Utjecaj dodatka pektinaze tijekom maceracije kupine na fizikalno-kemijske pokazatelje kakvoće kupinovih vina

Trbojević, Radovan

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:261894

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Radovan Trbojević

UTJECAJ DODATKA PEKTINAZE TIJEKOM MACERACIJE KUPINE NA FIZIKALNO-KEMIJSKE POKAZATELJE KAKVOĆE KUPINOVIH VINA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, prosinac 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Osnove bioprocesnog inženjerstva
Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 21. lipnja 2016.
Mentor: doc. dr. sc. *Natalija Velić*
Komentor: doc. dr. sc. *Anita Pichler*

Utjecaj dodatka pektinaze tijekom maceracije kupine na fizikalno-kemijske pokazatelje kakvoće kupinovih vina

Radovan Trbojević, 292-DI

Sažetak: Kupinovo vino je voćno vino dobiveno alkoholnom fermentacijom soka ili masulja svježe kupine. Zbog svog nutritivnog sastava ima blagotvoran utjecaj na ljudsko zdravlje. Tijekom procesa proizvodnje kupinova vina često se koriste komercijalni enzimski pripravci kako bi se dobio proizvod što bolje kakvoće. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj dodatka enzima pektinaze tijekom maceracije kupine na fizikalno-kemijske pokazatelje kakvoće kupinovih vina. Provedena je alkoholna fermentacija masulja kupine, pri čemu su dvije fermentacije provedene bez dodatka enzima tijekom maceracije te dvije fermentacije s dodatkom enzima pektinaze tijekom maceracije ploda kupine. U gotovim vinima, nakon dozrijevanja, provedene su fizikalno-kemijske analize kakvoće vina te određivanje boje. Rezultati istraživanja pokazali su kako je u vinu proizvedenom uz dodatak pektinaze tijekom maceracije postignuto veće iskorištenje sirovine, veći početni udjel suhe tvari u soku, veća relativna gustoća, ukupni suhi ekstrakt i udjel pepela, u odnosu na vino proizvedeno bez dodatka enzima (kontrola). Nadalje, veća koncentracija ukupnih polifenola te posljedično veće vrijednosti intenziteta boje i tona dobivene za vino proizvedeno uz dodatak enzima u odnosu na kontrolu ukazuju na bolju ekstrakciju tvari boje tijekom maceracije.

Ključne riječi: kupinovo vino, pektinaza, maceracija, fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće

Rad sadrži: 41 stranica
3 slike
3 tablice
0 priloga
29 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

1.	prof. dr. sc. *Darko Velić*	predsjednik
2.	doc. dr. sc. *Natalija Velić*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Anita Pichler*	član-komentor
4.	prof. dr. sc. *Mirela Kopjar*	zamjena člana

Datum obrane: 22. prosinca 2016.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Graduate program of Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology
Course title: Basics of Bioprocess Engineering
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on June 21, 2016
Supervisor: *Natalija Velić*, PhD, assistant prof.
Co-supervisor: *Anita Pichler,* PhD, assistant prof.

The influence of pectinase addition during blackberry maceration on physico-chemical quality parameters of blackberry wines

Radovan Trbojević, 292-DI

Summary: Blackberry wine is a fruit wine produced by alcoholic fermentation of raw blackberry juice or must. Because of its nutritional composition it has a beneficial effect on human health. In order to obtain the high quality product, the commercial enzyme preparations are often used during the blackberry wine production process. The aim of this work was to investigate the influence of pectinase addition during maceration of blackberries on physico-chemical quality parameters of blackberry wines. Fermentation of blackberry must was carried out in a way that two fermentations were carried out without the enzyme addition during maceration and two were carried out with the pectinase addition during maceration. After wine maturation, the finished wines were analysed for physico-chemical quality parameters as well as colour parameters. The results showed that compared to wine produced without the pectinase addition during maceration (control), the wine produced with the addition of pectinase had higher raw material utilization efficiency, higher initial dry matter content in juice after maceration and higher relative density, total dry extract and ash. Furthermore, higher concentration of total polyphenols and subsequently higher colour intensity and hue of blackberry wine produced with the addition of pectinase compared to control indicate better extraction of colour components during maceration.

Key words: blackberry wine, pectinase, maceration, physico-chemical quality parameters

Thesis contains: 41 pages
3 figures
3 tables
0 supplements
29 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Darko Velić*, PhD, full prof. — chair person
2. *Natalija Velić*, PhD, assistant prof. — supervisor
3. *Anita Pichler,* PhD, assistant prof. — co-supervisor
4. *Mirela Kopjar,* PhD, full prof. — stand-in

Defense date: December 22nd, 2016

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

Zahvaljujem svojim mentoricama doc. dr. sc. Nataliji Velić i doc. dr. sc. Aniti Pichler na prihvaćanju ideje diplomskog rada te strpljenju, pomoći i vodstvu koji su omogućili izradu istog. Zahvaljujem također i prof. dr. sc. Darku Veliću na pomoći i savjetima tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama s fakulteta koji su studiranje učinili zanimljivijim i lakšim.

Na kraju najveće hvala cijeloj mojoj obitelji a najviše roditeljima koji su uvijek bili podrška u dobru i zlu, bez Vas ne bih bio gdje jesam.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1 KUPINA I KUPINOVO VINO 4

2.1.1 VOĆNA VINA 6

2.1.2 KUPINOVO VINO 7

2.2 PROIZVODNJA KUPINOVA VINA 8

2.3 UPOTREBA PEKTOLITIČKIH ENZIMA U PROIZVODNJI VINA 12

2.4 FIZIKALNO – KEMIJSKI POKAZATELJI KAKVOĆE VINA 12

3. EKSPERIMENTALNI DIO 15

3.1 ZADATAK 16

3.2 MATERIJALI I METODE 16

3.2.1 VINO OD KUPINE 16

3.2.2 PROCES PROIZVODNJE VINA OD KUPINE 16

3.2.3 FIZIKALNO-KEMIJSKA ANALIZA VINA I ODREĐIVANJE BOJE 17

4. REZULTATI I RASPRAVA 24

5. ZAKLJUČCI 28

6. LITERATURA 30

1. UVOD

1. UVOD

Pravilnik o voćnim vinima definira kupinovo vino kao prehrambeni proizvod dobiven alkoholnom fermentacijom soka ili masulja svježe kupine (NN 74/06). Smatra se najpoznatijim voćnim vinom, a karakterizira ga kristalna rubin boja i izvrsna aroma. Ubraja se u teža vina, jer ga odlikuje ugodna trpkost te sklad ukupnih kiselina, alkohola i ekstrakta karakterističnih za kupinu (Opačić, 2010.).

Kupinovo vino je važan izvor minerala i vitamina, a zbog visokog udjela anotocijana, elagitanina i polifenola ima snažan antioksidacijski učinak. Zbog svog nutritivnog sastava ima blagotvoran utjecaj na ljudskoj zdravlje te pomaže u sprječavanju različitih bolesti (Johnson i Gonzalez de Mejia, 2012.).

Proces proizvodnje kupinova vina sastoji se od nekoliko osnovnih operacija: muljanja, maceracije (predfermentacije), fermentacije te zrenja i odležavanja. O načinu na koji se proces proizvodnje provodi ovisi kvaliteta dobivenog vina. Tijekom proizvodnje često se koriste komercijalni enzimski pripravci, naročito tijekom maceracije ploda kupine. Enzimi se dodaju jer pozitivno utječu na iskorištenje sirovine, ekstrakciju tvari boje i arome iz ploda kupine te na stabilnost i okus vina. Najčešće korišteni enzimi u su pektinaze (Bautista i sur., 2005.).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj dodatka pektinaze tijekom maceracije kupine na fizikalno-kemijske pokazatelje kakvoće kupinova vina.

2. TEORIJSKI DIO

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KUPINA I KUPINOVO VINO

Kupina (lat. *Rubus fruticous*) je od davnina poznata kao ljekovita biljka, a njezina ljekovita svojstva su zapisana u antičkim djelima o ljekovitom bilju. Lišće kupine se koristilo svojevremeno kao zamjena za ruski čaj, dok su ga Nijemci koristili kao zamjenu za kineski čaj. Zbog nadaleko poznatog ljekovitog svojstva kupine od antike pa do danas, sve se više znanstvene pozornosti pridaje kupini (Velić, 2015.).

