

# KONTROLA BISTRINE FILTRIRANOG I NEFILTRIRANOG BIJELOG VINA

---

**Božić, Antonia**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:406793>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**Veleučilište u Karlovcu**  
Odjel prehrambene tehnologije  
Stručni studij prehrambene tehnologije  
Prerada mlijeka

Antonia Božić

**KONTROLA BISTRINE FILTRIRANOG I  
NEFILTRIRANOG BIJELOG VINA**

Završni rad

Karlovac, 12. rujna, 2019.



**Veleučilište u Karlovcu**  
Odjel prehrambene tehnologije  
Stručni studij prehrambene tehnologije  
Prerada mlijeka

Antonia Božić

**KONTROLA BISTRINE FILTRIRANOG I  
NEFILTRIRANOG BIJELOG VINA**

Završni rad

Mentor; dr. sc. Sandra Zavadlav

Matični broj studentice:  
0314613070

Karlovac, 12. rujna, 2019.

## **Predgovor**

Ovaj završni rad izrađen je pod mentorstvom dr.sc. Sandre Zavadlav u sklopu stručnog preddiplomskog studija Prehrambene tehnologije, Veleučilišta u Karlovcu. Mentorici se zahvaljujem na savjetima i stručnošću kojom me vodila tijekom studija, kao i tijekom izrade ovog završnog rada.

Eksperimentalni dio rada izrađen je na Biotehničkom fakultetu u Ljubljani, u sklopu Erasmus + mobilnosti, pod mentorstvom prof. dr.sc. Tatjane Košmerl kojoj se zahvaljujem na ustupljenom vremenu i ustupljenim materijalima koji su mi pomogli pri izradi ovog završnog rada.

Također, zahvaljujem se prijateljima i kolegama koji su mi pomagali tijekom perioda studiranja i uljepšali moje studentsko razdoblje, te obitelji koja mi je pružala potporu.

# Kontrola bistrine filtriranog i nefiltriranog bijelog vina

## SAŽETAK

Zamućenje kod vina potječe od termički nestabilnih bjelančevina koji su koloidni dijelovi otopine i ukoliko se kod vina primjećuje zamućenje može se provesti toplotni test. Sposobnost čišćenja filtriranih vina se bitno razlikuje od nefiltriranih zbog sadržaja zaštitnih koloida prisutnih kod nefiltriranih vina. Prije provedbe glavnog čišćenja bentonitom potrebno je provesti preliminarni pokus kojim se određuje koju će se količinu bentonita dodati ukupnoj količini vina. Za čišćenja bentonitom koristi se 5% -tna otopina bentonita. Nakon provedenoga bistrenja i čišćenja vina, mutnoća se smanjuje te se može određivati turbidimetrom. Što je više različitih čestica koje uzrokuju mutnoću u vinu više će biti i apsorpcije svjetlosti koja će prolaziti uzorkom, samim time iznos apsorbancija je veći.

*Ključne riječi:* bijelo vino, bentonit, bistrenje, filtriranje vina, mutnoća vina

# Clarity control of filtered and unfiltered white wine

## ABSTRACT

Opacity of wine comes from thermal unstable proteins, that are colloidal parts of the solution and if there is notice of blur, a heat test has to be carried out. The ability of purifying between filtered and unfiltered wines differs significantly, due to the content of protective colloids in unfiltered wines. Prior to implementation of the main purifying with bentonite, a preliminary test should be carried out to add the amount of bentonite to the amount of wine. 5 % of bentonite is used in purifying the bentonite in wine. When the wine is being refined and purified, blariness of the wine is being reduced and can be determined by turbidimeter. The more varieties of particles that cause turbidity in wine will be, the higher will be the absorption of light, that will pass through the sample and the absorbance is higher.

*Key notes:* bentonite, refining, wine filtering, wine opacity, white wine

## Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO .....	3
	2.1. Primjereno sumporenje.....	5
	2.2. Popravljanje mošta/ masulja šećerom.....	5
	2.3. Vrenje .....	5
	2.4. Nadolijevanje.....	7
	2.5. Pretakanje vina .....	8
	2.6. Stabilnost i njega vina.....	9
	2.7. Bistrila vina .....	10
	2.8. Određivanje parametara boje spektrofotometrom .....	12
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	13
	3.1. Materijali.....	13
	3.2. Metode .....	14
	3.2.1. Priprema uzoraka čišćenjem vina s bentonitom (stabilizacija na termolabilne proteine).....	14
	3.2.2 Apsorbancije nefiltriranih uzoraka bijelog vina u intervalu od 380-660 nm ....	15
	3.2.3 Apsorbancija za filtrirane uzorke bijelog vina u intervalu od 380-660 nm.....	17
	3.2.4. Određivanje mutnoće nefiltriranih i filtriranih uzoraka vina pomoću turbidimetra .....	18
4.	REZULTATI .....	20
5.	RASPRAVA.....	24
6.	ZAKLJUČCI .....	28
7.	LITERATURA .....	29



## 1. UVOD

Bentonit je sredstvo za postizanje proteinske stabilnosti bijelih vina. U manjim količinama koristi se za rose, crvenkasta vina i jako rijetko kod crvenih vina (Košmerl in Kač, 2007). Bentonit korišten u eksperimentu je specifičan, ali postoji i nespecifični bentonit koji ima sposobnost odstranjivanja viška bakrovih iona nakon što se vino pročisti bakrovim sulfatom ili „popravlja“ nestabilnu boju kod mladih crvenih vina (Košmerl in Kač, 2007).

Glavnu fizikalnu nestabilnost pri flaširanim vinima u prvom redu predstavlja izlučivanje soli vinske kiseline (tartaratna nestabilnost) zatim na drugom mjestu je proteinska mutnoća bijelih vina (nestabilnost vina na termolabilne bjelančevine). Sposobnost čišćenja filtriranih vina se bitno razlikuje od nefiltriranih zbog sadržaja zaštitnih koloida prisutnih kod nefiltriranih vina. Po definiciji čišćenje je dodatak reaktivnih ili adsorpcijskih sredstava za odstranjivanje ili smanjenje koncentracije jedne ili više neželjenih komponenata. Sredstva za čišćenje (bistrenje) dodaju se u moštove, vina ili u osnovna vina za preradu u pjenušce s namjenom poboljšanja senzoričkih osobina vina: bistrine, boje, mirisa i okusa, arome i/ili fizikalno-kemijske stabilnosti. Bjelančevine kao i fenolni spojevi u vinu uzrokuju pojavu suspendirane mutnoće koja je „sadržana“ u mjehurićima CO<sub>2</sub> i obično se javlja kada se vino čuva u hladnijim prostorijama ili nižim temperaturama (Košmerl in Kač, 2007).

Boja vina je psihofizičko svojstvo, to znači da će se isti uzorak pod jednakim osvjetljenjem percipirati drugačije od strane jednog ili više promatrača u različitim dijelovima dana. Iz tog razloga potrebno je eliminirati tu promjenjivost kako bi se mogla opisivati boja (Mihoci, 2015).

Glavni problem pri mjerenju boje je izbor objektivno mjerljivih parametara, nekada su se upotrebljavali „tintometri“ s kojima se određivalo i uspoređivalo samo jedan parametar, bilo intenzitet boje ili nijansu. S razvojem spektroskopije postalo je moguće preciznije definirati boju tekućina (Košmerl in Kač, 2010). Spektrofotometrija postala je tako neizostavna tehnika za mnoge analize te primjenjivana metoda u brojnim laboratorijima od bilo kojeg drugog postupka. Spektrofotometrija se temelji na ovisnosti energije zračenja i kemijskog sastava tvari. Za određivanje u UV, VIS i IR djelu spektra upotrebljavaju se uređaji nazvani spektrofotometri. Prilikom određivanja boja najčešće se primjenjuju spektrofotometrijske krivulje u valnom području od 400 nm do 700 nm (Mihoci, 2015). Kako čovjekovo oko vidi boju ovisi o stimulaciji receptora za crvenu, zelenu i plavu komponentu, prema tome boja se ne može mjeriti jer ona nije svojstvo fizičkoga svijeta, već je samo psihički doživljaj izazvan

fizičkim podražajem, ono što se zapravo mjeri je taj podražaj, tj. svjetlo koje je ušlo u oko promatrača i u njegovom mozgu proizvelo doživljaj boje (Mihoci, 2015). Uz antocijane kod crvenih vina i bijela vina sadrže tragove nekih bojajućih tvari, kao što su klorofil, karotin i ksantofil. U hladnim područjima grožđe sadržava više klorofila koji daje vinu zelenkastu boju. U usporedbi sa svjetlo-žutom do žućkasto-smeđom (jantarnom) bojom vina što znači da tragovi klorofila nisu vidljivi (Košmerl in Kač, 2010). Boju opisujemo različito s obzirom na spektar apsorbirane i propuštene svjetlosti, pri čemu sva subjektivna opažanja ne znače jasno definirane fizikalne veličine (intenzitet boje, nijansu boje, spektar svjetlosti). Ljudsko oko nije sposobno razlikovati pojedine komponente boje odvojene po valnim dužinama, već ih se opaža kao cjelinu. Brojne bojajuće tvari i pigmente u vinu opažamo obično kao nijansu ili intenzitet boje (Košmerl in Kač, 2010). Fenolni spojevi također doprinose obojenosti vina i stabilnosti vina, u većim koncentracijama odgovorni su za trpkost vina i gorak okus. U prisutnosti kisika se oksidiraju i uzrokuju posmeđivanje vina. Fenolni spojevi apsorbiraju prije svega svjetlost UV spektra i vidljivog dijela spektra, zato očitane vrijednosti apsorbancije pri primjerenom valnoj dužini može se koristiti za ocjenu koncentracije ukupnih fenola, ukupnih antocijanina, udjela antocijanina u obojenom obliku, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ekvivalenta kavne kiseline (Košmerl in Kač, 2010). Žuta boja u uzorcima ukazuje na malu koncentraciju fenola, crveno-smeđa očitavanja boje ukazuju na prisutnost katehina, dok ljubičaste nijanse ukazuju na prisutnost galne kiseline, također žuto-smeđe obojenje ukazuje da vino sadrži malu koncentraciju fenola uz prisutnost katehina.

