

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO**

Tatjana Košmerl, Milica Kač

# **KEMIJSKE ANALIZE IN POSTOPKI ČIŠČENJA VINA**

Laboratorijske vaje pri izbirnem predmetu Vinarstvo

**Ljubljana, 2010**

Avtorici: prof. dr. Tatjana Košmerl, univ. dipl. inž.  
doc. dr. Milica Kač, univ. dipl. inž.

Naslov: Kemijske analize in postopki čiščenja vina: laboratorijske vaje pri izbirnem predmetu  
Vinarstvo

Recenzenti: prof. dr. Lucija Zupančič-Kralj, univ. dipl. inž.  
prof. dr. Janez Hribar, univ. dipl. inž.  
prof. dr. Rajko Vidrih, univ. dipl. inž.

Izdajatelj: Univerza v Ljubljani  
Biotehniška fakulteta  
Oddelek za živilstvo

Elektronsko študijsko gradivo: <http://www.bf.uni-lj.si/knjiznice/o-knjiznicah/organiziranost/knjiznica-odd-za-zivilstvo/ucbeniki-v-elektronski-obliki.html>

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

663.2:543.06(075.8)(076.5)  
663.257(075.8)(076.5)

KOŠMERL, Tatjana

Kemijske analize in postopki čiščenja vina [Elektronski vir] : laboratorijske vaje pri izbirnem predmetu Vinarstvo / Tatjana Košmerl, Milica Kač. - El. knjiga. - Ljubljana : Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2010

Način dostopa (URL): <http://www.bf.uni-lj.si/knjiznice/o-knjiznicah/organiziranost/knjiznica-odd-za-zivilstvo/ucbeniki-v-elektronski-obliki.html>

ISBN 978-961-6333-85-6  
1. Kač, Milica  
249446400

Po sklepu dekana Biotehniške fakultete dne 18.1.2010 je delo Kemijske analize in postopki čiščenja vina učbenik za študente 3. letnika univerzitetnega študija Živilstvo in prehrana pri vajah izbirnega predmeta Vinarstvo.

Vse pravice pridržane. Ponatis (grafični, elektronski ali mehanski, vključno z razmnoževanjem, snemanjem ali prenosom v baze podatkov) celote ali posameznih delov ni dovoljen brez pisnega soglasja nosilca avtorskih pravic.

## KAZALO VSEBINE

Metode določanja obravnavanih parametrov in njihove vrednosti .....	1
Definicije pridelkov .....	2
POJEM ALKOHOLA V VINU .....	4
REDUCIRAJOČI SLADKORJI V VINU .....	4
1 DOLOČANJE REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV V VINU PO REBELEINU .....	7
2 DOLOČANJE ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINU PO REBELEINU .....	13
3 DOLOČANJE ACETALDEHIDA V VINU PO REBELEINU .....	17
4 DOLOČANJE PROLINA V VINU PO OUGHU IN AMERINU .....	24
5 DOLOČANJE PROSTEGA AMINOKISLINSKEGA DUŠIKA V VINU PO NICOLINIJU IN SODELAVCIH .....	28
6 DOLOČANJE FENOLNIH SPOJIN V VINU PO SINGLETONU IN ROSSIJU .....	37
7 DOLOČANJE BARVE VINA .....	42
8 OSNOVE ČIŠČENJA VINA .....	47
9 POSTOPKI ČIŠČENJA VINA S ČISTILNIMI SREDSTVI .....	52
10 REZULTATI ČISTILNIH POSKUSOV .....	68

## Metode določanja obravnavanih parametrov in njihove vrednosti

Preglednica A1: Metode za določanje posameznih parametrov za mošt in vino, ki jih predpisujeta O.I.V. (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) in E.E.C. (European Economic Commission)

Parameter	Metoda	Enota	O.I.V.	E.E.C.
gostota ( $d_{20}$ )	piknometrija	g/cm <sup>3</sup>	R	R
	hidrometrija	g/cm <sup>3</sup>	O	O
	denzitometrija (hidrostatska tehnica)	g/cm <sup>3</sup>	O	O
alkohol (v destilatu)	piknometrija	vol.%, g/L	R	H
	hidrometrija	vol.%, g/L	O	O
	denzitometrija (hidrostatska tehnica)	vol.%, g/L	O	O
	refraktometrija	vol.%, g/L	O	/
	oksidacija z dikromatom	vol.%, g/L	E	
skupne (titrabilne) kisline	potenciometrična titracija (do pH=7)	g vinske kisline/L	R	R
	titracija z indikatorjem bromtimol modro (do pH=7)	g vinske kisline/L	O	O
hlapne kisline	destilacija z vodno paro in titracija destilata	g očetne kisline/L	E	E
pH	potenciometrija	–	E	E
nehlapne (fiksne) kisline	razlika med skupnimi in hlapnimi kisljinami	g vinske kisline/L	E	E
skupni suhi ekstrakt	vakuumska destilacija pri 70 °C	g/L	R	/
	računsko (Tabariéjev obrazec)	g/L	O	E
reducirajoči sladkorji	metoda po Luff-Schoorlu po čiščenju vzorca s:			
	- svinčevim acetatom	g/L	R	R
	- cinkovim ferocianidom	g/L	O	O
saharoza	kolorimetrija	g/L	/	O
	tenkoplastna kromatografija	g/L	/	R
	kvantitativno določanje RS pred inverzijo in po njej	g/L	/	R
sorbinska kislina	destilacija z vodno paro in UV spektrofotometrija	g/L	O	E
žveplova(IV) kislina	oksidacija v žveplovo(VI) kislino in titracija	mg SO <sub>2</sub> /L	O	R
	jodometrična titracija	mg SO <sub>2</sub> /L	H	O

Legenda:

R = referenčna metoda, O = običajno uporabljena metoda, H = hitra metoda, E = edina metoda  
– = parameter nima enote; / = metoda ni predpisana, RS = reducirajoči sladkorji

Vir:

Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu (UL RS 43/2004, z dne 26.04.2004)

## Definicije pridelkov

**Grozdje** je sadež vinske trte, pridelan na absolutnih vinogradniških legah iz priporočenih in dovoljenih sort vinske trte za določeno pridelovalno območje (v nadaljnjem besedilu: vinorodno območje), ki dosega predpisano sladkorno stopnjo ter ostale predpisane parametre in se uporablja za pridelavo grozdnega mošta in vina. Za pridelavo v vino se uporablja zrelo ali rahlo posušeno grozdje, ki se lahko drozga ali stisne z običajno kletarsko opremo, pri čemer lahko spontano poteče alkoholno vrenje.

Po drozganju oziroma stiskanju grozdja lahko spontano poteče alkoholno vrenje.

**Grozdni mošt** je tekoč pridelek, katerega volumenski delež dejanskega alkohola je največ 1% in je pridobljen iz grozdja brez ali s pomočjo fizikalnih postopkov.

Delno prevret grozdni mošt (v nadaljnjem besedilu: **vinski mošt**) je tekoč pridelek, katerega volumenski delež dejanskega alkohola je najmanj 1 % in največ 3/5 skupnega alkohola.

**Novo vino, ki še vre**, je pridelek, kjer alkoholno vrenje še ni zaključeno in vino še ni oddeljeno od droži in katerega volumenski delež dejanskega alkohola je več kot 3/5 skupnega alkohola.

**Vino** je pridelek, pridobljen s popolnim ali delnim alkoholnim vrenjem drozge ali mošta, pridelanega iz grozdja žlahtne vinske trte.

**Delno prevret grozdni mošt iz sušenega grozdja** je tekoč pridelek, pridobljen z delnim alkoholnim vrenjem iz sušenega grozdja, katerega koncentracija reducirajočih sladkorjev pred alkoholnim vrenjem je najmanj 272 g/L in katerega volumenski delež naravnega in dejanskega alkohola je najmanj 8 %.

Sveži grozdni mošt, ki mu je bilo vrenje ustavljeno z dodatkom alkohola (v nadaljnjem besedilu: **mistela**) je pridelek z volumenskim deležem dejanskega alkohola najmanj 12 % in največ 15 %.

**Zgoščen grozdni mošt** (v nadaljnjem besedilu: ZGM) je nekarameliziran pridelek iz grozdnega mošta, pridobljen z delno dehidracijo grozdnega mošta z vakuumom ali z zmrzovanjem vode v moštu, vendar brez uporabe neposrednega segrevanja. ZGM ima masni delež sladkorja, določen z refraktometrom pri temperaturi 20 °C, več kot 50,9 %. Volumenski delež dejanskega alkohola je lahko največ 1 %.

**Rektificiran zgoščen grozdni mošt** (v nadaljnjem besedilu: RTK) je tekoč nekarameliziran pridelek, kateremu so izločene vse sestavine mošta, razen sladkorja. Pridobljen je brez uporabe neposrednega segrevanja in razkisan z metodo razkisa, ki je predpisana s tem pravilnikom. Masni delež sladkorja v RTK, določen z refraktometrom pri temperaturi 20 °C, mora biti najmanj 61,7 %.

**Grozdni sok** je nefermentiran tekoč pridelek, ki je primeren za prehrano ljudi in je pridobljen iz svežega grozdja, iz grozdnega mošta, z razredčevanjem iz ZGM ali z razredčevanjem iz zgoščenega grozdnega soka. Volumenski delež dejanskega alkohola v grozdnem soku je lahko največ 1 %.

**Zgoščeni grozdni sok** je nekarameliziran pridelek, ki je pridobljen z delno dehidracijo grozdnega soka, brez uporabe neposrednega segrevanja. Masni delež sladkorja v zgoščenem grozdnem soku, določen z refraktometrom pri temperaturi 20 °C, je več kot 50,9 %. Volumenski delež dejanskega alkohola v zgoščenem grozdnem soku je lahko največ 1 %.

Vir:

Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu (UL RS 43/2004, z dne 26.04.2004)

Preglednica B1: Primerjava izrazov za pridelke v različnih jezikih

Slovenščina	Francoščina	Angleščina	Nemščina
grozdje	raisins frais	fresh grapes	frische Weintrauben
grozdni mošt	moût de raisins	grape must	Traubenmost
vinski mošt	moût de raisins partiellement fermenté	grape must in fermentation	teilweise gegorener Traubenmost
delno prevret grozdni mošt iz sušenega grozdja	moût de raisins partiellement fermenté issu de raisins passerillés	grape must in fermentation extracted from raisined grapes	teilweise gegorener Traubenmost aus eingetrockneten Trauben
sveži grozdni mošt, ki mu je bilo vrenje ustavljeno z dodatkom alkohola (mistela)	moût de raisins frais, muté à l'alcool	fresh grape must with fermentation arrested by the addition of alcohol	durch Zusatz von Alkohol stummgemachter Most aus frischen Weintrauben
zgoščen grozdni mošt (ZGM)	moût de raisins concentré	concentrated grape must	konzentrierter Traubenmost
rektificiran zgoščen grozdni mošt (RTK)	moût de raisins concentré rectifié	rectified concentrated grape must	rektifiziertes Traubenmostkonzentrat
grozdni sok	jus de raisins	grape juice	Traubensaft
zgoščen grozdni sok	jus de raisins concentré	concentrated grape juice	konzentrierter Traubensaft
vino	vin	wine	Wein
novo vino, ki še vre	vin nouveau encore en fermentation	new wine still in fermentation	Jungwein

Preglednica B2: Pojma drozge in mošta po Slovarju slovenskega knjižnega jezika in Slovenskem pravopisu

Pojem	Slovar slovenskega knjižnega jezika	Slovenski pravopis
<b>drozga</b> -e ž (o)	agr. <i>zmečkano, zmleto sadje, zlasti grozdje</i> : drozga je začela vreti; sadna, vinska drozga	sadna, vinska ~
<b>mošt</b> mošta m (o o)	1. <i>sladek sok iz mletega, mečkanega grozdja, sadja</i> : pokušati mošt / sadni, vinski mošt * agr. mošt vre 2. <i>sladka ali prevreta pijača iz mletega, mečkanega sadja</i> : delati mošt iz manjvrednega sadja; piti mošt / hruškov, jabolčni mošt	jabolčni ~

## Pojem alkohola v vinu

**NARAVNI ALKOHOL** = količina alkohola, ki je nastala iz sladkorja v grozdju

**DEJANSKI (ali prisotni) ALKOHOL** = alkohol, ki ga vsebuje vino; nastal je bodisi iz sladkorja v grozdju ali iz sladkorja, ki je bil v okviru dovoljenih predpisov dodan v mošt (obogatitev ali po starem dosladkanje)

**POTENCIALNI ALKOHOL** = v alkohol preračunana količina nepovretega sladkorja (vsebnost reducirajočih sladkorjev), ki bi eventualno lahko povrel v alkohol, pa ni

**SKUPNI ALKOHOL** = vsota vsebnosti dejanskega in potencialnega alkohola

## Reducirajoči sladkorji v vinu\* (sladkorne stopnje)

Glede na koncentracijo reducirajočih sladkorjev se mirna vina delijo na naslednje kategorije:

- **suho vino**, katerega koncentracija reducirajočih sladkorjev ne presega 9 g/L, pod pogojem, da koncentracija skupnih kislin, izražena v gramih vinske kisline na liter, ni več kot 2 grama pod koncentracijo reducirajočih sladkorjev;
- **polsuho vino**, katerega koncentracija reducirajočih sladkorjev presega največjo dovoljeno koncentracijo, določeno v prejšnji alineji, vendar ne presega 12 g/L ali v primeru, da je koncentracija skupnih kislin, izražena v gramih vinske kisline na liter, več kot 7 g/L, ne presega 18 g/L;
- **polsladko vino**, katerega koncentracija reducirajočih sladkorjev presega največjo dovoljeno koncentracijo, določeno v prejšnji alineji, vendar ne presega 45 g/L;
- **sladko vino**, katerega koncentracija reducirajočih sladkorjev presega 45 g/L.

\*12. člen Pravilnika o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu (UL RS 43/2004, z dne 26.04.2004)

V 3. členu Pravilnika o spremembah in dopolnitvah zgornjega pravilnika (UL RS 112/2005, z dne 15.12.2005) se definicija za **polsuho vino** glasi: katerega koncentracija reducirajočih sladkorjev presega največjo dovoljeno koncentracijo, določeno v prejšnji alineji, vendar ne presega 18 g/L, pod pogojem, da koncentracija skupnih kislin, izražena v gramih vinske kisline na liter, ni več kot 10 gramov pod koncentracijo reducirajočih sladkorjev.

Preglednica C1: Najmanjše in največje vrednosti kemijskih parametrov, ki so zahtevane pri posameznih kakovostnih razredih vin, ki so pridelana ali se tržijo na ozemlju Republike Slovenije, ki jih predpisuje veljavni Pravilnik\* (Priloga III)

Kemijski parameter		Najmanjša zahtevana koncentracija	Največja dovoljena koncentracija
Skupne kisline, izražene kot vinska kislina (g/L)		3,5	
Vinska kislina (g/L)		1,0	
Citronska kislina (g/L)			1,0
Metavinska kislina (mg/L)			100
Askorbinska kislina (mg/L)			100
Sorbinska kislina (mg/L)			200
Hlapne kisline, izražene kot očetna kislina (g/L)	Grozdni mošt v vrenju		1,0
	Bela in rose vina		1,0
	Rdeča vina		1,2
	Vrhunska vina ZGP – suhi jagodni izbor		2,1
	Vrhunska vina ZGP – jagodni izbor		1,8
	Vrhunska vina ZGP – ledeno vino		1,8
Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)**	DEŽELNO VINO PGO	belo, rose	16
		rdeče	18
	KAKOVOSTNO VINO ZGP	belo, rose	18
		rdeče	20
	VRHUNSKO VINO ZGP	belo, rose	20
		rdeče	22
Glicerol (g/L)	Namizna in deželna vina		4
	Kakovostna vina ZGP		5
	Vrhunska vina ZGP		6
Pepel (g/L)	Bela vina		1,2
	Rose vina		1,4
	Rdeča vina		1,5

\*Pravilnik o spremembah in dopolnitvah pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu (UL RS 127/2004, z dne 26.11.2004)

\*\*V izrednih primerih lahko minister zniža vrednosti minimalnih koncentracij sladkorja prostega ekstrakta (SPE) s skupinskim dovoljenjem za določeno območje.

PGO = priznana geografska oznaka (tradicionalni izraz v razredu namiznih vin je deželno vino PGO)  
ZGP = zaščiteno geografsko poreklo



Preglednica C2: Maksimalne vrednosti kemijskih parametrov, ki so zahtevane pri posameznih kakovostnih razredih vin, ki so pridelana ali se tržijo na ozemlju Republike Slovenije, ki jih predpisuje veljavni Pravilnik\* (Priloga II)

Kemijski parameter		Največja dovoljena koncentracija		
Skupni SO <sub>2</sub> (mg/L)	rdeča vina	suha (do 5 g/L red. sladkorjev)	160	
		(nad 5 g/L red. sladkorjev)	210	
	bela in rose vina	suha (do 5 g/L red. sladkorjev)	210	
		(nad 5 g/L red. sladkorjev)	260	
Skupni / prosti SO <sub>2</sub> (mg/L)	vrhunsko vino ZGP	(do 7 g/L red. sladkorjev )	180 / 40 (bela in rose)	140 / 35 (rdeča)
		(nad 7 g/L red. sladkorjev )	240 / 45 (bela in rose)	180 / 40 (rdeča)
	vrhunsko vino ZGP - pozna trgatav		300 / 50	
	vrhunsko vino ZGP - izbor		350 / 50	
	vrhunsko vino ZGP - jagodni izbor, ledeno vino, suhi jagodni izbor		400 / 50	
	barrique vino		160 / 50 (bela in rose)	160 / 40 (rdeča)

\*Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu (UL RS 43/2004, z dne 26.04.2004)

# 1 DOLOČANJE REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV V VINU PO REBELEINU

## Titracijska metoda (Rebelein, 1971, 1973)

### 1.1 Uvod

Prevladujoča sladkorja v grozdju, moštu in vinu sta glukoza in fruktoza, manj je saharoze in ostalih sladkorjev, posebno nefermentativnih pentoz. Trehalozo običajno najdemo le v botriticidnih vinih, tj. vinih, ki so pridelana iz grozdja, okuženega s (žlahtno) plesnijo vrste *Botrytis cinerea*.

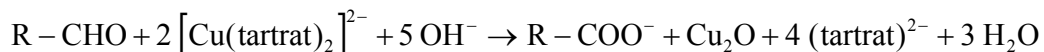
Vsebnost sladkorja v dozorevajočem grozdju je pomemben dejavnik pri določanju časa trgatve in kakovosti pridelka. Ker sladkor predstavlja več kot 90 % vseh raztopljenih snovi, je določanje le-teh približna mera vsebnosti sladkorja v grozdju in moštu. Med alkoholno fermentacijo poteče encimska hidroliza (naravno prisotne ali dodane) saharoze v glukozo in fruktozo, ki ju kvasovke lahko povrejo. V vinu je tako praktično komaj kaj saharoze. Popolnoma suha vina vsebujejo približno 1 g reducirajočih sladkorjev/L. V tej koncentraciji so zajeti zlasti nefermentativni reducirajoči sladkorji, npr. pentoze (arabinoza, ramnoza in ksiloza), medtem ko je skupna koncentracija nefermentativne glukoze in fruktoze minimalna (0,1-0,2 g/L).

### 1.2 Opis metode

Številni reagenti (Luffov, Soxhletov, Fehlingov) kvantitativno oksidirajo reducirajoče sladkorje v karboksilne kisline. Oksidacija je odvisna od uporabljenega reagenta in od pogojev (razmer) oksidacije. S segrevanjem do vrenja poteče v reakcijski zmesi oksidacija reducirajočih sladkorjev v kisline, dvovalentni bakrovi ioni iz reakcijske zmesi pa se reducirajo do bakrovega(I) oksida. Iz raztopine se izloči oborina netopnega bakrovega(I) oksida ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Preostali  $\text{Cu}^{2+}$  ioni se v raztopini kalijevega jodida v kislem (dodatek žveplove(VI) kisline) reducirajo, nastali jod ( $\text{I}_2$ ) pa titrimetrično določimo z raztopino natrijevega tiosulfata ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) s škrobovico kot indikatorjem. Koncentracijo reducirajočih sladkorjev (g/L) odčitamo direktno z birete ob upoštevanju slepega vzorca (to vrednost odštejemo od rezultata).

#### 1.2.1 Reakcije pri določanju reducirajočih sladkorjev po Rebeleinu

a) oksidacija reducirajočih sladkorjev in redukcija Fehlingove raztopine (raztopina bakrovega sulfata in K-Na tartrata) do bakrovega(I) oksida pri segrevanju do vrenja

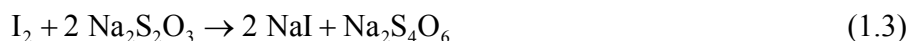


(1.1)

b) redukcija presežnega bakrovega sulfata ( $\text{Cu}^{2+}$  ionov) s kalijevim jodidom ( $\text{I}^-$  ioni) v kislem



c) titracija nastalega joda z raztopino natrijevega tiosulfata



### 1.3 Potrebna oprema

laboratorijska ura,  
stojalo,  
300 W električni grelec,  
bireta (25 mL),  
pipete (merilne 5 mL in 10 mL; polnilna 2 mL),  
erlenmajerica (250 mL),  
puhalka z deionizirano vodo,  
(po potrebi vrelni kamenčki).

