

Utjecaj vremena odležavanja na kvascu na udio biogenih amina u pjenušcima kultivara Syrah

Malčić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:287649>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivan Malčić

Sveučilišni diplomski studij

Smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

**UTJECAJ VREMENA ODLEŽAVANJA NA KVASCU NA UDIO
BIOGENIH AMINA U PJENUŠCIMA KULTIVARA
SYRAH (*Vitis vinifera L.*)**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivan Malčić

Sveučilišni diplomski studij

Smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

**UTJECAJ VREMENA ODLEŽAVANJA NA KVASCU NA UDIO
BIOGENIH AMINA U PJENUŠCIMA KULTIVARA
SYRAH (*Vitis vinifera L.*)**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu diplomskog rada:

Izv. prof. dr. sc. Mato Drenjančević, predsjednik

Prof. dr. sc. Borislav Miličević, mentor

Izv. prof. dr. sc. Vladimir Jukić, član

Osijek, 2020.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	2
2.1. Pregled kretanja proizvodnje i potrošnje vina.....	2
2.1.1. Povijesni pregled proizvodnje i potrošnje vina.....	2
2.1.2. Proizvodnja i potrošnja grožđa i vina u svijetu.....	3
2.1.3. Proizvodnja i potrošnja grožđa i vina u Republici Hrvatskoj.....	4
2.2. Sorte vinove loze za proizvodnju pjenušavih vina.....	4
2.2.1. Syrah.....	4
2.3. Proizvodnja pjenušavih vina.....	6
2.3.1. Kategorizacija pjenušavih vina.....	6
2.3.2. Postupci proizvodnje pjenušavih vina.....	7
2.3.3. Prirodni pjenušac od mladog nepotpuno provrelog vina.....	8
2.3.4. Prirodni pjenušac na bazi provrelog zrelog vina.....	9
2.3.5. Proizvodnja osnovnog vina za pjenušac.....	9
2.3.6. Priprema i dodavanje šećernog sirupa i vinskog kvasca.....	9
2.3.7. Naknadna fermentacija u boci.....	10
2.3.8. Degoržiranje.....	10
2.3.9. Industrijska proizvodnja pjenušaca u metalnim tankovima.....	10
2.4. Biogeni amini.....	11
2.4.1. Prisutnost biogenih amina u vinu.....	12
2.4.2. Nastanak biogenih amina u vinu – mikroorganizmi.....	14
2.4.3. Čimbenici koji utječu na nastanak biogenih amina.....	15
2.4.4. Toksičnost biogenih amina.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. Materijali.....	18
3.1.1. Postupak proizvodnje baznog vina.....	18
3.1.2. Postupak proizvodnje pjenušaca klasičnom metodom.....	19
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Fizikalno – kemijske metode.....	20
3.2.2. HPLC (Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti).....	20
3.2.3. Statistička analiza.....	21
4. REZULTATI.....	22

4.1. Fizikalno kemijska analiza vina.....	22
4.2. Analiza biogenih amina u vinu primjenom HPLC metode	23
5. RASPRAVA.....	24
5.1. Fizikalno kemijske osobine vina.....	
5.1.1. Utjecaj vremena odležavanja na kvascu na fizikalno-kemijske osobine pjenušavog vina kultivara Syrah.....	24
5.2. HPLC analiza biogenih amina osobine vina.....	25
5.2.1. Utjecaj vremena odležavanja na kvascu na prisutnost biogenih amina u pjenušavom vinu kultivara Syrah.....	25
6. ZAKLJUČAK.....	27
7. LITERATURA.....	28
8. SAŽETAK.....	31
9. SUMMARY.....	32
10. POPIS TABLICA.....	33
11. POPIS SLIKA.....	34
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	35
BASIS DOCUMENTATION CARD.....	36

1. UVOD

Vina koja sadrže ugljični dioksid u određenoj količini koji stvara tlak u boci nazivaju se pjenušava vina. Pjesnik Vergilije, još od doba Rimljana, spominje u svom spjevu vino koje se pjenu u čaši, te iz tog doba potječu u iskopinama čaše za pjenušac slične današnjima.

