jako dobro uspijeva na crvenici i flišnim terenima. Vina koja potječu od grožđa iz priobalnog dijela Istre gdje je tlo crvenica (terra rossa) karakterizira jača struktura dok se vina s fliša (lapor) odlikuju nježnom strukturom i delikatnijim mirisom. U pravilu vina ne podnose duže dozrijevanje, no od grožđa s dobrih položaja i dobrih vinogradskih godina, uz odgovarajuću tehnologiju, mogu se proizvesti vina koja optimalnu i vrhunsku kvalitetu postižu tek nakon određenog razdoblja dozrijevanja u reduktivnim uvjetima butelje (Herjavec, 2019). Boja vina varira od svijetložute i zelenkastih nijansi do zlatno žute ovisno o vinifikaciji i duljini dozrijevanja.

Tablica 2. Površina i broj trsova vodećeg sortimenta u Hrvatskoj

Sorta	Površina (ha)	Broj trsova (ha)
Graševina	4 563.62	21 169 712
Malvazija istarska	1 643.23	6 860 042
Plavac mali	1 473.95	11 910 716

Prema podacima Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju iz 2019. godine ukupna površina pod vinogradima u Republici Hrvatskoj iznosila je 19 022.09 ha, od toga 6.860.042 trsova odnosno 1 643.23 ha zasađeno je sortom 'Malvazija istarska' čime zauzima drugo mjesto po površini među sortama.

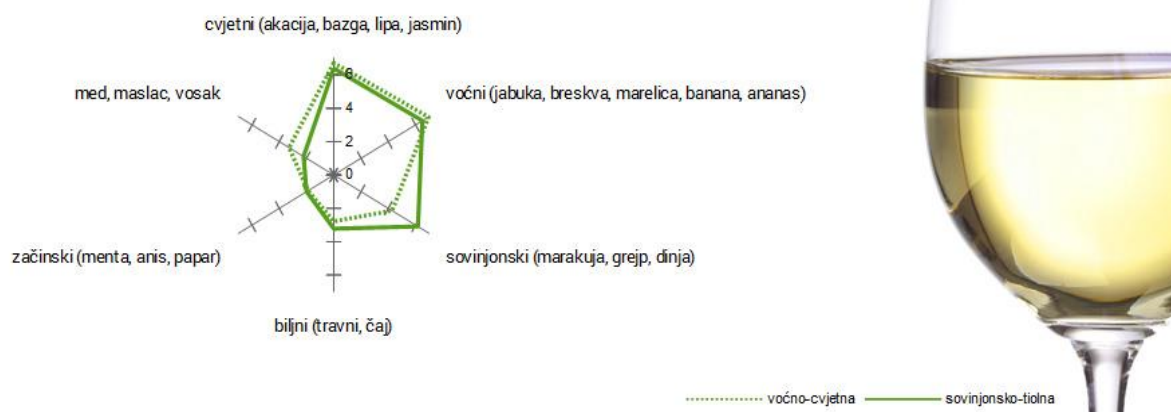
2.6.1. Aromatski profil 'Malvazija istarska'

Malvazija istarska ima veliki aromatski potencijal te je svrstana u poluaromatske sorte. Obično je aroma vina nježna cvjetno-voćna, u mladim vinima podsjeća na miris cvijeta bagrema i jabuke dok se u zreloom vinu može osjetiti i lagani gorkasti okus bajama (Herjavec, 2019). Veliki faktor u proizvodnji vina 'Malvazija istarskih' različitih aromatskih profila i senzornih svojstava je položaj s kojega dolaze kao i tehnologija proizvodnje.

Dosadašnja istraživanja govore o cvjetno-voćnom aromatskom profilu vina Malvazije, podrijetlom uglavnom od hlapivih estera (Lukić i sur., 2008) dobivenom standardnom tehnologijom proizvodnje (brzim odvajanjem mošta od krutih dijelova grožđa), odnosno naglašenoj sortnoj aromi vina 'Malvazija istarska' podrijetlom uglavnom od terpena (Radeka i sur., 2008) proizvedenih kraćom maceracijom masulja (crio i klasična maceracija u trajanju od 10-30 sati). Međutim, na tržištu se danas nalaze i vina 'Malvazije istarske' proizvedena dužom maceracijom masulja (i do nekoliko mjeseci) odnosno dio vina je proizveden iz prosušenog grožđa 'Malvazije istarske'. Primarne su arome zrele Malvazije kombinacija voćnih i cvjetnih aroma poput jabuka, bresaka i nektarina s cvijetom bagrema, podržanih više ili manje izraženim, ali uvijek prisutnim mineralnim notama. Mineralnost se također proteže kroz okus u vidu blage slanosti i nježno gorkastog završetka (www.vinacroatia.hr – pristupljeno 04.06.2021.).

Malvazije zapadne Istre, čiji su položaji bliže obali, imaju istaknutiju mineralnost koja je ponekad u potpunosti lišena ostalih aroma, no češće su u kombinaciji s nježnim voćnim aromama poput breskve. Malvazije središnje Istre i one s još većih nadmorskih visina karakterizira naglašena voćnost jabuka i nektarina te življe i osvježavajuće kiseline. Južnu Istru pak odlikuje nešto slađa voćnost usmjerena egzotičnijem voću i gotovo redovitoj aromi banana. Takve razlike u stilovima nisu uzrokovane samo raznolikošću položaja već i podtipovima malvazije čije je sređivanje i katalogizacija upravo u tijeku (www.vinacroatia.hr – pristupljeno 04.06.2021.).