Kupina je naziv za nekoliko vrsta biljaka penjačica iz roda *Rubus* koje pripadaju porodici ruža (*Rosaceae*). To je višegodišnja grmolika biljka crne boje ploda. U Europi se danas uzgajaju uglavnom američke sorte kupine koje su bez trnja, uspravnog rasta i daju plodove mase oko 5 g. Najveće značenje za gospodarski uzgoj imaju sorte:

- Wilsonova rana,
- Black Satin,
- Thornfree,
- Smoothstem,
- Thornless (Thornless Logan),
- Evergreen,
- Darow,
- Bailey,
- Ebony King,
- Eldorado,
- Boysen i
- Himalaya.

Listovi kupine su naizmjenično raspoređeni, dugački do 7 centimetara i sastavljeni od 3 do 5 ovalnih i nepravilno nazubljenih listića. Kupina cvjeta od lipnja do kolovoza, a iz cvijeta se razvije sitni jagodičasti plod koji je u početku crven a kako zrije potamni.

Slika 1. Kupina (http://www.coolinarika.com, 15.10.2016.)

Kupina kao biljka dobro podnosi hladnoću, zahtijeva puno svjetla i dosta je otporna na bolesti i štetočine. Osjetljiva je na suhe i olujne vjetrove. Najbolje uspijeva u podneblju pogodnom za uzgoj vinove loze, jer u takvim uvjetima daje krupnije plodove i visoke urode. Nadalje pogoduju joj i pjeskovito-ilovasta tla, koja su duboko i dobro drenirana, biološki aktivna i slabo kisela do neutralna (Opačić, 2010.).

Uzgoj kupine u Republici Hrvatskoj je do nedavno bio sveden samo na iskorištavanje samoniklih vrsta. Kupina se uzgaja u kontinentalnoj Hrvatskoj na malim plantažama, tradicionalnim tehnikama uzgoja te ručno bere. Najčešće uzgajane sorte su *Thornless Logan*, *Thornfree*, *BlackSatin* i *Tayberry* (Velić, 2015.).

Zbog velikog udjela nutritivnih i bioloških sastavnica ploda, kupina se ubraja u skupinu namirnica izrazito blagotvornog učinka na ljudsko zdravlje te nosi titulu "super voće". Bogata je različitim vitaminima (naročito vitamini grupe B, vitamin C) i mineralima (željezo, fosfor, magnezij i kalcij) te različitim biološki aktivnim tvarima poput polifenola, koji joj daju veliku hranjivu i zaštitnu vrijednost. Plod kupine je deset puta bogatiji antioksidansima nego rajčica ili brokula, pri čemu je najzastupljeniji polifenol elagitanin. Kiseline u kupinovom vinu su svojim sastavom slične kiselinama koje se nalaze u želučanom soku te stoga pomažu probavi hrane, naročito bjelančevina (Opačić, 2010.).

Kako je već spomenuto, kupinovo vino ima veliki sadržaj antocijana, elagitanina te drugih fenolnih spojeva, koji doprinose njenom antioksidacijskom učinku. Nutritivni sastav kupine varira na temelju raznolikosti uvjeta rasta, stupnja zrelosti, žetve te uvjeta skladištenja. Osim vrijednih polifenolnih spojeva, kupine sadrže ugljikohidrate te važne vitamine i minerale (Tablica 1.). Glavni šećeri koji se pojavljuju u kupini su glukoza, fruktoza i saharoza te se njihovi omjeri razlikuju od sorte do sorte. Kupina sadrži također jabučnu kiselinu kao

primarnu organsku kiselinu, ali i drugih organskih kiselina (fumarna, jantarna) koje su odgovorne za stabilizaciju antocijana i askorbinske kiseline te produženje roke trajanja svježih i procesiranih kupina (Kaume i sur., 2012.).

Tablica 1. Nutritivni sastav kupine izraženo kao masa na 100 g kupine (Kaume i sur., 2012.)

		VITAMINI		MINERALI	
Voda /g	88,20	Ukupna askorbinska kiselina /mg	21,00	Kalcij /mg	29,0
Energija /g	43,0	Tiamin /mg	0,02	Željezo /mg	0,62
Proteini /g	1,39	Riboflavin /mg	0,03	Magnezij /mg	20,0
Ukupni lipidi /g	0,49	Niacin /mg	0,65	Fosfor /mg	22,00
Pepeo /g	0,37	Pantotenska kiselina /mg	0,28	Kalij /mg	162,0
Ugljikohidrati /g	9,61	Vitamin B6 /mg	0,03	Natrij /mg	1,0
Ukupna vlakna /g	5,30	Ukupni folati /µg	25,00	Cink /mg	0,53
Ukupni šećeri /g	4,88	Vitamin B12 /µg	/	Bakar /mg	0,17
Saharoza /g	0,07	Vitamin A /IU	214,0	Mangan /mg	0,65
Glukoza /g	2,31	α – tokoferol /mg	1,17	Selenij /mg	0,40
Fruktoza /g	2,40	β – tokoferol /mg	0,04		
Maltoza /g	0,07	γ –tokoferol /mg	1,34		
Galaktoza /g	0,03	Δ - tokoferol /mg	0,90		
Škrob /g	/	Vitamin K /µg	19,8		

2.1.1.VOĆNA VINA

Voćno vino je, prema Pravilniku o voćnim vinima (NN 73/2006), prehrambeni proizvod dobiven fermentacijom soka ili masulja od svježeg i za to pogodnog koštičavog, jezgričavog, jagodičastog, bobičastog ili ostalog voća i ima minimalni sadržaj prirodnog alkohola 1,2 % vol.

Voćna vina se dijele na aromatizirano voćno vino, biser voćno vino, desertno voćno vino, pjenušavo voćno vino, voćni masulj, voćni mošt u fermentaciji, voćni sok i voćnu kominu. Proizvode se isključivo od najfinijeg samotoka, što znači da se nakon prvog pretoka ne preša

ostatak voćne komine, nego ona u cijelosti služi kao sirovina za destilaciju, tj. proizvodnju voćne rakije. Važna karakteristika je izostanak filtracije vina, s ciljem očuvanja izvorne boje i mirisa, te punoće okusa (Opačić, 2010.).

2.1.2. KUPINOVO VINO

Kupinovo vino je dobiveno od zrelih plodova kupine, osvježavajućeg je mirisa i okusa, odlikuje ga svojstvena kristal-rubin boja i manji postotak alkohola u odnosu na vino od grožđa. Kupinovo, kao i vina proizvedena od drugog jagodastog voća imaju udjel alkohola (5 - 6 %), jer se udio šećera u voću kreće od 5 – 12 %, ali taj postotak može biti i veći ukoliko se tijekom proizvodnje dodaje šećer (Opačić, 2010.).

Kupinovo vino se tradicionalno proizvodi u kontinentalnoj Hrvatskoj. Konzumira se u umjerenim količinama, kao desertno vino te je poznato kao dobar izvor minerala i drugih bioaktivnih tvari, koje imaju važnu ulogu u poboljšanju zdravlja i sprječavanju bolesti. Tradicionalno se koristi kao lijek protiv anemije, nedostatka željeza te pomaže kod poremećaja spavanja. Preporuča se dnevna konzumacija 250 mL kupinovog vina kao izvora esencijalnih minerala (Petravić-Tominac i sur., 2013.).