U počecima proizvodnje pjenušavih vina tehnološki postupak je bio znatno primitivniji od današnjeg, stoga je i kvaliteta istoga bila lošija nego danas. Razvojem tehnoloških postupaka u proizvodnji pjenušavih vina danas možemo utjecati na količinu kemijskih tvari u vinu koje imaju utjecaj na ljudsko zdravlje. Količina biogenih amina u vinu sve je bitnija što proizvođačima to i potrošačima budući da predstavlja opasnost za zdravlje ljudskog organizma. Biogeni amini su dušične organske baze niske molekulske mase koje mogu imati aromatsku, heterocikličku ili alifatsku strukturu. Biogeni amini rasprostranjeni su u fermentiranim pićima, u većini slučajeva kao produkti dekarboksilacije slobodnih aminokiselina koje su prethodnici njihovog nastanka. U vinu najčešće nalazimo histamin, putrescin, 2-feniletilamin i tiramin (Košmerl i sur., 2013; Čuš i sur., 2013; Soufleros i sur., 2007; Marcobal i sur., 2005.)

Osim u fermentiranim pićima, biogeni amini se mogu koristiti kao pokazatelji kvarenja ostalih prehrambenih proizvoda. U malim količinama bitni su za metaboličke i fiziološke funkcije biljaka, životinja i mikroorganizama, ali u većim količinama može doći do reakcija kod osjetljivih jedinki.

Razna znanstvena istraživanja rađena su s ciljem kako bi utvrdila prisutnosti amina te smanjila njihovu koncentraciju u vinu, a očekuje daljnji razvoj tehnologije i metoda detekcije. Do danas su prepoznati mnogi čimbenici koji utječu na formaciju amina, što se posebno odnosi na tehnologiju proizvodnje vina. Posebno je važno uzeti u obzir sve čimbenike, od uzgoja vinove loze, preko izbora pogodnih enoloških postupaka, pa sve do uvjeta čuvanja i serviranja vina.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Pregled kretanja proizvodnje i potrošnje vina

2.1.1. Povijesni pregled proizvodnje i potrošnje vina

Brojni znanstveni dokazi govore o tome kako je vinova loza veoma stara kultura. Najstarijim pisanim dokumentom iz područja vinogradarstva smatra se Biblija. Već u Starom zavjetu se svjedoči da je Noa podizao vinograde i proizvodio vino. Dokazi nam govore da kultiviranje vinograda i proizvodnja vina potječe i do 6.000 godina pr. Kr. Oko Kaspijskog mora i na području Mezopotamije spominje se prvi uzgoj vinove loze, a potom dolazi do širenja na ostale strane svijeta i to na istok prema Indiji, na zapad prema Balkanskom poluotoku i zapadnoj Europi, te na jug prema Egiptu i Palestini. Vjeruje se da su upravo Egipćani razvili prve metode branja i prerade grožđa, dok arheološki nalazi upućuju na lokacije na kojima su zakopani vrčevi što upućuje na to da im je bio poznat utjecaj temperature na čuvanje vina.

Na stari kontinent vino dolazi oko 1.600 godina prije Krista razvojem grčke civilizacije. Grci su smatrali da je konzumacija vina privilegija viših slojeva društva, dok „običan“ narod nije imao privilegiju trošiti vino. Za vrijeme Rimskog carstva dogodio se značajan razvoj i unapređenje vinarstva te širenje proizvodnje vina u zemlje Europe i to od Francuske, Španjolske, Italije pa sve do nekih dijelova Velike Britanije. Raspadom Rimskog carstva umijeće proizvodnje vina sačuvali su kršćanski samostani koji su utjecali na današnji razvoj najvažnijih vinskih regija u Europi (Burgundija, Champagne i dolina Rajne).

U našim krajevima dokaze o proizvodnji vina ostavio je u djelu „Gozba učenjaka“ Grčki pisac Atenaj (2. stoljeće prije Krista) gdje se navodi „na otoku Visu u Jadranskom moru proizvodi se vino koje je bolje od svih ostalih vina ako se s njim uspoređi“. Na otoku Visu su pronađeni vrčevi koji datiraju čak iz 6. stoljeća prije Krista kao i kovanice s otisnutim grozdom i peharom. S protokom vremena vinogradarstvo je prošireno cijelom našom obalom te postala jedna od bitnijih djelatnosti. Iako Hrvati nakon pokršćavanja u 8. i 9. stoljeću nisu poznavali uzgoj vinove loze prihvatili su je za poljoprivrednu kulturu. Nakon toga vinogradarstvo se počinje snažno razvijati i time porasta potražnja za vinima, a zbog položaja i prometne povezanosti s ostatkom svijeta šire se i strane sorte.