## 2. TEORIJSKI DIO

U rujnu započinje berba grožđa, trajanje berbe ovisi o zrelosti grožđa i proizvodnoj orijentaciji, npr. ako se proizvode bijela lagana-svježa vina s više ukupnih kiselina berba se započinje 8-10 dana prije pune zrelosti grožđa (tehnološka zrelost), ako se proizvodi predikatno vino tada je tehnološka zrelost doba prezrelosti grožđa (Zoričić, 2013). Za određivanje početka berbe prati se rast šećera u grožđu, obično 15 dana prije pretpostavljene berbe, šećer se mjeri na tri načina: aerometrima-moštnim vagama po Babo i Oechsleu te refraktometrom. Berba ne ovisi samo o količini stvarnog šećera već i o smanjenju ukupne kiseline, zato metodom titracije svaki puta (svakog dana) uz mjerenje šećera, u moštu se određuje i ukupna kiselina (Zoričić, 2013). Kada količina šećera tijekom 1-2 dana stagnira, trenutak je početka berbe, riječ je o tehnološkoj zrelosti, ta vrsta zrelosti nije istovremena za bijele i crne sorte. Bijele sorte je bolje brati nekoliko dana prije prestanka rasta šećera u bobici, osobito sorata koje sadrže manje ukupne kiseline (Zoričić, 2013).

Benvegnin i Peyer formulom indeksa zrelosti utvrđuje se vrijeme berbe, tj. očekivanu kakvoću vina po završnom vrenju mošta ili masulja (Zoričić, 2013).

$$\text{Indeks zrelosti (R)} = \text{stupanj Oe}^\circ \times 10 / \text{g/l kiselina}$$

Za konzumna vina R je manji od 70, za kvalitetna vina R je između 80 i 100, dok za vrhunska vina indeks zrelosti R veći je od 100 (Zoričić, 2013).

U godinama s nepovoljnim klimatskim prilikama u vrijeme dozrijevanja grožđa, u grožđu se najčešće ne nakupi dovoljno šećera, tako da mošt dobiven od takvog grožđa ne osigurava dobivanje kvalitetnog i zdravog vina. Po čl. 29 Zakona o vinu, Hrvatski zavod za vinogradarstvo i vinarstvo može dozvoliti proizvođačima da na osnovu provedenih analiza masulja, mošta ili mladih vina, u vrenju dodaju šećer ili koncentrirani mošt, zbog postizanja većeg sadržaja alkohola u vinu, ukoliko je sadržaj groždanog šećera u masulju i moštu manji od propisanog za tu sortu i područje. Masulj ili mošt obično se popravljaju kristalnim šećerom<sup>1</sup> (Zoričić, 2013). Na područjima gdje su za vrijeme zriobe česte kiše, kakvoća grožđa može se sniziti i za 50% (Zoričić, 2013). Naime povećava se količina vode u bobici što razrijeđuje šećer i izaziva pucanje kožice bobice, tada je moguća pojava sive plijesni. Siva plijesan je štetna za cijeli grozd jer umanjuje volumen berbe, povećava se postotak peteljkovine i patogene grožđane mikroflore, a time i količine oksidacijskih enzima koji

---

<sup>1</sup> Saharozom

kataliziraju oksidacijske procese u moštu, a kasnije i u vinu. Kod berbe takvog grožđa mora se odmah obaviti sumporenje masulja i taloženje mošta (Zoričić, 2013). Ukoliko je vrijeme zriobe grožđa suho, bez kiša, gljivica koja uzrokuje sivu plijesan tada uzrokuje plemenitu plijesan, a plemenita plijesan pridonosi vrsnosti vina. U tijeku berbe gnjilo i bolesno grožđe treba odvajati i posebno preraditi. Ako je vrijeme toplo, berbu treba obavljati ujutro i predvečer, dok su niže temperature (Zoričić, 2013). Važno je transport grožđa od vinograda do mjesta prerade obaviti u što kraćem roku, kako ne bi došlo do neželjenih promjena – oksidacija fenolnih spojeva - tvari boje i tanina znanog kao posmeđivanje grožđa, mošta, a kasnije i vina. Također, tokom stajanja ubranog grožđa i transporta hlape aromatske tvari iz kože bobice (Zoričić, 2013). Aromatske tvari su eterična ulja u kombinaciji s eterima pa ih se i u tijeku vrenja valja sačuvati i to provođenjem kontroliranog vrenja pri nižim temperaturama. Optimalna temperatura vrenja mošta bijelih sorata grožđa je od 15-18°C, tako se sačuva taj najvrjedniji sastojak sorte u budućem vinu. U toplim jesenima berba se započinje ujutro (zorom) dok je grožđe još hladno (Zoričić, 2013). Prerada grožđa mora se provesti brzo, kako bi se mošt ili masulj podvrgnuo kontroliranom vrenju, uz određeno sulfitiranje i primjenu selekcioniranog vinskog kvasca. Završetkom vrenja započinje proces dozrijevanja vina. Tada nastaju promjene, mnogi sastojci koji su posljedica vrenja (alkohol, kiseline i drugi) mijenjaju se i nastaju novi kao rezultat kemijskih oksido-redoks procesa. (Zoričić, 2013). Prerada grožđa obuhvaća runjanje i muljanje, te tiještenje ili prešanje. Strojevi zvani runjača-muljača koriste se pri preradi grožđa u masulj. Runjača-muljača odvaja peteljkovinu od bobica, te se tako dobije smjesa soka (mošta) i krutih dijelova bobice (sjemenka i kožica) zvana masulj. Masulj se odmah kod bijelog grožđa sulfitira i podvrgava prešanju (Zoričić, 2013). Prešanjem se određuje kakvoća mošta, time je uvjetovana i kakvoća vina. Prilikom prešanja masulja bijelog grožđa nužno je izvršiti određeni broj rastresanja<sup>2</sup>, jer kada je prešana masa pod pritiskom količina istjecanja mošta se smanjuje (Zoričić, 2013). Ukoliko se povećava pritisak na masu masulja neće se znatno povećati količina mošta, zato rastresanjem stještenog masulja uspostavlja se drenaža i ponovnim prešanjem obnavlja se istjecanje mošta. Od 100 kg grožđa dobije se oko 95 l masulja, od te količine masulja dobije se između 65-80 l mošta. Hektolitar grožđa teži 50-65 kg, dok hektolitar mošta 105-110 kg (Zoričić, 2013). Mošt bijelog grožđa mora se sulfitirati odmah nakon runjanja-muljanja kako bi se spriječio razvoj spontane mikroflore koja s bobica prelazi u mošt, kao i oksidaciju (posmeđivanje). Sumpor u moštu /masulju održava

---

<sup>2</sup> Postupak se provodi kod mehaničkih preša.

reduktivno stanje, a bjelančevinaste tvari zgrušava<sup>3</sup> (Zoričić, 2013). Takve čestice postaju teže od mošta i padaju na dno posude. Tako se sulfitiranjem dobije čisti mošt koji se nakon 24 h odvaja od taloga i dodaje mu se selekcionirani vinski kvasac, uz određenu dozu „hrane“ za kvasce. Prilikom taloženja mošta upotrebljava se 200-300 ml sumpovina-sumporaste kiseline ili 20-30 g K-matabisulfita-vinobrana (Zoričić, 2013). Potrebno je i hladiti sulfitirani mošt na 10-15°C dok se provodi taloženje. Ukoliko je grožđe bolesno potrebno je dodavati više 5-6% sumporaste kiseline (sumpovin) ili K-metabisulfita (vinobrana) na 1 hl. Navedene vrijednosti u prethodnom paragrafu odnose se na bolesno grožđe, vrijednosti za zdravo grožđe su upola manje za sumporastu kiselinu i za vinobran.

### **2.1. Primjereno sumporenje**

Bijelo vino s ostatkom šećera trebalo bi sadržavati 30-35 mg/L slobodnog SO<sub>2</sub>. Vino koje će se prije konzumirati manje se sumpori, dok ono koje će se skladištiti/arhivirati više. Prije pretoka preporuča se količinu sumpora provjeriti sa „VINI“ kompletom ili u nekom enološkom laboratoriju (Zoričić, 2013).

### **2.2. Popravljanje mošta/ masulja šećerom**

Na temelju zakona o vinu RH, na svakih 100 l mošta maksimalno se smije dodati 3,4 kg šećera, pri čemu se količina alkohola povećava za 2 vol.% (Zoričić, 2013). Saharoza koja se dodaje moštu ili masulju ne dolazi pod utjecaj kvasaca koji potiču vrenje već se ta molekula najprije hidrolizira na glukozu i fruktozu u prisutnosti kiseline vina. Međutim događa se izvjestan tehnološki gubitak šećera<sup>4</sup> kao i gubitak alkohola nastalog vrenjem, zato se moštu dodaje 1,9 kg šećera na svakih 100 l. Tako pripremljenom moštu dodaju se selekcionirani vinski kvasac i započinje kontrolirano vrenje (Zoričić, 2013).