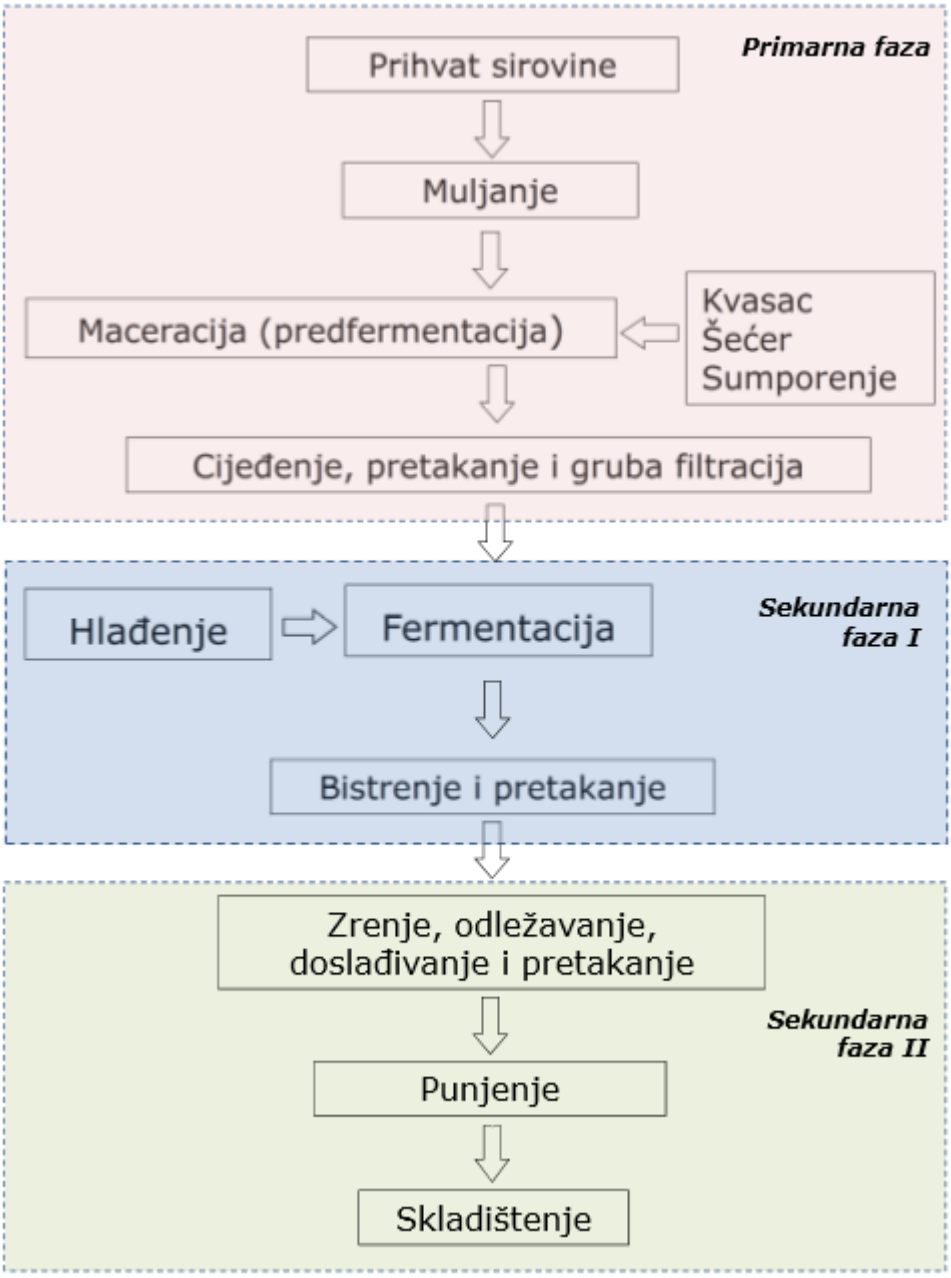
Klinička istraživanja su otkrila povezanost između konzumacije kupinovog vina i kardiovaskularnih bolesti. Konzumacija voćnog vina od kupine poboljšava vaskularne funkcije, dovodi do smanjenja pojave arterioskleroze. Poboljšava opće stanje organizma te ima antitumorsko djelovanje. Za pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi su u najvećoj mjeri odgovorni antioksidanti, polifenoli i ukupni antocijani prisutni u kupinovim vinima (Johnson i Gonzalez de Mejia, 2012.).

Posljednjih nekoliko godina, proizvodnja i konzumacija kupinova vina u Republici Hrvatskoj je u porastu. Međutim, velika većina proizvođača su mala obiteljska gospodarstva koja ne mogu osigurati dovoljne količine za sve brže rastuće tržište. Zbog toga je kupinovo vino još uvijek premalo zastupljeno na tržištu te kupci nisu dovoljno informirani o njegovom pozitivnom učinku (Klarić i sur., 2016.).

2.2. PROIZVODNJA KUPINOVA VINA

Kakvoća kupinova vina uvelike ovisi o rokovima berbe i načinu rukovanja prije tehnološke obrade. Rokove berbe treba prilagoditi, kako bi se osigurala istovrsnost i kvaliteta gotovog proizvoda. Subjektivnim i objektivnim metodama treba utvrditi prikladnost kupine za berbu. Vrijeme između branja i početka procesiranja kupine treba biti što kraće. Prije početka proizvodnje kupinova vina, potrebno je odvagati sirovinu zbog uvida u iskorištenje polazne sirovine te u slučaju otkupa za plaćanje kupina.

Tehnološki postupak proizvodnje vina od kupine se sastoji od primarne faze i sekundarne faze (I i II) kako je prikazano na slici 2.



Slika 2. Blok shema tehnološkog procesa proizvodnje kupinova vina (Velić, 2015.).

Tijekom primarne faze provode se tehnološke operacije kao što su maceracija, periodično miješanje, dekantacija, filtracija i cijeđenje mošta (Velić, 2015.).

Muljanje je postupak gnječenja kupine s ciljem oslobađanja soka - mošta. Nakon oslobađanja soka, kvasci kao predstavnici epifitne mikroflorne skupine, dolaze u dodir s moštom i provode alkoholnu fermentaciju. Nakon muljanja, tj. gnječenja kupina, masulj se ulijeva u posudu od nehrđajućeg čelika te mu se dodaje šećer.

Pri proizvodnji zdravih i stabilnih vina neizostavno je sumporenje mošta odnosno masulja prije početka vrenja, kao i za vrijeme pretakanja - njege vina. Dodavanje sumpora je regulirano Zakonom o vinu, gdje je točno određeno koliko sumpora neko vino može, odnosno smije sadržavati. Pravilnikom o voćnim vinima određena je maksimalna dozvoljena količina ukupnog SO_2 od 200 mg/L, odnosno slobodnog od 300 mg/L. SO_2 dodan moštu ili vinu prelazi u sumporastu kiselinu, koja se većim dijelom veže a manjim dijelom ostaje slobodna. Slobodna sumporasta kiselina ima antiseptično i antioksidativno svojstvo - kao antiseptik inhibira neželjenu mikrofloru, a kao antioksidans sprječava posmeđivanje mošta i vina.

Sumpor koji se koristi u vinarstvu dolazi u sljedećim oblicima:

- $K_2S_2O_5$ (vinobran, ili 5 %-tna otopina sumporaste kiseline koja se koristi zbog jednostavne pripreme i doziranja),
- sumporasta kiselina (najčešće se priprema u koncentraciji od 5 - 10 %, proizvodi se industrijski, a doziranje se vrši prema uputama proizvođača),
- tekući sumporov(IV) oksid (za sumporenje vina i bačvi, u čeličnim bocama do 50 kg jer se sumporenje može precizno odrediti).

Uloga sumpora je višestruka: ubrzava i potpomaže u taloženju nečistoća, sprječava djelovanje štetnih mikroorganizama te enzimsko i neenzimsko posmeđivanje vina.

Po završenom sumporenju dodaju se selekcionirani vinski kvasci (uobičajeno se dodaje 20 g/hL kvasca).

Izbor kvasaca koji imaju željena svojstva, preduvjet je za proizvodnju kvalitetnih vina. Važno unaprjeđenje proizvodnje vina je bolja kontrola fermentacije pomoću odabranih sojeva kvasca. Enološke karakteristike kvasaca mogu se podijeliti u dvije skupine - tehnološke i kvalitativne. Obje skupine karakteristika moraju se uzeti u obzir pri odabiru kvasca za provođenje fermentacije. Tehnološke karakteristike utječu na učinkovitost fermentacije, dok kvalitativne karakteristike određuju kemijski sastav i senzorska svojstva vina. Tehnološke karakteristike mogu se procijeniti praćenjem napredovanja fermentacije, dok se kvalitativne karakteristike procjenjuju na osnovu rezultata dobivenih određivanjem kemijskog sastava vina. Senzorske analize se koriste za dodatnu, završnu karakterizaciju pojedinog soja vinskih kvasca (Petravić-Tominac i sur., 2013.).