2.1.2. Proizvodnja i potrošnja grožđa i vina u svijetu

Svjetska proizvodnja vina, ne računajući sokove i mošt, u 2019. procjenjuje se na 260 milijuna hektolitara, što je osjetno smanjenje, u odnosu na povijesno visoku proizvodnju iz 2018. Nakon blagog pada svjetske potrošnje vina registrirane u 2018., svjetska potrošnja vina u 2019. procjenjuje se na 244 milijuna hektolitara, što je porast od +0,1% u odnosu na prethodnu godinu. U 2019. godini svjetsko tržište izvoza vina proširilo se s obzirom na 2018. godinu kako po količini, procijenjenoj na 105,8 milijuna hektolitara (+1,7%), tako i po vrijednosti od 31,8 milijardi EUR (+0,9%). Prve procjene proizvodnje vina na južnoj hemisferi ukazuju na niske očekivane količine za 2020. godinu za većinu zemalja, s izuzetkom Južne Afrike i Urugvaja.

Proizvodnja vina u vodećim europskim zemljama poput Francuske koja je u 2018. godini proizvela 41,4 milijuna hektolitara, Italija koja je u 2018. godini proizvela 40 milijuna hektolitara i Španjolska koja je proizvela 30,3 milijuna hektolitara.

Proizvodnja vina u SAD-u je imala znatan porast i dosegla je do 20,5 milijuna hektolitara. Čile također bilježi porast proizvodnje vina u 2018. godini pa tako postižu i svoj rekord u proizvodnji od 12,6 milijuna hektolitara.

Nakon što je u Argentini nekoliko godina stalno rasla proizvodnja grožđa i vina u 2018. godini dolazi do pada proizvodnje od 24% te količina proizvedenog vina iznosi 11,8 milijuna hektolitara.

Svjetska proizvodnja vina u 2018. godini procjenjuje se na količinu između 290,9 i 293 milijuna hektolitara (<https://juliofrangenfoto.com/2019/05/05/svijet-vina-2018-2019/>).

U 2019. godini svjetska proizvodnja vina pala je na 260 milijuna hektolitara, što je smanjenje od 35 milijuna hektolitara (11,5%) u odnosu na rekordnu 2018. godinu (Međunarodna organizacija za vinograde i vina OIV).

Na prvom se mjestu nalazi Italija s proizvodnjom od 47,5 milijuna hektolitara, zatim Francuska s 42,1 milijuna hektolitara, a na trećem je Španjolska s 33,5 milijuna hektolitara. Iako su te tri zemlje zabilježile blagi pad proizvodnje zajedno čine čak 48% svjetske proizvodnje vina.

2.1.3. Proizvodnja i potrošnja grožđa i vina u Republici Hrvatskoj

Proizvodnja grožđa i vina ima dugu tradiciju u Republici Hrvatskoj. Proizvodnja grožđa, a time i vina u posljednjih desetak godina je u porastu. Sortiment vinove loze sastoji se od mnogobrojnih sorti, a prema zastupljenosti prevladavaju kultivari Graševina, Malvazija istarska i Plavac mali koje su 45% sortimenta. Ostatak sortimenta čine brojne sorte koje se koriste za dobivanje manjih serija vina dok veliki potencijal leži u 130 autohtonih sorata koje nisu od posebnog gospodarskog značaja (Grgić i sur., 2011.).

U 2018. godini potrošnja vina u Republici Hrvatskoj procjenjuje se na 22 litre po stanovniku, s tim smo dostigli prosječnu potrošnju u EU (<https://www.hgk.hr/>).

2.2. Sorte vinove loze za proizvodnju pjenušavih vina

Vrlo je važan pravilan odabir sorte vinove loze budući da o njemu ovisi završna kvaliteta pjenušavih vina. U praksi se koriste sorte manje aromatičnosti koje sadrže veću ukupnu kiselinu i manji sadržaj šećera. Sorte koje se najčešće koriste na području Champagne za proizvodnju pjenušaca koji se proizvode tehnologijom vinifikacije za bijela vina su Chardonnay, Pinot crni i Pinot sivi.

Hrvatska proizvodnja pjenušavih vina je šireg spektra sorata kao što su Malvazija, Chardonnay, Kraljevina, Žlahtina, Graševina, Teran, Merlot i ostalih mješavina sorti.

2.2.1. Syrah



Slika 1. Syrah (<https://www.wine-searcher.com/m/2016/10/syrah-wine-s-international-success-story>)

Zoričić (1998.) navodi kako Syrah možemo najviše naći u Francuskoj, Australiji i SAD – u iako se uzgaja u mnogim vinogradarsko – vinarskim zemljama u svijetu. Njegovi sinonimi su Shiraz, Sirac, Sirah, te Balsamina. Ova sorta je uvežena iz Francuske zbog dobrih prinosa i kvalitete vina (boja, aroma i visoki ekstrakt), a koristi se za miješanje s vinima koja te karakteristike nemaju. U Republici Hrvatskoj je najzastupljeniji na lokalitetu Nadin u Zadarskom vinogorju.