### **2.3. Vrenje**

Vrenje se provodi na temperaturi 15-18 °C, vrenje je egzoterman proces, šećer prelazi u alkohol, dok mirisne tvari ostaju u vinu, vino je svježije a sadržaj hlapljivih kiselina je manji (Zoričić, 2013). Nositelj procesa vrenja je kvasac, za vinarsku praksu najznačajnije su vrste roda *Saccharomyces*, to su *Saccharomyces cerevisiae* var. *Ellipsoideus* i *S.oviformis* razmnožavaju se pupanjem, a za tu životnu aktivnost dobivaju energiju razgradnjom

---

<sup>3</sup> Djeluje koagulirajuće

<sup>4</sup> Vinski kvasci koriste ga za svoje životne funkcije, kruti dijelovi masulja upijaju jedan dio šećera.

monosaharida (Zoričić, 2013). Divlji kvasci sa bobice i rozgve koji dolaze u mošt mogu izazvati spontano vrenje, no oni nisu sposobni udovoljiti svim zahtjevima suvremene proizvodnje kvalitetnog vina. Stoga procesom fermentacije (vrenjem) treba upravljati. Za razliku od spontanog vrenja, provodimo tzv. Dirigirano vrenje, kada se u prethodno sulfitirani, rasluženi, mošt dodaje selekcionirani vinski kvasac, kvasac sadrži enzime zimazu, bez kojih ne bi bilo pretvorbe šećera u alkohol (Zoričić, 2013). Osim spomenutih enzima u kvascu, danas se koriste i visoko koncentrirani enzimatski preparati za maceraciju bijelog i crnog masulja, čijim posredstvom dolazi do oštećenja stjenke stanica bobice, što dovodi do povećane ekstrakcije soka (mošta). Bijelom grožđu se dodaju u postupku prešanja, a kod crnog u masulj, prilikom vrenja. Ovim tretiranjem mlada vina brže se bistre (Zoričić, 2013). Alkoholno vrenje biokemijski je proces tijekom kojeg nastaje velik broj produkata i međuprodukata. Osnovni produkti su etilni alkohol, ugljikov (IV) oksid, te ostali sekundarni produkti: metilni alkohol i viševalentni alkoholi<sup>5</sup>, pojavljuju se i jednovalentni viši alkoholi<sup>6</sup>, također među višim alkoholima pojavljuju se i heksanol, heptinol, oktinol, noninol i ostali. Najveći dio ovih jednovalentnih viših alkohola nastaje iz aminokiselina uz pomoć kvasaca (Zoričić, 2013). Neki od viših alkohola reagiraju s kiselinama tvoreći estere vrlo ugodna mirisa. Također manji dio organskih kiselina nastaje u procesu vrenja, poput jantarne, mravlje, octene, mliječne, propionske, maslačne, valerijanske i drugih. Također oksidacijom primarnih alkohola nastaju razni aldehidi. Vino sadrži najviše acetaldehida (Zoričić, 2013). Iz grožđa u vino prelaze: vinska, jabučna, limunska i oksalna kiselina. Vino je redovito manje kiselo od mošta, jer se u procesu vrenja i dozrijevanja vina smanjuju i mijenjaju pojedine kiseline. Alkoholno vrenje započinje pretvorbom glukoze i fruktoze, u tom procesu smjesa enzima u kvascima provodi tu pretvorbu šećera. Proces je anaeroban i odvija se preko niza enzimatskih reakcija, međusobno povezanih. Iz estera fosforne kiseline i glukoze 1,6 difosfata i zatim dalje nizom reakcija nastaju organske kiseline (gliceroljantarna i oksalna kiselina) te 2,3 butandiol i dr. Zatim nastaje velik broj prijelaznih spojeva, sve do konačne pojave etanola, pirogroždane kiseline, acetaldehida i ostalog. Stvaranje pirogroždane kiseline jedan je od ključnih trenutaka u procesu alkoholnog vrenja jer ona sudjeluje u daljnjem procesu dekarboksilacije, kada se pojavljuje velika količina CO<sub>2</sub> i acetaldehida koji redukcijom prelazi u etilni alkohol (Zoričić, 2013). Pri kraju alkoholnog vrenja ili u tijeku čuvanja vina dolazi do razgradnje jabučne kiseline u mliječnu kiselinu, posredstvom čistih

---

<sup>5</sup> Glicerol, dvovalentni 2,3 butandiol, manitol.

<sup>6</sup> Izamilni, izobutilni, propilin.

kultura mliječno - kiselih bakterija<sup>7</sup>. Naziva se još i sekundarno vrenje i u nekim ju je vinima potrebno spriječiti (Zoričić, 2013).

Biološka razgradnja jabučne kiseline jedan je od bitnih čimbenika za stabilnost vina u boci, u nekim bijelim vinima hladene fermentacije, koja dolaze u promet kao mlada, prouzročava gubitak voćnih mirisa pa se ne preporučuje, no poželjna je u bijelim vinima kod kojih se traži određeni karakter starosti, odnosno koja optimum kakvoće postižu duljim dozrijevanjem, primjerice u crnih vina (Zoričić, 2013). Mošt treba tokom vrenja hladiti, kako bi se održavala optimalna temperatura vrenja, postoje suvremene inox bačve koje imaju ugrađene sustave hlađenja/grijanja. Kod manjih vinogradara preporuča se hlađenje mošta u manjim cisternama/bačvama pomoću boca sa zamrznutom vodom. Kako bi se smanjio rizik od usporenog vrenja ili potpunog prekida vrenja poželjno je da se dodaje i „hrana“<sup>8</sup> za kvasce, osobito ako je godina dozrijevanja bila loša ili je obilovala napadima bolesti i štetočina (Zoričić, 2013). Hrana je smjesa raznih vitamina, sterola, arginina, nezasićenih masnih kiselina, kalcijeva pantetonata, niancina, folne kiseline i di-amonijeva fosfata. Važno je da se dodaje prije vrenja u fazi razmnožavanja kvasca, zatim tijekom usporenog vrenja, a to je obično poslije polovice prevrelog od ukupne količine šećera u moštu. Ovo kontrolirano vrenje potrebno je nadzirati svaki dan, sve do njegovog završetka (Zoričić, 2013).

#### **2.4. Nadolijevanje**

Prestankom vrenja mlado vino postupno se hladi, pa se zbog toga i zbog hlapljenja smanjuje volumen vina u bačvi /cisterni. Kako bi se spriječio dotok zraka a time i oksidacija vina, pristupa se nadolijevanju sa zdravim vinom iste kakvoće. Nakon nadolijevanja vino se smiri i započinje taloženje krutih čestica koje stvaraju talog vina (drožde). (Zoričić,2013). Nakon toga se obavlja prvi pretok, koji se u pravilu treba obaviti što ranije, kako bi vino zadržalo svježinu, čisti vinski okus i miris. Dulje ležanje vina na talogu pridonosi nepovoljnom mirisu (ponekad po sumporovodiku) i okusu vina. Sve to iziskuje rani prvi pretok 7-14 dana nakon vrenja, to prije ako mošt nije bio taložen. Isto tako manje kiselija vina ranije pretaču se kako ne bi došlo do razgradnje jabučne kiseline u mliječnu. Kasni pretok se provodi 2-3 mjeseca poslije vrenja, ovaj pretok je poželjan kod jako kiselih vina<sup>9</sup> (Zoričić, 2013).

---

<sup>7</sup> Malolaktična fermentacija - biološko smanjenje kiselina u vinu.

<sup>8</sup> Hrana je dodatni stimulans kvascu u tijeku razmnožavanja i nesmetanog vrenja (Zoričić, 2013).

<sup>9</sup> Vina s većim sadržajem jabučne kiseline.

## 2.5. Pretakanje vina

To je postupak odvajanja bistrog mladog vina od taloga. Pretakanje pridonosi stabilnosti i kakvoći vina. Vino se u prvoj godini pretače 2-3 puta, prvi pretok se obično obavlja od druge polovice studenoga pa sve do siječnja. Mnogi faktori utječu na vrijeme pretakanja, poput; stupnja provrelosti, jakosti vina, količini kiselina te opće zdravstveno stanje mladog vina. Kako će se obaviti prvi pretok i da li će biti uz pristup zraka, ovisi najviše o prethodno provedenom „zračnom testu“. Zračni test se obavlja na način da se iz svake bačve uzima čaša vina i ostavi na njoj 24 h, kako bi se pratila eventualna oksidacija odnosno posmeđivanje vina. Ako je vino podložno promjeni boje u smeđu ne smije se pretakati uz pristup zraka (otvoreno). Takvo vino 5-7 dana prije pretoka se sumpori uz dodatak 10-20 g/hl K-metabisulfita ili 5% sumporastom kiselinom 8-10 g/hl , odnosno 1,6-2,0 dcl/hl i tek nakon toga se pristupa pretoku (Zoričić, 2013). Vina koja su dobivena od bolesnoga grožđa, koja su alkoholno slabija i sadrže manje kiselina i ekstrakata, pretaču se odmah nakon završenog vrenja bez prisustva zraka. Suprotno od toga, vina koja su dobivena od mošta s većim sadržajem šećera i bogatija su ekstraktom, teže se bistre, pretaču se kasnije. Vina koja sadrže mnogo kiseline kasnije se odvajaju od taloga, kako bi se omogućilo taloženje vinskog kamena, a time i razgradnja jabučne kiseline u mliječnu kiselinu. Vina dobivena od gnjilog i pljesnivog grožđa podložna su manama i bolestima, pa ih se pretače bez pristupa zraka (zatvoreno) i sumpore se prije toga (Zoričić, 2013). Vino se pretače preko crpke, osim onda gdje to nije moguće, u tom slučaju koristi se vedro i lakomica. Nakon pretoka vino je „istučeno“ zatim se postupno smiruje i bistri (Zoričić, 2013).