Tijekom fermentacije kvasci su u kontaktu s tekućinom u kojoj je otopljen šećer te se počinju intenzivno razmnožavati metabolizirajući šećer do alkohola, CO_2 i drugih sastojaka (glicerin, octena kiselina, jantarna kiselina, tvari arome itd.) koji utječu na kvalitetu vina. Istovremeno nastaje određena količina energije koju kvasci koriste za svoje životne potrebe, a višak energije se oslobađa u obliku topline.

Temperaturu tijekom primarne fermentacije soka trebalo bi održavati na 17 - 19 °C, jer pri visokim temperaturama vrenja masulj može izgubiti velik dio aromatičnih i mirisnih tvari, a i fermentacija bi se mogla zaustaviti. Iz istog razloga nije poželjna niti preniska temperatura tijekom fermentacijskog procesa. Plod i talog se obično odvaja/skida 7. – 10. dan. Fermentacija na plodu ne bi trebala trajati duže od desetak dana, jer dolazi do ekstrakcije neželjenih tvari. Pretok se provodi kada je došlo do razrjeđivanja, olakšanog miješanja i podizanja ostatka ploda te ako je boja mošta/soka primjerena. Tada je potrebno odvojiti mošt tj. prekinuti vrenje na plodu (maceraciju), posebice ako se burno vrenje zaustavlja.

Sekundarna faza proizvodnje kupinova vina se sastoji od dva dijela:

- ***sekundarna faza I*** : kontrolirana/hladna fermentacija uz pretakanje, prije pretakanja dodaje se bentonit ili pentagel, koji imaju ulogu bistrila te po potrebi $K_2S_2O_5$. Nakon pretoka temperaturu treba spustiti na 18 °C
- ***sekundarna faza II***: hladna stabilizacija, odvija se zrenje vina pri kontroliranim uvjetima u spremnicima od nehrđajućeg čelika, pri temperaturi od 12 - 14 °C te se provodi periodično pretakanje. Tijekom vremena dolazi do stvaranja *bouquet-a* vina (Velić, 2015). Osim alkoholnog vrenja u mladom vinu se odvija još cijeli niz značajnih promjena biokemijske, kemijske, fizikalne i fizikalno-kemijske prirode, koje dovode do bistrenja te formiranja okusa i mirisa - dozrijevanja vina. Odležavanjem vina počinju brojni procesi u kojima sudjeluju sastojci mladog vina u kombinaciji s vanjskim čimbenicima među kojima je na prvom mjestu kisik. Vino u kontaktu s kisikom tijekom pretakanja povoljno utječe na dozrijevanje vina te na razvoj aromatičnih i buketnih vina.

Stabilizacija vina provodi se s ciljem sprječavanja mutnoće i taloženja nekih sastojaka vina. Nestabilnosti vina doprinose dušične tvari, bjelančevine, polifenoli - boje i tanini, prisutna

mikroflora te soli vinske kiseline. Zbog toga se poduzimaju mjere za stabilizaciju vina, poslije prvog pretoka, a osobito prije razlijevanja u boce. Sprječavanje negativnog utjecaja polifenola na stabilnost vina, kao i uzročnika mikrobiološke nestabilnosti provodi se sumporenjem vina (dodatkom $K_2S_2O_5$ ili 5 %-tnom otopinom sumporaste kiseline) (Opačić, 2010.).

2.3. UPOTREBA PEKTOLITIČKIH ENZIMA U PROIZVODNJI VINA

Mehaničkim usitnjavanjem kupina dobije se jako viskozna voćna kaša od koje je teško izdvojiti sok prešanjem. Iz tog razloga, dodatkom pektolitičkih enzimskih pripravaka omogućava se kvalitetnije i bolje taloženje mošta te bolji randman (iskorištenje) pri prešanju masulja. Enzimski pripravci su općenito višekomponentni, odnosno osim pektinaza sadrže još i hemicelulaze, celulaze te ponekad glikozidaze (Guadalupe i sur., 2007). Ovi pripravci sudjeluju u razgradnji strukturnih polimera koji izgrađuju biljne stanice te na taj način omogućuju oslobađanje i otapanje vezanih aromatskih spojeva i bolje izlučivanje tvari arome i boje iz kožice ploda. Pektolitički enzimi koji se koriste u vinarstvu uglavnom su dobiveni iz gljiva, odnosno fungalnog su podrijetla (Landbo i Mayer, 2004.). Pektinaza ima sposobnost razgradnje pahuljica pektina, zbog čega se koristi za bistrenje vina. Upotreba pektolitičkih enzima tijekom maceracije je postala česta praksa. Pektin koji ulazi u sastav stanične stjenke predstavlja fizičku barijeru za sve tvari koje se nalaze unutar nje, prvenstveno tvari boje (antocijani), polifenole te tvari arome (norizoprenoidi, terpeni). Dodatkom pektinaza, pektin se razgrađuje, dolazi do olakšanog izlučivanja tvari boje i arome te ekstrakcije polifenola. Također, mošt se obogaćuje dušičnim tvarima i taninima. Enzimi također utječu i na stabilnost, okus i strukturu samog vina (Bautista i sur., 2005.).

2.4. FIZIKALNO-KEMIJSKI POKAZATELJI KAKVOĆE VINA

Prema Pravilniku o vinu (NN 96/03) kakvoća vina se utvrđuje na osnovu sljedećih fizikalno-kemijskih pokazatelja: gustoća, alkoholna jakost, ukupni suhi ekstrakt, reducirajući šećeri, saharoza, pepeo, ukupna kiselost, hlapiva kiselost, pH, slobodni SO_2 i ukupni SO_2 (Sović, 2013.).

Relativna gustoća, kao jedan od pokazatelja kakvoće vina, ovisi o nekoliko čimbenika: sadržaju alkohola, sadržaju šećera te sadržaju glicerola (Diaz i sur., 2003.). Gustoća vina pri 20 °C definirana je kao masa vina po jedinici volumena i pri temperaturi od 20 °C, a izražena je u g/mL. Nadalje, relativna gustoća pri 20 °C ili specifična težina pri 20 °C je omjer gustoće određenog volumena vina prema gustoći istog volumena vode pri 20 °C.

Ukupni suhi ekstrakt. Ukupni suhi ekstrakt predstavlja skupi svih tvari u vinu koje u određenim fizičkim uvjetima ne isparavaju (vodena kupelj, eksikator). U ekstrakt spadaju ugljikohidrati, mineralne tvari, glicerol, butilen, glikol, nehlapljive kiseline (vinska, jabučna, mliječna), tanini i tvari boje (Vrdoljak, 2009.).

Reducirajući šećeri (prirodni šećeri). Reducirajući šećeri su definirani kao svi šećeri koji u svojoj strukturi imaju slobodne keto ili aldehidne funkcionalne skupine (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, NN 106/04, 2004). Reducirajući šećeri kao što su glukoza i fruktoza su široko prisutni u hrani, a najviše u voću. Kupina sadrži od 4,9 g šećera na 100 g suhe tvari (Huerta et al., 1998.).

Alkoholna jakost. Etanol je glavni produkt alkoholne fermentacije, dok se metanol i ostali alkoholi pojavljuju u manjim koncentracijama. Etanol je važan za aromu i stabilnost vina (Klarić i sur, 2016). Alkoholna jakost je izražena volumenom, % vol, a definirana je kao broj litara etanola u 100 L vina kada se volumen mjeri pri temperaturi od 20 °C. Homolozi etanola i homolozi estera etanola, zajedno s etanolom, su uključeni u alkoholnu jakost jer su prisutni u destilatu (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, NN 106/04, 2004.).

Sadržaj ukupnih kiselina. Kiseline su važna sastavnica voća, mošta i vina. Sadržaj organskih i anorganskih kiselina u voću ovisi o vrsti voća, sorti, klimi i geomorfološkim karakteristikama. Kiselost kupine se mijenja tijekom rasta i sazrijevanja te utječe na kiselost kupinovog soka i mošta. Zbog toga kiselost mošta može utjecati na vino, jer neke kiseline iz mošta prelaze u vino i sudjeluju u različitim fizikalno-kemijskim i biokemijskim procesima, kao što je nastanak arome. Ukupna kiselost je važna jer utječe na okus i kvalitetu vina (Huerta et al., 1998.).