### 1.4 Reagenti (kot so označeni v laboratoriju)

- glukoza - za pripravo umeritvene krivulje;
- S1 = raztopina bakrovega sulfata ( $\text{CuSO}_4$ ): 41,92 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  natehtamo v 1000 mL merilno bučko in raztopimo v približno 600 mL deionizirane vode; dodamo 10 mL 0,5 M raztopine  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , premešamo in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;
- S2 = raztopina kalijevega-natrijevega tartrata ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ ): 250 g kalijevega-natrijevega tartrata natehtamo v 1000 mL merilno bučko in raztopimo v približno 400 mL deionizirane vode. Ločeno raztopimo 80 g natrijevega hidroksida ( $\text{NaOH}$ ) v približno 400 mL deionizirane vode; raztopini združimo in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;
- S3 = raztopina kalijevega jodida ( $\text{KI}$ ): v 1000 mL merilno bučko natehtamo 300 g kalijevega jodida, ki ga raztopimo v 100 mL 1 M raztopine natrijevega hidroksida; ohladimo na sobno temperaturo in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;
- S4 = 16 % raztopina žveplove(VI) kisline ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ): v 1000 mL merilno bučko nalijemo približno 500 mL deionizirane vode, nato previdno z merilnim valjem dodamo 175 mL 96 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (previdno ravnanje s koncentrirano kislino!); premešamo, in ko se ohladi, dopolnimo z deionizirano vodo do oznake;
- S5 = raztopina škrobovice: 10 g škroba natehtamo v 500 mL vrele deionizirane vode; ločeno raztopimo 20 g kalijevega jodida v 500 mL deionizirane vode in dodamo 10 mL 1 M raztopine natrijevega hidroksida; previdno združimo obe raztopini;
- S6 = raztopina natrijevega tiosulfata (titrant): v 1000 mL merilno bučko natehtamo 13,777 g natrijevega tiosulfata pentahidrata ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), ki ga raztopimo v 50 mL 1 M raztopine natrijevega hidroksida in 500 mL deionizirane vode; dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;

- 0,5 M raztopina žveplove(VI) kisline ( $H_2SO_4$ ): v 1000 mL merilno bučko nalijemo približno 500 mL deionizirane vode, dodamo 28,35 mL 96 % raztopine  $H_2SO_4$  (previdno ravnanje s koncentrirano kislino!); premešamo, in ko se ohladi, dopolnimo do oznake z deionizirano vodo.

## 1.5 Postopek

### 1.5.1 Določanje reducirajočih sladkorjev v vzorcu vina

- a) električni grelec predhodno ogrevamo vsaj 5 minut;
- b) bireto z raztopino S6 napolnimo brez zračnih mehurčkov do vrha;
- c) v 250 mL erlenmajerico odpipetiramo 10 mL raztopine S1, 5 mL raztopine S2 in 2 mL vzorca vina;
- d) raztopino premešamo; paziti moramo, da erlenmajerico postavimo na (ne nad) ogret električni grelec in segrevamo do vrenja točno 1,5 minute (čas je enak kot pri segrevanju slepega vzorca oziroma standardne raztopine!);
- e) takoj po segrevanju erlenmajerico ohladimo pod tekočo vodo in k ohlajeni raztopini s pipeto dodamo po 10 mL raztopin S3, S4 in S5; temeljito premešamo;
- f) erlenmajerico postavimo na osvetljeno magnetno mešalo, dodamo magnet in titriramo z raztopino S6 do prehoda temno modro obarvane raztopine v slamnato rumeno barvo; barva naj bo obstojna vsaj 3-5 sekund;
- g) ker so koncentracije reagentov takšne, da so porabljeni volumni titranta številčno enaki koncentraciji reducirajočih sladkorjev (g/L), le-to odčitamo **direktno z birete**.
- h) samo v primeru, da nimamo originalne birete, uporabimo izračun:

$$RS = 28 - 28 \cdot \left( \frac{V_v}{V_{sv}} \right) \quad (1.4)$$

kjer pomeni **RS** koncentracijo reducirajočih sladkorjev (g/L),  $V_v$  volumen raztopine S6, porabljen pri titraciji vzorca vina (mL) in  $V_{sv}$  volumen raztopine S6, porabljen pri titraciji slepega vzorca (mL).

### 1.5.2 Titracija slepega vzorca

- a) v 250 mL erlenmajerico odpipetiramo 10 mL raztopine S1, 5 mL S2 in 2 mL deionizirane vode, ki ne vsebuje reducirajočih sladkorjev (namesto vzorca vina). Naprej postopamo enako kot z vzorcem vina (glej točko 5.1 d do 5.1 g). Titracija slepega vzorca (in priprava umeritvene krivulje) nadomesti tudi standardizacijo reagentov.

### 1.5.3 Priprava umeritvene krivulje

- a) pripravimo standardne raztopine reducirajočih sladkorjev (glukoze) iz glukoze in deionizirane vode. V 100 mL merilne bučke natehtamo določeno maso glukoze (preglednica 9.1), raztopimo v deionizirani vodi in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;

Preglednica 1.1: Standardne raztopine glukoze

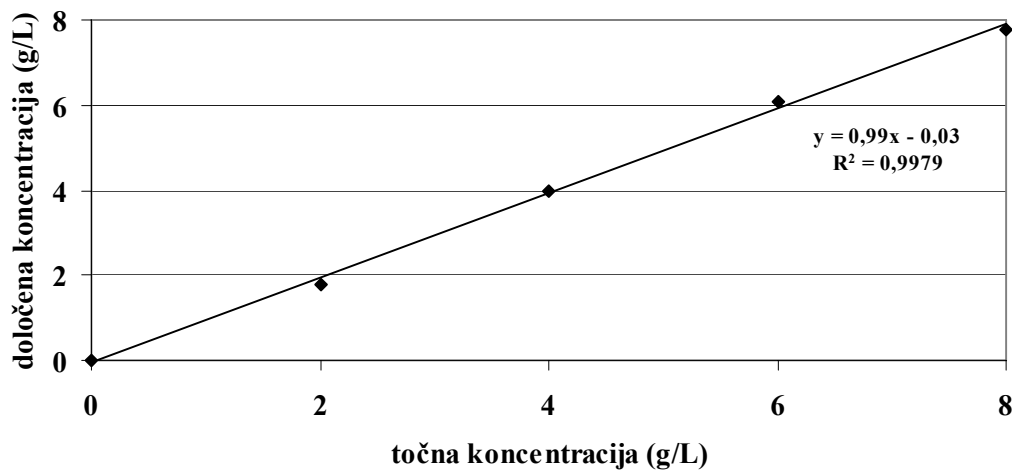
Oznaka bučke	Masa glukoze (g)	Končna koncentracija glukoze (g/L)
1	0	0 (slepi vzorec)
2	0,2	2
3	0,4	4
4	0,6	6
5	0,8	8

- b) raztopine dobro premešamo;
- c) naprej postopamo enako kot z vzorcem vina (glej točko 5.1 c do 5.1 g);
- d) narišemo umeritveno krivuljo: odvisnost določene ali izmerjene koncentracije od točne koncentracije reducirajočih sladkorjev v standardni raztopini in izračunamo enačbo premice;
- e) končni rezultat (g RS/L vina) izračunamo iz enačbe umeritvene krivulje.

## 1.6 Rezultati

### 1.6.1 Pričakovane vrednosti

Umeritvena krivulja za reducirajoče sladkorje



Slika 1.1: Primer umeritvene krivulje za določanje točne koncentracije reducirajočih sladkorjev v vzorcu vina po Rebeleinu

## 1.6.2 Določene vrednosti

Preglednica 1.2: Masne koncentracije reducirajočih sladkorjev (RS, g/L) v vzorcu vina, v slepem vzorcu in v vzorcu za umeritveno krivuljo

Oznaka	Koncentracija (g RS/L)
vzorec vina	
slepi vzorec	
vzorec za umeritveno krivuljo	
končni rezultat	

Enačba premice umeritvene krivulje: \_\_\_\_\_

Točna koncentracija RS (g/L): \_\_\_\_\_

Preglednica 1.3: Podatki za umeritveno krivuljo

Točna koncentracija RS (g/L)	Določena koncentracija RS (g/L)
0	
2	
4	
6	
8	
10	
12	

Priloga 1.1: Umeritvena krivulja za določanje točne koncentracije reducirajočih sladkorjev v vzorcu vina po Rebeleinu

### 1.6.3 Opombe

- Titracija slepega vzorca je potrebna pred vsakim določanjem.
- Točnost in ponovljivost opisane metode sta boljši od  $\pm 1\%$ . Neposredno je metoda uporabna za določanje reducirajočih sladkorjev do vsebnosti 28 g/L. Pri večjih koncentracijah reducirajočih sladkorjev (več kot 28 g/L) vzorec razredčimo in razredčitev upoštevamo pri končnem rezultatu.
- Pred določanjem koncentracije reducirajočih sladkorjev v vzorcih rdečega vina je potrebno najprej razbarvanje vina z aktivnim ogljem ali s PVPP ("Polyclar AT");
- Po dodatku raztopin S3, S4 in S5 takoj titriramo z raztopino S6.
- Reakcijo redukcije bakrovega sulfata v bakrov(I) oksid pospešimo s segrevanjem do temperature 90 °C; pri temperaturah nad 100 °C poteče značilna avtoredukcija bakrovih(II) ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ) v raztopini S1, kar znatno vpliva na pravilnost končnega rezultata.
- Na rezultat vpliva tudi koncentracija bakrovega sulfata; idealno razmerje med bakrovim(II) ionom ( $\text{Cu}^{2+}$ ) in hidroksilnimi skupinami ( $\text{OH}^-$ ) v redukcijski zmesi je 1:5; pri drugačnem razmerju se poveča možnost avtoredukcije bakrovih(II) ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

### 1.7 Priporočena literatura

- Ough C.S., Amerine M.A. 1988. Sugars. Methods for analysis of musts and wines. Second edition. New York, John Wiley&Sons, Inc.: 36-49.
- Schmitt A. 1975. Aktuelle Weinanalytik. Ein Leitfaden für die Praxis. Scheinfeld, Heller Chemie- und Verwaltungsgesellschaft mbH, Druckhaus Goldammer: 53-57.
- Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. 1995. Laboratory procedures. Wine analysis and production. New York, Chapman&Hall: 477-479.

### Izračun in komentar rezultatov

--

## 2 DOLOČANJE ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINU PO REBELEINU

### Titracijska metoda za določanje koncentracije SO<sub>2</sub> (Rebelein, 1973)

#### 2.1 Uvod

Poznane so različne kemijske metode za določanje koncentracije prostega in skupnega žveplovega dioksida v vinu:

- titrimetrično določanje SO<sub>2</sub> direktno v vzorcu vina z raztopino jodovice (po Ripperju);
- destilacija vzorca vina in nato kvantitativno določanje prostega in skupnega SO<sub>2</sub> v destilatu s titracijo z raztopino jodovice ali natrijevega tiosulfata (po Rebeleinu, 1973).

Destilacijska metoda določanja SO<sub>2</sub> je referenčna metoda, saj se izognemo številnim motečim dejavnikom pri direktnem titrimetričnem določanju.

#### 2.2 Opis metode

Z destilacijo predestiliramo skupni žveplov dioksid iz vzorca vina, ki mu pred destilacijo dodamo metanol in raztopino žveplove(VI) kisline, v reakcijsko zmes kalijevega jodata. Po destilaciji dodamo reakcijski zmesi ponovno žveplove(VI) kislino in titriramo z raztopino natrijevega tiosulfata s škrobom kot indikatorjem (kemizem reakcije je enak kot pri metodi po Ripperju; glej vajo 10).

#### 2.3 Potrebna oprema

električni grelec (300 W),  
laboratorijska ura,  
destilacijska cev,  
stojalo,  
bireti (25 mL in 50 mL),  
pipete (polnilne 2 mL in 10 mL),  
destilacijska bučka (100 mL),  
250 mL erlenmajerica,  
puhalka z deionizirano vodo,  
(po potrebi vrelni kamenčki in protipenilec).

#### 2.4 Reagenti (kot so označeni v laboratoriju)

- Ž1 = raztopina kalijevega jodata: 111,49 mg kalijevega jodata (KIO<sub>3</sub>) natehtamo v 1000 mL merilno bučko, dodamo 50 mL 1 M raztopine natrijevega hidroksida in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;
- Ž2 = metanol (p.a.);



- Ž3 = 16 % raztopina žveplove(VI) kisline, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: v 1000 mL merilno bučko nalijemo približno 500 mL deionizirane vode, nato previdno z merilnim valjem dodamo 175 mL 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; premešamo in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake;
- Ž4 = raztopina škrobovice (indikator): 2 g škroba natehtamo v 500 mL vrele deionizirane vode; ločeno raztopimo v 500 mL deionizirane vode 20 g kalijevega jodida in dodamo 10 mL 1 M raztopine natrijevega hidroksida; previdno združimo obe raztopini; hranimo v hladilniku!
- Ž5 = 16 % raztopina žveplove(VI) kisline, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: v 1000 mL merilno bučko nalijemo približno 500 mL deionizirane vode, nato previdno z merilnim valjem dodamo 175 mL 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; premešamo in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake;
- Ž6 = raztopina natrijevega tiosulfata (titrant): v 1000 mL merilno bučko natehtamo 1,5512 g natrijevega tiosulfata pentahidrata (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O), ki ga raztopimo v zmesi 10 mL 1 M raztopine natrijevega hidroksida in 500 mL deionizirane vode; s slednjo tudi dopolnimo do oznake;
- 10 % raztopina propanala, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O (oznaka na reagenčni steklenici: propionaldehid): v 100 mL merilno bučko odpipetiramo 10 mL propanala in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake (raztopina je namenjena le določevanju prostega žveplovega dioksida s korekcijo na askorbinsko kislino).

## 2.5 Postopek

### 2.5.1 Določanje skupnega žveplovega dioksida

- a) električni grelec predhodno ogrevamo vsaj 5 minut; ogrejemo tudi destilacijsko cev z destilacijo 10 mL deionizirane vode (3-4 minute);
- b) obe bireti (z raztopinama Ž1 in Ž6) napolnimo brez zračnih mehurčkov do vrha;
- c) v 250 mL erlenmajerico nalijemo iz birete 50 mL raztopine Ž1 in podstavimo pod konec destilacijske cevi, tako da sega konica cevi do dna erlenmajerice;
- d) v 100 mL destilacijsko bučko odpipetiramo 2 mL raztopine Ž2, 10 mL vzorca vina in 10 mL raztopine Ž3 (previdno ravnanje s kislino!); premešamo in destilacijsko bučko tesno pritrdimo na silikonski zamašek na začetku destilacijske cevi;
- e) paziti moramo, da bučko postavimo na (ne nad) ogret električni grelec in destiliramo točno 3 minute;
- f) po končani destilaciji najprej dvignemo destilacijsko cev in konico speremo z deionizirano vodo; nato snamemo še destilacijsko bučko z zamaška in konico destilacijske cevi ponovno speremo; bučko ohladimo pod tekočo hladno vodo;
- g) v erlenmajerico damo magnet in jo postavimo na osvetljeno magnetno mešalo; s pipeto dodamo po 10 mL raztopin Ž4 in Ž5; premešamo in titriramo z raztopino Ž6 do prehoda črno do temno modro obarvane raztopine v brezbarvno oziroma rahlo modrikasto;
- h) ker so koncentracije reagentov takšne, da pomenijo porabljeni volumni titranta direktno koncentracijo skupnega žveplovega dioksida (mg SO<sub>2</sub>/L vina), le-to odčitamo **direktno z birete**.

### 2.5.2 Določanje prostega žvepovega dioksida (brez destilacije)

- obe bireti (z raztopinama Ž1 in Ž6) napolnimo brez zračnih mehurčkov do vrha;
- v 100 mL erlenmajerico odpipetiramo 10 mL vzorca vina; dodamo 10 mL raztopine Ž3 (previdno ravnanje s kislino!) in 10 mL raztopine Ž4; premešamo;
- v erlenmajerico damo magnet in jo postavimo na osvetljeno magnetno mešalo; titriramo z raztopino Ž1 do prehoda barve raztopine v rahlo modrikasto; barva mora biti obstojna vsaj 20-30 sekund;
- vrednost direktno odčitamo z birete in jo pomnožimo z 10; rezultat ( $c_1$ ) predstavlja masno koncentracijo prostega žvepovega dioksida in reductentov (mg/L, izraženo kot mg SO<sub>2</sub>/L vina); le-ti so predvsem reducirajoči sladkorji in askorbinska kislina (vitamin C).

### 2.5.3 Določanje prostega žvepovega dioksida s korekcijo na askorbinsko kislino (brez destilacije)

- obe bireti (z raztopinama Ž1 in Ž6) napolnimo brez zračnih mehurčkov do vrha;
- v 100 mL erlenmajerico odpipetiramo 10 mL vzorca vina; dodamo 1 mL 10 % raztopine propanala;
- premešamo, erlenmajerico pokrijemo s parafilmom in počakamo točno 5 minut, da poteče reakcija prostega žvepovega dioksida s propanalom;
- po 5 minutah nadaljujemo s postopkom določanja prostega SO<sub>2</sub> (glej 2.5.2);
- vrednost direktno odčitamo z birete in jo pomnožimo z 10; rezultat ( $c_2$ ) predstavlja masno koncentracijo askorbinske kisline, izraženo kot prosti žveplov dioksid (mg/L).

### 2.5.4 Izračun prostega SO<sub>2</sub>

- dejansko koncentracijo prostega SO<sub>2</sub> (mg/L) izračunamo iz razlike izračunanih koncentracij prostega SO<sub>2</sub> v vzorcu vina  $c_1$  (prosti SO<sub>2</sub> brez korekcije na askorbinsko kislino) in  $c_2$  (prosti SO<sub>2</sub> s korekcijo na askorbinsko kislino) – (relacija 2.1).

$$c_{\text{SO}_2}(\text{prosti}) = c_1 - c_2 \quad (2.1)$$

### 2.5.5 Izračun vezanega SO<sub>2</sub>

- koncentracijo vezanega SO<sub>2</sub> (mg/L) izračunamo iz razlike izračunanih koncentracij skupnega in prostega SO<sub>2</sub> v vzorcu vina (relacija 2.2).

$$c_{\text{SO}_2}(\text{vezani}) = c_{\text{SO}_2}(\text{skupni}) - c_{\text{SO}_2}(\text{prosti}) \quad (2.2)$$

### 2.5.6 Titracija slepega vzorca

- v 250 mL erlenmajerico nalijemo iz birete 50 mL raztopine Ž1 in s pipeto dodamo po 10 mL raztopin Ž4 in Ž5; premešamo in titriramo z raztopino Ž6 do razbarvanja. Maksimalno odstopanje pri titraciji slepega vzorca je  $\pm 2$  mg SO<sub>2</sub>/L. Točnost opisane metode pri določanju koncentracije skupnega SO<sub>2</sub> pa je  $\pm 7$  mg SO<sub>2</sub>/L vina.

## 2.6 Rezultati

### 2.6.1 Določene vrednosti

Preglednica 2.1: Masne koncentracije prostega, skupnega in vezanega žveplovega dioksida (mg/L) v vzorcu vina

Oznaka	Koncentracija* (mg SO <sub>2</sub> /L)
c <sub>1</sub> (prosti SO <sub>2</sub> in reducenti) – brez korekcije	
c <sub>2</sub> (prosti SO <sub>2</sub> s korekcijo na askorbinsko kislino)	
prosti SO <sub>2</sub>	
skupni SO <sub>2</sub>	
vezani SO <sub>2</sub>	

\*končni rezultat zaokrožimo na celo število (brez decimalnih mest)

## 2.7 Priporočena literatura

- Schmitt A. 1975. Aktuelle Weinanalytik. Ein Leitfaden für die Praxis. Scheinfeld, Heller Chemie- und Verwaltungsgesellschaft mbH, Druckhaus Goldammer: 75-76.
- Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. 1995. Laboratory procedures. Wine analysis and production. New York, Chapman&Hall: 493-502.

**Izračun in komentar** (z ozirom na preglednico B2)

--

### 3 DOLOČANJE ACETALDEHIDA V VINU PO REBELEINU

#### Spektrofotometrična metoda (Rebelein, 1970)

##### 3.1 Uvod

Acetaldehid je prekursor tako acetata kakor tudi etanola. V organizmu nastaja iz piruvata, ki je (vmesni) produkt glikolize. Koncentracija acetaldehida v vinu je odvisna od temperature fermentacije, aeracije, pH in vsebnosti (pomanjkanja) vitaminov (pantotenata in zlasti tiamina). Velika koncentracija SO<sub>2</sub> v moštu pred alkoholno fermentacijo ali med alkoholno fermentacijo povzroči večjo vsebnost tako vezanega kot tudi skupnega acetaldehida. Prosti acetaldehid pomeni CH<sub>3</sub>CHO, vezani pomeni bisulfitni kompleks acetaldehida, tj. acetaldehid vezan na SO<sub>2</sub> oz. sulfat(IV), CH<sub>3</sub>CH(OH)SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, skupni acetaldehid pa je vsota obeh; masna koncentracija pomeni mg CH<sub>3</sub>CHO/L vina. Uporaba manjših količin SO<sub>2</sub> v moštu povzroči relativno več prostega acetaldehida v pridelanem vinu. Koncentracija prostega acetaldehida v vinih je 21-105 mg/L, v desertnih vinih 62-87 mg/L in v šerijih 126-218 mg/L.

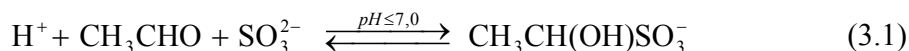
##### 3.2 Opis metode

Vino najprej razbarvamo z aktivnim ogljem. V filtrat dodamo piperidin in natrijev nitroprusid, nastane obarvan reakcijski produkt; koncentracija le-tega je proporcionalna količini CH<sub>3</sub>CH(OH)SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (acetaldehid, vezan na SO<sub>2</sub>). Absorbanco obarvanega reakcijskega produkta izmerimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 570 nm in določimo masno koncentracijo acetaldehida (mg/L) iz umeritvene krivulje.

##### 3.2.1 Ponazoritev kemizma

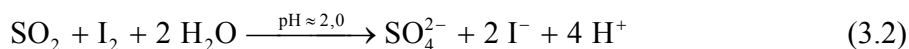
##### 3.2.1.1 Priprava bisulfitnega kompleksa in jodometrična titracija standardne raztopine acetaldehida

a) priprava bisulfitnega kompleksa (glej postopek 3.5.1 a):

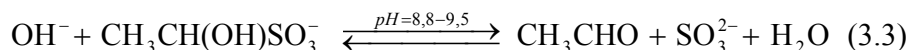


Ravnotežje reakcije je odvisno od pH; pri pH < 7,0 je praktično ves acetaldehid vezan v bisulfitni kompleks.

b) pri jodometrični določitvi koncentracije acetaldehida (glej postopek 3.5.1 b za pripravo umeritvene krivulje) najprej titrimetrično oksidiramo prebitni SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (SO<sub>2</sub>) pri pH ≈ 2,0:



nato raztopino naalkalimo, bisulfitni kompleks acetaldehida razpade:

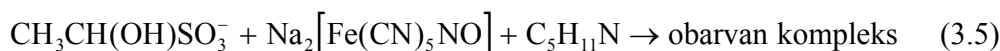


in sproščeni sulfat(IV) titriramo z jodovico:



### 3.2.1.2 Spektrofotometrična analiza standardne raztopine acetaldehida

a) bisulfitni kompleks acetaldehida tvori z natrijevim nitroprusidom in s piperidinom rumeno obarvan kompleks:



### 3.2.1.3 Spektrofotometrična analiza vina

- a) vezani acetaldehid v vinu reagira po reakciji v točki 3.2.1.2 a);  
b) prosti acetaldehid v vinu vezemo s prebitkom  $\text{SO}_2$  ali  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (glej točko 3.2.1.1 a); nastane bisulfitni kompleks acetaldehida, ki reagira kot v točki 3.2.1.2 a).