Aromatski profil stila vina



Slika 7. Prikaz rezultata deskriptivne senzorna analize aromatskog profila svježije Malvazije istarske (www.vinacroatia.hr – pristupljeno 04.06.2021.)

3. Materijali i metode

Istraživanje je provedeno 2020. godine u vinogradima i vinskom podrumu Kalavojne d.o.o u selu Radeki Polje 10 km udaljenom od grada Pule. Za potrebe istraživanja korišteno je grožđe sorte 'Malvazija istarska' koje je ručno brano u trenutku njegove tehnološke zrelosti od 24. do 27. kolovoza, 2020. iz vinograda „Castello“, na području vinogradske podregije Hrvatska Istra, Vinogorja Zapadne Istre. Vegetacija je tijekom početnih mjeseci bila vrlo sušna, međutim kako se bližilo vrijeme berbe najavljeni su kišni dani što se odrazilo na nekoliko dana raniju berbu kako bi se izbjegle komplikacije tijekom postupaka prerade grožđa koja je provedena na dane berbe.

3.1. Prerada

Ručno ubrano grožđe dopremljeno je traktorom s prikolicom do vinskog podruma Kalavojne gdje su provedeni svi postupci primarne prerade grožđa, pripreme mošta te proizvodnje vina. Runjenje, muljanje i prešanje obavljani su na dan berbe. Grožđe je od oksidacije prilikom runjenja i muljanja zaštićeno postupnim dodavanjem Aromax-a u omjeru 20g/100kg grožđa. Nakon prešanja koje je provedeno pomoću pneumatske preše zatvorenog tipa pod tlakom od 1 bar odvojena je gruba prešavinska frakcija te je mošt iz cjednice prebačen u tankove zapremnine 10 000 L i flotiran s upotrebom želatine i inertnog dušičnog plina. Mošt je nakon flotacije 27.08.2020 rastočen po varijantama u četiri staklena demižona zapremnine 54 L u kojima su kasnije provedena istraživanja utjecaja direktne primjene bentonita u mošt te primjene bentonita tijekom alkoholne fermentacije.

U svaki demižon napunjeno je 50 L mošta s vrijednostima od: °Kl 15.1, pH 3,39, reducirajućim šećerima od 170 g/L te ukupnom kiselosti 5,1 g/L. Komercijalni kvasac Fermol Cryofruit (*Saccaromyces cerevisiae* x *Uvarum*) kojim je provedena alkoholna fermentacija prije inokulacije rehidriran je u deset puta većoj količini otopine tople vode i mošta te je doziran po preporuci proizvođača u omjeru 20 g/hL.



Slika 8. Mošt nakon flotacije rastočen u demižone zapremine 54 L

3.2. Priprema bentonita

Suspenzija bentonita na bazi natrija "Bentogran,, prije primjene pripremljena je u dvije odvojene posude u različitim dozama od 100 i 200 g/hL. Granule bentonita namočene su u deseterostruko većoj količini vodovodne vode te su uz povremeno miješanje ostavljene 24 sata u posudama kako bi se osigurala dovoljna hidratacija i bubrenje. Bubrenjem se stvara velika adsorptivna površina jer 1 g bentonita bubrenjem dobiva aktivnu površinu od oko 5 m². Nakon 24 sata kada je poprimio oblik želatinozne mase nabubreni bentonit dodan je u demižone s vinom uz snažno miješanje gdje je ostavljen do završetka reakcije taloženja.



Slika 9. Pripremljeni bentonit nakon 24 sata namakanja u vodovodnoj vodi

3.3. Dodatak bentonita u mošt

Nakon što je grožđe sorte 'Malvazija istarska' prerađeno po tehnologiji proizvodnje bijelih vina te nakon taloženja mošta, provedeno je prvo istraživanje 27.08.2020 dodatkom bentonita (pripremljenog dan prije) na bazi natrija "Bentogran,, direktno u mošt prije započete alkoholne fermentacije.

Za potrebe pokusa korištena su 2 staklena demižona zapremine 54 L napunjena moštom 'Malvazije istarske' te uzorak mošta koji je prethodno zaleđen radi kasnije analize. Pokus je proveden u dvije varijante. U prvoj varijanti 100 g pripremljenog bentonita dodano je u prvi demižon te pomiješano s moštom uz snažno miješanje od nekoliko minuta, a u drugoj varijanti pomiješano je 50 g pripremljenog bentonita s moštom iz drugog demižona. Na demižone su nakon postavljenog pokusa dodane vrenjače te su ostavljeni narednih mjesec dana u mračnoj prostoriji unutar podruma na temperaturi od 15°C do završetka reakcije taloženja i alkoholne fermentacije. Ovo istraživanje provedeno je kako bi se utvrdila razlika između učinka dvije različite doze bentonita tijekom bistrenja mošta prije fermentacije, na koncentraciju sastojaka sorte arome te na senzorsku kvalitetu vina koja je kasnije analizirana u laboratoriju Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 10. Prve dvije varijante postavljenog istraživanja nakon dodatka pripremljenog bentonita direktno u mošt