Drugi pretok obavlja se obično dva mjeseca nakon prvoga. U pravilu lagana i svježja vina koja se namjenjuju brzom potrošnji ne pretaču se drugi put, izuzev ako su mutna, tada ih se mora sumporiti s 10 g/l metabisulfita potom pretočiti. Sva druga vina koja ostaju u podrumu na čuvanju trebaju se pretočiti prije ljeta (izbjeci vrućine), zatvoreno, bez pristupa zraka uz potrebno sumporenje (Zoričić, 2013). Sumporenje je potrebno zbog održavanja stabilnosti vina i kakvoće vina, o pravilnom sumporenju mošta ovisi sumporenje vina (Zoričić, 2013). Pretok vina uz primjereno sumporenje utječe na proces bistrenja vina. Ako vino nije bistro nakon pretoka već mutno, potrebno je primjenjivati bistrenje jednim od bistrila. Bistrilo manje ili više utječe na kakvoću vina jer djeluje na boju, miris, aromu i okus, odnosno na sve ono što se naziva sortna osobitost vina. Mlado vino se čuva na temperaturama od 12-15°C kako bi se izbjegle promjene uzrokovane oksidacijom ili razvoj bolesti vina, pri tome bačva ili cisterna mora biti puna. Vino koje se puni u boce mora biti stabilno, što znači da



ne smije u boci doći do promjene okusa, mirisa, taloženja soli vinske kiseline i termolabilnih bjelančevina, koje na dnu boce stvaraju talog (Zoričić, 2013).

## 2.6. Stabilnost i njega vina

Stabilno je svako vino koje u boci ili nekoj drugoj posudi, unatoč različitim uvjetima čuvanja i vremenu čuvanja, ostaje nepromijenjeno obzirom na bistroću, boju, miris i okus. Bostroća vina ovisi o topljivosti različitih tvari, ako su u potpunosti otopljene vino je bistro. Koloidne skupine vrlo sitnih čestica koje se u vinu sporo talože a uzrokuju zamućenje su bjelančevine, neki fenoli, teški metali i dr. Druga vrsta zamućenja je zamućenje razmravljenim česticama krute tvari. U određenim uvjetima čuvanja vina, svi navedeni sastojci se izluče iz vina i mute ga. Kako bi se to spriječilo potrebno je od berbe grožđa pa do ulijevanja vina u boce provoditi potrebne radnje koje pridonose bistroći<sup>10</sup> (Zoričić, 2013). Vino se u boce ulijeva zatvorenim sistemom punjenja, bez pristupa zraka te se boca zatvara kvalitetnim odgovarajućim čepom, to se provodi zato da bi se sačuvala kakvoća vina u boci na duži period, koji se mjeri u godinama. Ako takav postupak nije osiguran kod vina dolazi do grubih promjena boje, okusa i mirisa, kao i taloga na dnu boce. Dovoljna je promjena temperature u prostoru gdje se vino čuva (12°C) nikako viša, prisustvo svjetla ili protresanje boce da se stabilnost vina naruši. Odluka kada će se vino puniti i način na koji će se puniti u boce donosi se onda kada vino postane prepoznatljivo po sorti, najboljoj mogućoj kakvoći i stabilnosti. Stolnim vinima boca omogućuje očuvanje kakvoće, a manje razvoj, dok kod vrhunskih i kvalitetnih vina u boci dolazi do razvoja arome sorte i bukea dozrelog, njegovanog vina. Kod crnih vina nakon dužeg odležavanja dolazi do taloženja tvari boje, što je u tijeku njege vina u bocama redovna pojava i ne podliježe odredbama Zakona o vinu. (Zoričić, 2013). Sva vina nakon vrenja prolaze određeni proces koji se očituje u zamućenju, to mogu biti biljna onečišćenja nastala kod runjanja-muljanja, termolabilne bjelančevine, zamućenja uzrokovana željezom i bakrom (crni, sivi i bakreni lom), izdvajanje netopivih soli organskih kiselina te biološka zamućenja uzrokovana kvascima i bakterijama (Zoričić, 2013). Stabilizacija vina se postiže primjenom nekog od bistrila, hlađenjem, filtriranjem te centrifugiranjem. Mlada vina općenito se teško bistre, kako bi se pospješilo bistrenje bez upotrebe bistrila, preporučuje se pretakanje. Uz otvoreno pretakanje i zračenje pospješuje se razgradnja tvari koje sprječavaju bistrenje, npr. pektini. Kiselića i vina s više alkohola brže se bistre. Ako zamućenje vina su uzrokovali mikroorganizmi, njihovo djelovanje se sprječava sulfitiranjem, a tek nakon toga se

---

<sup>10</sup> To su pretakanje, bistrenje, filtriranje.

primjenjuje jedno od bistrila (Zoričić, 2013). Sumpor djeluje kao antiseptik, antioksidans i koagulator, te taloži bjelančevine vina i druge sitne čestice. Nakon prvog pretoka i u daljnjem tijeku čuvanja vina potrebno je kontrolirati količinu sumporovog dioksida, kako bi njegov udio bio u dozvoljenim granicama, jer presumporeno vino uzrokuje tegobe i glavobolju (Zoričić, 2013). Ukoliko podrumski prostor nije održavan čistim, kao i suđe (bačve i cisterne) te ostali pribor, zatim ako nije pravilno provedena berba, prerada, sulfitiranje, kontrolirano vrenje te konačno pravilna njega vina (pretok, nadolijevanje, sulfitiranje i dr.) često dolazi do pojave dugotrajne mutnoće vina, većeg ili manjeg intenziteta, kao i do pojave mana i bolesti vina (Zoričić, 2013). Mutnoća u vinu uzrokovana je bjelančevinama, mikroflorom vina, sluznim tvarima, koloidima metala, taninskim tvarima i bojama u crnim vinima (Zoričić, 2013). Bistrilima se uklanja mutnoća vina, koja djeluju u vinu kemijski, fizikalno –kemijski ili mehanički. Uspjeh bistrjenja ovisi o tome koje se bistrilo upotrebljava i njegovoj količini, zatim o pravilnoj pripremi bistrila, temperaturi vina<sup>11</sup> i ona je jedan od bitnih uvjeta brzog i dobro provedenog bistrjenja. Nadalje, uspjeh bistrjenja ovisi i o kiselosti vina, što je niži pH učinak bistrila je bolji. Vrijeme taloženja nečistoća posredstvom bistrila je od 7-15 dana, ponekad i nešto dulje, ovisno o slučaju. Da bi se vino izbistrilo stručno, potrebno je uzorak vina<sup>12</sup> odnijeti u vinarski laboratorij, stručnoj osobi, kako bi utvrdio se razlog zamućenja vina i na osnovu toga se odabire jedno od bistrila. Bistrila se razlikuju svojim podrijetlom i načinom djelovanja. U enološkoj praksi najčešće se upotrebljavaju: želatina, bentonit, tanin, bjelance jajeta, aktivni ugljen, gelita klar, blankasit, kombi gel i dr. (Zoričić, 2013).

## 2.7. Bistrila vina

Želatina je tvar koja se dobiva preradom i kuhanjem životinjskih kostiju, hrskavica i kože (svinja) te od ribljih kostiju pri čemu se kod prerade uklanja miris ribe. U prodaji dolazi u obliku listića, mljevena u prahu ili kao tekuća pod nazivom Gelita-Klar 20%. Preporuča se upotreba tekuće želatine kako bi se izbjegla priprema želatine u listićima ili prahu. Tekuća želatina upotrebljava se na podrmskoj temperaturi u količini 30-50 ml /100l, dobro ju je koristiti u kombinaciji s Blankasitom u omjeru Blankasit: Gelita-Klar = 2:1, jer se njihovom kombinacijom dobije vino primjerene bistroće. Blankasit je također jedno od bistrila, to je silicijeva sol koja se upotrebljava za otklanjanje i taloženje bjelančevina iz vina. Ukoliko se

---

<sup>11</sup> Najpovoljnija je između 10 i 15°C.