## 3.3 Potrebna oprema

UV-VIS spektrofotometer,  
kivete (10 mm),  
erlenmajerice (100 mL),  
eprovete (20 mL),  
merilne bučke (100 mL, 250 mL in 1000 mL),  
polnilne pipete (2 mL, 5 mL in 25 mL),  
puhalka z deionizirano vodo.

## 3.4 Reagenti

- osnovna raztopina acetaldehida ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ): v 1000 mL merilno bučko nalijemo 500 mL ohlajene deionizirane vode, natehtamo približno 1 g acetaldehida, dodamo 30 mL 5 % raztopine  $\text{H}_2\text{SO}_3$  in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake;
- aktivno (živalsko) oglje;
- raztopina natrijevega borata: v 1000 mL merilno bučko natehtamo 8,75 g borne kisline, ki jo raztopimo v 400 mL 1 M raztopine natrijevega hidroksida; dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;

- klorovodikova kislina (HCl): v 100 mL merilno bučko odpipetiramo 25 mL koncentrirane HCl in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;
- 0,05 M raztopina jodovice;
- 1 % raztopina škrobovice (indikator): 10 g škroba popolnoma raztopimo (s segrevanjem do vrenja) v 500 mL deionizirane vode, s katero tudi dopolnimo do oznake 1000 mL. Po ohladitvi hranimo indikator v hladilniku, kjer je obstojen do pojava motnosti;
- 0,4 % raztopina natrijevega nitroprusida (dinatrijev pentacianonitrozilferat(II),  $(\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ ): v 250 mL merilno bučko natehtamo 1,1376 g natrijevega nitroprusida dihidrata in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;
- 10 % raztopina piperidina ( $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}$ ): v 250 mL merilno bučko odpipetiramo 25 mL piperidina in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;
- deionizirana voda.

### 3.5 Postopek

#### 3.5.1 Priprava umeritvene krivulje

- a) z jodometrično titracijo določimo točno koncentracijo acetaldehida v pripravljene osnovni raztopini: v 500 mL erlenmajerico odpipetiramo 50 mL osnovne raztopine acetaldehida, dodamo 10 mL razredčene raztopine klorovodikove kisline, 100 mL deionizirane vode in 10 mL 0,2 % raztopine škrobovice. Tako pripravljeno raztopino titriramo z 0,05 M raztopino jodovice, da iz raztopine odstranimo presežek bisulfita. Nato dodamo v raztopino 100 mL alkalne raztopine natrijevega borata in ponovno titriramo, tokrat sproščeni  $\text{SO}_2$  z 0,05 M raztopino jodovice do modre barve. Koncentracijo acetaldehida (mg/L) izračunamo z naslednjo formulo:

$$c_{\text{CH}_3\text{CHO}} = \frac{c_2 \cdot v_2 \cdot M \cdot 1000}{v} \quad (3.6)$$

kjer pomeni  $v$  volumen standardne raztopine acetaldehida (50 mL),  $c_2$  koncentracijo jodovice (0,05 mol/L),  $v_2$  volumen 0,05 M raztopine jodovice, porabljen pri drugi titraciji (mL) in  $M$  molsko maso acetaldehida (44,05 g/mol);

- b) pripravimo standardne raztopine za umeritveno krivuljo z ustreznim razredčevanjem osnovne raztopine acetaldehida z deionizirano vodo. V 100 mL merilne bučke odpipetiramo določen volumen (preglednica 3.1) in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;

Preglednica 3.1: Standardne raztopine acetaldehida

Oznaka bučke	Volumen acetaldehida (mL)	Končna koncentracija v standardni raztopini (mg acetaldehida/L)
1	2	20
2	5	50
3	10	100
4	15	150
5	20	200

- c) premešamo in iz vsake merilne bučke odpipetiramo po 2 mL v epruveto, dodamo 5 mL raztopine natrijevega nitroprusida in tik pred merjenjem absorbance še 5 mL raztopine piperidina (z avtomatsko pipeto). Vsebino epruvete dobro premešamo, prenesemo v 10 mm kiveto in takoj vstavimo v spektrofotometer; odčitamo absorbanco pri valovni dolžini 570 nm, ko je ta največja (po približno 50 sekundah od dodatka raztopine piperidina se začne absorbanca manjšati);
- d) narišemo umeritveno krivuljo: odvisnost absorbance od masne koncentracije acetaldehida (mg/L) in izračunamo enačbo premice. Beer-Lambertov zakon za to metodo velja za koncentracijsko območje 20-200 mg/L.

### **3.5.2 Določanje acetaldehida v vzorcu vina**

#### **3.5.2.1 Določanje vezanega acetaldehida**

- a) v 100 mL erlenmajerico odpipetiramo 25 mL vina, dodamo 2 g aktivnega oglja in dobro premešamo;
- b) po 2 minutah sledi filtracija skozi filtrni papir z modrim trakom; filtracijo ponovimo, če ne dobimo bistrega filtrata;
- c) odpipetiramo 2 mL bistrega filtrata v epruveto in naprej postopamo tako kot pri umeritveni krivulji (od 3.5.1 c naprej);
- d) tako kot pri umeritveni krivulji je tudi pri preiskovanih vzorcih vina potrebno odčitati absorbanco, ko je ta največja (približno 50 sekund po dodatku zadnjega reagenta, tj. raztopine piperidina);
- e) masno koncentracijo vezanega acetaldehida v vzorcu (mg acetaldehida/L) izračunamo iz enačbe umeritvene krivulje.

#### **3.5.2.2 Določanje skupnega acetaldehida v vinu**

- a) ker reakcija poteče le z vezanim acetaldehidom ( $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{SO}_3^-$ ), moramo prosti acetaldehid naprej vezati z dodatkom presežka žveplovega dioksida oziroma  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (glej točko 3.2.1.1 a), ki ga dodamo v vzorec vina (25 mL) približno noževno konico, dobro premešamo in po 1 uri določamo naprej, kot je opisano v točkah 3.5.2.1 a-d;
- b) masno koncentracijo skupnega acetaldehida v vzorcu (mg acetaldehida/L) izračunamo iz enačbe umeritvene krivulje.

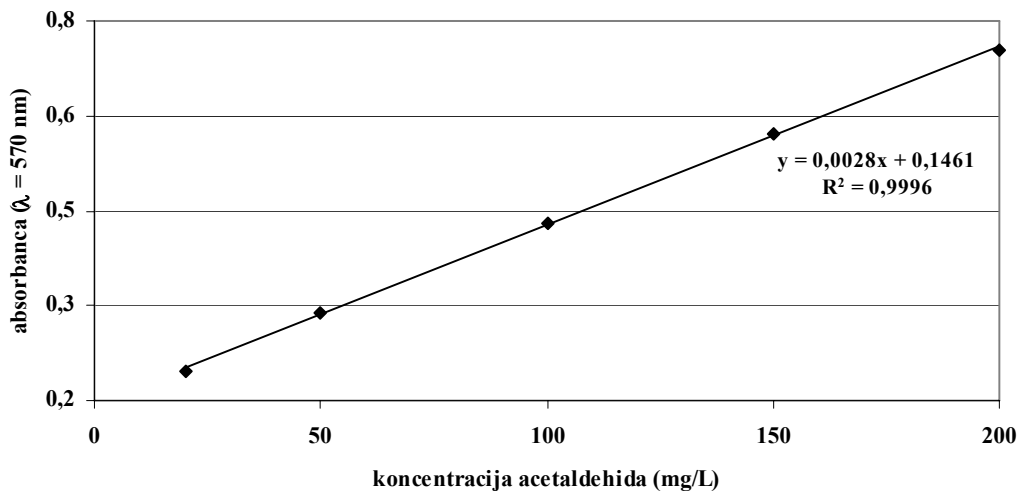
#### **3.5.2.3 Izračun prostega acetaldehida**

- a) masno koncentracijo prostega acetaldehida izračunamo iz razlike masnih koncentracij skupnega acetaldehida in vezanega acetaldehida; ne odštevamo absorbanc!

### 3.6 Rezultati

#### 3.6.1 Pričakovane vrednosti

Umeritvena krivulja za določanje acetaldehida



Slika 3.1: Primer umeritvene krivulje za določanje acetaldehida

#### 3.6.2 Določene vrednosti

Preglednica 3.2: Absorbance (A) in masne koncentracije acetaldehida (mg/L) v vzorcu vina in v vzorcu za umeritveno krivuljo

Oznaka	A	Koncentracija (mg acetaldehida/L)
vzorec vina - vezani acetaldehid		
vzorec vina - skupni acetaldehid		
vzorec vina - prosti acetaldehid	/	
vzorec za umeritveno krivuljo		

Enačba premice umeritvene krivulje: \_\_\_\_\_

Točna\* koncentracija acetaldehida (mg/L) v standardni raztopini: \_\_\_\_\_

(\*izračun po formuli 3.6)



Preglednica 3.3: Podatki za umeritveno krivuljo

<b>Teoretična koncentracija (mg acetaldehida/L)</b>	<b>Točna koncentracija (mg acetaldehida/L)</b>	<b>A</b>
20		
50		
100		
150		
200		

Priloga 3.1: Umeritvena krivulja za določanje acetaldehida

### 3.6.3 Opombe

Acetaldehid predstavlja glavni aldehid v vinu. Tvori se kot vmesni produkt med alkoholno fermentacijo ali kot produkt oksidacije etanola med zorenjem in skladiščenjem vina. V mladem vinu neposredno po končani fermentaciji je običajno koncentracija acetaldehida manj kot 75 mg/L. Senzorični prag zaznave je v območju med 100 in 125 mg/L. Pri večjih koncentracijah so zaznavne senzorične spremembe vonja vina, ki ga lahko opišemo z naslednjimi deskriptorji: vonj po prezrelosti sadja, po poškodovanih in/ali zmetih jabolkih, po šeriju, po orehah, idr.

Velika koncentracija acetaldehida v vinu pomeni veliko koncentracijo skupnega in majhno koncentracijo prostega SO<sub>2</sub>. Glavni del nastalega acetaldehida v vinu je posledica mikrobiološke oksidacije etanola v aerobnih razmerah. Kot intermediat bakterijske tvorbe očetne kisline se lahko acetaldehid akumulira v vinu tudi ob majhni koncentraciji kisika in/ali veliki koncentraciji alkohola (več kot 10 vol.%). To si razlagajo s tem, da je encim aldehid-dehidrogenaza v opisanih razmerah manj stabilen od encima alkohol-dehidrogenaza.

Bisulfit ( $\text{HSO}_3^-$ ) daje z acetaldehidom in nekaterimi drugimi spojinami (preglednica 3.4) hidroksi sulfonate. Vsi ti produkti so bistveno manj hlapni kot izhodne snovi in zato senzorično bolj nevtralni. Reakcija acetaldehida z  $\text{SO}_2$  je zelo hitra. Majhna konstanta disociacije ( $K_D$ ) kaže, da je ravnotežje na strani produkta (bisulfitnega kompleksa). V primerjavi z ostalimi spojinami je nastali bisulfitni kompleks acetaldehida najbolj stabilen. Bistveno počasneje poteče reakcija bisulfitna s sladkorji, nastali produkt pa je tudi manj stabilen. V raztopini acetaldehida, glukoze in bisulfitna se 90-95 % acetaldehida veže z bisulfitom že po dveh minutah. Še več: če v raztopino bisulfitnega kompleksa glukoze dodamo acetaldehid, le-ta zamenja glukozo v kompleksu.

Preglednica 3.4: Konstante disociacije ( $K_D$ ) kompleksa bisulfitna z različnimi spojinami

Spojina	$K_D^*$
acetaldehid	$5,0 \cdot 10^{-6}$
$\alpha$ -ketoglutarna kislina	$8,8 \cdot 10^{-4}$
piruvična kislina	$4,0 \cdot 10^{-4}$
glukoza	$6,4 \cdot 10^{-1}$

\* $K_D$  pomeni konstanto disociacije kompleksa; torej so snovi z manjšo  $K_D$  bolj stabilne

### 3.7 Priporočena literatura

Ough C.S., Amerine M.A. 1988. Carbonyl compounds. Methods for analysis of musts and wines. Second edition. New York, John Wiley&Sons, Inc.: 141-148.

Rebelein H. 1970. Beitrag zur Bestimmung und Beurteilung des Azetaldehyds bzw. der an Azetaldehyd gebundenen schwefligen Säuren im Wein. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 66(1): 6-11.

Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. 1995. Laboratory procedures. Wine analysis and production. New York, Chapman&Hall: 328-331.

### Izračun in komentar

## 4 DOLOČANJE PROLINA V VINU PO OUGHU IN AMERINU

### Spektrofotometrična metoda (Ough in Amerine, 1988)

#### 4.1 Uvod

Prolin je aminokislina; njena povprečna koncentracija v grozdnem soku je 742 mg/L, v vinu pa 869 mg/L. Pri nižjih letnih temperaturah so vsebnosti prolina večje od navedenih in obratno. Koncentracija prolina je tudi sortno pogojena; npr. sorti chardonnay in cabernet sauvignon imata bistveno več prolina v primerjavi s sorto laški rizling. Med dejavniki, ki vplivajo na koncentracijo prolina v grozdnih jagodi, je med najpomembnejšimi zrelost grozdja ( $^{\circ}\text{Oe}$ ,  $^{\circ}\text{Brix}$ ), glede na katero se koncentracija prolina linearno povečuje. Ker se z dozorevanjem grozdja zmanjšuje razmerje med prevladujočima aminokislinama (prolinom in argininom), lahko ta podatek uporabimo za določitev optimalnega časa trgatve. Poleg ostalih dejavnikov, ki vplivajo na aminokislinsko sestavo grozdja, je razmerje med obema aminokislinama sortno pogojeno in tudi letno močno variira.

V primeru presežka razpoložljivega dušika se prolin akumulira že v grozdnih jagodi, značilno pa je tudi, da pri nemoteni rasti kvasnih celic in alkoholni fermentaciji kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* prolina praktično ne vključijo v metabolizem med alkoholno fermentacijo (izjemoma ga metabolizirajo v stresnih razmerah). Običajno je koncentracija prolina v rdečih vinih posledica popolnejše ekstrakcije prolina (in skupnega dušika) iz jagodnih kožic, mesa in pečk med maceracijo.

#### 4.2 Opis metode

Razredčenemu vzorcu mošta ali vina dodamo mravljinčno kislino in ninhidrin, segrevamo, po ohlادitvi dodamo 1-butanol, dobro premešamo in izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 517 nm. Koncentracijo prolina v vzorcu izračunamo s pomočjo umeritvene krivulje in rezultat izrazimo v mg prolina/L vzorca.

#### 4.3 Potrebna oprema

UV-VIS spektrofotometer,  
kivete (10 mm),  
epruvete (20 mL),  
merilne bučke (100 mL),  
polnilne pipete (1 mL, 2 mL, 5 mL in 10 mL),  
puhalka z deionizirano vodo.

#### 4.4 Reagenti

- osnovna raztopina prolina: uporabimo L(-)-prolin (molska masa 115,1 g/mol). V 100 mL merilno bučko natehtamo 0,0575 g prolina in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo. Koncentracija

tako pripravljene raztopine prolina je 5  $\mu\text{mol/mL}$ . Hranimo jo v hladilniku, kjer je obstojna 1 teden;

- 3 % raztopina ninhidrina: 3,0 g ninhidrina raztopimo v 100 mL etilenglikol monometil etra; raztopino hranimo v hladilniku;
- 98-100 % mravljinčna kislina;
- 1-butanol (lahko uporabimo tudi mešanico 2-propanol:voda v razmerju 1:1).

## 4.5 Postopek

### 4.5.1 Priprava umeritvene krivulje

- a) pripravimo standardne raztopine z ustreznim razredčevanjem osnovne raztopine prolina z deionizirano vodo. V posamezne 100 mL merilne bučke odpipetiramo določen volumen osnovne raztopine (preglednica 3.1) in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;

Preglednica 4.1: Standardne raztopine prolina

Oznaka bučke	Volumen osnovne raztopine prolina (mL)	Končna koncentracija v standardni raztopini ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0	0	0 (slepi vzorec)
1	1	0,05
2	2	0,10
3	3	0,15
4	5	0,25
5	7	0,35
6	10	0,50

- b) premešamo in iz vsake merilne bučke odpipetiramo po 0,5 mL standardne raztopine v epruveto. Dodamo 0,25 mL mravljinčne kisline in 1 mL raztopine ninhidrina. Premešamo in epruveto zapremo z gumijastim zamaškom. Segrevamo v vodni kopeli (temperatura 100 °C) točno 15 minut. Nato vzorec ohladimo na 20 °C in dodamo 5 mL 1-butanola; še enkrat dobro premešamo. Vzorec prelijemo v kiveto (10 mm) in na spektrofotometru izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 517 nm. Intenziteta barve kompleksa se zmanjšuje za približno 2 % na uro;
- c) absorbanco merimo glede na slepi vzorec, ki ga pripravimo po opisanem postopku (4.5.1 b), le da namesto 0,5 mL standardne raztopine prolina odpipetiramo v epruveto 0,5 mL deionizirane vode;
- d) narišemo umeritveno krivuljo: odvisnost absorbance od koncentracije prolina ( $\mu\text{mol/mL}$ ) in izračunamo enačbo premice. Beer-Lambertov zakon za to metodo velja za koncentracijsko območje od 0,00-0,50  $\mu\text{mol}$  prolina/mL.

### 4.5.2 Analiza vzorca mošta ali vina glede na umeritveno krivuljo

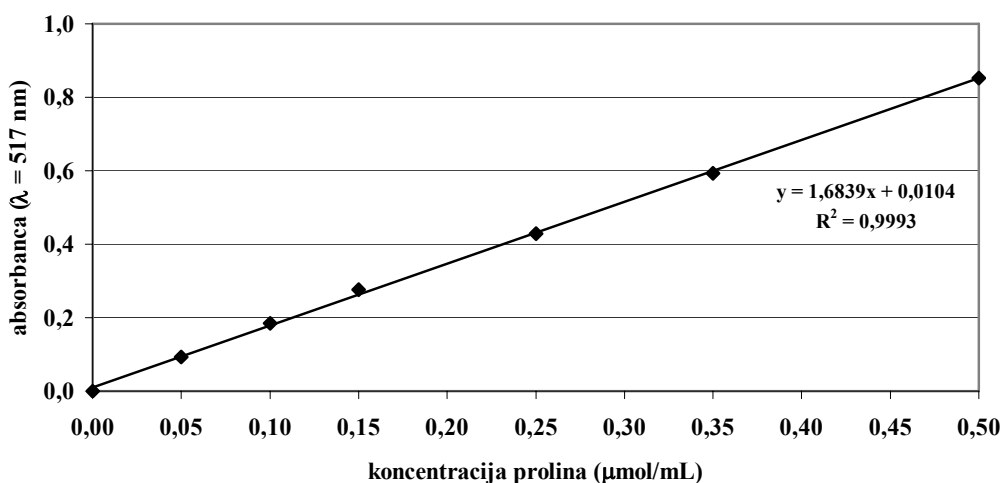
- a) vzorec mošta ali vina razredčimo z deionizirano vodo v razmerju 1:50;
- b) v epruveto odpipetiramo 0,5 mL razredčenega vzorca, dodamo 0,25 mL mravljinčne kisline in 1 mL raztopine ninhidrina. Premešamo in epruveto zapremo z gumijastim zamaškom. Segrevamo v vodni kopeli (temperatura 100 °C) točno 15 minut. Nato ohladimo na 20 °C in dodamo 5 mL

- 1-butanola; še enkrat dobro premešamo. Vzorec prelijemo v kiveto (10 mm) in na spektrofotometru izmerimo absorbanco glede na slepi vzorec pri valovni dolžini 517 nm. Intenziteta barve kompleksa se zmanjšuje za približno 2 % na uro;
- c) koncentracijo prolina v vzorcu izračunamo iz enačbe umeritvene krivulje in vrednost pomnožimo z razredčitvijo (za rezultat v  $\mu\text{mol/mL}$ ) in še z molsko maso prolina (115,1 g/mol), da dobimo končni rezultat v masni koncentraciji prolina, izraženi v mg/L.

## 4.6 Rezultati

### 4.6.1 Pričakovane vrednosti

Umeritvena krivulja za določanje prolina



Slika 4.1: Primer umeritvene krivulje za določanje prolina

### 4.6.2 Določene vrednosti

Preglednica 4.2: Razredčitvi, absorbanci in masni koncentraciji prolina (mg/L) v vzorcu vina in v vzorcu za umeritveno krivuljo

Oznaka	R*	A	Koncentracija (mg prolina/L)
vzorec vina			
vzorec za umeritveno krivuljo	/		

\* uporabljena razredčitev vzorca

Enačba premice umeritvene krivulje: \_\_\_\_\_

Preglednica 4.3: Podatki za umeritveno krivuljo

<b>Koncentracija v standardni raztopini (<math>\mu\text{mol/mL}</math>)</b>	<b>A (povprečje določitev)</b>
0,00 (slepi vzorec)	0
0,05	
0,10	
0,15	
0,25	
0,35	
0,50	

Priloga 4.1: Umeritvena krivulja za določanje prolina

#### 4.7 Priporočena literatura

- Fatur A. 1998. Spektrofotometrično določanje arginina in prolina v moštu in vinu. Diplomski naloga, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 62 s.
- Ough C.S., Amerine M.A. 1988. Nitrogen compounds. Methods for analysis of musts and wines. Second edition. New York, John Wiley&Sons, Inc.: 172-195.
- Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. 1995. Laboratory procedures. Wine analysis and production. New York, Chapman&Hall: 467-468.