3.4. Dodatak bentonita tijekom fermentacije

Za potrebe ovog istraživanja u preostala dva staklena demižona zapremnine 54 L napunjena moštom 'Malvazije istarske' provedena je alkoholna fermentacija u kontroliranim uvjetima pri temperaturi od $15 \pm 0,5$ °C do sniženja koncentracije reducirajućih šećera. Nakon dva tjedna kada je fermentacija u demižonima ušla u posljednju fazu 09.09.2020 postavljen je pokus u dvije varijante. U obje varijante dodan je uz snažno miješanje prethodno pripremljeni bentonit na bazi natrija "Bentogran". U prvoj varijanti u treći demižon dodano je 100 g bentonita dok je u drugoj varijanti pokusa u četvrti demižon dodano 50 g bentonita. Na demižone su nakon dodatka bentonita vraćene vrenjače te su ostavljeni u mračnoj prostoriji unutar podruma uz dnevne preglede do završetka reakcije taloženja. Za kontrolni uzorak uzeto je vino iz tanka u koje nije dodan bentonit. Istraživanje je provedeno kako bi se utvrdila razlika između utjecaja bentonita u različitim koncentracijama tijekom alkoholne fermentacije te napravila usporedba s rezultatima istraživanja gdje je bentonita primijenjen u moštu na osnovni fizikalno kemijski sastav vina 'Malvazije istarske' te koncentraciju ukupnih proteina i proteinsku stabilnost vina koja je analizirana u laboratoriju Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.5. Uklanjanje taloga

Po završetku reakcije taloženja bentonita, sadržaj demižona iz dvaju istraživanja pretočeno je u plastične posude kako bi se iz demižona uklonio nastali talog čiji je udio u direktnoj ovisnosti s karakteristikama bubrenja bentonita. Nakon pretoka s taloga, demižoni su detaljno oprani te je u njih ponovo pretočeno vino koje je stajalo u plastičnim posudama. Iz kontrolnog tanka nadolivena je potrebna količina vina koju je svaka varijanta istraživanja izgubila uklanjanjem taloga kako bi demižoni bili napunjeni do vrha te su tako ostavljeni još neko vrijeme uz svakodnevne preglede. U istraživanju gdje je bentonit dodan u mošt pretok s taloga izvršen je 29.09.2020 dok je u istraživanju gdje je bentonit dodan u alkoholnoj fermentaciji pretok izvršen 07.10.2020. Nakon taloženja na dobivenim uzorcima iz svakog demižona provela se analiza osnovnog kemijskog sastava vina prema metodi O.I.V., sadržaj ukupnih proteina odredio se fluorescentnim obilježavanjem uz kvantitativnu analizu na Qubit 3.0. instrumentu (Thermo Fisher Scientific) dok se proteinska stabilnost vina odredila se testom zagrijavanja prema Iland, a statistička obrada podataka provela se sa STATISTICA 7.0. paketom.



Slika 11. Prikaz sadržaja taloga nakon završetka reakcije taloženja bentonitom. Prikaz demižona ide po varijantama redom: a) 100 g mošt, b) 50 g mošt, c) 100 g alkoholna fermentacija, d) 50 g alkoholna fermentacija

3.6. Osnovna analiza mošta i vina

Osnovna analiza uzoraka mošta i vina provedeno je standardnim metodama objavljenima od strane OIV-a (Međunarodne organizacije za lozu i vino sa sjedištem u Parizu) u Laboratoriju za grožđe, mošt i vino Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Tijekom analize koja je provedena 02.12.2020 odrađeni su uzorci 'Malvazije istarske' na kojima su provedena istraživanja te na kontrolnom uzorku 'Malvazije istarske' i moštu u kojima nije dodavan bentonit.

3.6.1. Određivanje alkoholne jakosti

Vrijednost alkoholne jakosti određena je u Kjeldahovoj tikvici metodom destilacije na način da se alkohol izdvojio iz vina kao destilat te se njegova specifična težina usporedila s specifičnom težinom vode na 20°C. Količina alkohola se iz dobivenih vrijednosti pomoću odgovarajućih tablica očitavala u g/L, a potom se iz tih vrijednosti očitao vol % alkohola. Rezultat je dobiven očitavanjem vrijednosti na Riechardovim tablicama. Analiza koja je obuhvaćala određivanje specifične težine mjerena je metodom piknometrije.

3.6.2. Određivanje ukupnog suhog ekstrakta

Ukupni ekstrakt u vinu analiziran je iz ostatka nakon destilacije u Kjeldahovoj tikvici te je izražen u g/L dok je ekstrakt bez šećera (razlika između ukupnog suhog ekstrakta i ukupnog šećera) izmjeren nakon što je od količine ukupnog ekstrakta oduzeta količina rezidualnog šećera koji predstavlja vrijednost ekstrakta bez šećera minus vrijednost nehlapivih kiselina izraženih kao vinska.

3.6.3. Određivanje hlapljive kiselosti

Određivanja hlapljive kiselosti (izražena kao octena u g/L) dobiveno je njezinom odvajanjem iz uzorka putem destilacije u struji vodene pare. Nakon destilacije uzoraka vodenom parom, nekoliko kapi fenolftaleina dodano je u dobivene destilate koji su potom titrirani sa 0, 1 M NaOH do pojave svijetlo ružičaste boje koja se morala zadržati barem 30 sekundi. Utrošak natrijevog hidroksida nakon pojave svijetlo ružičaste boje pomnožen je sa 1,2 čime je definirana koncentracija hlapljive kiselosti.