Sadržaj hlapljivih kiselina. Hlapljive organske kiseline su grupa kiselina koje se nalaze u vinu, a koje pod određenim uvjetima isparavaju. Nastaju kao sekundarni produkti alkoholne fermentacije, a mogu nastati i u procesu kvarenja vina.

Pepeo. Anorganski ostatak nakon izgaranja vina. Što je vino kvalitetnije u njemu se nalazi veća koncentracija pepela i minerala (Klarić i sur., 2016.).

Sadržaj ukupnog i slobodnog SO_2. SO_2 se nalazi u vinu u slobodnom i vezanom obliku. Veže se sa šećerima, aldehidima i polifenolnim tvarima (Sović, 2013.).

Boja. Boja je jedan od glavnih paramtera koji se uzimaju u obzir kada je u pitanju kvaliteta vina. Boja voćnih vina, okus i astringentnost su senzorska svojstva koja uvelike ovise o prisutnosti fenolnih spojeva (Klarić i sur., 2012.). Kromatske karakteristike vina ovise o koncentraciji antocijana u plodu te o kemijskim reakcijama tijekom fermentacije i starenja, kao što su reakcije između antocijana i drugih sastojaka u vinu. Te reakcije su odgovorne za nastajanje novih, stabilnijih pigmenata koji su odgovorni za prelazak boje vina od svijetlijih nijansi crvene do tamno crvene (Arozarena i sur., 2012.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj dodatka enzima pektinaze tijekom maceracije kupine na fizikalno – kemijske pokazatelje kakvoće kupinovih vina.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. VINO OD KUPINE

Analizirana su četiri vina od kupine dobivena istim tehnološkim postupkom proizvodnje, od kojih su po dva vina proizvedena s dodatkom i bez dodatka pektinaze.

3.2.2. PROCES PROIZVODNJE VINA OD KUPINE

Za pripremu kupinova vina upotrijebljene su kupine sorte Boysen u smrznutom stanju te su pripremljena četiri uzorka – dva bez dodatka pektinaze i dva s dodatkom pektinaze.
U četiri plastične posude volumena 7 L stavljeno je 1050 g smrznutog ploda kupine. U posude je zatim dodano 157,5 g konzumnog šećera (15 % na masu ploda kupine) te je sadržaj posuda dobro izmiješan. Nakon 4 sata odmrzavanja kupina, u svaku je posudu dodano 0,11 g $K_2S_2O_5$ kako bi se suzbila proliferacija nativne mikroflore prisutne na plodu kupine. U dvije od četiri posude dodano je 0,02 g komercijalnog enzimskog pripravka pektinaze (Lallzym OE, Lallemand, Austrija), prethodno suspendiranog u 10 mL tople vode. Nakon toga u sve četiri posude dodano je 0,32 g kvasca (Uvaferm 299, Lallemand, Austrija) prethodno rehidratiranog u 10 mL tople vode kroz 10 min. Nakon dodatka kvasca, u sve posude dodana je i hrana za kvasce u količini od 0,32 g. Faza maceracije trajala je 6 dana pri čemu je sadržaj posuda bio svakodnevno miješan. Nakon maceracije (predfermentacije) slijedilo je cijeđenje te gruba filtracija kroz sloja platna i pretakanje dobivenog mladog vina (800 mL) u Erlenmeyerove tikvice (slika 3), koje su zatvorene gumenim čepom i vrenjačama.

Slika 3. Procijeđeno kupinovo vino nakon maceracije

Daljnja fermentacija provedena je pri sobnoj temperaturi tijekom 8 dana. Po završetku fermentacije mlado kupinovo vino iz tikvica pretočeno je (odekantirano je vino s taloga) u nove tikvice te je u svaku tikvicu dodano 8 % bijelog konzumnog šećera na volumen vina u tikvicama. Osim šećera, u tikvice je također dodan $K_2S_2O_5$ (10 g / hL preračunato na volumen vina u tikvici nakon pretakanja) te sredstvo za bistrenje (pentagel, 10 g / hL preračunato na volumen vina u tikvici nakon pretakanja). Tikvice su zatim prenesene u hladnjak, gdje su 4 dana čuvane na 2 °C kako bi se vino što bolje izbistrilo. Nakon toga, izbistreno vino pretočeno je u tamne boce te ostavljeno da zrije i odležava u hladnjaku na 5 °C do provođenja analiza. Tijekom odležavanja, vino je u dva navrata pretakano.

3.2.3. FIZIKALNO-KEMIJSKA ANALIZA VINA I ODREĐIVANJE BOJE

Određivanje relativne gustoće pri 20 °C

Nakon određivanja mase suhog piknometra (m_1), staklena bočica ispere se analiziranim vinom i napuni istim uzorkom do polovice grla tj. iznad oznake na vratu piknometra. Zatim se piknometar termostatira u vodenoj kupelji na 20 °C najmanje 20 minuta. Nakon toga, staklenom kapaljkom izvadi višak uzorka tako da donji meniskus vina dodiruje oznaku na vratu piknometra samo u jednoj točki. Unutrašnjost površine vrata piknometra pažljivo se osuši filter papirom, a vanjske stjenke dobro obrišu suhom krpom. Vaganjem se odredi masa piknometara napunjena ispitivanim uzorkom (m_2). Nakon vaganja piknometar se isprazni,

očisti, ispere vodom i na isti način odredi masa piknometra napunjenog destiliranom vodom (m3). Relativna gustoća uzorka se računa prema formuli:

$$V_{piknometra} = m_3 – m_1 / \rho(H_2O) - \rho(zraka)$$

gdje je:

$V_{piknometra}$ – volumen piknometra [m^3],

m_1 – masa suhog piknometra [kg],

m_3 – masa suhog piknometra napunjenog vodom [kg],

$\rho(H_2O)$ – gustoća vode u uvjetima eksperimenta [kg/m^3], i

ρ(zrak) – gustoća zraka koja iznosi 0,0012 g/mL pri 20 °C i 101 325 Pa.

Nakon točnog određivanja volumena piknometra, analogno se odredi gustoća ispitivane tekućine prema formuli:

$$\rho(uzorka, 20\ °C) = (m_2 – m_1)/V_{piknometra} +0,0012$$

gdje je:

ρ(uzorka) – gustoća uzorka pri 20 °C [g/mL],

m_2 – masa piknometra s ispitivanom tekućinom [kg], i

$(m_2 – m_1)$ – masa tekućine u piknometru [kg]

Određivanje pepela

Ostatak zaostao nakon potpunog spaljivanja uzorka vina predstavlja pepeo u vinu. U porculanskoj zdjelici na vodenoj kupelji (120°C) uzorak vina se isparava (25 mL), zatim se suši u sušioniku na 120°Cjedan sat, te potom spaljuje u mufolnoj peći pri temperaturi od 200 do 500 °C do potpunog spaljivanja.

Račun:

$$m\ (pepela; \frac{g}{25\ mLvina}) = m_1 – m_2$$

$$m\ (pepela; \frac{g}{L}) = m\ (pepela; \frac{g}{25\ mLvina}) * 40$$

gdje je:

m_1 – masa prazne porculanske zdjelice

m_2 – masa porculanske zdjelice s pepelom

Određivanje ukupnog ekstrakta i alkohola

Suhi ostatak ili ekstrakt je cjelokupna količina onih tvari koje zagrijavanjem na 100 °C (destilacija) ne prijeđu u destilat. Uzorak vina (50 mL) se destilira te se upotrebom piknometra izračuna relativna gustoća ekstrakta prema jednadžbi:

$$\gamma(ekstrakta) = \frac{Q1-Q}{Q2-Q} * K$$

γ – relativna gustoća ekstrakta

Q – masa praznog piknometra

Q1 – masa piknometra s ekstraktom

Q2 – masa piknometra s destiliranom vodom

K – faktor korekcije (K=0,99823).

Iz izračunate gustoće ekstrakta iz tablice za preračunavanje očita se količina ekstrakta izražena u g/L.

Ekstrakt bez šećera izračunat je matematički:

$$\text{E}kstrakt\ bez\ \text{šećera}\ (\frac{g}{L}) = ekstrakt\ (\frac{g}{L}) - količina\ \text{šećera}\ (\frac{g}{L})$$

Količina alkohola mjeri se preko destilata koji je dobiven destilacijom, korištenjem iste jednadžbe te se udio alkohola (vol%) očita iz Tablice za preračunavanje grama alkohola u litri na volumne postotke.