<sup>12</sup> Potrebno je 0,5 l do 1 l vina za analizu u laboratoriju.

ova bistrila upotrebljavaju u kombinaciji s Gelita-Klar, tada se prvo dodaje Blankasit, dobro se izmiješa, potom se dodaje Gelita-Klar, te se ponovno dobro izmiješa. Međutim ukoliko je vino trpk, što znači da sadrži dosta tanina, redosljed dodavanja ovih bistrila je obrnut uz obavezno miješanje nakon dodavanja svakog od bistrila (najprije se dodaje tekuća želatina). (Zoričić, 2013). Kombi Gel je bistrilo proizvedeno na bazi: želatine, kazeina i ribljeg mjehura. Dobro bistri mlada vina te se također može upotrijebiti s blankasitom, u tom slučaju omjer za primjenu je: Blankasit: Kombi Gel = 2:1, odnosno 50 ml : 25 ml na svakih 100 l vina (Zoričić, 2013). Bjelance jajeta je najstarije sredstvo za bistenje vina. Aktivni dio bjelanceta su njegove bjelančevine (albumin i globulin) i sadrži ih oko 12,5%. Posebno se upotrebljava za uklanjanje viška tanina u vinu. Za bistenje se koriste 2 svježa jaja na svakih 100 l vina, bjelance se odvaja od žumanjka i u zdjeli se tuče ali ne do kraja, jer se kao „snijeg“ teško umiješa u vino. Tako pripremljeno bjelance umiješa se u cjelokupnu količinu vina. Samo suhi albumin može se također kao bistrilo koristiti i u tom slučaju prethodno se izmiješa s vodom u kašu, a zatim dodaje vinu uz miješanje. Ako se upotrebljava čisti albumin, dodaje je 8-12 g na svakih 100 l vina (Zoričić, 2013). Granukol- Ge je aktivni ugljen biljnog podrijetla, a primjenjuje se za odstranjivanje neželjenog mirisa i okusa, po plijesni, bačvi, čepu, talogu i dr. Granukol- Ge se primjenjuje u količini 10-40g/100 l vina, a kod okusa po naftnim derivatima 60 g i više na 100 l vina (Zoričić, 2013). Danas se podrumarima nude sredstva za bistenje na bazi bentonita, kod primjene takvih bistrila valja se držati uputa proizvođača. Neka od bistrila na bazi bentonita su: Protomix-G, Bentolit Super, Bentonit Piuxcompact, Pluxbenton Kwk. Bentonit je ime dobio po nalazištu minerala-gline Fort Bentonu u Montani (SAD). Bentonit se proizvodi tako da se rudača granulira i suši, potom melje. Na tržištu je u granulama ili mljeven. Prije bistenja vino se podvrgne toplotnom testu na termolabilne bjelančevine. Bentonit posjeduje veliku sposobnost upijanja sastojaka koji mute vino, bjelančevina i ostalih nečistoća, zatim uklanja greške okusa, mirisa, i manje greške u boji vina. Temeljem dugogodišnjeg ispitivanja upotrebe bentonita primjenjuje se količina od 20-150 g/hl vina. Ukoliko vina imaju i strani miris te se tretiraju aktivnim ugljenom, dodaje se 20-60 g/hl vina bentonita kako bi se brže taložio ugljen. Bentonit za bistenje priprema se tako da na dno posude, emajlirane ili inox, stavlja se potrebna količina bentonita, zatim se nalijeva voda i pušta se stajati 2 dana. Nakon toga odlijeva se voda iznad nabubrenog bentonita, a bentonit se izmiješa u prikladnoj posudi sa 20 do 30 l vina, zatim se sve ulijeva u bačvu ili cisternu s vinom i dobro promiješa (Zoričić, 2013). Nakon bistenja može se mjeriti mutnoća kako bi se ustanovila učinkovitost bistenja, mutnoća se može provjeravati pomoću turbidimetra. Također, bjelančevine koje

se uklanjaju bentonitom apsorbiraju određene valne duljine svjetlosti, kao i kompleksi bentonit- bjelančevina, pa se pomoću spektrofotometra može odrediti pad koncentracije istih u uzorku. U tom slučaju govori se o mjerenju apsorbancije, a njen iznos predstavlja intenzitet boje.

## 2.8. Određivanje parametara boje spektrofotometrom

Spektrofotometar koji se koristi kod određivanja boje uzorka vina je UV-VIS spektrofotometar. To je instrument koji mjeri određenu količinu svjetla koju apsorbira neka vrsta molekula u uzorku, zraka određene valne duljine propušta se kroz uzorak, te se mjeri intenzitet svjetlosti koja je prošla kroz uzorak i uspoređuje s ulaznim intenzitetom svjetla. Intenzitet apsorbiranog svjetla proporcionalan je koncentraciji tvari koja se određuje (Anonymus). Glavni dijelovi spektrofotometra su: Izvor svjetlosnog zračenja, monokromator, nosač uzorka- kiveta, detektor. Do promjene boje dolazi tijekom zorenja ili starenja vina radi brojnih procesa koji su ovisni o temperaturi, koncentraciji SO<sub>2</sub>, oksidacijskog stupnja, vremena, te odnosa između bojajućih tvari i tanina. Prije svega značajne su oksidacijske i ne oksidacijske reakcije polimerizacije procianidina pri tvorbi kondenziranih tanina, za koje je značajna tamno-žutosmeđa boja, te manja trpkost (astrigencija) (Košmerl in Kač, 2007). Obojenost bijelih vina se mjeri spektrofotometrom direktno<sup>13</sup>. Mjeri se apsorbancija uzorka pri valnoj dužini 420 nm, koja predstavlja intenzitet boje. U širem spektru svjetlosti od 400-420 nm mogu se izmjeriti nijanse smeđe boje kod bijelih vina. U kvarcnoj kiveti se mjeri apsorbancija A 400, A 420, A 380 i A 660 te se snimi apsorpcijski spektar od A 380 do A 660 uzorka bijelog vina naspram slijepog uzorka<sup>14</sup>. Mjerenja se obavljaju na nefiltriranim i filtriranim uzorcima kroz filtere s promjerom pora 0,45 µm. Idealno je da je apsorbancija u području od 0,3 do 0,7. Na boju inače utječe pH, SO<sub>2</sub> i alkohol. S povećanjem pH i povećanjem koncentracije SO<sub>2</sub>, te povećanjem koncentracije alkohola, smanjuje se apsorbancija pri valnim dužinama od 420 nm i 520 nm. Važan je također razmjer između tvari koje daju boju i tanina, koji utječe kako na boju tako i na stabilnost boje bijelih vina (Košmerl in Kač, 2007).

---

<sup>13</sup> Bez razrjeđivanja uzorka.

<sup>14</sup> Destilirana ili deionizirana voda.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Materijali**

U eksperimentalnom dijelu korištena je mješavina bijelog vina sorti:

Chardonnay,

Pinot bijeli,

Laški rizling (Graševina) i

Sauvignon od malih proizvođača koje je prethodno pomiješano i promiješano (više sorti) zatim stabilizirano na bjelančevine sa bentonitom.

U eksperimentu korištena je 5% otopina bentonita.

#### **Pribor:**

Erlenmayer tikvice od 250ml,

odmjerne tikvice od 100 ml,

staklena čaša,

vodena kupelj,

menzura,

termometar,

sat,

stakleni štapić,

plastični lijevci,

boca štrcaljka,

filter papiri,

UV-VIS spektrofotometar,

kvarcna kiveta 1cm,

pipete (1ml, 5ml ili 10ml),

turbidimetar,

kiveta za turbidimetar,

parafilm,

automatska pipeta i nastavci za automatsku pipetu, papirnati ubrusi.

#### **Kemikalije:**

bentonit,

deionizirana voda

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema uzoraka čišćenjem vina s bentonitom (stabilizacija na termolabilne proteine)**

Uzorak vina (100-150 ml) zagrijava se u Erlenmayer tikvici u vodenoj kupelji na temperaturu od 70°C ukupno 15 minuta. Uzorak se miješa tijekom zagrijavanja, a nakon što se dosegne temperatura, uzorak se obriše i ohladi na sobnu temperaturu. Ukoliko se pri hlađenju pojavi zamućenje pristupa se čišćenju s bentonitom (Košmerl in Kač, 2007).

U predmetnom eksperimentu toplotni test nije se izvodio, odmah se pristupilo postupku čišćenja bentonitom. Za čišćenja bentonitom koristila se 5% -tna otopina bentonita koju je potrebno zasebno pripremati na način da u odmjernu tikvicu volumena 100 ml se dodaje 5 g bentonita, zatim se u staklenoj laboratorijskoj čaši zagrijava 85 ml deionizirane vode do 60°C, voda se potom ulijeva u odmjernu tikvicu pomoću menzure i dobro se promiješa.

Potrebno je paziti da se ne ulijeva skroz do oznake na vratu tikvice, već nešto niže, jer bentonit nabubri i tako podigne razinu tekućine u tikvici, a ukoliko je potrebno, do oznake drugi dan dolijeva se deionizirana voda. Za predmetni pokus bilo je potrebno 15 x toliko vode jer pokus sadrži 15 uzoraka, koristila se čaša od 1000ml, odnosno najveća kojom se raspolaže u laboratoriju, kako bi se skratilo vrijeme pripreme otopina. Na opisan način se priprema 14 odmjernih tikvica s 5% -tnom otopinom bentonita, prva je čista deionizirana voda, tikvice se zatvaraju s parafilmom i ostavljaju stajati do drugog dana (24h). Tikvice je bitno obilježavati rednim brojevima, da se ne pomiješaju.

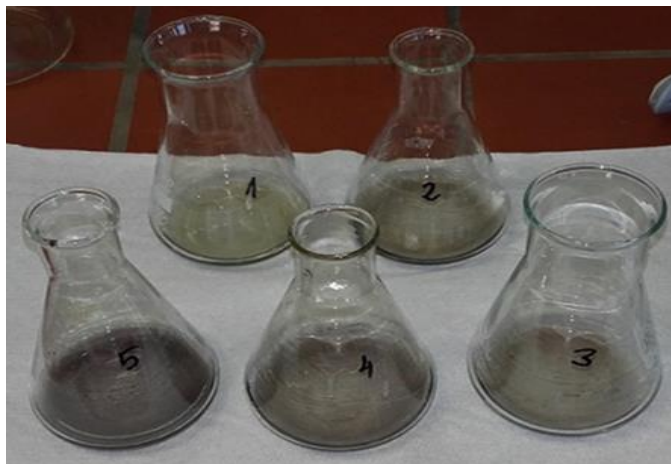
Drugi dan, nakon što je bentonit nabubrio i dopuni se, ukoliko je potrebno, do oznake tikvice s vodom, promiješaju se opet sve odmjerne tikvice.