#### Izračun

--

## 5 DOLOČANJE PROSTEGA AMINOKISLINSKEGA DUŠIKA V VINU PO NICOLINIJU IN SODELAVCIH

### Spektrofotometrična metoda ali metoda IASMA (Nicolini in sod., 1997)

#### 5.1 Uvod

Aminokislinska sestava mošta je skupaj s koncentracijo sladkorjev in skupnih kislin glavni kakovostni parameter kemijske sestave mošta. Znano je, da je vsebnost aminokislin v pozitivni korelaciji s stopnjo zrelosti grozdja. Aminokislina so med alkoholno fermentacijo pomemben vir dušika za kvasovke, ki jih izkoriščajo za izgradnjo lastnih strukturnih in funkcijskih beljakovin. Tako posledično vplivajo na rast kvasne biomase, normalen potek fermentacije in sodelujejo pri tvorbi aromatičnih snovi vina.

Med fermentacijo se koncentracije posameznih aminokislin različno hitro zmanjšujejo, odvisno tudi od metabolične aktivnosti posameznih sevov kvasovk. S skupnim imenom prosti aminokislinski dušik ali FAN (Free Amino Nitrogen) označujemo dušikove spojine, ki na opisan način sodelujejo v metabolizmu kvasovk (amoniak in aminokislina). V moštu in vinu je predvsem šest najpomembnejših *alfa*-aminokislin: arginin, alanin, treonin, serin in glutaminska ter asparaginska kislina. Iz podatkov o začetni koncentraciji *alfa*-aminokislin lahko sklepamo na možne probleme med fermentacijo in napovemo potrebo po dodajanju dušikovitih snovi v mošt (dodajanje amonijevih soli, npr. diamonijevega fosfata(V) ali s kratico DAP). Pomanjkanje prostih aminokislin je pogost vzrok za počasne ali nepopolne alkoholne fermentacije. Okužba grozdja s plesnijo vrste *Botrytis cinerea* npr. zmanjša vsebnost aminokislin za 7-61 %. Fermentacija je najintenzivnejša pri skupni koncentraciji FAN 800-900 mg aminokislinskega dušika/L (800-900 mg N/L); delež metabolnega dušika v tej vrednosti je 400-500 mg N/L.

#### 5.2 Opis metode

Razredčenemu vzorcu mošta ali vina dodamo razvijalec barve (ninhidrin, fruktoza in acetatni pufer), segrevamo, po ohladitvi dodamo raztopino za razredčevanje, dobro premešamo, posnamemo absorpcijski spekter v območju valovne dolžine od 450 nm do 700 nm (primer na sliki 5.1). Koncentracijo FAN v vzorcu lahko odčitamo iz umeritvene krivulje, ki jo po enakem postopku, kot analiziramo vzorec, pripravimo z raztopinami L(-)-treonina znane koncentracije (primer na sliki 5.2) ali pa koncentracijo izračunamo primerjalno iz maksimalne absorbance analiziranega vzorca in maksimalne absorbance standardnega vzorca (z znano koncentracijo), ki ju analiziramo na enak način. Absorbanco merimo pri valovni dolžini, kjer ima absorpcijski spekter maksimum. Rezultat izrazimo v mg N/L.

### 5.3 Potrebna oprema

UV-VIS spektrofotometer,  
kivete (10 mm),  
erlenmajerica (500 mL),  
epruvete (20 mL),  
merilne bučke (100 mL, 1000 mL)  
polnilne pipete (1 mL, 2 mL, 5 mL in 25 mL),  
puhalka z deionizirano vodo.

### 5.4 Reagenti

- osnovna raztopina L(-)-treonina (molska masa 119,1 g/mol): v 100 mL merilno bučko natehtamo 170,1 mg treonina in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo. Koncentracija tako pripravljene raztopine treonina pomeni 200 mg N/L. Hranimo jo v hladilniku, kjer je obstojna 1 teden;
- acetatni pufer: v 500 mL erlenmajerico natehtamo 272,0 g natrijevega acetata trihidrata ali 164,0 g brezvodnega natrijevega acetata; dodamo približno 300 mL deionizirane vode, 20-30 mL 100 % očetne kisline (ledocet) in raztopimo v ultrazvočni kopeli. Z ledocetno kislino uravnamo pH pufrne mešanice na vrednost točno 5,53! Dopolnimo z deionizirano vodo do 500 mL in prefiltriramo z vakuumsko črpalko čez filtrirni papir;
- barvni reagent: v 100 mL merilno bučko natehtamo 1,0 g ninhidrina in ga raztopimo v acetatnem pufru; dodamo raztopino 0,3 g fruktoze v acetatnem pufru in raztopino dopolnimo do oznake z acetatnim pufrom. Hranimo v hladilniku;
- raztopina za razredčevanje: v 1000 mL bučko natehtamo 2,0 g KIO<sub>3</sub>, raztopimo v 600 mL deionizirane vode, dodamo 400 mL 96 % etanola in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake.

### 5.5 Postopek

#### 5.5.1 Priprava umeritvene krivulje

- a) pripravimo standardne raztopine za umeritveno krivuljo z ustreznim razredčevanjem osnovne raztopine treonina z deionizirano vodo. V 100 mL merilne bučke odpipetiramo določen volumen osnovne raztopine (preglednica 5.1) in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;

Preglednica 5.1: Standardne raztopine treonina

Oznaka bučke	Volumen osnovne raztopine treonina (mL)	Končna koncentracija v standardni raztopini (mg N/L)
0	0	0,0 (slepi vzorec)
1	0,2	0,4
2	0,4	0,8
3	0,5	1,0
4	0,8	1,6
5	1,0	2,0



- b) premešamo in iz vsake merilne bučke odpipetiramo po 4,0 mL standardne raztopine v epruveto. Dodamo 2,0 mL razvijalca barve, premešamo in epruveto zapremo z gumijastim zamaškom. Segrevamo v vodni kopeli (temperatura 100 °C) točno 20 minut. Ohladimo na 20 °C, dodamo 10 mL raztopine za razredčevanje in še enkrat premešamo. Po 10 minutah prelijemo vzorec v kiveto (10 mm) in na spektrofotometru izmerimo absorpcijski spekter v območju valovne dolžine med 450 nm in 700 nm;
- c) absorbanco merimo glede na slepi vzorec, ki ga pripravimo enako kot standardne raztopine, le da namesto raztopine treonina odpipetiramo v epruveto 4,0 mL deionizirane vode;
- d) iz slike absorpcijskega spektra izračunamo absorbanco po naslednji formuli:

$$A = \frac{x}{y} \cdot z \quad (5.1)$$

Na spektru (slika 5.1) pomeni **A** absorbanco, **x** delovno območje (odvisno od intenzitete vijolične barve; na sliki 5.1 je  $x = 0,2$ ), **y** višino grafa (cm) in **z** navpično razdaljo (cm) med absorpcijskim maksimumom in narisano bazno linijo, ki povezuje dolini levo in desno od merjenega maksimuma;

- e) narišemo umeritveno krivuljo (slika 5.2): odvisnost absorbance od koncentracije prostega aminokislinskega dušika (mg N/L) in izračunamo enačbo premice. Beer-Lambertov zakon za to metodo velja za koncentracijsko območje 0,0-2,0 mg N/L.

### 5.5.2 Določitev prostega aminokislinskega dušika v vzorcu mošta ali vina glede na umeritveno krivuljo

- a) vzorec mošta ali vina ustrezno razredčimo z deionizirano vodo (končna koncentracija aminokislinskega dušika od 0,5 mg N/L do 1,5 mg N/L) in po razredčitvi filtriramo (velikost por 0,2 µm);
- b) v epruveto odpipetiramo 4,0 mL razredčenega vzorca in 2,0 mL razvijalca barve; dobro premešamo, epruveto zapremo z gumijastim zamaškom in segrevamo v vodni kopeli (temperatura 100 °C) točno 20 minut;
- c) ohladimo na sobno temperaturo (20 °C), dodamo 10 mL raztopine za razredčevanje in premešamo. Po 10 minutah prelijemo vzorec v kiveto (10 mm) in na spektrofotometru posnamemo absorpcijski spekter v območju valovne dolžine med 450 nm in 700 nm. Absorbanco je potrebno izmeriti najkasneje v 30 minutah po dodatku raztopine za razredčevanje, sicer se zmanjša intenziteta barve. Pri valovni dolžini 700 nm mora biti na absorpcijskem spektru vrednost absorbance manjša kot 0,03! Večja vrednost pomeni premalo razredčen vzorec, zato je potrebno vzorec še enkrat ustrezno razredčiti in analizo ponoviti;
- d) absorbanco merimo glede na slepi vzorec, ki ga pripravimo po opisanem postopku (5.5.2 a-c), le da namesto vzorca mošta ali vina odpipetiramo v epruveto 4,0 mL deionizirane vode;
- e) absorbanco vzorca in standardnih raztopin izračunamo po formuli (5.1) iz slike posnetega spektra;
- f) končno koncentracijo prostega aminokislinskega dušika v vzorcu (mg N/L) izračunamo iz enačbe umeritvene krivulje (ob upoštevanju razredčitve).

### 5.5.3 Določitev prostega aminokislinskega dušika v vzorcu mošta ali vina glede na standardno raztopino

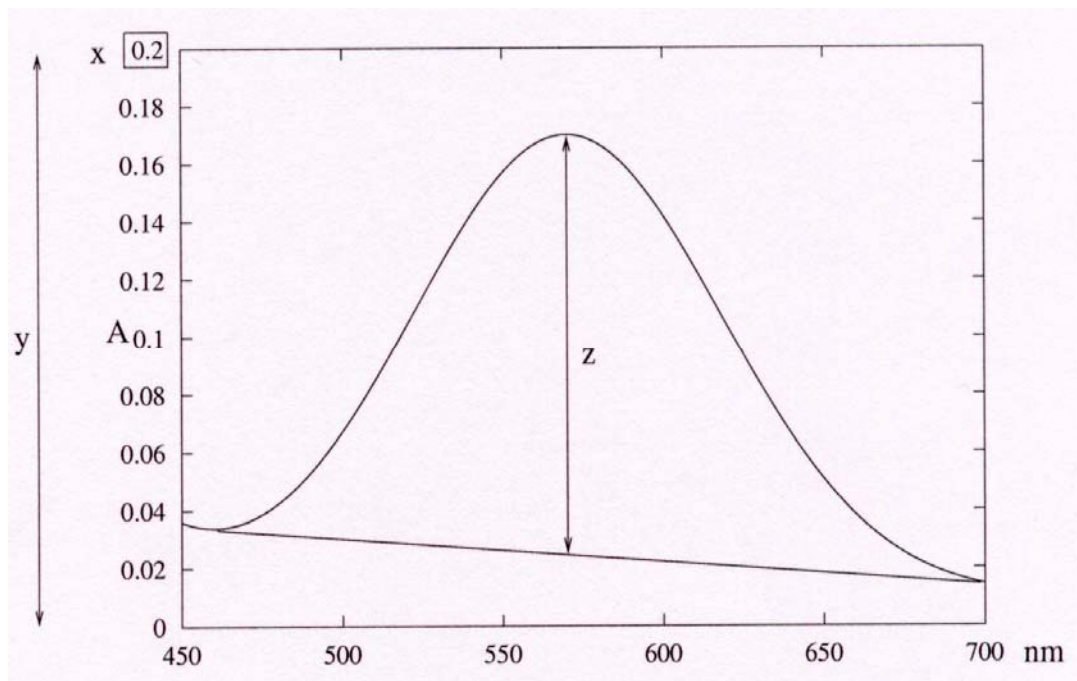
- a) vzorec mošta ali vina ustrezno razredčimo z deionizirano vodo (končna koncentracija aminokislinskega dušika od 0,5 mg N/L do 1,5 mg N/L) in po razredčitvi filtriramo (velikost por 0,2  $\mu\text{m}$ );
- b) v epruveto odpipetiramo 4,0 mL razredčenega vzorca in 2,0 mL razvijalca barve; dobro premešamo, epruveto zapremo z gumijastim zamaškom in segrevamo v vodni kopeli (temperatura 100 °C) točno 20 minut;
- c) ohladimo na sobno temperaturo (20 °C), dodamo 10 mL raztopine za razredčevanje in premešamo. Po 10 minutah prelijemo vzorec v kiveto (10 mm) in na spektrofotometru posnamemo absorpcijski spekter v območju valovne dolžine med 450 nm in 700 nm. Absorbanco je potrebno izmeriti najkasneje v 30 minutah po dodatku raztopine za razredčevanje, sicer se zmanjša intenziteta barve. Pri valovni dolžini 700 nm mora biti na absorpcijskem spektru vrednost absorbance manjša kot 0,03! Večja vrednost pomeni premalo razredčen vzorec, zato je potrebno vzorec še enkrat ustrezno razredčiti in analizo ponoviti;
- d) absorbanco merimo glede na slepi vzorec, ki ga pripravimo po opisanem postopku (5.5.3 a-c), le da namesto vzorca mošta ali vina odpipetiramo v epruveto 4,0 mL deionizirane vode;
- e) pripravimo standardno raztopino treonina s koncentracijo 1,0 mg N/L (glej preglednico 1), glede na katero potem izračunamo iskano koncentracijo v vzorcih. Najprej posnamemo absorpcijski spekter standardnih raztopin in takoj preverimo, ali je absorbanca ustrezna. Maksimalna absorbanca raztopine s koncentracijo standarda točno 1,0 mg N/L mora biti v območju med 0,180 in 0,190! Če ni, preverimo pH acetatnega puфра in po potrebi analizo ponovimo s sveže pripravljenim barvnim reagentom;
- f) absorbanco vzorca in standarda izračunamo po formuli (5.1) iz slike posnetega spektra.
- g) končno koncentracijo prostega aminokislinskega dušika v vzorcu (mg N/L) izračunamo po naslednji formuli:

$$c_{\text{vzorec}} = \frac{A_{\text{vzorec}}}{A_{\text{standard}}} \cdot c_{\text{standard}} \cdot R \quad (5.2)$$

kjer pomeni  $c$  koncentracijo vzorca oziroma standarda (mg N/L),  $A$  absorbanco vzorca oziroma standarda in  $R$  razredčitev vzorca.

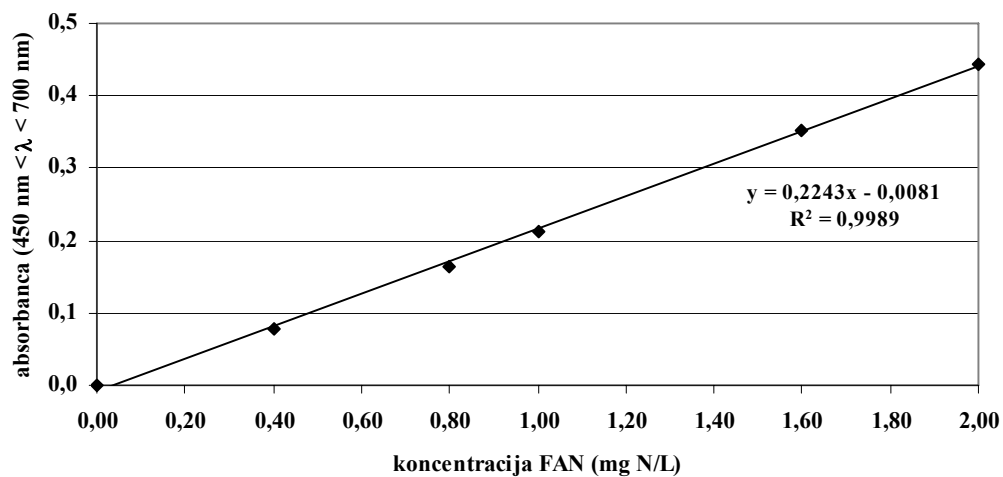
## 5.6 Rezultati

### 5.6.1 Pričakovane vrednosti



Slika 5.1: Primer absorpcijskega spektra vzorca vina po reakciji za določanje FAN

#### Umeritvena krivulja za določanje FAN



Slika 5.2: Primer umeritvene krivulje za določanje FAN

### 5.6.2 Določene vrednosti

Preglednica 5.2: Razredčitve, maksimalne absorbance in masne koncentracije FAN (mg N/L) v vzorcu vina in v vzorcu za umeritveno krivuljo

Oznaka	R*	Maksimalna A	Koncentracija FAN (mg N/L)	
			glede na umer. krivuljo	glede na stand. raztopino**
vzorec vina				
vzorec za umer. krivuljo	/			

\*uporabljen razredčitev vzorca

\*\*tudi če nismo določali po postopku, opisanem pod točko 5.5.3, glede na naše rezultate vzorca vina in vzorca za umeritveno krivuljo izračunamo iskano koncentracijo

Enačba premice umeritvene krivulje: \_\_\_\_\_

Rezultat masne koncentracije FAN (mg N/L) v vzorcu vina izračunajte glede na umeritveno krivuljo in glede na standardno raztopino (po formuli 5.2)!

Priloga 5.1: Absorpcijski spekter analiziranega vzorca vina

Priloga 5.2: Absorpcijski spekter analiziranega vzorca standardne raztopine

Preglednica 5.3: Podatki za umeritveno krivuljo

<b>Koncentracija v standardni raztopini (mg N/L)</b>	<b>Maksimalna A (povprečje določitev)</b>
0,0 (slepi vzorec)	0
0,4	
0,8	
1,0	
1,6	
2,0	

### Priloga 5.3: Umeritvena krivulja za določanje FAN

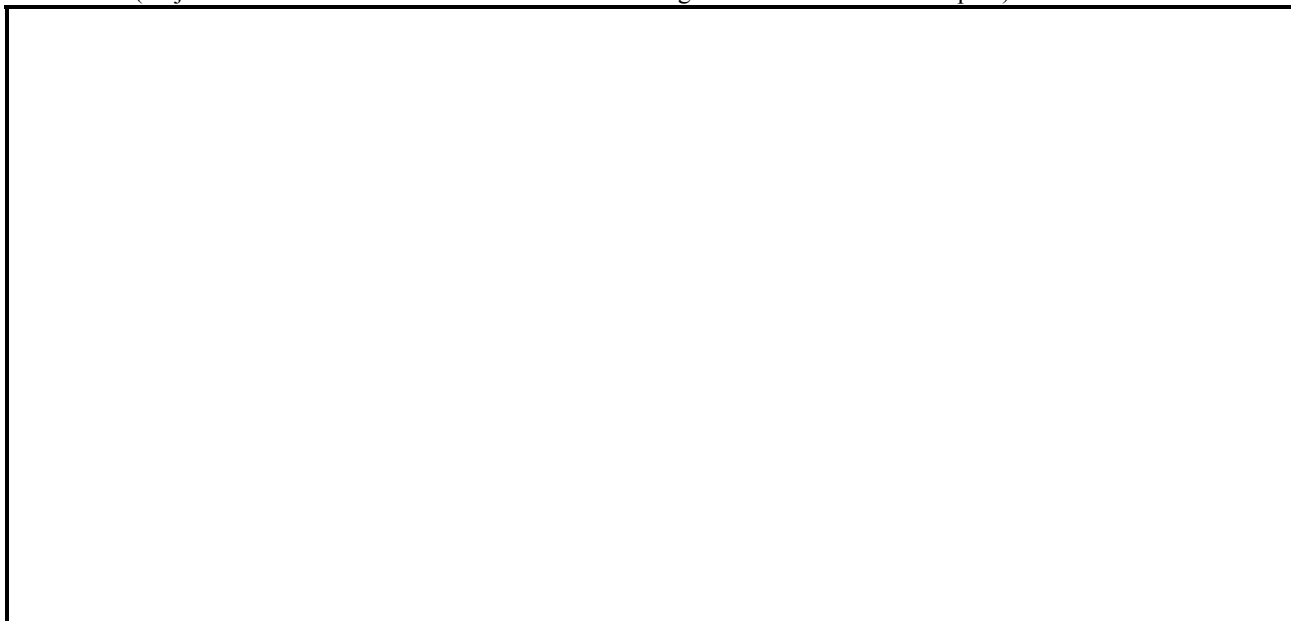
#### 5.6.3 Opombe

Običajno zadošča, da vzorce mošta pred analizo razredčimo v razmerju 1:100, vzorce vina pa v razmerju 1:50. Pri reakciji med ninhidrinom in prostim aminokislinskim dušikom se po segrevanju razvije vijolična barva, pri zelo majhnih koncentracijah FAN pa je barva ustrezno svetlejša (lahko celo rjavorumena). Velike probleme pri razvijanju barve predstavljajo ostanki beljakovin v vzorcu (npr. beljakovinsko-taninska motnost ali avtolizirane kvasne celice), če jih s centrifugiranjem (20 minut pri 2000 obratih/minuto) in filtriranjem (velikost por 0,2  $\mu\text{m}$ ) povsem ne odstranimo.

#### 5.7 Priporočena literatura

- Fatur A. 1998. Spektrofotometrično določanje arginina in prolina v moštu in vinu. Diplomaska naloga, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 62 s.
- Košmerl T., Fatur A., Wondra M. 1998. Kinetika *alfa*-aminokislinskega dušika in prolina med fermentacijo = Free amino nitrogen (FAN) and proline kinetics during alcoholic fermentation. V: Bole-Hribovšek, V. (ur.), Ocepek, M. (ur.), Klun, N. (ur.). 2. kongres mikrobiologov Slovenije z mednarodno udeležbo, Portorož, Slovenija, 27.-30. september 1998. Zbornik s programom. Ljubljana, Slovensko mikrobiološko društvo: 86-89.
- Nicolini G., Versini L., Corradin L., Grandi C. 1997. Un nuovo metodo valutativo dell'azoto assimilabile nei mosti e nei vini base Trento D.O.C. Proceeding, S. Michele all'Adige, 7 Novembre, 1997.
- Ough C.S., Amerine M.A. 1988. Nitrogen compounds. Methods for analysis of musts and wines. Second edition. New York, John Wiley&Sons, Inc.: 172-195.
- Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. 1995. Nitrogen compounds. Wine analysis and production. New York, Chapman&Hall: 152-167.

**Izračun** (vključno z obema absorbancama vzorca analiziranega vina in standardne raztopine)



## 6 DOLOČANJE FENOLNIH SPOJIN V VINU PO SINGLETONU IN ROSSIJU

### Spektrofotometrična metoda (Singleton in Rossi, 1965)

#### 6.1 Uvod

Fenolne spojine so lahko relativno enostavne fenolne spojine, ki izvirajo iz grozdja, kakor tudi zelo kompleksne fenolne spojine (tanini), ki se ekstrahirajo iz lesene vinske posode med procesom zorenja vina. Fenolne spojine so pomembne, saj prispevajo k barvi in stabilnosti vina, v večjih koncentracijah pa so odgovorne za trpkost (astringentnost) ter grenkobo okusa; v prisotnosti kisika se hitro oksidirajo in povzročajo porjavitev vina.