Račun:

$$\gamma(ekstrakta) = \frac{Q1-Q}{Q2-Q} *$$

Određivanje reducirajućih šećera

U odmjernu tikvicu volumena 200 mL odvaže se 25 g uzorka te se redom dodaje 5 mL reagensa I (vodena otopina kalijferocijanida) i 5 ml reagensa II (vodena otopina cinkovog

acetata), pomiješa i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Cijeli sadržaj se profiltrira preko suhog, naboranog papira u suhu tikvicu. Dobiveni filtrat označen je kao F1. U tikvicu od 300 mL redom se odmjeri 25 mL Luffove otopine i doda otopina šećera. Osim toga, potrebno je napraviti i slijepu probu. Slijepa proba radi se od 25 mL Luffove otopine i 25 mL destilirane vode. Prije zagrijavanja u tikvice se dodaju staklene kuglice, a potom se zagrijava sadržaj do vrenja te vrije 2 minute i još 10 min na temperaturi manjoj od temperature vrenja. Zagrijavanje se vrši uz povratno hladilo i preko azbestne mrežice. Po isteku 10 minuta naglo se hladi sadržaj tikvice pod mlazom hladne vode, a potom se dodaje 3 mL otopine KI. Brzo se promiješa te se pažljivo doda 20 mL 25 % H_2SO_4 i 10 mL otopine KCNS. Sadržaj tikvice se miješa do prestanka šuma. Titracija se vrši otopinom Na-tiosulfata uz prethodni dodatak škroba kao indikatora. Gubitkom plave boje završava titracija.

Račun:

$$\%\ reducirajućih\ šećera = \frac{a * 100}{mg\ uzorka}$$

a – mg šećera izračunati iz tablice po Schoorl-Luff-u.

Određivanje ukupnih šećera

U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 50 mL filtrata F1 i doda se 5 mL HCl-a te se sve promiješa. Zagrijavanje se vrši u vodenoj kupelji na 70°C u trajanju od 10 minuta, brzo se hladi uz stalno miješanje. Doda se metiloranž kao indikator te se neutralizira sa 20%-tnom NaOH.

Hlađenje se vrši do postizanja sobne temperature i dopuni do oznake destiliranom vodom. Dobiveni filtrat zove se F2. Postupak dalje slijedi isto kao kod određivanja reducirajućih šećera.

$$\%\ reducirajućih\ šećera = \frac{a * 100}{mg\ uzorka}$$

a – mg šećera izračunati iz tablice po Schoorl-Luff-u.

Određivanje ukupnih kiselina

Određivanje ukupnih kiselina temelji se na neutralizaciji svih kiselina s NaOH. U čašu od 100 mL stavi se 25 mL uzorka te se zagrijava do vrenja kako bi se uklonio CO_2, a potom se ohladi. Zatim se dodaje fenolftalein kao indikator. Titracija se provodi sa 0,25 N NaOH. Promjena boje ukazuje na završetak neutralizacije. Količina ukupnih kiselina se dobije umnoškom utroška 0,25 N NaOH i faktora 0,75 ili se očita u tablici. Dobivena vrijednost količine ukupnih kiselina izražava se kao u g vinske kiseline po litri.

Račun:

$$vinska\ kiselina\left(\frac{\mathrm{g}}{\mathrm{L}}\right) = V\ (0{,}25\ NaOH)(mL)\ *\ 0{,}75$$

Određivanje hlapljivih kiselina

Uzorak vina destilira se na u posebnoj aparaturi. Nakon destilacije dodaje se indikator fenolftalein i provodi se titracija sa NaOH. Titracija se provodi do pojave konstantne ružičaste boje. Utrošak NaOH pri titraciji ukazuje na količinu octene kiseline.

Račun:

$$\frac{g}{l}\mathrm{NaOH} = \frac{g}{l}\mathrm{CH_3COOH}$$

Određivanje slobodnog SO_2

Volumen uzorka od 50 mL stavi se u Erlenmeyer-ovu tikvicu s brušenim grlom, potom se redom dodaju 10 mL H_2SO_4 (1:4) i 3mL otopine škroba (w = 0,01) kao indikator. Titracija se vrši otopinom joda ($c(I_2)$ = 0,02) do pojave plave boje.

Određivanje ukupnog SO_2

U Erlenmeyer-ovu tikvicu stavi se 50 mL kupinovog vina, a zatim se doda 25 mL otopine NaOH (c = 1 mol/L) i ostavi stajati 15 minuta. Potom se doda 15 mL otopine H_2SO_4 (1:4) i 3 mL škroba (w = 0,01). Vino se prethodno tretira s NaOH čime je stvorena alkalna sredina u kojoj se oslobađa SO_2 (vezan na šećere, aldehide i polifenolne tvari). U oba slučaja titracija se provodi jodom do pojave konstantne plave boje. Račun je za oba slučaja jednak, tj. utrošak

otopine joda u mL množi se faktorom 12,8 i dobije količina ukupnog SO_2 u mg/L kupinovog vina tj.

$$SO_2 \left(\frac{mg}{L}\right) = V\ (0{,}02\ N\ I_2)(mL) * 12{,}8$$

Određivanje sadržaja polifenolnih spojeva

Koncentracija ukupnih fenola se određuje Folin-Ciocalteu metodom. Folin-Ciocalteu metoda temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja (apsorbancije) pri valnoj duljini od 765 nm. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline a pri oksidaciji fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Folin-Ciocalteu reagens (1:10) pripremljen je tako da je otpipetirano 3,3 ml Folin-Ciocalteu reagensa u odmjernu tikvicu od 100 ml i do oznake dopunjeno s destiliranom vodom. Otpipetirano je 0,2 ml uzorka soka određenog razrijeđenja, te dodano 1,8 ml destilirane vode, 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa te nakon stajanja 30 sekundi do 8 minuta dodano 8 ml 7,5% Na_2CO_3 (ukupni volumen mora biti 20 ml). Za slijepu probu otpipetira se 2 ml destilirane vode u epruvetu, te doda 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 8 ml 7,5 % Na_2CO_3. Nakon stajanja u mračnom prostoru 2 – 20 sati, pri čemu dolazi do razvijanja boje, mjeri se apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm. Sadržaj polifenolnih spojeva je interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/L uzorka (Sović, 2013.).

Određivanje boje

Određivanje apsorbancije pri 420, 520, 620 nm je provedeno na UV-VIS spektrofotometru Specord 200 (Analytik Jena, Njemačka).

Prije kromatske analize, svi uzorci su profiltrirani kroz Minisart RC4, 0,45 µm filtere (Sartorius, Njemačka), koji nisu zadržali niti jedan od analita. Intenzitet boje (I), udio žute (dA420 (%)), crvene (dA520 (%)) i plave (dA620 (%)) boje je izračunat korištenjem sljedećih jednadžbi:

$$I = \sum (A_{420} + A_{520} + A_{620})$$

$$T = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

$$dA_{420}(\%) = \frac{A_{420}}{I} \times 100$$

$$dA_{520}(\%) = \frac{A_{520}}{I} \times 100$$

$$dA_{620}(\%) = \frac{A_{620}}{I} \times 100$$

Obrada rezultata

Svaki od 4 uzorka vina analiziran je u triplikatu. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost paralela fermentacija, odnosno vino bez dodatka enzima (kontrola, označena kao K1) te vino s dodatkom enzima (označeno kao E2).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati određivanja fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće te parametara boje analiziranih kupinovih vina prikazani su u tablicama 2. i 3.

Iz tablice 2. vidljivo je kako je postupkom proizvodnje vina uz dodatak pektinaze tijekom maceracije kupine (označeno kao 2E) postignuto 8,1 % veće *iskorištenje sirovine* te 0,65 °Brix veći *početni udjel suhe tvari u soku nakon maceracije* u odnosu na postupak proizvodnje bez dodatka enzima (označeno kao 1K). Ovo je u skladu s istraživanjima koja su proveli Oszmianski i suradnici (2011.) koji su također postigli veće iskorištenje sirovine pri proizvodnji jabučnog soka s pulpom dodatkom pektolitičkih enzima u odnosu na kontrolu u koju nisu dodani enzimi.