3.6.4. Određivanje ukupne kiselosti

Ukupna kiselost (g/L) određena je metodom direktne titracije koja se bazira na neutralizaciji svih kiselih frakcija otopinom neke lužine. Na osnovi utroška natrijevog hidroksida izračunata je ukupna kiselost pri čemu se bromtimolplavi koristio kao indikator.

3.6.5. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost izmjerena je potenciometrijski pomoću pH metra sa skalom kalibriranom u jedinicama pH tako da omogućava mjerenja do točnosti od najmanje 0,05 pH jedinice.

3.6.6. Određivanje slobodnog, vezanog i ukupnog sumpornog dioksida

Određivanje slobodnog sumpornog dioksida (mg/L) u uzorcima vinima mjereno je metoda po Paulu. Metoda se temelji na oslobađanju sumpornog dioksida iz zakiseljenog uzorka vina (dodatkom 25 %-tne ortofosforne kiseline) u struji zraka te njegovog vezanja na vodik peroksid pri čemu nastaje sumporna kiselina. Kao indikator koristi se mješavina metilen crvenog i metilen plavog te se titrira sa 0,01 M NaOH do pojave maslinasto zelene boje. Slobodni SO₂ dobije se množenjem utroška NaOH s 32.

Vezani SO₂ (mg/L) dobiven je ostavljanjem vina koje je nakon određivanja slobodnog sumpora ostalo u tikvici za kuhanje. Promijenjen je reagens u maloj apsorpcionoj tikvici, a zatim je pod tikvicu za kuhanje stavljen mali plamenik te je uz lagano vrenje ostavljen točno 10 minuta. Množenjem utrošenog 0,01 M NaOH s 32 dobije se vezani SO₂ u 1 litri vina. SO₂ ukupni (mg/L) dobije se zbrajanjem vrijednosti slobodnog i vezanog SO₂.

3.6.7. Određivanje pepela u vinu

Pepeo u vinu određen je spaljivanjem ostalog taloga nakon isparavanja uzoraka u mufolnoj peći na 525 °C. Nakon spaljivanja masa pepela pomnožena je s 50 čime je dobiven rezultat u g/L.

3.6.8. Određivanje ukupnog sadržaja fenola i proteina

Koncentracija ukupnog udjela fenola u uzorcima određena je reakcijom s Folin Ciocalteu-ovim reagensom. Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 750 nm na instrumentu UV/VIS spektrofotometru „Specord 400“ pri čemu su korištene 10 mm kvarcne kivete. Rezultati se izražavaju u ekvivalentima galne kiseline - mg GAE/L.

Ukupni sadržaj proteina u uzorcima određen je fluorescentnim obilježavanjem uz kvantitativnu analizu na Qubit 3.0. instrumentu (Thermo Fisher Scientific). Prvi korak analize bio je priprema je rade otopine pufera i fluorescentne boje (Qubit reagens A) u volumnom udjelu od 0,5 %. Nakon što je u epruveticu volumena 0,5 mL dodano 190 µL radne otopine te 10 µL uzorka vina dobivena smjesa miješa se od 2 do 3 sekunde u vortexu te se zatim postavlja na inkubaciju u trajanju od 15 minuta. Mjerenje se provodi na Qubit instrumentu koji sadrži poseban program za određivanje proteina te se dobivene vrijednosti izražavaju se u mg/L.

3.6.9. Određivanje parametara boje

Boja vina, definirana je kao optička gustoća vina izmjerena na tri valne duljine: 420 nm (žuta), 520 nm (crvena) te 620 nm (plava). Boja je određena pomoću spektrofotometra „Specord 400“. Intenzitet, tonalitet i pigmenti boje analizirani su mjerenjem absorbanci na 420, 520 i 620 nm. Intenzitet boje (CI), tonalitet (hue) te udjeli žute (%Ye), crvene (%Rd) i plave (%Bl) izračunati su po formulama:

$CI = Abs\ 420 + Abs\ 520 + Abs\ 620;$

$Hue = Abs\ 420 / Abs\ 520;$

$\% Ye = (Abs\ 420 / CI) \times 100;$

$\% Rd = (Abs\ 520 / CI) \times 100;$

$\% Bl = (Abs\ 620 / CI) \times 100.$

3.7. Određivanje proteinske stabilnosti

Proteinska stabilnost u uzorcima vina određena je standardnim testom zagrijavanja prema Ilandu i sur. (2000). Postupak je proveden zagrijavanjem uzoraka tijekom dva sata na 80 °C. Nakon postupka zagrijavanja uzorci su kratko hlađeni pod mlazom hladne vode te su potom postavljeni u hladnjak sljedeća dva sata na 4 °C. Nakon postupka hlađenja uzorci su ostavljeni neko vrijeme kako bi postigli sobnu temperaturu. Stupanj zamućenja u tako tretiranim uzorcima mjeren je turbidimetrom. Uzorci se ulijevaju u staklenu posudicu za turbidimetar, zatvore plastičnim čepom te se zatim očitaju vrijednosti stupnja zamućenja izražene u NTU. Uzorak je smatran proteinski stabilnim ako je razlika u izmjerenom zamućenju između uzorka koji je grijan i hlađen te odgovarajuće kontrole bio manji od 2 NTU.