Povprečna koncentracija fenolnih spojin v belem vinu je 225 mg skupnih fenolnih spojin/L (razpon od 150 do 400 mg/L), v rdečem vinu 1800 mg/L (razpon od 700 do 4000 mg/L), v desertnem vinu pa 350-950 mg/L. Fenolne spojine preidejo v mošt in vino iz grozdnih jagod; njihova porazdelitev je razvidna iz preglednice 6.1.

Preglednica 6.1: Porazdelitev skupnih fenolnih spojin (%) v grozdnih jagodi

Del grozdne jagode	Rdeče grozdje	Belo grozdje
jagodna kožica	33,3 %	23,2 %
grozdni sok	3,4 %	4,5 %
grozdne pečke	62,6 %	71,4 %

Na koncentracijo skupnih fenolnih snovi v vinu vplivajo številni dejavniki: čas kontakta grozdnega soka s kožicami in pečkami, koncentracija etanola, temperatura fermentacije, mešanje soka in kožic (pri maceraciji), intenzivnost stiskanja, sorta vinske trte, idr.

#### 6.2 Opis metode

Fenolne spojine absorbirajo predvsem svetlobo UV spektra in vidnega spektra. Zato lahko odčitano vrednost absorbance pri primerni valovni dolžini uporabimo za oceno koncentracije skupnih fenolov, skupnih antocianinov, obarvanih antocianinov, deleža antocianinov v obarvani obliki, skupnih hidrokscimetnih kislin in ekvivalenta kavne kisline. S podobnimi spektrofotometričnimi metodami določamo tudi barvo vina (Vaja 20).

Za določanje koncentracije skupnih fenolnih snovi dodamo v vino Folin-Ciocalteujev reagent, ki v alkalni raztopini (dodatek natrijevega karbonata) oksidira fenolne snovi. Reagent Folin-Ciocalteu (F.C.) je vodna raztopina natrijevega volframata(VI), natrijevega molibdata(VI) in litijevega sulfata(VI); slednji prepreči obarvanje F.C. reagenta. Dodatek natrijevega karbonata je potreben za alkalnost reakcijske zmesi. Redukcija volframata(VI) in molibdata(VI) poteče le v prisotnosti fenolatnega aniona. Raztopina, ki vsebuje reducirani obliki volframata(VI) in ali molibdata(VI), je modro obarvana, medtem ko je raztopina nereducirane oblike rumene barve.



Absorbanco reakcijske mešanice izmerimo pri valovni dolžini 765 nm. Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin odčitamo iz umeritvene krivulje in rezultat izrazimo kot mg galne kisline/L. (Galno kislino uporabimo kot standardno referenčno spojino za določanje skupnih fenolnih spojin).

### 6.3 Potrebna oprema

UV-VIS spektrofotometer,  
kivete (10 mm),  
merilne bučke (100 mL),  
polnilne pipete (1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL in 10 mL),  
puhalka z deionizirano vodo.

### 6.4 Reagenti

- osnovna raztopina galne kisline: v 100 mL merilno bučko natehemo 500 mg galne kisline, dodamo 10 mL absolutnega etanola, raztopimo in razredčimo do oznake z deionizirano vodo;
- Folin-Ciocalteujev reagent (F.C.), komercialni reagent: tik pred uporabo ga razredčimo po navodilih proizvajalca (pri vajah uporabljamo Merckov reagent, ki ga redčimo z deionizirano vodo v razmerju 1:2);
- 20 % raztopina natrijevega karbonata;
- deionizirana voda.

### 6.5 Postopek

#### 6.5.1 Priprava umeritvene krivulje

- a) iz osnovne raztopine galne kisline pripravimo z ustreznim razredčevanjem različne koncentracije standardnih raztopin galne kisline: v 100 mL merilne bučke odpipetiramo od 0 do 10 mL osnovne raztopine galne kisline, dopolnimo do oznake z deionizirano vodo ter premešamo (preglednica 6.2 v nadaljevanju);

Preglednica 6.2: Standardne raztopine galne kisline

Oznaka bučke	Volumen osnovne raztopine galne kisline (mL)	Končna koncentracija galne kisline v standardni raztopini (mg/L)
0	0	0 (slepi vzorec)
1	1	50
2	2	100
3	3	150
4	5	250
5	10	500

- b) iz vsake merilne bučke (preglednica 6.2) odpipetiramo po 1 mL standardne raztopine v 100 mL merilno bučko, dodamo približno 60 mL deionizirane vode, raztopino premešamo in dodamo 5 mL razredčenega Folin-Ciocalteujevega reagenta (glej točko reagenti). Raztopino ponovno dobro premešamo in po 30 sekundah (najkasneje po 8 minutah) dodamo 15 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata. Premešamo in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake. Raztopino pustimo stati točno 2 uri pri temperaturi 20 °C. Po tem času vsebino merilne bučke še enkrat premešamo, prenesemo v 10 mm kivete in izmerimo absorbanco proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 765 nm;
- c) narišemo umeritveno krivuljo: odvisnost absorbance od masne koncentracije galne kisline (mg/L) in izračunamo enačbo premice. Beer-Lambertov zakon za to metodo velja za koncentracijsko območje 50-500 mg galne kisline/L.

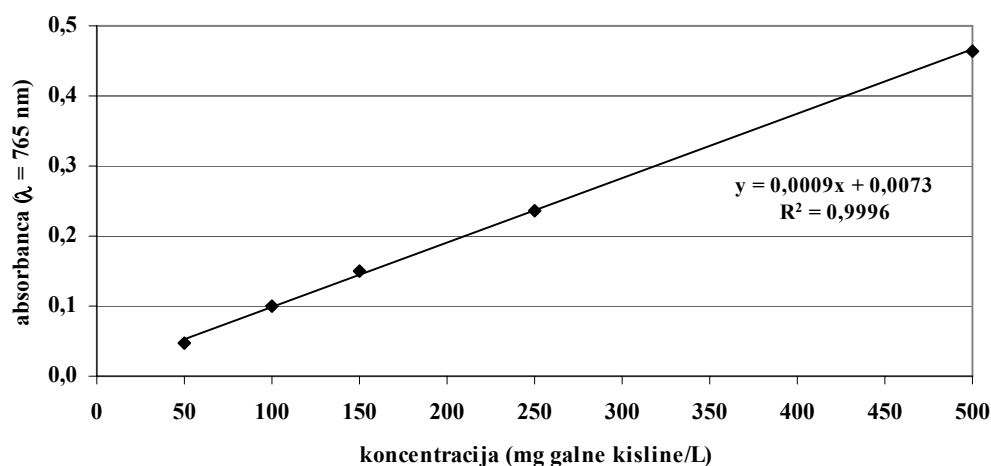
### 6.5.2 Določanje fenolnih spojin v vzorcu vina glede na umeritveno krivuljo

- a) za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin v belih vinih odpipetiramo 1 mL vzorca v 100 mL merilno bučko, dodamo 60 mL deionizirane vode in postopamo naprej enako kot pri pripravi umeritvene krivulje (glej 6.5.1 b);
- b) rdeča vina je potrebno pred analizo ustrezno razredčiti (običajno v razmerju 1:10); 10 mL vina odpipetiramo v 100 mL merilno bučko, dopolnimo do oznake z deionizirano vodo in premešamo; za analizo uporabimo 1 mL tako razredčenega vzorca;
- c) končno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcu (mg galne kisline/L) izračunamo iz enačbe umeritvene krivulje (ob upoštevanju razredčitve).

## 6.6 Rezultati

### 6.6.1 Pričakovane vrednosti

Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin



Slika 6.1: Primer umeritvene krivulje za določanje skupnih fenolnih spojin

## 6.6.2 Določene vrednosti

Preglednica 6.3: Razredčitvi, absorbanci in masni koncentraciji skupnih fenolnih spojin (mg galne kisline/L) v vzorcu vina in v vzorcu za umeritveno krivuljo

Oznaka	R*	A	Koncentracija (mg galne kisline/L)
vzorec vina			
vzorec za umeritveno krivuljo	/		

\*uporabljeni razredčitvi vzorca

Enačba premice umeritvene krivulje: \_\_\_\_\_

Preglednica 6.4: Podatki za umeritveno krivuljo

Koncentracija (mg galne kisline/L)	A (povprečje določitev)
50	
100	
150	
250	
500	

Priloga 6.1: Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin

### 6.6.3 Opombe

Opisana spektrofotometrična metoda ni specifična; reagira večina reducentov, npr. vse hidroksilne (-OH) skupine, ki se lahko oksidirajo.

Tudi reducirajoči sladkorji (zlasti fruktoza) lahko reducirajo volframat(VI) in molibdat(VI) v alkalnem mediju. Z ozirom na koncentracijo reducirajočih sladkorjev je lahko potrebna korekcija določene koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg galne kisline/L) po preglednici 6.5.

Preglednica 6.5: Korekcija določene vsebnosti fenolnih spojin (mg galne kisline/L) s F.C. reagentom glede na vsebnost reducirajočih sladkorjev (g/L)

Koncentracija reducirajočih sladkorjev (g/L)	Faktor, s katerim <u>delimo</u> določeno koncentracijo skupnih fenolnih spojin
0-10	/
10-25	1,03
25-100	1,06
100-200	1,10

Na rezultat meritev lahko vpliva tudi žveplov dioksid (določimo večje vrednosti skupnih fenolnih spojin, v povprečju za 30-40 mg več galne kisline/L). Napaka je večja pri belih vinih, ki vsebujejo v primerjavi z rdečimi več SO<sub>2</sub> in bistveno manj fenolnih spojin. Zato vzorcem vina, za katere sumimo, da vsebujejo veliko prostega SO<sub>2</sub>, dodamo prebitek acetaldehida (500 mg acetaldehida/L vzorca), premešamo in določimo koncentracijo skupnega SO<sub>2</sub> (npr. z jodometrično titracijo po Ripperju ali s spektrofotometrično metodo po Rebeleinu). Korekcijo koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg galne kisline/L) izračunamo po naslednji formuli:

$$\text{korekcija} = c (\text{skupni SO}_2) \cdot 0,122 \quad (6.1)$$

kjer pomeni **c (skupni SO<sub>2</sub>)** koncentracijo skupnega SO<sub>2</sub> (mg/L) in **0,122** empirični faktor. Vrednost korekcije (mg galne kisline/L) odštejemo od določene koncentracije skupnih fenolnih spojin.

### 6.7 Priporočena literatura

- Ough C.S., Amerine M.A. 1988. Phenolic compounds. Methods for analysis of musts and wines. Second edition. New York, John Wiley&Sons, Inc.: 196-221.
- Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. 1995. Laboratory procedures. Wine analysis and production. New York, Chapman&Hall: 328-331.

### Izračun

--

## 7 DOLOČANJE BARVE VINA

### Spektrofotometrična metoda

#### 7.1 Uvod

Za laike je barva vina rdeča, rdečkasta (rosé), rumena (svetlejša ali temnejša). Za poznavalca pa je barva bistveno bolj kompleksna zaznava. Glavni problem pri merjenju barve je izbira objektivno merljivih parametrov. Včasih so uporabljali t.i. "tintometre", s katerimi so določali in primerjali le en parameter: bodisi intenzivnost barve ali barvni odtenek (nianso). Z razvojem spektroskopije (po letu 1931) je postalo možno bolj natančno definirati barvo tekočin, tudi takih kot je vino.

Poleg antocianinov v rdečih vinih vsebujejo tudi bela vina sledove nekaterih barvil: klorofila, karotina in ksantofila. V hladnih klimatskih razmerah vsebuje grozdje bistveno več klorofila, ki obarva vino zaznavno zelenkasto v primerjavi s svetlo rumeno do rumenkastorjavo (jantarno) barvo vina, ki pomeni, da sledovi klorofila niso opazni.

Barvo opisujemo različno glede na spekter absorbirane in prepuščene svetlobe, pri čemer vse subjektivne zaznave ne pomenijo jasno definirane fizikalne veličine (intenziteta barve, odtenek barve, spekter svetlobe). Človeško oko ni sposobno razlikovati posameznih komponent barve ločeno po valovnih dolžinah, ampak jih zaznamo samo kot celoto. Številna barvila in pigmente v vinu zaznamo običajno kot odtenek barve ali intenziteto barve.

#### 7.2 Opis metode

V praksi obarvanost belih vin merimo direktno (brez razredčitve) s spektrofotometrom; merimo absorbanco vzorca pri valovni dolžini 420 nm. V širšem spektru svetlobe od 400-440 nm lahko izmerimo tudi odtenke rjave barve belih vin. Z merjenjem absorbance pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm pa določamo barvo rdečih vin, ki jih moramo predhodno ustrezno razredčiti; običajno v razmerju 1:10. Vsota absorbanc predstavlja intenziteto barve, medtem ko razmerje absorbance pri 420 nm in 520 nm pomeni odtenek barve. Razredčitev prilagodimo barvi rdečega vina (rdečkasta vina lahko npr. razredčujemo tudi v manjšem razmerju, 1:2 ali 1:4). Za redčenje uporabimo pufrno raztopino, katere pH je čim bolj enak pH analiziranega vzorca vina.

#### 7.3 Potrebna oprema

UV-VIS spektrofotometer,  
kivete (10 mm),  
epruvete (20 mL),  
polnilne pipete (1 mL, 5 mL ali 10 mL),  
pH meter (kadar določamo barvo rdečih vin).

## 7.4 Reagenti

- raztopina za razredčevanje: v 1000 mL merilno bučko natehemo 10,21 g kalijevega hidrogenftalata, dodamo 6,10 mL 2 M raztopine HCl in razredčimo do oznake z deionizirano vodo; vrednost pH tako pripravljene raztopine je 3,30;
- (raztopino za razredčevanje si lahko pripravimo tudi z uporabo deionizirane vode, kateri uravnamo pH na želeno vrednost z dodatkom koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

## 7.5 Postopek

### 7.5.1 Določanje barve belih vin

- a) vzorec odpipetiramo direktno v kvarčno kiveto in izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 420 nm proti slepemu vzorcu (voda).

### 7.5.2 Določanje barve rdečih vin

- a) vzorec razredčimo v razmerju 1:10 z raztopino za razredčevanje in dobro premešamo;
- b) razredčen vzorec odpipetiramo v kvarčno kiveto in izmerimo absorbanco pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm proti slepemu vzorcu (voda).

### 7.5.3 Izračun osnovnih barvnih parametrov

#### 7.5.3.1 intenziteta barve (bela vina)

$$I = A_{420} \quad (7.1)$$

#### 7.5.3.2 intenziteta barve (rdeča vina)

$$I = \sum (A_{420} + A_{520} + A_{620}) \quad (7.2)$$

(pri podajanju končnega rezultata ne smemo pozabiti na razredčitev vzorca!)

#### 7.5.3.3 ton barve

$$\text{ton} = \frac{A_{420}}{A_{520}} \quad (7.3)$$

## 7.5.4 Dodatni izračuni (samo za vzorce rdečih vin)

### 7.5.4.1 delež (%) rdeče barve, tj. prostih in vezanih antocianinov v obliki flavilijevega kationa

$$dA_F (\%) = \left( A_{520} - \frac{(A_{420} + A_{620})}{2} \right) \cdot \frac{1}{A_{520}} \cdot 100 \quad (7.4)$$

### 7.5.4.2 delež (%) rdeče barve pri posamezni valovni dolžini

$$\text{pri 420 nm:} \quad dA_{420} (\%) = \left( \frac{A_{420}}{I} \right) \cdot 100 \quad (7.5)$$

$$\text{pri 520 nm:} \quad dA_{520} (\%) = \left( \frac{A_{520}}{I} \right) \cdot 100 \quad (7.6)$$

$$\text{pri 620 nm:} \quad dA_{620} (\%) = \left( \frac{A_{620}}{I} \right) \cdot 100 \quad (7.7)$$

## 7.6 Rezultati

### 7.6.1 Določene vrednosti

Preglednica 7.1: Izmerjene in preračunane absorbance (A) vzorca pri posameznih valovnih dolžinah

Valovna dolžina (nm)	R*	Izmerjena A	Končna A
420			
520			
620			

\*uporabljena razredčitev vzorca, ki jo upoštevamo pri izračunu končne absorbance vzorca

Preglednica 7.2: Izračun osnovnih barvnih parametrov in posameznih deležev

Oznaka	Rezultat*
intenziteta barve	
ton barve	
dA <sub>F</sub> (%)	
dA <sub>420</sub> (%)	
dA <sub>520</sub> (%)	
dA <sub>620</sub> (%)	

\*rezultate za intenziteto in ton barve podamo na tri decimalna mesta, vse deleže rdeče barve (%) pa na eno decimalno mesto

### Priloga 7.1: Absorpcijski spekter razredčenega vzorca rdečega vina v območju valovne dolžine med 400 nm in 640 nm

#### 7.6.2 Opombe

Namesto razredčitve rdečega vina je bolje, da za merjenje namesto običajne 10 mm uporabimo 5 mm ali 1 mm kvarčno kiveto. Idealno je, da je absorbanca v območju 0,3-0,7.

Poleg pH vplivata na barvo vina tudi žveplov dioksid in alkohol. Z naraščanjem vrednosti pH, večanjem koncentracije SO<sub>2</sub> in večanjem koncentracije alkohola se zmanjšujeta absorbanca pri 420 nm in 520 nm. Pomembno je tudi razmerje med antocianini (A) in tanini (T), ki vpliva tako na barvo kot tudi na stabilnost barve rdečih vin. Stabilna barva rdečih vin je: rdeča, temno rdeča in oranžnordeča (enostavni kondenzacijski produkti antocianov in taninov). Pri rdečkastih vinih se barva zaradi premajhnega razmerja A/T spremeni od prijetne svetlo rdeče v oranžnorjavo (večja absorbanca pri 420 nm). Idealno razmerje med A in T je 1:10; če je prostih antocianinov več, se odtenek barve značilno spremeni od rdeče v rumeno. Do spremembe barve posebno pri rdečih vinih pride med zorenjem ali staranjem zaradi številnih procesov (transformacij), ki so odvisni od temperature, koncentracije SO<sub>2</sub>, stopnje oksidacije, časa in razmerja med A in T. Značilne so predvsem oksidativne in neoksidativne reakcije polimerizacije procianidinov ob tvorbi kondenziranih taninov, za katere je značilna temno rumenorjava barva (in tudi manjša trpkost oz. astringenca).



## 7.7 Priporočena literatura

- Glories Y. 1984. La couleur des vins rouges. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18(4): 253-271.
- Official Journal of the European Communities. 1990. English edition, Legislation. L 272, vol. 33, 3 October 1990: 167-176.
- Ough C.S., Amerine M.A. 1988. *Wine Color. Methods for analysis of musts and wines*. Second edition. New York, John Wiley&Sons, Inc.: 316-37.
- Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. 1995. *Laboratory procedures. Wine analysis and production*. New York, Chapman&Hall: 382-385.

## Izračun

--

## 8 OSNOVE ČIŠČENJA VINA

Bistrenje in čiščenje (imenovano tudi lepšanje) služita kot pomoč, ne pa kot nadomestilo za spontano bistrenje mošta ali vina ter stabilizacijo vina. Zato ju uporabljamo samo za doseg potrebne stopnje bistrosti in stabilnosti s fizikalno-kemijskega stališča, z najmanjšimi spremembami kemijskega in fizikalnega ravnotežja v vinu. Čiščenje vina značilno vpliva na njegovo stabilnost z odstranitvijo dejavnikov, ki so predvsem posledica tvorbe kompleksov med beljakovinami in vinsko kislino v belih vinih, oziroma kompleksov fenolnih spojin (polifenolov) in vinske kisline v rdečih vinih. Glavno fizikalno nestabilnost stekleničenih vin na prvem mestu predstavlja izločanje soli vinske kisline (tartratna nestabilnost), po pogostnosti drugo nestabilnost pa predstavlja beljakovinska motnost belih vin (nestabilnost vina na termolabilne beljakovine). Obstaja torej neposredna zveza med čiščenjem vina in stabilizacijo vina na beljakovine ter vinski kamen. Sposobnost čiščenja filtriranih vin se bistveno razlikuje od nefiltriranih zaradi vsebnosti zaščitnih koloidov, prisotnih v nefiltriranih vinih. Zlasti občutljiva na njihovo prisotnost je želatina, jajčni beljak manj, najmanj pa kazein in ribji mehur.

Po definiciji je čiščenje dodatek reaktivnih (nasprotno delujočih) ali adsorptivnih sredstev za odstranitev ali zmanjšanje koncentracije ene ali več neželenih komponent. Čistilna sredstva dodajamo v mošte, vina ali osnovna vina (cuveé) za pridelavo penečih vin z namenom izboljšanja predvsem senzoričnih lastnosti: bistrosti (čistosti), barve, vonja in okusa, arome in/ali fizikalno-kemijske stabilnosti.

Z ozirom na njihovo funkcijo v enologiji predstavljajo čistilna sredstva eno izmed devetih skupin enoloških sredstev oziroma aditivov (Plahuta in sod., 1994):

1. čistilna sredstva
2. sredstva za fermentacijo: kvasovke, bakterije, hrana za kvasovke,...
3. sredstva s protimikrobnim učinkom: žveplov dioksid ali sulfit, sorbinska kislina, kalijev sorbat, lizozim
4. sredstva za zaščito pred oksidacijo: žveplov dioksid ali sulfit, tanini, askorbinska kislina ali vitamin C
5. sredstva za povečanje kislosti: vinska kislina, citronska kislina
6. sredstva za zmanjšanje kislosti (kemijski razkis): kalcijev karbonat (enojna ali dvojna sol), kalijev hidrogenkarbonat
7. sredstva za povečanje sladkosti: saharoza, koncentrat, rektifikat
8. sredstva za odstranjevanje neprijetnih vonjev: oglje, bakrov sulfat, bakrov citrat
9. sredstva za stabilizacijo (na vinski kamen, na termolabilne beljakovine, na kovine): metavinska kislina, bentoniti, kalijev ferocianid.