#### **Priprema uzoraka vina:**

Vino se ulijeva u nove odmjerne tikvice od 100 ml, svaka se pri tom označava rednim brojevima od 2-15, jer broj 1 je kontrolni uzorak-deionizirana voda, te automatskom pipetom iz odmjerne tikvice s otopinom bentonita koja je bila označena brojem 2 prenese se u tikvicu 2-s uzorkom vina, 1,2ml otopine bentonita, i tako redom sparuju se uzorci vina s pripadajućim tikvicama s otopinama bentonita. Odmjerne tikvice s uzorcima u koje je dodana otopina bentonita su zatvarane čepovima i ostavljene stajati do drugog dana. Drugi dan mogao se zapaziti talog bjelančevina s bentonitom u svakoj tikvici.

Nakon čišćenja (stabiliziranja s bentonitom) dio vina iznad taloga (kompleksa bentonit-bjelančevine) u odmjernoj tikvici, otpipetira se u Erlenmayer tikvicu (prethodno numeriranu brojem uzorka), te se svaki posebno testira na spektrofotometru.

Opisani uzorci predstavljaju nefiltrirane uzorke (Slika 1.).



**Slika 1. Nefiltrirani uzorci**

Izvor: Vlastita slika (Antonia Božić)

### **3.2.2 Apsorbancije nefiltriranih uzoraka bijelog vina u intervalu od 380-660 nm**

Za analize korišten je UV-VIS spektrofotometar.

Spektrofotometar je potrebno prethodno standardizirati deioniziranom vodom (kontrolni uzorak). Obojenost bijelih vina se mjeri bez razrjeđivanja uzorka (direktno) s spektrofotometrom (Košmerl in Kač, 2007).

Organske tvari (bjelančevine i fenolni spojevi) u uzorcima apsorbiraju svjetlost iz UV te vidljivog dijela spektra (Strmić, 2006). Uzorke koje se u prethodnom koraku stabiliziralo na termolabilne proteine u odmjernim tikvicama gdje nakon stabilizacije postoji talog bjelančevina, koriste se najprije tako nefiltrirani i predstavljaju nefiltrirane uzorke. Odmjerne tikvice se ne smije potresati kako se ne bi suspendirao talog. Pipetom se prenese iz tikvice nekoliko ml takvog uzorka vina u čistu Erlenmayer tikvicu, koje se također prethodno numeriraju za svaki uzorak posebno, i analiziraju.

Na spektrofotometru se prethodno izmjeri slijepi uzorak (kontrolni). Provede se zatim snimanje na zadanoj valnoj duljini (420 nm), tako se svaki puta za prvi uzorak uzima voda, za svaku pojedinu valnu duljinu. Postupak se naziva „umjeravanje“ spektrofotometra.

Započne se s nefiltriranim uzorcima, nakon vode, u kivetu se dodaje uzorak 2, do ruba se napuni, ako se prelije, kiveta se prebriše papirnatim ubrusom i pažljivo se stavlja istu u njen nosač unutar uređaja. Poklopac spektrofotometra se zatim zatvara i aktivira se očitavanje apsorbancije na zadanoj valnoj duljini.

Kada je postupak gotov, poklopac se otvara, kivetu se pažljivo izvadi, uzorak se izlijeva natrag u njegovu pripadajuću Erlenmayer tikvicu, te se kivetu ispire destiliranom ili deioniziranom vodom pomoću boce štrcaljke, zatim se obriše prije sljedećeg mjerenja.

Zatim se ulijeva uzorak 3 u kivetu i postupak se ponavlja dok se ne izmjere svi zadani uzorci. Na kraju se ponovno očisti kiveta i obriše, kako bi bila spremna za sljedeća očitavanja.

Iz odmjernih tikvica se nefiltrirani uzorci kroz filter papir, preko lijevaka, filtriraju u nove, čiste Erlenmayer tikvice (postupak na Slika 2.).



**Slika 2. Filtriranje uzoraka**

Izvor: Vlastita slika (Antonia Božić)

Nakon što se provedu spektrofotometrijska mjerenja za nefiltrirane uzorke na monitoru spektrofotometra prikazane su ispisane vrijednosti apsorbancije uzoraka pri određenim valnim duljinama (Slika 4.).



### 3.2.3 Apsorbancija za filtrirane uzorke bijelog vina u intervalu od 380-660 nm

Nakon izmjerenih vrijednosti apsorbancije za nefiltrane uzorke za valne duljine od 380,400,420 te 660 nm, uzorci se filtriraju kroz filter papir preko lijevka u Erlenmayer tikvice, te se ponovno svakome izmjeri apsorbancija za valne duljine od 380, 400, 420 i 660 nm. Erlenmayer tikvice se također numeriraju, da ne bi došlo do miješanja uzoraka.

Tako dobiveni filtrati u Erlenmayer tikvicama odnose se do spektrofotometra i ponovno uređaj se umjerava na određenu valnu duljinu, za koju se želi da bude prva, sa destiliranom ili deioniziranom vodom. Nakon umjeravanja postupak je isti kao i sa nefiltranim uzorcima, kiveta se očisti nakon svakog pojedinog mjerenja. Umjeravanje spektrofotometra izvodi se svaki puta kada se zadaje nova valna duljina, sa svim uzorcima<sup>15</sup> vrše se mjerenja za valne duljine 380, 400, 420 te 660 nm, tako se svaki pojedini uzorak upotrebljava 4 puta. Bitno je da se uzorak ne baca nakon mjerenja. Važno je paziti da se Erlenmayer tikvice s filtriranim i nefiltranim uzorcima ne pomiješaju, te da se u neku ne pripadajuću tikvicu ne bi nehotice, nakon provedenog mjerenja, bacalo uzorke iz kivete, i tako kontaminiralo neki drugi uzorak za daljnja mjerenja. Svi uzorci u Erlenmayer tikvicama moraju ostati očuvani jer s njima se prelazi na sljedeća mjerenja.

Filtrirani uzorci su prikazani na Slici 3.



**Slika 3. Filtrirani uzorci**

Izvor: Vlastita slika (Antonia Božić)

---

<sup>15</sup> Nefiltranim i filtranim.

Nakon završenih mjerenja filtriranih uzoraka, pri svakoj određenoj valnoj duljini, na monitoru ponovno su prikazane sve izmjerene vrijednosti apsorbancija za svaki pojedini uzorak, ti se podaci također ispisuju.



**Slika 4. Prikaz rezultata na monitoru spektrofotometra**

Izvor: Vlastita slika (Antonia Božić)

### **3.2.4. Određivanje mutnoće nefiltriranih i filtriranih uzoraka vina pomoću turbidimetra**

#### **Upotreba turbidimetra:**

Turbidimetar (Slika 5.) je uređaj kojim se mjeri turbiditet uzorka. Turbiditet je optičko svojstvo koje uzrokuje raspršenje svjetlosti i apsorpciju svjetla. Raspršenje svjetlosti dolazi prije svega od suspendiranih čestica u uzorku, što ih je više, veća je i količina raspršene svjetlosti, samim time i turbiditet. Čak i molekule u čistoj otopini, raspršuju svjetlost do određenog stupnja i nijedna otopina nema turbiditet nula. Svjetlost dolazi iz volframove žarulje sa žarnom niti, detektora raspršenog svjetla (90°) i detektora propuštenog svjetla (180°). Mikroprocesor turbidimetra zatim izračuna NTU vrijednost na temelju signala iz spomenuta dva detektora (Kralj, 2015). Mutnost se određuje nefelometrijski s turbidimetrom.

Turbidimetar koji mjeri mutnoću pri rasipanju svjetlosti pod kutom  $90^\circ$  je nefelometar i mjeri smetnje putovanja svjetlosti kroz tekućinu koje uzrokuju krute čestice u tekućini. Jedinica za mjerenje mutnoće je NTU (Compendium i sur., ,2013).



**Slika 5. Turbidimetar**

Izvor: Vlastita slika (Antonia Božić)

Uzorak se ulijeva u kivetu za turbidimetar, kiveta se zatvori plastičnim čepom i zatim se očita vrijednost NTU. Najprije se radi sa kontrolnim uzorkom (deionizirana voda) , mjerenja se vrše dva puta za svaki uzorak, rezultat se zapisuje u dnevnik, zatim se kiveta izvadi iz utora turbidimetra, gdje bude dok se očitava NTU , te se isprazni i ispere vodom iz boce štrcaljke, obriše, i ulije se sljedeći uzorak. Mjerenja se izvode 2x uzastopce, zbog toga kako bi se potvrdila pouzdanost rezultata prvog mjerenja. Ne smiju odstupanja biti velika, nelogično različita, npr. potpuno dva različita početna broja u rezultatu. Očitavanja se izvode najprije za nefiltrirane uzorke, a potom filtrirane. Kivetu je potrebno ispirati vodom i brisati papirnatim ubrusom svaki put nakon dva uzastopna mjerenja pojedinog uzorka.