3.8. Senzorna analiza

Senzorna analiza pokusnih vina provedena je metodom redoslijeda na Agronomskom fakultetu u Zagrebu u Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo. Ocjenjivačima je predstavljeno pet uzoraka. Prvi je bio kontrolni uzorak koji nije tretiran bentonitom, a ostala su četiri uzorka varijante vina dobivena tijekom provedbe istraživanja. Metodom redoslijeda ocjenjivači su definirali uzorke prema kakvoći mirisa, okusa te općeg dojma. Miris je opisan kroz šest mirisnih nota (cvjetne, voćne, prosušeno voće, orašasto voće, biljne, začinsko bilje) uz ostale mirise (tost, med, maslac, kruh) dok je kod okusa definirana kakvoća, kiselost, gorčina, astringencija, tijelo, harmoničnost i „*aftertaste*“ te ukupni dojam. Naposljetku je svaki ocjenjivač dao ocjenu ovisno o općem dojmu koji je stekao prilikom mirisanja i kušanja vina na skali od 1 za najbolji uzorak do 5 za najlošiji uzorak.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati fizikalno-kemijskih analiza vina

Tablica 3. Osnovni kemijski sastav vina 'Malvazija istarska'

Fizikalno-kemijski parametri	Kontrola	M100	M50	AF100	AF50
Specifična težina (20/20°C)	0,9909	0,9911	0,9926	0,9921	0,9928
Alkohol (g/L)	103,6	94,0	96,0	95,4	96,7
Alkohol (vol%)	13,1	11,9	12,2	12,1	12,3
Ekstrakt ukupni g/L	20,6	17,5	22,2	20,6	22,9
Šećer reducirajući g/L	1,2	2,6	5,4	5,4	6,1
Ekstrakt bez šećera g/L	20,4	15,9	17,8	16,2	17,8
Ekstrakt bez šećera i nehl. kiselosti g/L	14,9	11,8	13,6	12,3	13,6
Ukupna kiselost (kao vinska) g/L	5,9	4,5	4,7	4,5	4,7
Hlapljiva kiselost (kao octena) g/L	0,29	0,36	0,42	0,46	0,41
Nehlapljiva kiselost g/L	5,5	4,1	4,2	3,9	4,2
pH	3,26	3,38	3,36	3,34	3,36
SO ₂ slobodni mg/L	0	0	0	0	0
SO ₂ vezani mg/L	40,0	18,0	18,0	16,0	21,0
SO ₂ ukupni mg/L	40,0	18,0	18,0	16,0	21,0
Pepeo g/L	1,69	1,46	1,50	1,40	1,54

Očitanjem fizikalno-kemijskih parametara iz tablice 3. vidljive su značajnije razlike u volumnom postotku alkohola između kontrolnog uzorka koji je iznosi 13,1 vol % i svih testnih uzoraka gdje je vidljiv pad i do više od 1 vol%. Te razlike nisu uzrokovane djelovanjem bentonita već nedovoljnoj homogenosti početnog mošta koji je korišten u pokusu.

Nadalje najveći gubitak ukupnog ekstrakta u odnosu na kontrolu vidljiv je u uzorku gdje je bentonit dodan direktno u mošt u količini od 100 g (M100) dok se u uzorcima gdje je dodano 50g bentonita i u mošt (M50) i tijekom alkoholne fermentacije (AF50) količina ukupnog ekstrakta povećala za gotovo 2 g/L u odnosu na kontrolu.

Što se tiče reducirajućih šećera iz testnih je uzoraka vidljivo da neovisno o količini i fazi primijenjenog bentonita postoji značajna razlika s kontrolnim uzorkom. Ta se razlika izrazito istaknula u uzoru AF50 koji je imao gotovo 4,9 g/L reducirajućih šećera više od kontrolnog uzorka a može se povezati sa različitim uvjetima same alkoholne fermentacije tj. činjenice da je kontrolni uzorak proizveden većem inoks tanku dok se pokusne varijante fermentirale u demijonima od 54 L.

Očitanjem ekstrakta bez šećera i ekstrakta bez šećera i nehlapljive kiselosti vidljivo je da neovisno o fazi primjene, uzorci u kojima je dodano 100 g bentonita imaju značajnijeg pada tih parametara u odnosu na kontrolu.

Iz rezultata ukupne kiselosti može se zaključiti kako pad sadržaja ukupne kiselosti u odnosu na kontrolu ne ovisi o fazi primjene bentonita već isključivo o količini dodanog bentonita zato što je usporedbom testnih uzoraka ovisno o količini dodanog bentonita utvrđeno da su parametri gotovo identični.

Vrijednost hlapljive kiselosti kao i pH bila je najniža u kontrolnom vinu, ali nije značajno odstupala od svih uzoraka vina tretiranih bentonitom. Što se tiče koncentracije pepela, iz rezultata je vidljiva mala razlika između uzoraka tretiranih bentonitom koja ipak ukazuje kako količina dodanog bentonita utječe na njezin sadržaj.