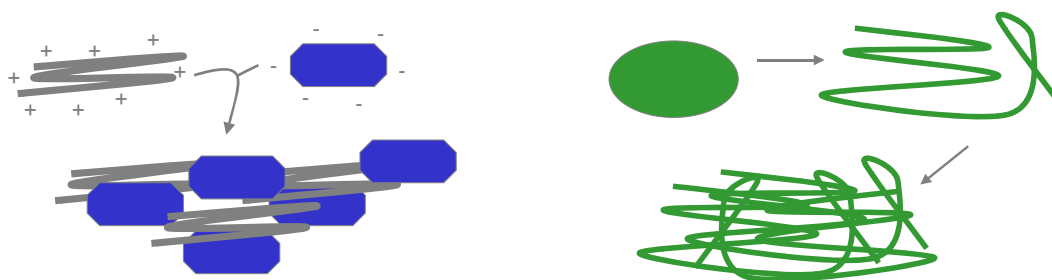
Osnovne zahteve za vsa uporabljena enološka sredstva:

- učinkovitost pri majhnih koncentracijah,
- brez ali s čim manjšimi ostanki v vinu,
- imeti morajo učinek, ki ga ne moremo doseči z mehanskimi (fizikalnimi) postopki,
- neškodljivi zdravju.

Na osnovi njihovih glavnih (čistilnih) lastnosti jih lahko razdelimo na osem podskupin (Zoecklein in sod., 1995):

1. zemlje: bentonit, kaolin
2. beljakovine: želatina, ribji mehur, kazeini, pasterizirano mleko, jajčni beljak, kvasovke
3. polisaharidi: alginati, gumiarabika
4. aktivno oglje
5. sintetični polimeri: PVPP (polivinilpolipirolidon), najlon
6. silicijev dioksid (silika gel ali kremenčevo čistilo)
7. tanini in
8. ostala sredstva: encimi (proteaze, pektinaze, glukanaze, ureaze, glikozidaze), modro čiščenje (kalijev ferocianid), druga čistila za odstranjevanje težkih kovin, idr.

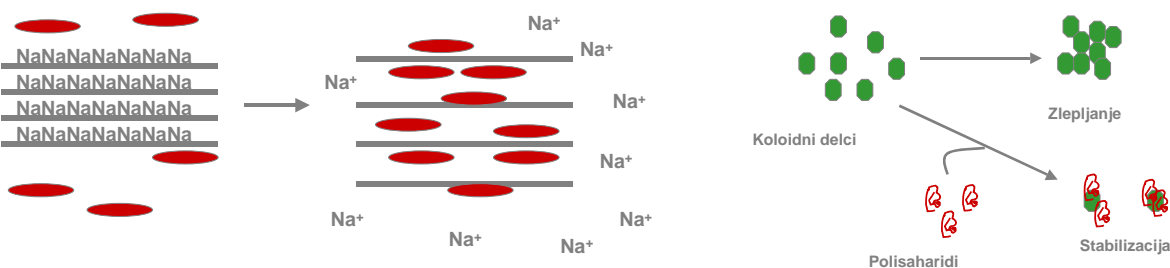
Mehanizme delovanja čistilnih sredstev lahko razdelimo na osnovi električnih interakcij (naboja), tvorbe vezi in/ali absorpcije oziroma adsorpcije. V primeru električnih interakcij se delci z nasprotnim nabojem vežejo na čistilno sredstvo ob tvorbi večjih delcev, ki zaradi večje gostote sedimentirajo. V primeru absorpcije ali adsorpcije pride do tvorbe vodikovih vezi (v notranjosti čistilnega sredstva ali na njegovi površini) med karboksilnimi skupinami beljakovin in hidroksilnimi skupinami fenolov in/ali taninov.



Slika 8.1: Prikaz delovanja interakcije električnih nabojev (levo) in hidrofobnih interakcij (desno)

### Natrijev bentonit:

princip delovanja je izmenjava kationov s komponentami vina



Slika 8.2: Prikaz delovanja izmenjave kationov (levo) in stabilizacije koloidnih delcev

V praksi najpogosteje uporabimo izbrano čistilno sredstvo z ozirom na električni naboj delcev, ki jih želimo iz mošta ali vina odstraniti:

- pozitivno naelektrene so beljakovine ali proteini, ki jih iz vina odstranimo z negativno naelektrenimi čistilnimi sredstvi, kot so tanini, kvasovke, bentonit in silicijev dioksid.
- negativno naelektrene delce v vinu pa predstavljajo tanini, fenoli, antociani, kvasovke in bakterije, ki jih odstranimo z želatino, albuminom, kazeinom ali kalijevim kazeinatom, jajčnim beljakom in zaščitnim koloidom (mešanica polisaharidov in diatomejske zemlje, znana pod imenom Sparkolloid).

Iz zgornje delitve praktično sledi, da beljakovinsko nestabilna vina (s pozitivno naelektrenimi delci) lahko očistimo ali v celoti stabiliziramo le z bentonitom ali silicijevim dioksidom (ki sta oba negativno naelektrena). Tako beljakovine kot fenolne spojine povzročajo suspendirano motnost vina, ki je »ujeta« v mehurčke ogljikovega dioksida. S premestitvijo vina s hladnega prostora (kleti) na toplo, se pogosto ta pojav zmanjša.

Beljakovine, ki se spontano odstranijo po zaključeni alkoholni fermentaciji ali pa s pomočjo čistil oziroma pri filtraciji, so po velikosti dovolj majhne, da ostanejo topne. To dejstvo ima določen prispevek k aromi vina, zlasti pri zaznavi polnosti in »teles« ali ekstraktnosti vina.

Fenolne spojine so nekoliko bolj aktivne v primerjavi z beljakovinami. Nagnjene so k procesom oksidacije in polimerizacije, kar vpliva na aromatičnost in kakovost okusa vina. Pod izrazom tanini mislimo na polimerizirane fenole, medtem ko so predstavniki enostavnih molekul flavonoidnih fenolov antociani, flavoni, katehini in proantocianini. Antociani so predstavniki rdečih barvil, medtem ko so flavoni rumeni obarvani fenoli, ki pod vplivom oksidacijskih reakcij tvorijo rjavo obarvane polimerne pigmente. Zadnji predstavniki katehini in proantocianini imajo podobno strukturo. Njihova vsebnost v rdečih vinih je običajno 1-3 g/L, v belih vinih pa le nekaj 10 mg/L. V odvisnosti od stopnje polimerizacije so to bodisi brezbarvne in ne-trpke molekule, ki lahko povzročajo tudi značilno motnost in rdeče obarvano usedlino.

Motnost mošta in vina je lahko posledica prisotnosti delcev prahu, zemlje, grozdnega tkiva, kvasovk in bakterij, koloidov grozdja oziroma sprememb, ki nastanejo med staranjem ali zorenjem. Delci so lahko v obliki beljakovin, pektinov, gumijastih (smolnatih) snovi, razgradi produkti polifenolov ali pa kompleksi kovin in beljakovin, ki nastanejo s flokulacijo netopnih oksidiranih soli. Absorpcija/adsorpcija koloidno suspendiranega materiala s čistilnimi sredstvi omogoči boljšo in lažjo filtrabilnost.

Čiščenje se najpogosteje nanaša na:

- odstranitev taninov in/ali rjavih polimeriziranih fenolov z beljakovinskimi čistilnimi sredstvi (kazein, ribji mehur, jajčni beljak in želatina);
- zmanjšanje monomernih in manjših polimernih fenolov s poliamidnimi sredstvi (PVPP, Polyclar AT) ali najlonom;
- adsorpcijo beljakovin vina na bentonit;
- zmanjšanje vsebnosti težkih kovin z modrim čiščenjem;
- zmanjšanje vsebnosti koloidov;
- odstranitev neprijetnih, tujih vonjev (običajno vodikov sulfid) npr. z bakrovim sulfatom ali bakrovim citratom.

Običajno uporabljena čistilna sredstva so prikazana v preglednici 8.1 v padajoči stopnji njihove aktivnosti in učinkovitosti (od najbolj do najmanj). Zlasti učinkovitost čistilnih sredstev je odvisna od samega sredstva, postopka priprave in dodatka, koncentracije, temperature, kemijske sestave mošta ali vina (pH, vsebnost kovin, starosti in predhodnih obdelav). Samo v nekaterih primerih je zmanjšanje določene komponente neposredno odvisno od količine dodanega čistila, na splošno pa ni tako. Z večjo koncentracijo čistila se običajno sicer zmanjša koncentracija neželene komponente, vendar je prav tako zmanjšana tudi nadaljnja adsorpcija, kar vodi k bistveno manjši učinkovitosti čistila (Boulton in sod., 1996).

Preglednica 8.1: Primerjava izbranih čistilnih sredstev z ozirom na želen učinek in možne probleme v padajočem zaporedju (Zoecklein in sod., 1995)

Zmanjšanje barve	Zmanjšanje taninov	Volumen usedline	Bistrost in stabilnost	Možnost prečiščenja	Poslabšanje kakovosti
ogljje	želatina	bentonit	bentonit	želatina	ogljje
želatina	jajčni beljak	želatina	ferocianid*	jajčni beljak	bentonit
kazein	ribji mehur	kazein	ogljje	ribji mehur	kazein
jajčni beljak	kazein	jajčni beljak	ribji mehur	kazein	želatina
ribji mehur	bentonit	ribji mehur	kazein	ferocianid*	jajčni beljak
bentonit	ogljje	ferocianid*	želatina		ribji mehur
ferocianid*	ferocianid*	ogljje	jajčni beljak		ferocianid*

\* kalijev ferocianid ali kalijev heksacianoferat; ni dovoljen v ZDA, v večini evropskih držav pa lahko modro čiščenje izvajajo le na pooblaščenih organizacijah (ne pa posamezni pridelovalci vina)

Ker je čiščenje površinska reakcija, je zelo pomembna pravilna metoda hidratacije in samega dodatka. Priprava in uporaba čistilnega sredstva v kleti mora biti identična laboratorijskim predposkusom.

Pri vsakem uporabljenem čistilnem sredstvu ali njihovi kombinaciji je potrebno ugotoviti njegove značilnosti in posebnosti z vidika zelene spremembe oziroma sprememb:

- bistrosti, barve,
- tvorbe sedimenta in njegove kompaktnosti,
- arome in njene intenzivnosti,
- polnosti okusa,
- trpkosti (astringentnosti) in grenkobe,
- sposobnosti staranja oz. zorenja,
- fizikalne in kemijske stabilnosti,
- celotne sprejemljivosti vina.

Čistilna sredstva vedno izbiramo z ozirom na namen čiščenja (preglednica 8.2), seveda v okviru dovoljenih največjih količin uporabe. Skupne značilnosti večine čistilnih sredstev lahko povzamemo v povezavi z vrednostjo pH vina: z naraščajočim pH se zmanjšuje moč relativnega električnega naboja suspendiranih delcev. Pri visokih vrednosti pH vina je značilno, da beljakovinska čistila nimajo dovolj pozitivnih nabojev, da bi vezala negativno naelektrene delce, kar potencialno

povečuje motnost vina. Kadar preostane v vinu presežek čistilnega sredstva, ki ni reagiral z delci, govorimo o **prečiščenju vina**, kar praktično povzroča nestabilnost v bistrosti vina. Enostaven test za ugotavljanje prečiščenja je dodatek 0,5 g tanina/L vina in senzorično ugotavljanje bistrosti po 24 urah.

Preglednica 8.2: Pregled čistilnih sredstev z ozirom na namen čiščenja

Namen uporabe	Sredstvo/sredstva
zmanjšanje negativnih arom	ogljje deodorante
zmanjšanje barvnih snovi	ogljje dekolorante, PVPP
izboljšanje bistrosti	želatina, kazein, ribji mehur, zaščitni koloidi, bentonit
porjavitev	PVPP, kazein
oksidativni ton (vonj in okus po oksidaciji)	PVPP
grenkoba	PVPP, kazein, želatina (za bela vina)
zmanjšanje taninov	želatina, jajčni beljak (za rdeča vina)
beljakovinska stabilnost	bentonit, SiO <sub>2</sub>
zmanjšanje lesne note	kazein

### KAJ MORAMO UPOŠTEVATI PRI ČIŠČENJU VINA?

- Uporabimo samo najmanjšo potrebno količino čistilnega sredstva.
- Uporabimo samo čistila z največjo čistostjo, brez neželenih tujih (nevinskih) vonjev in okusov.
- Čas kontakta omejimo na toliko, da je reakcija zaključena s tvorbo usedline (približno 75 % skupnih beljakovin je odstranjenih že v prvi minuti kontakta z bentonitom); s centrifugiranjem ali filtracijo lahko čas še dodatno skrajšamo, ne da čakamo na tradicionalno spontano bistrenje, ki lahko v odvisnosti od temperature traja tudi več dni.
- Na osnovi laboratorijskih predposkusov se lotimo čiščenja v kleti na enak način (priprava čistilnih sredstev, metoda, temperatura, idr.).
- Za zagotovitev optimalne porabe in reaktivnosti je potrebno temeljito premešanje čistila z moštom ali vinom (najbolj učinkovito s prečrpavanjem).
- Vina namenjena čiščenju naj imajo čim manjšo vsebnost ogljikovega dioksida, ki preprečuje usedanje.
- Učinek beljakovinskih čistilnih sredstev je bolj prizanesljiv do mladih vin kot starejših.
- Vina z nižjim pH potrebujejo manj čistilnega sredstva (npr. bentonita) za stabilizacijo, kljub znatnim razlikam v vsebnosti beljakovin med posameznimi sortami. Beljakovinsko stabilizacijo opravimo vedno po stabilizaciji vina na vinski kamen (t.im. »tartratna« stabilnost) in popravku kislinske stopnje (z dokisanjem ali razkisanjem).
- Večina vinarjev uporablja za hidratacijo čistilnih sredstev deionizirano vodo, kajti večja vsebnost kovin, bodisi v čistilih ali v vinu, lahko povzroči flokulacijo in s tem manjšo aktivnost. Izjema je le želatina (v lističih ali prahu), katere delovanje je odvisno od prisotnosti kovinskih ionov (Fe).
- Beljakovinska čistilna sredstva so značilno bolj učinkovita pri odstranjevanju fenolnih spojin pri nižji temperaturi (10 °C) v primerjavi z višjimi temperaturami (20-25 °C).
- Na učinkovitost čistilnega sredstva vplivajo: sredstvo, metoda priprave in dodatka, količina dodatka, pH, vsebnost kovin, temperatura, prisotnost CO<sub>2</sub> in predhodna obdelava vina (Boulton in sod., 1996).

## 9 POSTOPKI ČIŠČENJA VINA S ČISTILNIMI SREDSTVI

### 9.1 Čiščenje vina z jajčnim beljakom

#### Uvod

Primerna so sveža jajca ali posušen jajčni beljak, ki je komercialno dostopen v obliki prahu. Le-tega moramo obvezno preskusiti na vonj in okus. Če ima vodna raztopina jajčnega beljaka vonj po amonijaku, je neuporabna.

#### Priprava 0,1 % raztopine jajčnega beljaka (sveža kurja jajca)

Beljak srednje velikega kurjega jajca stepemo v trd sneg, premešamo s 6 mL vode. Prefiltriramo skozi gosto staničevino in kvantitativno prenesemo v 1000 mL merilno bučko in dopolnimo do oznake z vodo.

Število porabljenih mL 0,1 % raztopine jajčnega beljaka v predposkusu (za 100 mL vina) nam pove število jajc, ki jih potrebujemo za glavno čiščenje 1 hL vina.

#### Priprava 0,1 % raztopine jajčnega beljaka (beljak v prahu)

V 500 mL erlenmajerico natehtamo 1 g beljaka v prahu, raztopimo v približno 500 mL vode in kvantitativno prenesemo v 1000 mL merilno bučko; dopolnimo do oznake z vodo.

Število porabljenih mL čistila v predposkusu za 100 mL vina odgovarja 1 g suhega jajčnega beljaka za glavno čiščenje 1 hL vina.

#### Izvedba predposkusa

V pet označenih epruvet z 10 mL vina po vrsti (po 0,1 mL razlike) dodamo od 0,1 mL do 0,5 mL 0,1 % raztopine jajčnega beljaka, kar za glavno čiščenje odgovarja količini dodatka 1-5 g/hL.

#### Glavno čiščenje

Običajno potrebujemo 2-5 svežih kurjih jajčk za glavno čiščenje 1 hL vina z jajčnim beljakom oziroma 8-14 g beljaka v prahu. Jajčni beljak stepemo v trd sneg in precedimo skozi gazo, medtem ko jajčni beljak v prahu raztopimo v manjši količini vode.

Jajčni beljak uporabljamo predvsem za čiščenje rdečih vin v količini od 2-8 beljakov/225 L (barrique sodček).

## 9.2 Čiščenje z želatino

### Uvod

V prodaji imamo želatino v obliki ploščic, lističev, prahu ali tekočine. Ne glede na obliko, je najpomembnejše, da je nevtralnega vonja in okusa. To preskusimo na sledeč način: 1 g želatine prelijemo z 200 mL vode; pustimo nabrekati 12 ur, po tem času jo raztopimo s segrevanjem na 40 °C. Raztopina želatine mora biti povsem brez vonja in nevtralnega okusa.

### Uporaba

Čiščenja z želatino se poslužujemo pri:

- oksidiranih belih vinih, ki so dalj časa ležala na drožeh;
- pri belih vinih z veliko vsebnostjo fenolnih spojin (grenkih in trpkih taninov);
- pri rdečih vinih, kjer se izogibamo modrega čiščenja.

Pri belih vinih vedno uporabljamo želatino kot dodatek k modremu čiščenju, ker pospeši izločanje kosmičev (običajno 3-4 g želatine/hL vina).

### Priprava 0,1 % raztopina želatine

1 g želatine raztopimo v približno 100 mL vode pri temperaturi 35-40 °C; s približno 700 mL vode raztopino kvantitativno prenesemo v 1000 mL merilno bučko; nato dodamo 150 mL 96 % raztopine etanola in dopolnimo do oznake z vodo.

Število porabljenih mL 0,1 % raztopine želatine v predposkusu (za 100 mL vina) nam pove količino želatine (g), ki jo potrebujemo za glavno čiščenje 1 hL vina.

### Predposkus z 0,1 % raztopino želatine

V pet označenih 100 mL merilnih valjev s 100 mL vina po vrsti dodamo 3 mL, 6 mL, 9 mL, 12 mL in 15 mL 0,1 % raztopine želatine. Najprej po 24 urah ugotavljamo čistilni učinek, ki odgovarja 3-15 g želatine/hL vina.

### Priprava 3 % raztopina želatine iz komercialno dostopne 30 % raztopine

V 100 mL merilno bučko odpipetiramo 10 mL komercialno 30 % raztopino želatine in dopolnimo do oznake z vodo.

Število porabljenih mL 0,1 % raztopine želatine v predposkusu (za 100 mL vina) nam pove količino želatine (g), ki jo potrebujemo za glavno čiščenje 1 hL vina.

### Predposkus z 3 % raztopino želatine

V tri označene stekleničke s 100 mL vina po vrsti dodamo 0,9 mL, 1,8 mL in 2,7 mL 3 % raztopine želatine. Po 24 urah ugotavljamo čistilni učinek, ki odgovarja dodatku osnovne 30 % raztopine želatine 9-27 mL/hL vina, kolikor tudi priporoča proizvajalec sredstva.

### Glavno čiščenje

S predposkusom določeno količino želatine v obliki ploščic ali lističev nabrekamo v hladni vodi 5-6 ur (razmerje želatina:voda = 1:100). Po nabrekanju segrejemo raztopino želatine na 35-40 °C in ob stalnem mešanju dodamo v sod. Običajno potrebna količina za čiščenje je 3-15 g suhe želatine/hL, v zadnjih letih pa se uporablja predvsem koncentrirana 30 % raztopina, katere je potrebno dodati 10-30 g/hL (oziroma 9-27 mL/hL).



### 9.3 Čiščenje z agarjem

#### Uvod

V prodaji imamo agar v obliki dolgih vlaken ali prahu. Ne glede na obliko mora biti brez barve, vonja in okusa, kar preskusimo na sledeč način: 1 g agarja prelijemo z 200 mL vode; pustimo 5-6 ur nabrekati in po tem času raztopimo s segrevanjem do vrenja. Vrela raztopina agarja mora biti povsem brez barve, vonja in nevtralnega okusa. Po ohladitvi na sobno temperaturo dobimo želatini podobno snov.

#### Priprava 0,1 % raztopine agarja

1 g agarja raztopimo v približno 100 mL vode in pustimo nabrekati 24 ur. Po tem času dodamo ob stalnem mešanju približno 700 mL vroče vode in vse skupaj segrevamo približno 10 min. blizu temperature vrelišča. Po ohladitvi raztopino kvantitativno prenesemo v 1000 mL merilno bučko in dopolnimo do oznake z vodo.

Število porabljenih mL 0,1 % raztopine agarja v predposkusu (za 100 mL vina) nam pove količino agarja (g), ki jo potrebujemo za glavno čiščenje 1 hL vina.

#### Predposkus

V pet označenih 100 mL merilnih valjev s 100 mL vina po vrsti dodamo 5, 10, 15, 20 in 25 mL 0,1 % raztopine agarja, ki smo jo predhodno segreti na vodni kopeli. Dobro premešamo in po 24 urah ugotavljamo čistilni učinek, ki odgovarja 5-25 g agarja/hL vina.

#### Glavno čiščenje

S predposkusom določeno količino agarja nabrekamo v hladni vodi 24 ur (razmerje agar:voda = 1:100). Po nabrekanju raztopino agarja dodajamo ob stalnem mešanju vroči vodi, dokler ne dobimo 1 % raztopine (npr. za 25 g agarja moramo dodati do 2,5 L vroče vode). To raztopino segrejemo do vrenja in jo razredčimo z vročim moštom ali vinom (odvisno kaj čistimo) v razmerju 1:1, tako da dobimo 0,5 % raztopino. Ohladimo na 80 °C in ob stalnem mešanju dodamo v mošt ali vino. Po 24 urah ponovno premešamo, po 4 do 5 dneh pa pretočimo ali filtriramo.

### 9.4 Čiščenje s kalijevim kazeinatom

#### Uvod

Kazein ali kalijev kazeinat se najpogosteje uporabljata za izboljšanje barve oksidiranih belih vin, dodatno pa poleg barve odstranita tudi oksidativni ton; pogovorno govorimo, da je to sredstvo primerno za revitalizacijo oksidiranih vin. Mlečna beljakovina kazein vpliva na izboljšanje bistrosti, porjavenje in zmanjšanje grenkobe (zlasti dalj časa maceriranih ali starejših vin). Je nežno čistilno sredstvo, bistveno manj učinkovito v primerjavi za aktivnim ogljem ali kombiniranim čistilom. Ima vpliv tudi na zmanjšanje kovinskih ionov in sicer bakrovih do 45 % ter železovih do 60 %. Ker je mlečni kazein slabo topen v kislem (za dehidracijo je potrebna voda s pH nad 8), je v praksi najpogosteje uporabljen kalijev kazeinat, ki ga raztopimo direktno v vodi. V obeh primerih je potrebno počasno in temeljito mešanje, saj le tako preprečimo prečiščenje (da preostane nezreagirano sredstvo v vinu).