## 4. REZULTATI

Tablica 1. Apsorbancije za nefiltrirane uzorke bijelog vina u intervalu od 380-660 nm

Valna duljina ( $\lambda$ )	380.0	400.0	420.0	660.0
Uzorak	A1	A2	A3	A4
1*	0.285	0.126	0.083	0.003
2	0.391	0.197	0.139	0.011
3	0.322	0.153	0.108	0.008
4	0.488	0.224	0.146	0.014
5	0.560	0.280	0.193	0.028
6	0.342	0.161	0.110	0.011
7	0.338	0.173	0.125	0.008
8	0.287	0.130	0.086	0.006
9	0.519	0.235	0.152	0.013
10	0.421	0.197	0.130	0.009
11	0.405	0.192	0.131	0.023
12	0.370	0.179	0.124	0.006
13	0.337	0.166	0.119	0.008
14	0.492	0.229	0.150	0.013
15	0.570	0.287	0.199	0.028

\*kontrolni uzorak

**Tablica 2.** Apsorbancije za filtrirane uzorke bijelog vina u intervalu od 380-660 nm

<b>Valna duljina (<math>\lambda</math>)</b>	<b>380.0</b>	<b>400.0</b>	<b>420.0</b>	<b>660.0</b>
<b>Uzorak</b>	A1	A2	A3	A4
<b>1*</b>	0.254	0.104	0.066	0.001
<b>2</b>	0.329	0.156	0.106	0.006
<b>3</b>	0.281	0.126	0.085	0.004
<b>4</b>	0.347	0.154	0.098	0.006
<b>5</b>	0.370	0.176	0.119	0.013
<b>6</b>	0.287	0.123	0.079	0.003
<b>7</b>	0.291	0.138	0.095	0.005
<b>8</b>	0.259	0.110	0.069	0.003
<b>9</b>	0.403	0.182	0.117	0.008
<b>10</b>	0.328	0.145	0.094	0.006
<b>11</b>	0.319	0.134	0.083	0.005
<b>12</b>	0.312	0.141	0.094	0.005
<b>13</b>	0.287	0.130	0.088	0.006
<b>14</b>	0.355	0.161	0.104	0.008
<b>15</b>	0.347	0.160	0.106	0.011

\*kontrolni uzorak

**Tablica 3.** Izmjerene vrijednosti mutnoće za nefiltrirane uzorke bijelog vina

<b>Uzorak</b>	<b>NTU nefiltriranih uzoraka</b>	
	1	2
<b>1*</b>	0.60	0.59
<b>2</b>	2.82	2.98
<b>3</b>	2.58	2.54
<b>4</b>	4.85	4.90
<b>5</b>	11.74	11.28
<b>6</b>	4.12	4.33
<b>7</b>	2.81	2.80
<b>8</b>	1.25	1.20
<b>9</b>	5.08	5.00
<b>10</b>	3.34	3.28
<b>11</b>	9.10	9.12
<b>12</b>	2.84	2.82
<b>13</b>	3.43	3.25
<b>14</b>	4.50	4.18
<b>15</b>	13.80	13.26

\*kontrolni uzorak

**Tablica 4.** Izmjerene vrijednosti mutnoće za filtrirane uzorke bijelog vina

<b>Uzorak</b>	<b>NTU filtriranih uzoraka</b>	
	1	2
<b>1*</b>	0.66	0.58
<b>2</b>	4.06	3.99
<b>3</b>	2.32	2.31
<b>4</b>	3.00	3.08
<b>5</b>	6.50	6.28
<b>6</b>	1.69	1.63
<b>7</b>	3.10	3.04
<b>8</b>	0.96	0.81
<b>9</b>	4.47	4.52
<b>10</b>	2.94	2.94
<b>11</b>	2.87	2.77
<b>12</b>	2.98	2.92
<b>13</b>	2.68	2.66
<b>14</b>	2.87	2.92
<b>15</b>	4.98	4.76

\*kontrolni uzorak

## 5. RASPRAVA

Tablica 1 i Tablica 2 prikazuju za nefiltrirane i filtrirane uzorke apsorbancije uzoraka pri svim zadanim valnim duljinama. Kod pojedinih uzoraka, kao što su uzorak br. 5 i uzorak br. 15 te razlike su izraženije, dok kod uzoraka br. 3 i br. 8 te razlike su manje, no općenito određena razlika prije filtracije i poslije filtracije postoji kod svakog uzorka, neovisno o valnoj duljini. Kao što je spomenuto u eksperimentalnom dijelu u pod poglavlju 3.2.2., organske tvari, odnosno komponente, u uzorcima apsorbiraju svjetlost u vidljivom te u UV djelu spektra. Jasno je da u uzorcima postoje tvari koje izazivaju mutnoću, te tvari su bjelančevine, teški metali, fenolni spojevi u vinu i dr. Međutim, u ovom eksperimentu pod nefiltriranim uzorcima ne smatraju se netaknuti uzorci vina doneseni na analizu u laboratorij, već oni uzorci koje smo dobili nakon bistrenja sa bentonitom, te kao takvi sadrže uz spomenute tvari koje zamućuju i čestice bistrila, odnosno –bentonita. Što je više različitih čestica koje uzrokuju mutnoću u vinu više će biti i apsorpcije svjetlosti koja će prolaziti uzorkom, samim time iznosi apsorbancija biti će veći.

Bistrenje bentonitom ima ulogu da otklanja prvenstveno proteinsko zamućenje jer veže bjelančevine, i na taj način će se smanjivati njihov broj u vinu. Postoji također i primjena nespecifičnog bentonita koji će odstraniti i višak bakrovih iona, ukoliko je vino prethodno čišćeno s bakrovim sulfatom, također takav bentonit može stabilizirati boju mladih crvenih vina. Međutim učinak bistrenja neće biti 100%-tan jer na tijek i proces uspješnosti bistrenja utječu mnogi faktori, kao što su: prethodni načini obrade, količina bistrila kojom se čisti, vrsta bistrila, način pripreme bistrila, zatim koncentracije, temperature, kemijskog sastava vina, sadržaja metala, pH, količine CO<sub>2</sub>, te alkohola. Svaka sorta ima različite udjele bjelančevina koje će se otpustiti u vino. Vina s nižim pH i većim udjelom alkohola brže se čiste, također, vina koja su kiseliya traže manju količinu bentonita za čišćenja, bez obzira što postoji spomenuta razlika u udjelima bjelančevina kod pojedinih sorti. Takvo vino može biti mješavina vina dobivena od različitih sorti vinove loze, no ukoliko ima niži pH potrebno će biti manje sredstva za čišćenje, odnosno stabilizaciju vina na bjelančevine. Stoga se čišćenje bentonitom provodi nakon korekcije kiselina u vinu dokiseljavanjem ili odkiseljavanjem, te stabilizacije vina na vinski kamen. Bitnu ulogu pri procesu čišćenja vina ima pH, tj. djelovanja sredstva za čišćenje, jer mehanizam djelovanja sredstva za čišćenje, u ovom slučaju bentonita, temelji se na osnovi električnih međudjelovanja čestica. Pozitivno su nabijene bjelančevine a negativno čestice bentonita, njihovim međudjelovanjem stvara se



kompleks bjelančevina-bentonit, koji tada zbog veće gustoće sedimentira. Povećanjem pH smanjiti će se moć međudjelovanja relativnoga električnog naboja među suspendiranim česticama i tada čestice nekih pozitivno nabijenih bjelančevinastih bistrila neće imati dovoljno pozitivnoga naboja da bi vezale negativno naelektrizirane čestice, poput fenola, antocijana, tanina i dr., te će se pojaviti višak sredstva za čišćenje u vinu koji nije reagirao sa negativno naelektriziranim česticama. Opisano će uzrokovati potencijalno povećanje zamućenja vina. Ovim eksperimentom uklonjene su prije svega bjelančevine dok većinom fenoli nisu, zato što su fenoli većinom negativno nabijene čestice, te ih se s negativno nabijenim česticama bentonita neće odstraniti i zbog toga je bentonit jedno od negativno nabijenih bistrila za bjelančevine. Preostali fenolni spojevi određivati će boju filtriranih uzoraka.

Ukoliko u vinu ima više CO<sub>2</sub> biti će potencijalno i veća mutnoća ako se vino nalazi u hladnom prostoru, jer bjelančevine i fenolni spojevi obično su „zarobljeni“ u mjehuriće CO<sub>2</sub> i povećanjem temperature prostora u kojem se čuva vino smanjiti će se i mutnoća.

Također više CO<sub>2</sub> u vinu ometa taloženje kompleksa bjelančevina s bentonitom. Bjelančevine su dovoljno malene da ostanu topljive i one doprinose aromi vina, stoga bistrenje uvijek doprinosi promjeni te arome, zato se za bistrenje, među ostalim, uvijek koristi samo ona najmanja količina bistrila koja je potrebna da se vino stabilizira. Također, vrijeme kontakta bjelančevina s bistrilom ograničava se na toliko vremena koliko je potrebno da nastane talog. 75% bjelančevina je već u prvoj minuti kontakta s bentonitom odstranjeno (Košmerl in Kač, 2010). Proteinska bistrila imaju bolju efikasnost odstranjivanja fenolnih spojeva pri nižim temperaturama (10 °C) nego pri višim (20-25 °C) (Košmerl in Kač, 2010). Fenolni spojevi su reaktivniji od bjelančevina, naime, skloni su procesima oksidacije i polimerizacije koji pod utjecajem oksidacijskih reakcija tvore smeđe obojene polimerne pigmente (Košmerl in Kač, 2010).