Veći početni udjel suhe tvari u soku nakon maceracije kupine uz dodatak enzima vjerojatno je posljedica bolje ekstrakcije matičnog soka kupine.

Analize fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće odnjegovanog vina pokazale su kako su relativna gustoća, ukupni suhi ekstrakt te pepeo također veći u uzorku 2E u odnosu na kontrolni uzorak 1K, proizveden bez dodatka enzima.

Tablica2. Fizikalno – kemijski pokazatelji kakvoće analiziranih kupinovih vina

	Uzorak	
	1 K	**2 E**
Iskorištenje sirovine / %	80,28	88,37
Početni udjel suhe tvari u soku nakon maceracije / °Brix	7,00	7,65
Relativna gustoća / (g/mL)	1,0295	1,0305
Ukupni suhi ekstrakt / (g/L)	113,60	115,80
Pepeo / (g/L)	2,90	3,05
Reducirajući šećeri / (g/L)	23,78	23,73
Ukupni šećeri / (g/L)	122,23	115,40
Alkoholna jakost / vol %	10,68	10,56
Sadržaj ukupnih kiselina / (g/L)	14,07	14,59
Sadržaj hlapljivih kiselina / (g/L)	0,95	1,13
Sadržaj ukupnog sumpornog dioksida / (mg/L)	157,12	168,32

Sadržaj slobodnog sumpornog dioksida / (mg/L)	44,16	46,72

Relativna gustoća uzoraka iznosila je 1,0295 za uzorak 1K, odnosno 1,0305 g/ml za uzorak 2E, što je u skladu s literaturnim podatcima. Amidžić Klarić i suradnici (2017.) analizirali su 15 uzoraka hrvatskih kupinovih vina, pri čemu je prosječna vrijednost relativne gustoće uzoraka iznosila 1,0276 g/mL.

S obzirom na već spomenuti početni udjel suhe tvari u soku nakon maceracije, koji je bio veći u uzorku 2E u odnosu na kontrolni uzorak 1K, dobiveni rezultati određivanja *ukupnog suhog ekstrakta* u vinima su očekivani – odnosno ukupni suhi ekstrakt u vinu 2E dobivenom uz primjenu enzima tijekom maceracije je veći u odnosu na kontrolni uzorak 1K.

Pepeo, anorganski ostatak zaostao nakon spaljivanja uzoraka vina određen je gravimetrijski i iznosio je 2,90 g/L za kontrolni uzorak vina 1K te 3,05 g/L za uzorak 2E. Sadržaja pepela u 15 uzoraka hrvatskih kupinovih vina koje su analizirali Amidžić Klarić i suradnici (2017.) kretao se u rasponu od 2,77 do 3,28 g/L. Većina zemalja koje su proizvođači vina imaju propisanu vrijednost minimalnog sadržaja pepela za vina od grožđa – za bijela vina ta vrijednost iznosi 1,2 g/L, dok je za crvena vina ta vrijednost nešto veća i iznosi 1,6 g/L (Dikanović-Lučan i sur., 1993). Sadržaj pepela manji od minimalnih propisanih vrijednosti može ukazivati na patvoreno vino. Veći sadržaj pepela u vinu, kao posljedica većeg sadržaja minerala, može implicirati bolju kvalitetu vina (Amidžić Klarić i sur., 2017.).

Osnovni šećeri prisutni u plodu kupine uključuju glukozu, fruktozu i saharozu, pri čemu su njihove koncentracije i međusobni omjeri obilježje pojedine sorte. Sadržaj glukoze i fruktoze, ali i ukupnih šećera značajno se povećava zrenjem ploda, odnosno njegovom promjenom boje od svijetlo crvene do tamnoplave (Kaume i sur., 2012.). Tijekom proizvodnje vina, kvasac fermentira glukozu i fruktozu do različitih spojeva, poput alkohola, CO_2 i glicerola. Nadalje, tijekom proizvodnje kupinova vina šećer (najčešće saharoza) se dodaje tijekom procesa, što je vjerojatno razlog širokog raspona koncentracija reducirajućih šećera u vinima koje su analizirali Amidžić Klarić i suradnici (2017.) i koji je iznosio od 13,5 do 177,6 g/L. Koncentracija reducirajućih šećera određena u vinu 1K iznosila je 23,78 g/L (koncentracija ukupnih šećera 122,23 g/L), dok je u vinu 2E proizvedenom uz dodatak enzima koncentracija iznosila 23,73 g/L (koncentracija ukupnih šećera 115,40 g/L).

Etanol, glavni proizvod alkoholne fermentacije, važan je kako za senzorske karakteristike vina, tako i za njegovu stabilnost. Prema dostupnim literaturnim podatcima sadržaj alkohola

u komercijalno dostupnim kupinovim vinima kreće se u rasponu od 9,4 do 14,99 vol % (Amidžić Klarić i sur. 2017.; Johnson i Gonzalez de Mejia, 2012; Arozarena i sur., 2012.). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem u skladu su s navedenim literaturnim vrijednostima. Alkoholna jakost proizvedenih vina iznosila je 10,68 vol % za kontrolno vino 1K, odnosno 10,56 vol % za vino 2E.

Kiselost ploda kupine mijenja se tijekom rasta i zrenja te utječe na kiselost kupinova soka i mošta. Posljedično, kiselost mošta utječe na ukupnu kiselost vina, jer neke kiseline iz mošta prelaze u vino i sudjeluju u fizikalno-kemijskim i biokemijskim procesima, poput nastajanja specifičnog okusa vina (Huerta i suradnici, 1998.). *Ukupna kiselost* proizvedenih vina iznosila je 14,07 g/L za uzorak 1K proizveden bez dodatka enzima, odnosno 14,59 g/L za uzorak 2E. Literaturne vrijednosti za ukupnu kiselost komercijalno dostupnih kupinovih vina iznosile su od 3,3 do 18,1 g/L (Amidžić Klarić i sur. 2017; Johnson i Gonzalez de Mejia, 2012; Gao i sur., 2012.). *Sadržaj hlapljivih kiselina* iznosio je 0,95 g/L za kontrolni uzorak te 1,13 g/L za uzorak 2E proizveden uz dodatak enzima tijekom maceracije.

Sadržaj ukupnog sumporova(IV) oksida iznosio je 157,12 mg/L (sadržaj slobodnog SO_2 iznosio je 44,16 mg/L) za kontrolno vino K1, odnosno 168,32 mg/L (sadržaj slobodnog SO_2 iznosio je 46,72 mg/L) za kupinovo vino E2 proizvedeno uz dodatak enzima.

Parametri boje proizvedenih kupinovih vina prikazani su u tablici 3.

Tablica3. Parametri boje analiziranih kupinovih vina

	Uzorak	
	1 K	**2 E**
Parametar boje		
Intenzitet boje (CI)	4,56	4,94
Ton (T)	0,75	0,87
% žute	40,34	43,35
% crvene	53,86	50,11
% plave	5,80	6,55
Ukupni polifenoli / (mg/L)	1480	1550

S tehnološkog stajališta proizvodnje kupinovih vina, fenolni spojevi su ključni za razvoj nekoliko karakteristika vina, poglavito boje, trpkosti i gorčine. Crvena boja vina ovisi o

koncentraciji antocijana u plodu kupine, proizvodnom postupku te velikom broju kemijskih reakcija koje se događaju tijekom fermentacije i odležavanja vina. Koncentracija ukupnih polifenola u uzorku vina 2E iznosi 1550 mg/L te je veća od koncentracije u kontrolnom uzorku 1K koja iznosi 1480 mg/L. Ovakav rezultat je očekivan, s obzirom na činjenicu kako upotrebom pektinaza dolazi do bolje ekstrakcije biološki aktivnih tvari, poput polifenolnih spojeva, iz ploda kupine. Dobivene koncentracije za oba vina u skladu su s koncentracijama koje za kupinova vina navode drugi autori i koje se kreću od 600 mg/L do preko 2000 mg/L (Arozarena i sur., 2012; Amidžić Klarić i sur., 2011.)