### **Priprava 1 % raztopine K-kazeinata**

1 g K-kazeinata raztopimo v približno 100 mL vode, ogrete na 40 °C in pustimo nabrekati preko noči oziroma največ do 24 ur. Po nabrekanju dopolnimo merilno bučko do oznake z vodo. Tako pripravljena raztopina je obstojna 1-2 dni.

### **Predposkus**

V pet označenih epruvt z 10 mL vina po vrsti dodamo 0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL in 1,0 mL 1 % raztopine K-kazeinata. Dobro premešamo in po 24-48 urah ugotovljamo čistilni učinek, ki odgovarja 20-100 g kalijevega kazeinata/hL vina.

### **Glavno čiščenje**

S predposkusom določeno količino K-kazeinata nabrekamo v mlačni vodi 24 ur (v razmerju 1:100). Pripravljeno raztopino ob stalnem mešanju dodamo v vino. Običajno so v praksi za glavno čiščenje potrebne količine kalijevega kazeinata 50-100 g/hL, za starikava in oksidirana vina pa 20-60 g/hL.

## **9.5 Modro čiščenje (stabilizacija vina na težke kovine)**

### **Uvod**

Motnosti sivega in črnega loma so že od nekdaj povzročale v kletarstvu veliko težav, ker se z nežnejšimi čistilnimi sredstvi, kot sta želatina in ribji mehur, niso učinkovito odstranile. Kljub filtraciji je pogosto prišlo do ponovne motnosti. Leta 1909 sta Baragiola in Saborde ugotovila, da povzročajo sivi in črni lom vina železove spojine, ki med zorenjem vina preidejo v netopno oksidacijsko obliko in se izločajo v obliki finih, tančici podobnih motnih delcev. Pri sivem lomu gre za železove spojine s fosforjem (ferifosfate), pri črnem lomu pa za železove spojine s tanini (feritanate).

Predpogoj za uspešnost modrega čiščenja je analiza vina s predposkusom, kajti v vino ne smemo dodati niti premajhne (ne dosežemo zelenega čistilnega učinka), še manj pa previsoke količine kalijevega ferocianida (le-ta se lahko zaradi organskih kislin v vinu razgradi v strupene snovi).

Dodan kalijev ferocianid ( $K_4Fe(CN)_6$ ) se veže z železom najprej v topno berlinsko modrilo ( $KFe_2(CN)_6$ ), ki tvori temno modre koloidne kosmiče. Zaradi prebitne količine feri soli ( $FePO_4$ ) postopoma preide v vodi netopno berlinsko modrilo ( $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ ), ki je topno le v razredčeni oksalni kislini (modra tinta).

S kalijevim ferocianidom reagirajo tudi bakrovi ( $Cu_2Fe(CN)_6$ ), cinkovi ( $Zn_2Fe(CN)_6$ ) in manganovi ioni ( $K_2MnFe(CN)_6$ ). Z bakrom se tvori rdeče-rjava, s cinkom pa bela oborina.

### **Uporaba**

- pri vinih z večjo vsebnostjo železovih ionov (več kot 7-10 mg/L);
- pri vinih z večjo vsebnostjo bakrovih ionov (škropljenje z modro galico), ki imajo poleg bakrene motnosti tudi zelo trpek okus;
- pri vinih z večjo vsebnostjo cinkovih in manganovih ionov;
- pri okusu vina po kovinah;
- pri okusu vina po zmrzali.

Z analizami je dokazano, da se pri čiščenju s kalijevim ferocianidom izločajo tudi dušikove spojine, predvsem beljakovine, ki so jih v preteklosti odstranjevali le z večkratnimi pretoki. Pri modrem

čiščenju ne pride do direktne vezave kalijevega ferocianida na beljakovine, ampak jih na principu adsorpcijske sposobnosti veže nase nastalo berlinsko modrilo in se vse skupaj sesede na dno posode. Z modrim čiščenjem lahko torej posredno vplivamo tudi na hitrejšo zorenje vina.

V vinu se koncentracija železa nahaja med 5-25 mg/L. Pri vinih, ki med predelavo grozdja in pridelavo vino niso prišla v stik z železom, je običajna koncentracija manjša (4-7 mg/L). Za izločanje 1 g železa v feri obliki potrebujemo 5,6720 g, za izločanja 1 g železa v fero obliki pa 7,5643 g K-ferocianida trihidrata,  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ . Količina, ki jo potrebujemo za modro čiščenje se giblje med 30-150 mg/L oziroma med 3-15 g/hL vina.

Ker se železo nahaja v vinu v dveh oblikah ( $Fe^{2+}$  in  $Fe^{3+}$ ) ni mogoče na podlagi kemijske analize ugotoviti točne količine K-ferocianida, potrebne za čiščenje vina. Le-to ugotovimo na osnovi predposkusa, pri čemer zajamemo tudi v vinu nahajajoče se ostale kovine (Cu, Zn, Mn).

### Beli ali modri lom

Beli ali modri lom temelji na izločanju železovih spojin v obliki ferifosfata. V vinu se najprej pojavi bela motnost v obliki belega pajčolana, ki sčasoma preide v modro barvo vina in se izloči v obliki belo-sivo-vijolične usedline. K tej obliki loma so nagnjena vina, siromašna na kislinah ter bogata na železu in alkoholu. Vina, ki vsebujejo veliko fosforne kisline nagibajo ob prisotnosti železa k belemu lomu. Pogosto opazimo tudi nekoliko temnejšo barvo vina zaradi primesi usedlin črnega loma. Lahko pride tudi do obeh lomov hkrati; v tem primeru je usedlina temno sive barve in govorimo o sivem lomu.

Pri tem ne smemo pozabiti, da železo ne povzroča le motnosti vina oziroma lome, ampak vino tudi stara, obarva, pri rdečih vinih pa dodatno pospešuje izločanje barvnih snovi (vina nagibajo k rjavkastim odtenkom rdeče barve). Ker je železo kot katalizator udeleženo pri številnih kemijskih reakcijah, nam prekrije fine snovi okusa in močno poslabša kakovost aromatičnih vin.

### Črni lom

Črni lom sloni na vezavi železa s fenolnimi spojinami (tanini) in izločanju v obliki feritanatov. K tej obliki loma nagibajo vina, siromašna na kislinah, bogata na taninskih snoveh in kovinah, zlasti železu. Vino se obarva temno-sivo do črno. S tem lomom se pogosteje kot pri vinu srečujemo pri jabolčniku in hruškovcu.

### Bakreni lom

Bakreni lom vina povzroči izločena, rdeče-rjavo obarvana usedlina bakrovega(I) oksida, predvsem v močno žveplanih vinih, bogatih na bakru (ostanki fungicidov, kletarska oprema, posoda in predelovalni stroji). Bakrove spojine (soli) so strupene in povzročajo neprijeten kovinski okus. Modro čiščenje zaradi bakrovega loma pride v poštev zlasti pri stekleničenju nepovretilih moštov, tj. sadnih sokov, kjer ni potekla alkoholna fermentacija. Značilno je, da med alkoholno fermentacijo kvasovke resorbirajo baker, ki ga odstranimo s prvim pretokom mladega vina. Baker tvori s kalijevim ferocianidom rdeče-rjavo oborino bakrovega ferocianida, ki se pri modrem čiščenju izloča za cinkom in pred železom.

### Kovinski okus

Je trpek, dolgo trajajoč priokus po kovinah. Z njim se srečamo v vinih, kjer je koncentracija bakra in cinka več kot 5 mg/L. Soli teh kovin so strupene in povzročajo pri občutljivih ljudeh težke prebavne motnje. Nasprotno pa soli železa niso strupene in jih v vinu zaznamo le, če so prisotne v velikih koncentracijah, ko povzročajo priokus po črnilu ali tinti. Vse omenjene priokuse korigiramo z modrim čiščenjem, medtem ko soli drugih kovin (svinca in aluminija) ne moremo nevtralizirati s K-ferocianidom.

### **Raztopine za izvedbo predposkusa**

0,1 % raztopina kalijevega ferocianida,  $K_4Fe(CN)_6$ : v 200 mL merilno bučko natehtamo 0,2 g K-ferocianida, raztopimo v manjši količini vode in dopolnimo do oznake. V predposkusu porabljeni mL K-ferocianida/100 mL vina odgovarjajo v glavnem poskusu 1 g  $K_4Fe(CN)_6$ /hL vina.

0,1 % raztopina tanina: 1 g tanina raztopimo v manjši količini vode, kvantitativno prenesemo v 1000 mL merilno bučko, dodamo 150 mL 96 % raztopine etanola in dopolnimo do oznake z vodo.

0,1 % raztopina želatine: 1 g želatine v lističih raztopimo v manjši količini vode (100 mL), ogrete na 35-40 °C. Raztopino kvantitativno prenesemo s 700 mL vode v 1000 mL merilno bučko, dodamo 150 mL 96 % raztopine etanola in dopolnimo do oznake z vodo.

10 % raztopina kalijevega fero-fericianida = reagent za določanje železa: v 100 mL merilno bučko natehtamo 5 g K-ferocianida in 5 g K-fericianida, raztopimo in dopolnimo do oznake z vodo. Če dodamo 1-2 kapljici tega reagenta vinu, ki je nakisano s HCl; če vino še vsebuje železo, se obarva temno zeleno do modro.

Nasičena raztopina kalijevega feriamonsulfata = reagent za dokazovanje prebitne količine  $K_4Fe(CN)_6$ : v 100 mL vode v merilni bučki dodamo toliko K-feriamonsulfata, da se kristali ne raztapljajo več. Bistro raztopino pretočimo v drugo merilno bučko. Če dodamo 1-2 kapljici tega reagenta vinu, ki je nakisano s HCl; če vino še vsebuje K-ferocianid (nevezani), se vino obarva modro.

10 % raztopina klorovodikove kisline: v 1000 mL merilno bučko nalijemo vodo, previdno dodamo 230 mL HCl (relativna gostota 1,19) in dopolnimo do oznake z vodo.

### **Predposkus**

V pet oštevilčenih epruvet odpipetiramo 10 mL vina in po vrsti dodajamo 0,3 mL, 0,6 mL, 0,9 mL, 1,2 mL in 1,5 mL 0,1 % raztopine K-ferocianida, kar odgovarja v glavnem čiščenju od 3-15 g  $K_4Fe(CN)_6$ /hL vina. V vsako epruveto dodamo 1 mL 0,1 % raztopine tanina, takoj premešamo in dodamo 1 mL 0,1 % raztopine želatine; dobro premešamo. Epruvete postavimo po vrstnem redu v stojalo. Nastaja usedlina, katero po 1 uri prefiltriramo (skozi filter z modrim trakom), da dobimo povsem bister filtrat, ki ga razdelimo na dva enaka dela. Da se izognemo pomoti, postavimo epruvete ponovno po vrstnem redu v stojalo tako, da imamo v prvi vrsti epruvete za določanje prostega železa, v drugi pa za dokazovanje prebitne količine K-ferocianida.

V prvo epruveto dodamo 1 mL 10 % raztopine HCl in 1-2 kapljici 10 % raztopine kalijevega fero-fericianida. Če nastopi zeleno ali modro obarvanje, vsebuje vino še prosto železo.

V drugo epruveto dodamo prav tako 1 mL 10 % raztopine HCl in 1-2 kapljici nasičene raztopine kalijevega feriamonsulfata. Če ni opazne nobene spremembe v barvi vina, le-to vsebuje preveč K-ferocianida.

Primer: Če ugotovimo pri dodatku K-fero-fericianida v 4.epruveti še prosto železo in pri dodatku K-feriamonsulfata v 5.epruveti še prosti K-ferocianid, to pomeni, da se nahaja potrebna količina K-ferocianida med 4. in 5.epruveto oziroma med 1,2-1,5 g/hL.

Ponovno nastavimo predposkus z 10 mL vina v štirih epruvetah, katerim dodajamo po 1,2 mL, 1,3 mL, 1,4 mL in 1,5 mL 0,1 % raztopine K-ferocianida. V vsako epruveto dodamo 1 mL 0,1 % raztopine tanina, takoj premešamo, dodamo 1 mL 0,1 % raztopine želatine in dobro premešamo. Po 1 uri prefiltriramo (skozi filter z modrim trakom) in ponovimo reakciji na prosto železo in prebitno količino K-ferocianida.

Primer: Če ugotovimo, da je vzorec v 3.epruveti očiščen, v 4.epruveti pa prečiščen, potem potrebujemo za glavno čiščenje 14 g/hL. Iz previdnosti uporabimo 2 g/hL manj, torej 12 g kalijevega ferocianida/hL vina.

### Izvedba modrega čiščenja v kleti

V predposkusu določeno količino K-ferocianida raztopimo v 3-kratni količini vode. Prelijemo z manjšo količino vina in dodamo v sod ali tank, najbolje s prečrpavanjem, da čistilo enakomerno porazdelimo po celotni prostornini. Če modro čiščenje kombiniramo s taninom in želatino, potem moramo vinu najprej dodati tanin, nato kalijev ferocianid in nazadnje želatino. Običajno se vino očisti v nekaj dneh. Najkasneje po 2-3 tednih vino pretočimo in obvezno tudi filtriramo, sicer se nam lahko naknadno v stekleničenem vinu izločajo modri kosmiči. Če je vino s kalijevim ferocianidom prečiščeno, je neuporabno (ne sme se uporabljati niti za žganjekuho, niti za kis). Pravilno očiščeno vino ostane čisto in se ne obarva. Samo prečiščena vina se obarvajo modro-zeleno.

V praksi izvajamo modro čiščenje 4-6 tednov pred stekleničenjem vina. Pri rdečih vinih je modro čiščenje manj pogosto, kot pri belih vinih. Velik pomen ima modro čiščenje pri pridelavi penečih vin, kjer je sekundarna alkoholna fermentacija, zaradi nizkega oksidacijsko-redukcijskega potenciala, katerega vzrok so velike količine železa, otežena ali onemogočena.

Če modro čiščenje izvajamo v leseni posodi, je potrebno sode po končanem čiščenju temeljito sprati z 2 % raztopino sode ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

## PRAKTIČNA IZVEDBA ČISTILNEGA POSKUSA 1

Vsa čiščenja delajo študenti v paru (po dva skupaj)

Sredstvo (% raztopine, w/v)	Steklovina Volumen vina (mL)	Dodatek raztopine sredstva (mL)	Potrebna količina osnovnega čistila za glavno čiščenje (g/hL oz. mL/hL)
0,1 % raztopina jajčnega beljaka	5 epruvet po 10 mL vina	0,1-0,2-0,3-0,4-0,5	1-5 g/hL
3 % raztopina želatine (pripravljena iz 30 % osnovne raztopine)	3 stekleničke po 100 mL vina	0,9-1,8-2,7	9-27 mL/hL (30 % raztopina HYDRO- CLAR H)
0,1 % raztopina agarja	5 epruvet po 10 mL vina	0,5-1,0-1,5-2,0-2,5	5-25 g/hL
1 % raztopina K-kazeinata	5 epruvet po 10 mL vina	0,2-0,4-0,6-0,8-1,0	20-100 g/hL (Protoklar K)
0,1 % raztopina K- heksacianoferata (modro čiščenje)	5 epruvet po 10 mL vina	0,3-0,6-0,9-1,2-1,5	3-15 g/hL

### OBVEZNO:

– shraniti kontrolni vzorec vina (100 mL) v stekleničko za ovrednotenje čistilnih poskusov

Čistilni poskus 1 obsega čiščenja s čistilnimi sredstvi, opisanimi v točkah 9.1-9.5.

## 9.6 Čiščenje z ogljem

### Uvod

Oglje ne sme oddati v vino barvnih ali drugih snovi, vonja in okusa, kar preskusimo na sledeč način: 5 g oglja prelijemo s 100 mL vode; počakamo 2 uri. Med tem časom filter papir temeljito speremo z vodo (večkrat), da v filtratu ne zaznamo vonja in okusa po papirju, celulozi. Čez ta filter prefiltriramo raztopino oglja in dobljen filtrat ocenimo na barvo, vonj in okus.

### Priprava 10 % raztopine oglja

V 100 mL merilno bučko odpipetiramo 10 mL 96 % raztopine etanola, dodamo 80 mL vode in 10 g oglja. Dobro premešamo in dopolnimo do oznake z vodo. Dodatek 1 mL tako pripravljene 10 % raztopine v 100 mL vina odgovarja 100 g/hL (kar je tudi največja še dopustna količina sredstva), oziroma dodatek 0,1 mL/100 mL vina odgovarja količini oglja za glavno čiščenje 10 g/hL.

### Predposkus

V tri označene 100 mL merilne valje po vrsti dodamo 0,2 mL, 0,4 mL in 0,6 mL 10 % raztopine oglja ter prelijemo s 100 mL vina. Dobro premešamo, valj zamašimo z gumijastim zamaškom in dodatno prekrijemo še s parafilmom. Valje položimo v vodoraven položaj, po 48 urah pa jih postavimo pokončno. Ko se oglje sesede na dno, ugotavljamo čistilni učinek in sicer ocenimo barvo, vonj in okus v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Pravilna je tista količina oglja, ki nam zadostuje za odstranitev napake v vonju in okusu, brez večjega vpliva na barvo.

V predposkusu uporabljene količine oglja za 100 mL vina odgovarjajo za glavno čiščenje dodatku 20-60 g oglja/hL vina. Proizvajalec priporoča količino dodatka 10-100 g/hL.

### Glavno čiščenje

S predposkusom določeno količino oglja dodamo v vino ob stalnem mešanju (najbolj učinkovito je prečrpavanje), po 6 urah celotno količino vina ponovno prečrpamo. Po 2 do 3 dneh dodamo še 2 g tanina/hL vina + 2 g želatine/hL vina. Po tem dodatnem čiščenju vino pretočimo.

### Uporaba

Oglje je izredno nespecifično in agresivno čistilno sredstvo, ki zelo osiromaši mošt ali vino na aromatičnih in ekstraktnih snoveh. Poslužujemo se ga pri vseh napakah vonja in okusa (po lepilu, petroleju, zmrzali, dimu, plesni, idr.) tako belih kot rdečih vin. Vina z visoko barvo lahko z ogljem tudi razbarvamo.

## 9.7 Čiščenje s kombiniranim čistilom

### Uvod

Ker je aktivno oglje eno izmed najbolj agresivnih in nespecifičnih čistilnih sredstev, se na tržišču pojavljajo t.i.m. kombinirana čistilna sredstva, ki v svoji sestavi poleg oglja vsebujejo še npr. bentonit, želatino, jajčni beljak, idr. Osiromašenje vina na barvnih ali drugih pomembnih snovi za vonj in okus naj bi bilo po čiščenju s kombiniranim sredstvom značilno manjše v primerjavi z ogljem. Tudi pri teh sredstvih se priporoča, da jih predhodno preskusimo na sledeč način: 5 g kombiniranega sredstva prelijemo s 100 mL vode in počakamo 2 uri. Med tem časom filter papir temeljito speremo z vodo (večkrat), da v filtratu ne zaznamo vonja in okusa po papirju ali celulozi. Čez ta filter prefiltriramo raztopino kombiniranega sredstva in dobljen filtrat ocenimo na barvo, vonj in okus.

### Priprava 10 % raztopine kombiniranega sredstva

V 100 mL merilno bučko odpipetiramo 10 mL 96 % raztopine etanola, dodamo 80 mL vode in 10 g kombiniranega sredstva. Dobro premešamo in dopolnimo do oznake z vodo. Dodatek 0,1 mL tako pripravljene 10 % raztopine v 100 mL vina odgovarja količini kombiniranega sredstva za glavno čiščenje 10 g/hL.

### Predposkus

V tri označene 100 mL merilne valje po vrsti dodamo 0,2 mL, 0,4 mL in 0,6 mL 10 % raztopine kombiniranega sredstva ter prelijemo s 100 mL vina. Dobro premešamo, valj zamašimo z gumijastim zamaškom in dodatno prekrijemo še s parafilmom. Valje položimo v vodoraven položaj, po 48 urah pa jih postavimo pokončno. Ko se sredstvo sesede na dno, ugotavljamo čistilni učinek in sicer ocenimo barvo, vonj in okus v primerjavi s kontrolnim vzorcem vina in vzorcem, čiščenim samo z ogljem. Pravilna je tista količina kombiniranega sredstva, ki nam zadostuje za odstranitev napake v vonju in okusu, brez večjega vpliva na barvo.

V predposkusu uporabljene količine kombiniranega sredstva za 100 mL vina odgovarjajo za glavno čiščenje dodatku 30-90 g/hL vina. Proizvajalec priporoča količino dodatka 50-150 g/hL, kar pa je po naših izkušnjah absolutno preveč.

## 9.8 Čiščenje z bentonitom (stabilizacija na termolabilne beljakovine)

### Uvod

Vina, pri katerih smo s toplotnim testom ugotovili prisotnost termolabilnih beljakovin, stabiliziramo oz. čistimo z bentonitom.

### Toplotni test

Če vino nagiba k opalescenci in motnosti, ki je posledica prisotnosti termolabilnih beljakovin (nestabilnih koloidnih delcev), to najhitreje ugotovimo s segrevanjem. V 250 mL erlenmajerico damo 100-150 mL vina in segrevamo na vodni kopeli pri temperaturi 70 °C 15 minut. Med segrevanjem je potrebno stalno mešanje in kontrola temperature. Če se po ohlajanju vina na sobno temperaturo pojavi motnost, je potrebno čiščenje z bentonitom. Motnost vizualno ocenimo v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

### **Priprava 5 % raztopine bentonita**

V 100 mL merilni bučki segrejemo 85 mL vode na 60 °C; med mešanjem dodamo 5 g bentonita. Pustimo, da suspenzija bentonita nabrekne preko noči oziroma največ do 24 ur, potem pa merilno bučko dopolnimo do oznake z vodo. Če bentonit po tem času ni popolnoma raztopljen, pred dopolnitvijo z vodo ponovno ogrejemo suspenzijo na 60 °C. Pred uporabo pripravljeno raztopino dobro premešamo.