Kada proces bistrenja završi i vidljiv je talog, onaj dio vina iznad taloga smatra se nefiltriranim uzorkom. U takvom uzorku još uvijek je nešto suspendiranih čestica bistrila i bjelančevina i pri mjerenju apsorbancija iznosi apsorbancija zato će biti veći. Filtracijom takvih uzoraka kroz primjereni filter papir dobije se filtrirane uzorke, gdje je talog bjelančevina s bentonitom jasno odvojen od tekućeg djela, time i suspendirane čestice kompleksa bistrilo-bjelančevine. Kada se mjeri apsorbanciju pri tim uzorcima iznosi apsorbancija će biti znatno manji iznosom, osim kod nekih gdje će ta razlika kod filtriranih i nefiltriranih uzoraka biti mala, kao kod spomenutih uzoraka 3 i 8 u Tablici 2. Prvenstveno pri pripremi bentonita obično se koristi deionizirana voda da bi se spriječila pojava većeg

udjela metala u vinu ili bistrilu, ukoliko se dogodi povećanje metala u vinu dolazi do flokulacije, a time i do smanjene aktivnosti bistrila. Za pretpostaviti je da je do te pojave došlo kod uzoraka 3 i 8 (Tablica 2.) jer pri tim uzorcima nije bilo jasno odijeljenog taloga od sloja vina u odmjernoj tikvici nakon 24 h bistrenja, te se može zaključiti da je počinjena greška u pripremi bistrila kod tih uzoraka, jer svi uzorci su pripremljeni na istoj temperaturi, pod istim radnim uvjetima, a kako je vino smjesa vina raznih sorti koja je prethodno pomiješana u jedan spremnik, ne mogu se uzimati razlike pH kao faktori razlika u iznosima apsorbancija, kao ni ostali čimbenici. Ono što je uzrokovalo razlike u apsorbancijama od uzorka do uzorka su načini pripreme bentonita s deioniziranom vodom, kod nekih uzoraka je došlo do veće, a kod nekih do manje pojave flokulacije, samim time učinak bistrila od uzorka do uzorka je različit. Nakon filtracije uzorci su pokazivali manju apsorbanciju pri svim valnim duljinama, što je znak da je udio bjelančevina sada manji, ono što je pri određenim valnim duljinama apsorbiralo svjetlost kod filtriranih i nefiltriranih uzoraka su prvenstveno fenolni spojevi. Tako pri nefiltriranim uzorcima 2, 3, 4 i 11 opaža se prije filtracije crvenkasto-smeđe obojenje, što je znak da ti uzorci sadrže pretežno katehine. U uzorku 6 opažaju se uz crvenkasto-smeđe nijanse i ljubičaste nijanse, što znači da uz katehine, taj uzorak sadrži i galnu kiselinu. Ukoliko uz crveno-smeđe obojenje se opaža i nijanse žute kao kod uzorka 7 i 12, to znači da uz prisutne katehine prisutna je i mala koncentracija fenola. Općenito žuto obojenje znači malu koncentraciju fenola, takvi su bili uzorci 8 i 13. Ukoliko u nekom uzorku se očitava veća apsorbancija pri valnoj duljini koja je karakteristična za ljubičasto područje spektra, zaključujemo da u tom uzorku je prisutna galna kiselina, takvi su bili uzorci 5, 9, 10, 14 i 15.

Sva navedena tumačenja iznosa apsorbancija za spomenute uzorke odnose se na nefiltrirane uzorke. Nakon filtracija uzoraka, dolazi do promjena u obojenjima nekih od uzoraka, nekima se samo promjeni intenzitet boje, dok kod nekih uzoraka dolazi do otklanjanja određenih fenolnih spojeva filtracijom i tada će očitovanja apsorbancija kod takvih uzoraka pokazivati najveći intenzitet apsorbancija u područjima karakterističnima za neke druge fenolne spojeve. Iz navedenih podataka može se zaključiti da su se bentonitom tijekom filtracije odvojile i određene vrste fenolnih spojeva (određeni tanini koji imaju pozitivan naboj) uz bjelančevine. Spomenuto varira ovisno o dobroj pripremljenosti bistrila, jer o pripremljenosti bistrila je ovisio i aktivitet bistrila kasnije. Kod uzoraka 2, 8, 12, 13 i 14 (Tablica 2.) boja je žuta, što ukazuje na malu koncentraciju fenola. Crveno-smeđa očitavanja boje pojavljuju se kod uzoraka 3, 4, 5, 6, 11 i 15, što ukazuje na prisutnost katehina. Uzorci 7 i 9 pokazuju najveće apsorbancije kod ljubičastog djela spektra, ljubičaste nijanse ukazuju

na prisutnost galne kiseline, dok uzorak 10 je žuto- smeđe obojan, to ukazuje da sadrži malu koncentraciju fenola i prisutni su katehini.

Uzorak 1 je kontrolni uzorak, kod nefiltriranih i kod filtriranih uzoraka bijelog vina, i pokazuje vrlo nisku prisutnost fenola u vodi korištenoj za kontrolni uzorak. Iznosi apsorbancija najmanji su pri svim zadanim valnim duljinama kod obje vrste uzoraka u odnosu na druge uzorke (vino).

Nakon spektrofotometrijskog određivanja boje, slijedila je dodatna analiza mutnoće pomoću turbidimetra. Kod nefiltriranih uzoraka (Tablica 3.) opaža se da uzorci 5, 11 i 15 pokazuju najveće zamućenje, uzorak 15 ima najveći iznos NTU, dok najmanje pokazuje kontrolni uzorak, tj. voda, te uzorak br. 8. Očitavanja NTU kod tih uzoraka u skladu su s očitanjima apsorbancija koje su također kod nefiltriranih uzoraka najveće iznosom za spomenute uzorke, i također najmanje po iznosu opet kod uzoraka koji pokazuju i najmanje zamućenje. Kod filtriranih uzoraka najveći iznosi NTU su kod uzoraka 5, 9 i 15 ( Tablica 4.) a najmanji za uzorak 1 i 8, što je ponovno u skladu sa iznosima apsorbancija za spomenute filtrirane uzorke, koje su iznosom najveće i najmanje upravo kod spomenutih uzoraka.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Bistroča vina ovisi o topljivosti tvari koje ako su potpuno otopljene vino će biti bistro, dok koloidne skupine vrlo sitnih čestica uzrokuju mutnošću (bjelančevine, fenoli, teški metali i dr.).
2. Druga vrsta zamućenja je zamućenje razmrvljenim česticama krute tvari, te u određenim uvjetima ti dijelovi se izluče i zamute vina, pa se zbog tih čestica provodi bistrenje i pravilno punjenje (zatvoreni sistem punjenja, bez pristupa zraka).
3. Bentonit se veže za određene vrste fenolnih spojeva (pozitivno nabijeni tanini) uz bjelančevine, te se filtracijom nefiltriranih uzoraka uklanjaju sa sedimentom bentonita i stoga dolazi do nižih iznosa apsorbancija, a filtrirani uzorci su bistriji.
4. Nakon filtracije dolazi do pojave drugačijih nijansi obojenja, što upućuje da je u tim uzorcima došlo do uklanjanja fenolnih spojeva.

## 7. LITERATURA

1. KOŠMERL, T., KAČ, M., (2007): Kemijske analize in postopki čiščenja vina: Laboratorijske vaje pri izbirnem predmetu Vinarstvo, UL, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 60-61, 42-51.
2. KOŠMERL, T., KAČ, M., (2010): Kemijske analize in postopki čiščenja vina: Laboratorijske vaje pri izbirnem predmetu Vinarstvo, UL, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 60-61, 42-51.
3. MIHOČI, M., (2015): Osvrti, *Kem. Ind.* **64** (11-12), 683-685.  
<http://silverstripe.fkit.hr/kui/assets/Uploads/Osvrti-683-685.pdf>, pristupljeno (28.6.2019.)
4. ZORIČIĆ, M., (2013): Vinogradarsko vinarski priručnik, 2. izdanje, Slobodna Dalmacija, Split, 31-44, 48-56.
5. KRALJ, I., (2015): Petrološke i geokemijske značajke izvorišta potoka Šiškinovca na Plješevici: Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Rudarsko-geološko-naftni fakultet, Zagreb, 18.  
<https://repozitorij.unizg.hr/islandora/object/rgn:38/preview>, pristupljeno (7.4.2019.)
6. Compendium of international methods wine and must of analysis – OIV. 2013. Wine turbidity. Method OIV-MA-AS2-08, Type IV method, Volume 1. Paris, International organization of vine and wine, 109-115.  
<http://www.oiv.int/public/medias/2476/oiv-ma-as2-08.pdf>, pristupljeno (7.4.2019.)
7. Anonymus (1): Spektrofotometar Thermo Electron Corporation Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.  
[http://www.pbf.unizg.hr/content/download/4908/32188/version/3/file/spektrofotometar\\_biok.pdf](http://www.pbf.unizg.hr/content/download/4908/32188/version/3/file/spektrofotometar_biok.pdf), pristupljeno (7.4.2019.)
8. STRMIĆ, S., (2006): Spektroskopske metode, Sveučilište u Zagrebu, Geofizički odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Zagreb.  
<http://gfz.hr/~sabistrmic/SM.ppt>, pristupljeno (7.4.2019.)