4.2. Parametri boje

Očitanjem parametara inteziteta boje te tonaliteta boje iz tablice 4. vidljivo je kako doza primijenjenog bentonita predstavlja bitan čimbenik koji utječe na boju vina. U uzorcima M50 i AF50 gdje je primijenjeno 50 g bentonita neovisno o fazi primjene, rezultati ukazuju na neznatnu razliku u intezitetu i tonalitetu boje u usporedbi s kontrolom. Te razlike su veće u uzorcima gdje je vino tretirano s bentonitom u količini od 100 g čiji su parametri intenziteta boje iznosili 0,397 odnosno tonaliteta 2,28 u uzorku M100 gdje je bentonit dodan direktno u mošt. Uspoređujući uzorak AF100 gdje je bentonit dodan tijekom alkoholne fermentacije s kontrolnim uzorkom, uočene su najveće razlike u parametarima inteziteta boje 0,560 te tonaliteta 1,93.

Iz tablice 4. također su vidljive i razlike u kompoziciji boje uzoraka vina tretiranih s većim dozama bentonita u odnosu na kontrolni uzorak te na uzorke vina tretirane s 50 g bentonita. Promatrajući tako kontrolni uzorak vidljivo je kako je najzastupljenija žuta boja s 70,2%, zatim crvena s 19,3% te plava boja s 10,5%. S druge strane u uzorku AF100 žuta boja drastično je smanjena na 50,1% dok je crvena povećana na 25,8% a plava na 24,1%. Očitanjem ovih parametara može se zaključiti kako je za očuvanje intenziteta i tonaliteta boje najbolje koristiti bentonit u malim dozama i to direktnom primjenom u mošt što potvrđuje i teza Ribéreau-Gayon i sur. (2000) koja kaže kako bentonit može značajno utjecati na senzorna svojstva vina zbog svoje slabe selektivnosti.

Tablica 4. Rezultati intenziteta, tonaliteta i udjela pigmenta boje

Uzorak	Intezitet boje	Tonalitet	% Ye	%Rd	%Bl
Kontrola	0,236	3,69	70,2	19,3	10,5
M100	0,397	2,28	55,3	24,1	20,6
M50	0,228	3,88	71,5	18,4	10,1
AF100	0,560	1,93	50,1	25,8	24,1
AF50	0,235	3,75	70,3	18,5	11,2

4.3. Ukupni fenoli i proteini

Što se tiče sadržaja ukupnih fenola i proteina najviše vrijednosti očekivano je imao kontrolni uzorak gdje je njihov sadržaj iznosio 206 mg/L za ukupne fenole odnosno 130,0 mg/L za ukupne proteine.

Iz tablice 5. vidljivo je kako primjena bentonita utječe na smanjenje ukupnih fenola te na drastično smanjenje ukupnih proteina što je u korelaciji s količinom korištenog bentonita. Uspoređujući uzorke M100 i AF100 u kojima je primijenjeno 100 g bentonita vidljivo je da su nešto bolji rezultat uklanjanja ukupnih proteina postignuti u uzorku M100 odnosno primjenom bentonita u fazi mošta te je u odnosu na kontrolu njihov sadržaj smanjen za gotovo 73,8 mg/L.

S druge strane, primjena manjih količina bentonita tj. 50 g u testnim uzorcima M50 i AF50 pokazala se učinkovitijom kada je bentonit dodan u fazi alkoholne fermentacije. Uspoređujući ta dva uzorka vidljivo je da je u uzorku AF50 uklonjeno 10,7 mg/L više proteina te je sadržaj ukupnih fenola smanjen za 5 mg/L.

Tablica 5. Koncentracija ukupnih fenola i proteina

Uzorak	Ukupni fenoli (mg/L)	Ukupni proteini (mg/L)
Kontrola	206	130,0
M100	151	56,2
M50	177	92,6
AF100	158	60,1
AF50	172	81,9

4.4. Proteinska stabilnost

Usporedbom razlika u izmjerenom zamućenju vina izraženih u NTU između uzoraka koji su grijani i hlađeni vidljivo je da su jedino uzorci M100 i AF100 u kojima su korištene više koncentracije bentonita proteinski stabilni jer im razlike iznose manje od 0,46 odnosno 0,41 NTU. Kontrolni uzorak očekivano je rezultirao višim vrijednostima zamućenja te su njegove razlike iznosile oko 10,61 NTU dok su kod uzoraka gdje je korišteno 50 g bentonita M50 i AF50 te razlike bile oko 50% manje. Iz ovih se rezultata može utvrditi da je postizanje potpune proteinske stabilnosti u direktnoj vezi sa dozom bentonita neovisno o fazi njegove primjene.

Tablica 6. Rezultati proteinske stabilnosti vina

Uzorak	Prije zagrijavanja (NTU)	Nakon zagrijavanja (NTU)	Razlika
Kontrola	5,41	16,02	>10.61
M100	4,44	4,90	>0,46
M50	4,00	9,81	>5,81
AF100	4,62	5,04	>0,41
AF50	4,08	10,7	>6,62



Slika 12. Prikaz uzoraka nakon provedenog testa proteinske stabilnosti

4.5. Senzorno ocjenjivanje

Obradom podataka senzornog ocjenjivanja iz tablice 7. vidljivo je, kao što je i očekivano, da su ocjenjivači najbolje ocijenili kontrolni uzorak u kojem nije bio primjene bentonita prema kakvoći okusa i općem dojmu što potvrđuje tezu kako bentonit može negativno utjecati za senzorna svojstva vina. Nadalje, iz podataka je uočljivo kako se na senzorna svojstva može utjecati pravovremenom fazom primjene bentonita pa su tako uzorci vina u kojima je bentonit primijenjen dodatkom u mošt ocijenjeni nešto bolje. Te uzorke ocjenjivači su definirali kao uzorke boljeg mirisa, kakvoće okusa i općeg dojma u usporedbi s uzorcima gdje je bentonit dodan u fazi alkoholne fermentacije.