Intenzitet boje ispitivanih vina iznosio je 4,56 za kontrolni uzorak K1 te 4,94 za uzorak 2E. Ove vrijednosti su nešto manje od vrijednosti koje navode Ortiz i suradnici (2013.) i koje se kreću u rasponu od 6,9 do 9, ali su u skladu s vrijednostima koje za hrvatska kupinova vina navode Amidžić Klarić i suradici (2017) i koje iznose od 1,8 do 13,19. Ton koji za ispitivana vina iznosi 0,75 (uzorak K1), odnosno 0,87 (uzorak 2E) također su u skladu s vrijednostima koje navode Amidžić Klarić i suradici (2017). Žuta i crvena su boje koje u oba ispitivana uzorka doprinose intenzitetu boje (IC) s više od 90%, pri čemu je crvena boja komponenta koja u najvećoj mjeri doprinosi intenzitetu boje. Doprinos plave boje u ukupnom intenzitetu boje iznosi 5,80% za kontrolni uzorak K1, odnosno 6,55 za uzorak 2E. Arozarena i suradnici (2012.) navode kako je crvena također komponenta koja najviše doprinosi intenzitetu boje, ali je njezina vrijednost gotovo dvostruko veća od vrijednosti žute boje, dok u ovom istraživanju ta razlika nije toliko značajna. Nešto veće vrijednosti intenziteta boje, tona, kao i koncentracije ukupnih polifenola dobivene za uzorak vina 2E u odnosu na kontrolu ukazuju na moguć pozitivan učinak primjene enzima tijekom maceracije na razvoj tvari boje.

5. ZAKLJUČCI

5. ZAKLJUČCI

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

Dodatkom pektinaze tijekom maceracije kupine postignuto je 8,1 % veće *iskorištenje sirovine* te 0,65 °Brix veći *početni udjel suhe tvari u soku nakon maceracije* u odnosu na postupak proizvodnje bez dodatka enzima.

Analiza fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće vina pokazala je kako su vrijednosti relativne gustoće, ukupnog suhog ekstrakta te pepela veće u vinu proizvedenom uz dodatak enzima u odnosu na vino proizvedeno bez dodatka enzima.

Koncentracije reducirajućih i ukupnih šećera, sadržaj etanola, ukupna kiselost te koncentracija ukupnog i slobodnog SO_2 bili su ujednačeni neovisno o načinu proizvodnje vina, dok je nešto veća razlika u koncentraciji hlapljivih kiselina utvrđena u vinu proizvedenom uz dodatak enzima.

Veća koncentracija ukupnih polifenola te posljedično veće vrijednosti intenziteta boje i tona dobivene za vino proizvedeno uz dodatak enzima u odnosu na kontrolu ukazuju na bolju ekstrakciju tvari boje tijekom maceracije.

Sve navedeno upućuje na pozitivan učinak primjene komercijalnih pektolitičkih pripravka na fizikalno-kemijske pokazatelje kakvoće te boju kupinova vina.

6. LITERATURA

6. LITERATURA

Amidžić Klarić D, Klarić I, Velić D, Velić N, Marček T: Evaluation of Quercetin Content, Colour and Selected Physico – Chemical Quality Parameters of Croatian Blackberry Wines. *Polish Journal of Food and Nutrition Science* 67: 75-83, 2017.

Amidzic-Klaric D, Klaric I, Mornar A: Polyphenol content and antioxidant activity of commercial blackberry wines from Croatia: application of multivariate analysis for geographic origin differentiation. *Journal of Food Nutrition and Research* 50: 199–209, 2011.

Arozarena I, Ortiz J, Hermosin-Gutieerrez I, Urretavizcaya I, Salvatierra S, Cordova I, Remedios Marin-Arroyo M, Jose Noriega M, Navarro M: Color, Ellagitannins, Anthocyanins, and Antioxidant Activity of Andean Blackberry (*Rubus glaucus* benth.) Wines. *Journal of agricultural and food chemistry* 60: 7463-7473, 2012.

Bautista-Ortin A, Martinez-Cutillas A, Ros-Garcia M, Lopez-Roca J M, Gomez-Plaza E: Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology* 40: 867-878, 2005.

Bošnjaković, M: Istraživanje utjecaja kontrolirane fermentacije na kvalitetu ekoloških kupinovih vina. *Diplomski rad*, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, 2012.

Dıaz C, El'ıas Conde J, Claverie C, D'ıaz E, Pérez Trujillo J P: Conventional enological parameters of bottled wines from the Canary Islands (Spain). *Journal of Food Composition and Analysis* 16: 49–56, 2003.

Dikanović-Lučan Ž, Palić A, Hanser D: Determination of ash content in wines by the conductometric method. *Prehrambeno-tehnološka i biotehnološka Revija* 31: 15–18, 1993.

Guadalupe Z, Palacios A, Ayestarán B: Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4854–4862, 2007.

Gao J, Xi Z, Zhang J, Guo Z, Chen T, Fang Y, Meng J,Zhang A, Li Y, Liu J: Influence of fermentation method on phenolics, antioxidant capacity, and volatiles in blackberry wines. *Analytical Letters* 45: 2603–2622, 2012.

Huerta M D, Salinas M R, Masoud T, Alonso G L: Wine differentiation according to color using conventional parameters and volatile components. *Journal of Food Composition and Analysis* 11: 363–374, 1998.

Jakobović S, Jakobović M, Zima D: Utjecaj maceracije masulja na kakvoću vina Rajnski rizling. *Agronomski glasnik,* 63 – 72, 2009.

Kaume L, Howard R L, Devareddy L: The Blackberry Fruit: A Rewiew on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 5716 – 5727, 2012.

Landbo A, Meyer A: Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5: 503 – 513, 2004.

Johnson MH, Gonzalez de Mejia E*:* Comparison of Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Commercially Available Blueberry and Blackberry Wines in Illinois. *Journal of Food Science* 71: C141 – C148, 2012.

Mihovilović M: Utjecaj procsenih parametara na zadržavanje tvari boje i arome vina od jabuke. *Diplomski rad*, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2016.

Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, *Pravilnik o voćnim vinima*, „Narodne novine“ br. 73/06, 24/11, 120/12, 59/13

Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva Vlade Republike Hrvatske, *Zakon o ekološkoj proizvodnji prehrambenih i poljoprivrednih proizvoda*, “Narodne novine“ br. 12/01, Zagreb, 2001.

Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva RH: *Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina*. Narodne novine 96/03, 2004.

Opačić T: Tehnološki proces proizvodnje kupinovog vina. *Završni rad*, Prehrambeno–tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2010.

Ortiz J, Marín-Arroyo MR, Noriega-Domínguez MJ, Navarro M, Arozarena I: Color, phenolics, and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and apple wines from Ecuador. *Journal of Food Science* 78: 985–993, 2013.

Oszmiański J, Wojdyło A, Kolniak J: Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. *Food Chemistry* 127: 623–631, 2011.

Petravić – Tominac V, Mesihović A, Mujadžić S, Lisičar J, Oros D, Velić D, Velić N, Srečec S, Zechner – Krpan V, Petrović Z: Production of Blackberry Wine by Microfermentation using Commercial Yeasts Fermol Rouge and Fermol Mediterranee. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 78: 49 – 55, 2013.

Sović V: Utjecaj membranske filtracije na kemijski sastav i kvalitetu vina sorte graševina. *Diplomski rad,* Prehrambeno–tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2013.

Velić, D: *Razvoj i standardizacija proizvodnje ekoloških kupinovih vina*. Priručnik, VIP projekt, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2015.

Velić D, Amidžić Klarić D, Petravić T, Velić N, Bilić M, Jokić S, Bošnjaković M: Istraživanje utjecaja kontrolirane fermentacije na kvalitetu ekoloških kupinovih vina. U *3. Zbornik sažetaka Okolišno prihvatljiva proizvodnja kvalitetne i sigurne hrane*, 41 – 42. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Grafika Osijek, 2013.

Vrdoljak I: Utjecaj membranske filtracije na aromu i kemijski sastav vina sorte Graševina. *Diplomski rad,* Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2009.

Web 1.http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2003_06_96_1219.html[22.11.2016]

Web 2. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2006_07_73_1738.html[22.11.2016]

Web 3:http://www.coolinarika.com/magazin/prehrambeni-rjecnik/p/pektinaza/[22.11.2016]