### **Predposkus**

V tri označene stekleničke dodamo najprej po 0,4 mL, 0,8 mL in 1,2 mL 5 % raztopine bentonita in potem prelijemo z 200 mL vzorca vina. Dobro premešamo in pustimo stati najmanj 1-2 dni pri sobni temperaturi (tudi med tem časom je priporočljivo večkratno mešanje). Po 2 dneh tako očiščeno vino kot kontrolni vzorec prefiltriramo (skozi filter z modrim trakom) in filtrat razdelimo na dva dela:

- z najmanj 20 mL filtrata opravimo toplotni test; po ohladitvi na sobno temperaturo vizualno ocenimo motnost;
- 10 mL filtrata dodamo bentoreagent (1 mL), premešamo, po 10 minutah pa opazujemo motnost in barvo.

Dodani mL 5 % raztopine v predposkusu odgovarjajo dodatku bentonita za glavno čiščenje v količini 10-30 g/hL.

Primer: Če vzorec, čiščen z 0,4 mL 5 % raztopine bentonita postane moten, z 0,8 g in 1,2 mL pa ne, potem za glavno čiščenje uporabimo 0,8 mL oziroma 20 g bentonita/hL vina.

### **Glavno čiščenje**

S predposkusom določeno količino bentonita dodamo ob stalnem mešanju v manjšo količino vina in pustimo stati 1-2 uri. Dobro premešamo in ob stalnem mešanju dodamo k preostali količini vina. Po približno 6 urah ponovno premešamo ali prečrpamo. Vino pustimo 12 ur; če je potrebno, po tem času izvedemo modro čiščenje, sicer pa vino pretočimo ali prefiltriramo. Čiščenje vina z bentonitom uspešno kombiniramo z želatino in taninom.

Bentonit je predvsem sredstvo za doseg beljakovinske stabilnosti belih vin. V manjših količinah se uporablja tudi za rose in rdečkasta vina, zelo redko pa v rdečih vinih. Za nespecifični bentonit, ki se uporablja do 100 g/hL je značilno, da v količini 10-20 g/hL lahko odstrani presežek bakrovih ionov po čiščenju vina z bakrovim sulfatom, ali pa »popravi« nestabilno barvo v mladih rdečih vinih.

## **9.9 Čiščenje s polivinilpolipirrolidonom (PVPP)**

### **Uvod**

PVPP je novejša adsorpcijsko čistilno sredstvo, katerega uporaba je dovoljena od leta 1971. V prodaji se nahaja tudi pod oznako Polyclar®AT. Številna sredstva imajo določeno afiniteto do posameznih fenolnih spojin. S povečano adsorpcijsko sposobnostjo se adsorbirajo predvsem težko topne substance, ob istočasni adsorpciji lažje topnih snovi. Tako npr. kremenčeva siga adsorbira visoko molekularne beljakovine, bentonit pa razen teh tudi nizko molekularne termolabilne beljakovine. V primerjavi z omenjenimi nespecifičnimi čistilnimi sredstvi je PVPP specifično čistilno sredstvo za fenolne spojine (tanine, antocianine, idr.). Hitrost adsorpcije fenolnih snovi s PVPP je odvisna od koncentracije. Praviloma je adsorpcija končana po 9. minutah pri temperaturi



3 °C. Vpliv temperature na hitrost adsorpcije je neznaten: npr. pri 27 °C se hitrost podaljša le za 10 %.

Čiščenje s PVPP se lahko opravlja med alkoholno fermentacijo ali po njej. Ugotovljeno je, da je čiščenje med samim potekom alkoholne fermentacije ugodnejše: vina so bolj sveža in bogatejša na aromatičnih snoveh. V primerjavi z najlonom ima PVPP za 2/3 do 3/4 večji čistilni učinek.

V prodaji se nahaja kot bel prah, ki ga lahko dodamo direktno v vino ali pa ga predhodno raztopimo v manjši količini vina. V obeh primerih je potrebna dobra porazdelitev čistilnega sredstva (z mešalci ali s prečrpavanjem). V praksi se računa, da v času 1-2 ur reagirajo fenolne spojine s PVPP. Za njihovo sedimentacijo na dno pa je potrebno počakati 1-3 dni, odvisno od količine vina. Čistilo odstranimo s pretokom ali filtracijo. Čiščenje lahko kombiniramo tudi z bentonitom, vendar najprej izvedemo čiščenje s PVPP.

### **Uporaba**

- zlasti za čiščenje belih vin z veliko vsebnostjo trpkih fenolov;
- pri močno oksidiranih belih vinih, kjer je poleg barve prizadet tudi okus;
- za čiščenje rdečih vin za odstranitev neželenih barvnih snovi.

Brez škode za kakovost vina lahko uporabimo do 250 g PVPP/hL vina (kot Polyclar<sup>®</sup> AT), čeprav nam običajno za stabilizacijo belega vina zadostuje 30-70 g/hL v kombinaciji z žveplanjem (z žveplovo(IV) kislino), za stabilizacijo barve rdečega vina pa 10-25 g/hL.

### **Priprava 10 % raztopine PVPP**

V 100 mL merilno bučko odpipetiramo 10 mL 96 % raztopine etanola, dodamo 80 mL vode in 10 g PVPP. Dobro premešamo in dopolnimo do oznake z vodo. Dodatek 0,1 mL tako pripravljene 10 % raztopine PVPP v 10 mL vina odgovarja količini sredstva za glavno čiščenje 100 g/hL.

### **Predposkus**

V pet označenih epruvet z 10 mL vina po vrsti dodamo od 30, 40, 50, 60 in 70 µL 10 % raztopine PVPP (Polyclar<sup>®</sup> AT). Po 2 urah že lahko odčitamo čistilni učinek in določimo količino, ki je potrebna za čiščenje 1 hL vina v glavnem poskusu, medtem ko je za potrditev te količine potrebno izvesti še pH-7 test (najprej po 24 urah) tako očiščenega kot kontrolnega vzorca, katera je potrebno pred izvedbo testa obvezno prefiltrirati skozi filter z modrim trakom.

Ker za izvedbo pH-7 testa potrebujemo večjo količino vzorca (20 mL), je bolje opravljati predposkus v treh označenih stekleničkah, kamor dodamo po vrsti po 0,3-0,7 mL 10 % raztopine PVPP in prelijemo s 100 mL vina. Naprej postopamo enako, kot je opisano zgoraj. Uporabljene količine v predposkusu odgovarjajo količini dodatka za glavno čiščenje 30-70 g/hL.

Znano je, da vina vsebujejo zelo različne koncentracije fenolnih spojin (taninov). Pri nevtralni točki (pH 7,0) se bela vina različno obarvajo od rdeče-rjave, sivo-vijolične do črne barve. Barva je tem intenzivnejša, čim več vsebuje vino različnih fenolnih spojin ob prisotnosti železa (železovih ionov). Vino je lahko zelo bogato na fenolnih spojinah, vsebuje pa malo železa; zato pri nevtralni točki ostane barva tega vina praktično nespremenjena. Za izrazitejši kontrast dodamo kapljico železovega amonsulfata (amonijevega železovega(II) sulfata(VI), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·FeSO<sub>4</sub>).

## VIZUALNO OCENJEVANJE VSEBNOSTI FENOLOV (pH-7 test)

### Princip

Schanderl (1962) je predlagal enostaven test za ugotavljanje vsebnosti fenolov v belih in penečih vinih (cuveés). Test vključuje dodatek amonijevega železovega(II) sulfata(VI) v vzorec, kateremu je pH predhodno uravnan na vrednost 7,0. Vsebnost fenolov vizualno ocenimo na osnovi barve obarvanega reakcijskega kompleksa.

### Oprema

- 15-20 mL epruvete
- polnilne pipete
- kapalka
- pH meter

### Reagenti

- 1-2 % (m/v) raztopina amonijevega železovega(II) sulfata(VI),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4$
- 1 M (ali 0,1 M) raztopina natrijevega hidroksida, NaOH

### Postopek

1. 10 mL bistrega vzorca belega ali osnovnega vina uravnamo pH vrednost na 7,00 z dodatkom 1 M raztopine natrijevega hidroksida
2. nevtraliziranemu vzorcu dodamo 2 kapljici 1-2 % raztopine amonijevega železovega(II) sulfata(VI)
3. premešamo in opazujemo barvo:
  - rumena barva  $\Rightarrow$  majhna koncentracija fenolov
  - črna ali temno vijolična barva  $\Rightarrow$  prisotnost galne kisline
  - rdeča ali rdeče-rjava barva  $\Rightarrow$  prisotnost katehinov
  - rdeče-rjava oborina  $\Rightarrow$  prisotnost elaginske kisline
4. za boljšo primerjavo in kvantifikacijo vsebnosti fenolov je zelena priprava ustreznih standardov

## 9.10 Čiščenje s silicijevim dioksidom ( $\text{SiO}_2$ )

### Uvod

Silicijev dioksid (imenovan tudi silikatna kislina, koloidna kremenčeva kislina ali Kieselsol) je čistilno sredstvo, ki so ga začeli uporabljati v Nemčiji po letu 1940 namesto tanina, v Evropi pa je njegova uporaba dovoljena od leta 1977. Njegova začetna uporaba kot nadomestno čistilo je pokazala, da ima zelo mnogovrsten učinek:

- šibko delovanje na izločanje beljakovin;
- delovanje na izločanje fenolnih spojin (trpkost in grenkoba);
- vpliva ugodno na bistrenje in daje kompaktno usedlino;
- v kombinaciji z želatino vpliva tudi na izboljšanje okusa vina;
- uporablja se lahko v kombinaciji z ostalimi čistili (bentonitom, K-ferocianidom).

V prodaji ga dobimo kot 15 % raztopino (relativna gostota 1,09) ali 30 % raztopino (relativna gostota 1,2 in  $\text{pH} \approx 9$ ). Za čiščenje vina se najbolj priporoča 30 % koloidna raztopina z velikostjo delcev  $\approx 0,12 \mu\text{m}$  v kombinaciji z želatino v volumenskem razmerju 1 del želatine na 5-10 delov  $\text{SiO}_2$ . Če imamo na razpolago 15 % raztopino  $\text{SiO}_2$ , potem uporabimo razmerje 1:12 do 1:15.

Silicijev dioksid najpogosteje uporabljamo za čiščenje belih vin z manj tanina.

### **Raztopine**

1,5 % raztopina silicijevega dioksida: v 1000 mL merilno bučko odmerimo 100 mL 15 % raztopine ali 50 mL 30 % raztopine  $\text{SiO}_2$  raztopimo v manjši količini destilirane vode in z njo dopolnimo do oznake. (Firma Bayer priporoča za predposkus pripravo 3 % raztopine  $\text{SiO}_2$  s komercialnim imenom Baykisol tako, da sredstvo pomešamo z destilirano vodo v razmerju 1:9).

0,1 % raztopina želatine: 1 g želatine raztopimo v približno 100 mL vode pri temperaturi 35-40 °C; s približno 700 mL vode raztopino kvantitativno prenesemo v 1000 mL merilno bučko, dodamo 150 mL 96 % raztopine etanola in dopolnimo do oznake z vodo.

### **Predposkus**

V tri oštevilčene merilne valje s 100 mL vina dodamo po vrsti najprej 2, 4 in 6 mL 0,1 % raztopine želatine in nato ustrezno količino 1,5 % raztopine  $\text{SiO}_2$  v razmerju npr. 1:13 (običajno razmerje je 1:10-15), kar odgovarja 0,26 mL, 0,52 mL in 0,78 mL.

Če nam je že od predposkusa z želatino znana določena količina želatine (npr. 5 g/hL) za glavno čiščenje, lahko izvedemo predposkus le z različnimi količinami  $\text{SiO}_2$  v treh različnih razmerjih (1:5, 1:10 in 1:15).

Namesto zgoraj opisane 1,5 % raztopine  $\text{SiO}_2$  lahko uporabimo tudi 3 % raztopino, ki si jo tik pred uporabo pripravimo iz komercialno dostopne 15 ali 30 % raztopine. Ne glede na koncentracijo  $\text{SiO}_2$  je potrebno raztopino pred dodatkom vedno premešati. V primeru predposkusa s 3 % raztopino, le-to dodamo z avtomatsko pipeto v tri označene epruvete, v naslednjih količinah: 0,375 mL, 0,75 mL in 1,125 mL, prelijemo s 15 mL vina in dobro premešamo. Za ugotavljanje čistilnega učinka kombinacije čiščenja  $\text{SiO}_2$  in želatine hkrati, ju uporabimo v razmerju 5:1, kar pomeni, da pri manjši uporabljeni količini  $\text{SiO}_2$  dodamo naknadno še želatino (oba čistila sta pripravljena kot 3 % raztopini). To pomeni, da je potreben dodatek želatine naslednji: 0,075 mL, 0,15 mL in 0,225 mL. Ta dodatek odgovarja v glavnem čiščenju 5-15 mL 30 % raztopine želatine/hL vina.

Po 24 urah čiščenja na sobni temperaturi vizualno ocenimo epruvete in odčitamo količino, s katero smo dosegli najboljši čistilni učinek. Uporabljen  $\text{SiO}_2$  odgovarja potrebni količini za glavno čiščenje 25-75 mL/hL, izraženo kot osnovna 30 % raztopina. V praksi se moramo zavedati, da je želatina potrebna za povečanje čistilnega učinka  $\text{SiO}_2$ , kar praktično pomeni, da je potrebna manjša količina le-tega ob istočasno bolj kompaktni usedlini.

### **Čiščenje v kleti**

Koloidna raztopina silicijevega dioksida ima negativen električni naboj, zato se najpogosteje uporablja za čiščenje belih vin v kombinaciji z želatino.

Primeri:

25 mL 30 % SiO <sub>2</sub> + 2,5 g želatine/hL	za normalna vina
50 mL 30 % SiO <sub>2</sub> + 5 g želatine/hL	za mlada vina, ki se slabo čistijo
več kot 50 mL 30 % SiO <sub>2</sub> + 7-10 g želatine/hL	za vina z več tanina in čiščenje vin v kombinaciji z bentonitom

V praksi najprej raztopimo SiO<sub>2</sub> v manjši količini vina, premešamo in šele nato sledi dodatek želatine. Kjer želimo z želatino močnejše vplivati na okus, tj. pri vinih z več tanina, je lahko vrstni red obraten. Pri modrem čiščenju najprej uporabimo kalijev ferocianid, nato SiO<sub>2</sub> in nazadnje želatino. Če izvajamo istočasno čiščenje z bentonitom, je njegova uporaba možna takoj na začetku (če imamo bentonit, ki manj nabreka), lahko pa tudi na koncu, tj. približno 3-5 ur po dodatku želatine.

**PRAKTIČNA IZVEDBA ČISTILNEGA POSKUSA 2**  
**Vsa čiščenja delajo študenti v paru (po dva skupaj)**

Sredstvo (% raztopina, w/v)	Steklovina Volumen vina (mL)	Dodatek raztopine sredstva (mL)	Potrebna količina osnovnega čistila za glavno čiščenje (g/hL oz. mL/hL)
10 % raztopina oglja	2 merilna valja po 100 mL vina	0,2-0,4-0,6	20-60 g/hL
10 % raztopina kombiniranega čistila	2 merilna valja po 100 mL vina	0,3-0,6-0,9	30-90 g/hL NEOKLAR
5 % raztopina bentonita	2 steklenički po 100 mL vina	0,2-0,4-0,6	10-30 g/hL BENTONIT SPECIAL
10 % raztopina PVPP	2 steklenički po 100 mL vina	0,3-0,5-0,7	30-70 g/hL
3 % raztopina SiO <sub>2</sub> (pripravljena iz 30 % osnovne raztopine)*	2 epruveti po 15 mL vina	0,375-0,75-1,125 (z avtomatsko pipeto)	25-75 mL/hL 30 % raztopine 30 SIL

**OBVEZNO:**

– shraniti kontrolni vzorec vina (100 mL) v stekleničko za ovrednotenje čistilnih poskusov

\*: kombinacija čiščenja SiO<sub>2</sub> z želatino v razmerju 5:1 (manjši dodatek SiO<sub>2</sub>; premešanje in dodatek želatine; premešanje) – nastavitev v epruveti s 15 mL vina

Čistilni poskus 2 obsega čiščenja s čistilnimi sredstvi, opisanimi v točkah 9.6-9.9.

## OVREDNOTENJE ČISTILNEGA POSKUSA 2

### Vsa čiščenja delajo študenti v paru (po dva skupaj)

Sredstvo (% raztopina, w/v)	Ovrednotenje in dodatni testi
10 % raztopina oglja*	senzorično ocenjevanje spremembe barve, vonja in okusa; za hiter rezultat čistilnega učinka sredstva v 1 uri moramo vsakih 10 min premešati merilni valj (torej vsaj 5-krat); sledi filtracija, senzorična ocena in spektrofotometrično merjenje barve ( $A_{420}$ , $A_{520}$ ) in skupnih fenolnih spojin
10 % raztopina kombiniranega čistila**	senzorično ocenjevanje spremembe barve, vonja in okusa v primerjavi s kontrolo in predhodnim čiščenjem z ogljem
5 % raztopina bentonita	20 mL filtrata čiščenega in kontrolnega vzorca: toplotni test (70 °C/15 min); 10 mL filtrata čiščenega in kontrolnega vzorca: bentotest (1 mL reagenta); ovrednotenje rezultata po 24 urah; obvezna filtracija skozi filter z modrim trakom
10 % raztopina PVPP	pH-7 test (po 50 mL filtrata obeh poskusov v primerjavi s kontrolo: titracija z 0,1 M NaOH do pH 7; opazovanje spremembe barve v končni točki titracije); ovrednotenje učinka PVPP je možno že po 2 urah, medtem ko je izvedba pH-7 test pa po 24 urah
3 % raztopina SiO <sub>2</sub>	ocenjujemo bistrost vina, kompaktnost usedline in spremembo okusa vina (primerjalno obe količini dodatka in v kombinaciji z želatino)

\*oglje ali aktivno oglje se s strani proizvajalca priporoča na splošno kot dodatek v količini 10-100 g/hL po predhodnem čistilnem predposkusu; za korekcijo vonja in okusa so potrebne običajne količine 5-50 g/hL, za korekcijo barve pa 10-200 g/hL; na splošno velja nepisano pravilo, da že v mošt iz okuženega grozdja dodamo toliko g/hL oglja, kolikor je objektivno ocenjen delež (%) gnilega grozdja

\*\*kombinirano čistilo vsebuje bentonit, želatino, jajčni beljak in oglje; priporočilo s strani proizvajalca je dodatek v količini 50-150 g/hL

### 9.11 Priprava vina na stekleničenje

Stabilizirano vino ne sme dolgo časa ostati v posodi, kjer je možen dostop kisika, ampak lahko počaka na stekleničenje le v "neprepustni" zaprti posodi (iz stekla, nerjavnega jekla ali primerne živilske plastike).

Priprava vina na stekleničenje zajema:

- stabilizacijo na termolabilne beljakovine,
- stabilizacijo na vinski kamen,
- stabilizacijo na prosti SO<sub>2</sub> (linija vezave žvepla),
- stabilizacijo na kovine in
- mikrobiološko stabilizacijo (tudi uporaba konzervansov – protimikrobnih sredstev).

## 9.12 Priporočena literatura

Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. 1996. The fining and clarification of wines. V: Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman & Hall: 279-290.

Plahuta P., Lemut M., Plahuta D. 1994. Zmanjšana uporaba aditivov (enoloških sredstev) v proizvodnji vina. V: Aditivi: dodatki-tehnologija-zdravje: Zbornik 16. Bitenčevih živilskih dnevo in 1. simpozija živilcev, Bled, Slovenija, 9. in 10. junij 1994 = Additives: additives-technology-health: Proceedings of the 16<sup>th</sup> Bitenc's Food Days and 1<sup>st</sup> Symposium of Food and Nutrition Professionals, Bled, Slovenia, June 9-10, 1994; urednik Peter Raspor. - Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. s. 69-78.

Zoecklein B.W., Fugelsang K.G., Gump B.H., Nury F.S. 1995. Fining and fining agents. V: Zoecklein B.W., Fugelsang K.G., Gump B.H., Nury F.S. Wine analysis and production. New York, Chapman & Hall: 242-271.

## 10 REZULTATI ČISTILNIH POSKUSOV

### 10.1 Čiščenje z jajčnim beljakom

Komentar rezultatov predposkusa (opisno):

Potrebna količina čistila za glavno čiščenje (v g/hL): \_\_\_\_\_

### 10.2 Čiščenje z želatino (30 % raztopina)

Komentar rezultatov predposkusa (opisno):

Potrebna količina čistila za glavno čiščenje (v mL/hL): \_\_\_\_\_

### 10.3 Čiščenje z agarjem

Komentar rezultatov predposkusa (opisno):

Potrebna količina čistila za glavno čiščenje (v g/hL): \_\_\_\_\_

### 10.4 Čiščenje s kalijevim kazeinatom

Komentar rezultatov predposkusa (opisno):

Potrebna količina čistila za glavno čiščenje (v g/hL): \_\_\_\_\_



### 10.5 Modro čiščenje (stabilizacija vina na težke kovine)

Komentar rezultatov predposkusa (opisno):

Potrebna količina čistila za glavno čiščenje (v g/hL): \_\_\_\_\_

### 10.6 Čiščenje z ogljem

Komentar rezultatov predposkusa (opisno):

Potrebna količina čistila za glavno čiščenje (v g/hL): \_\_\_\_\_

### 10.7 Čiščenje s kombiniranim čistilnim sredstvom

Komentar rezultatov predposkusa (opisno):

Potrebna količina čistila za glavno čiščenje (v g/hL): \_\_\_\_\_

Na kratko opišite primerjavo čiščenja vina z ogljem in kombiniranim čistilnim sredstvom:

---

---

---

### 10.8 Čiščenje z bentonitom (stabilizacija na termolabilne beljakovine)

Komentar rezultatov predposkusa (opisno):

Potrebna količina čistila za glavno čiščenje (v g/hL): \_\_\_\_\_

## 10.9 Čiščenje s PVPP

Komentar rezultatov predposkusa (opisno):

Potrebna količina čistila za glavno čiščenje (v g/hL): \_\_\_\_\_

## 10.10 Čiščenje s silicijevim dioksidom (30 % raztopina)

Komentar rezultatov predposkusa (opisno):

Potrebna količina  $\text{SiO}_2$  za glavno čiščenje (v mL/hL): \_\_\_\_\_

Potrebna količina želatine za glavno čiščenje (v mL/hL): \_\_\_\_\_