Tablica 7. Senzorna ocjena uzoraka metodom redoslijeda

Uzorak	Kakvoća mirisa	Kakvoća okusa	Opći dojam
Kontrola	2	1	1
M100	1	2	2
M50	4	3	3
AF100	3	4	4
AF50	5	5	5

5. Zaključak

Na osnovi ovog istraživanja, kojemu je cilj bio utvrditi utjecaj primjene bentonita u različitim koncentracijama te u različitim terminima aplikacije na osnovni fizikalno-kemijski sastav te na ukupnu proteinsku stabilnost vina 'Malvazije istarske' jasno je vidljivo kako je u uzorcima tretiranim s većom količinom bentonita (M100, AF100) neovisno o fazi primjene došlo do znatnijeg pada parametara ukupnog ekstrakta, ekstrakta bez šećera te ekstrakta bez šećera i nehlapljive kiselosti čime se može zaključiti kako je za fizikalno-kemijski sastav vina bitniji faktor količina primijenjenog bentonita nego faza njegove primjene.

Uzorci s manjim koncentracijama bentonita pokazali su i pozitivniji utjecaj na parametre boje gdje nije došlo do gotovo nikakvih promjena u odnosu na kontrolni uzorak. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako i faza primjene bentonita bitan faktor koji utječe na parametre boje pri čemu se varijanta bentonita primijenjenog direktno u mošt izdvojila kao bolja.

Sadržaj ukupnih fenola i proteina kao što je i očekivano u korelaciji je s količinom primijenjenog bentonita odnosno manje količine bentonita utječu na manji gubitak njihovog sadržaja. Međutim, kada se u obzir uzmu i rezultati proteinske stabilnosti vidljivo je kako uzorci M50 i AF50 nisu uspjeli zadovoljiti kriterij potpune proteinske stabilnosti što nas dovodi do zaključka kako su više koncentracije bentonita bile neophodne za postizanje potpune proteinske stabilnosti.

Iz svega navedenoga vidljivo je kako su uzorci M100 i AF100 imali izraženi utjecaj na koncentraciju ukupnih proteina te proteinsku stabilnost vina 'Malvazija istarska' te kada se u obzir uzmu i rezultati senzorne analize iz ovog istraživanja možemo zaključiti kako se najboljom strategijom uzimajući u obzir fizikalno-kemijski sastav, parametre boje, koncentraciju ukupnih proteina te proteinsku stabilnost vina 'Malvazija istarska' pokazala primjena bentonita u dozi od 100 g direktnim dodavanjem u mošt.

S obzirom da se radi o jednogodišnjem istraživanju saznanja o najboljem načinu primjene bentonita trebalo bih upotpuniti nastavkom istraživanja čime bi se obuhvatio i utjecaj godine, položaja ali i tehnologije proizvodnje, a sve sa ciljem očuvanja kvaliteta bijelih vina uz postizanje potpune proteinske stabilnosti.

6. Popis literature

1. Achaerandio, I., Pachova, V., Güell, C., López, F. (2001). Protein adsorption by bentonite in a white wine model solution: effect of protein molecular weight and ethanol concentration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 122–126.
2. Anelli, G. (1977). The proteins of must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 200- 203.
3. Berg, H. W., M. Akiyoshi. (1971) "The utility of potassium bitartrate concentration product values in wine processing." *Am. J. Enol. Vitic.* 22: 127–134.
4. Blade, W.H., Boulton, R. (1988): Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39(3): 193-199.
5. Boulton, R. 1980. The Nature of Wine Proteins. *Proceedings of the Sixth Wine Industry Technical Seminar*. Pp. 67-70.
6. De Bruijn, J.; Loyola, C.; Flores, A.; Hevia, F.; Melin, P.; Serra, I. Protein stabilisation of Chardonnay wine using trisacryl and bentonite: a comparative study. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2009, 44, 330–336
7. Dordoni, R., Colangelo, D., Giribaldi, M., Giuffrida, M. G., De Faveri, D. M., Lambri, M. (2015). Effect of bentonite characteristics on wine proteins, polyphenols, and metals under conditions of different pH. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66, 518-530
8. Ferreira B, R, Piccara-Pereira , A, M, Monteiro, S, Loureiro B, V, Teixeira, R, A (2002.): The wine proteins, *Trends in Food Science & Technology* 12 230–239
9. Hassan, M.S., Abdel-Khalek, N.A.(1998): Beneficiation and applications of an Egyptian Bentonite. *Applied Clay Science* 13: 99–115.
10. Herjavec, S, (2019): *Vinarstvo, Nakladni zavod Globus*, 49, 196-203
11. Hsu, J.-C.; Heatherbell, D. A. Heat-unstable proteins in wine. I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment. *Am. J. Enol. Vitic.* 1987, 38, 11–16.
12. Iland, P.G., Ewart, A.J.W., Sitters, J.H., Markides, A.J. and Bruer, N.G.C. (2000) *Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking* (Patrick Iland Wine Promotions: Campbelltown, SA)

13. Kawatra, S.K., Ripke, S.J. (2003): Laboratory studies for improving green ball strength in bentonite-bonded magnetite concentrate pellets. *International Journal of Mineral Processing*. 72 (1-4):429-441.
14. Lambri, M, Dordoni, R, Silva, A, De Faveri, D, M, (2010): Effect of bentonite fining on odor active compounds in two different white wine styles, *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(2):225-33.
15. Lambri, M., Colangelo, D., Dordoni, R., Torchio, F., De Faveri, D. M. (2016). Innovations in the Use of Bentonite in Oenology: Interactions with Grape and Wine Proteins, Colloids, Polyphenols and Aroma Compounds. U A. Morata (ur.) *Grape and Wine Biotechnology* (str. 381-400). London, UK: IntechOpen.
16. Lambri, M., Dordoni, R., Giribaldi, M., Violeta, M. R., Giuffrida, M. G. (2012). Heat-unstable protein removal by different bentonite labels in white wines. *LWT – Food Science and Technology*, 46, 460–467
17. Lukić, I., Plavša, T., Sladonja, B., Peršurić, Đ. (2008) Aroma compounds as marks of wine quality in the case of Malvazija istarska young wine. *J. Food Qual.* 31, 717-735. doi: 10.1111/j.1745-4557.2008.00230.x
18. Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J. (2008). *Vinova loza - Ampelografija, ekologija, oplemenjivanje*. Školska knjiga, Zagreb.
19. Maletić, E., Pejić, I., Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Stupić, D., Andabaka, Ž., Marković, Z., Šimon, S., Žulj Mihaljević, M. (2015). *Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze*
20. Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Neilson, K. A., Chan, C., Haynes, P. A., Waters, E. J., Falconer, R. J. (2011). Roles of grape thaumatin like protein and chitinase in white wine haze formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 733–740.
21. Murphey, J. M., Spayd, S. E., Powers, J. R. (1989) Effect of grape maturation on soluble protein characteristics of Gewürztraminer and White Riesling juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 199–207.
22. Plavša, T, Palman, I, (2011): Suspenzija bentonit – voda: utjecaj na proteinsku stabilnost vina Malvazija istarska, Vol. 17, No.2, *Poljoprivreda*, 8-12
23. Pocock, K. F., Hayasaka, Y., McCarthy, M. G., Waters, E. J. (2000). Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1637–1643.
24. Pocock, K. F., Salazar, F. N., Waters, E. J. (2011). The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 280–284.

25. Radeka, S., Herjavec, S., Peršurić, Đ., Lukić, I., Sladonja, B. (2008). Effect of different maceration treatments on free and bound varietal aroma compounds in wine of *Vitis vinifera* L. cv. Malvazija istarska bijela. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 86–92
26. Rapp, A. (1988). Wine aroma substances from gas chromatographic analysis, in: *Wine Analysis*. Springer. 29–66.
27. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2000). *Handbook of Enology: The chemistry of wine stabilization and treatments*, Vol. 2. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons, Inc.
28. Sarmento, M. R., Oliveira, J. C., Slatner, M., Boulton, R. B. (2000) Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests. *Food Control* 11, 423-432. doi: 10.1016/S0956-7135(00)00004-9
29. Siebert, K. J., Carrasco, A., Lynn, P. Y. (1996) Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1997-2005. doi: 10.1021/jf950716r
30. Van Sluyter, S. C., McRae, J. M., Falconer, R. J., Smith, P. A., Bacic, A., Waters, E. J., Marangon, M. (2015). Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (16), 4020–4030.
31. Vincenzi, S., Marangon, M., Tolin, S., Curioni, A. (2011). Protein evolution during the early stages of white winemaking and its relations with wine stability. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 20-27.v
32. Waters, E. J.; Muhlack, R. A.; Pocock, K. F.; Colby, C.; O'Neill, B. K.; Jones, P. (2005.): Preventing Protein Haze in Bottled White Wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, No. 11, 215–225
33. Waters, E.J., Z. Peng, K.F. Pocock, and P.J. Williams. 1995. Proteins in white wine. I. Procyanidin occurrence in soluble proteins and insoluble protein hazes and its relationship to protein instability. *Aust. J. Grape Wine Res.* 1:86-93.
34. Weiss, K. C.; Bisson, L. F. Effect of bentonite treatment of grape juice on yeast fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 2002, 53, 28–36.
35. Zoecklein, B, (1991.): Protein stability. Determination in Juice and Wine, <https://www.apps.fst.vt.edu/extension/enology/downloads/ProteinS.pdf> pristup 20.05.2021
36. Zoecklein,B, (2005.): Wine proteins and protein stability, https://www.apps.fst.vt.edu/extension/enology/downloads/wm_issues/Wine%20Proteins%20and%20Protein%20Stability.pdf pristup 20.05.2021
37. Zorčić, M., (2013): *Vinogradarsko vinarski priručnik*, 2. izdanje, Slobodna Dalmacija, Split, 31-44, 48-56.