Simon (2004.) navodi kako je Syrah sorta koja nam daje vina srednje do visoke kvalitete, a to ovisi o uvjetima okoline. Prikuplja 18 do 25% šećera, a kretanje ukupne kiseline od 6,0 do 8,0 g/L. Često se miješa s Cab. sauvignonom i Merlotom i time daje ukusna, jaka, zrela i mirisna vina. Grad Shiraz (Iran) smatra se kolijevkom perzijske umjetnosti i pismenosti. Ovdje je i kolijevka istoimene crne sorte grožđa imenom Syrah koja se udomačila u dolini francuske rijeke Rhone te se od tamo raširila o svijetu. U zadnjih desetak godina dolazi u naše krajeve Slavoniju, Istru, Dalmaciju, zelinsko Prigorje i na Plešivicu. Syrah je sorta koja u podnebljima hladnije klime daje vina s aromom crnog papra i crnog ribiza, dok u vrućim dijelovima miriše na kupinu i čokoladu.

Jedan je od najboljih kultivara koji se mogu primijeniti za blendiranje vina (Clarke, Oz; Margaret Rand 2008.) „Grožđe je puno antocijana i podnosi fermentacije od 30 do 35 °C, dok su uobičajene maceracije u trajanju od pet do petnaest dana, a grožđe kasnije brano daje bolje rezultate pri duljim maceracijama“ (Jackson 2008.). Iako klimatski uvjeti i nisu idealni za ovu sortu uzgoj u vinogorju Kutjevo u posljednjih godinama ipak uspijeva. Syrah je sorta koja u sušnim i toplim godinama daje vina visoke punoće, jake boje i visokih alkohola za razliku od kišnih godina kada su vina manje alkoholična i znatno laganija. Vinogorje Kutjevo, prema Pravilniku o vinu, pripada u regiju C1 (Winklerova klasifikacija) Slavonija i hrvatsko Podunavlje, podregija Slavonija koje se nalazi na 45,3^o paraleli, a najpoznatije je po sorti Graševina koja prevladava u tom vinogorju. Optimalne uvjete za uzgoj crnih sorata možemo naći na južnim obroncima gora Papuka i Krndije na višim nadmorskim visinama (oko 300 m).



Slika 2. Syrah (<https://www.austrianwine.com/our-wine/grape-varieties/red-wine/syrah>)

2.3. Proizvodnja pjenušavih vina

2.3.1. Kategorizacija pjenušavih vina

Zakonom o vinu u RH pjenušava vina podijeljena su na:

- pjenušavo vino
 - kvalitetno pjenušavo vino
 - kvalitetno aromatično pjenušavo vino
 - gazirano pjenušavo vino
 - biser vino
 - gazirano biser vino
- Prema Zakonu o vinu, NN 96 / 03 s izmjenama i dopunama navodi se kako su „prirodna pjenušava vina i prirodna biser vina su vina čiji je sadržaj i pritisak ugljičnog dioksida u boci proizveden isključivo naknadnim vrenjem šećera u vinu. Gazirana pjenušava vina su vina kojima je prilikom punjenja u boce dodan ugljični dioksid.

Pjenušavim vinima može se nakon završenog naknadnog vrenja dodati ekspedicioni liker, radi postizanja odgovarajućeg sadržaja ne provrelog šećera.“

Tablica 1. Utjecaj sadržaja alkohola na odmjeravanje šećera pri šampanizaciji (Radovanović, 1970.)

Količina alkohola u vinu, vol%	Potrebna količina šećera u g/l za dobivanje pritiska od:		
	5 bara	5,5 bara	6 bara
9	19	21	23
10	20	22	24
11	21	23	25
12	22	24	26

Prema načinu proizvodnje pjenušava vina dijele se na dvije metode proizvodnje:

- klasična metoda – metoda vrenja u bocama (sekundarna fermentacija u boci), poznata kao champenoise metoda (tom metodom proizvode se šampanjci i samo pjenušci proizvedeni klasičnom metodom iz francuske pokrajine *Champagne* mogu se zvati šampanjcima);
- metoda vrenja u tankovima (sekundarna fermentacija u tanku) poznata kao *charmat* metoda (<https://www.mladina.hr/mala-skola-pjenusaca/>).

2.3.2. Postupci proizvodnje pjenušavih vina

Različita pjenušava vina možemo dobiti različitim postupcima proizvodnje. Ako nam je cilj proizvesti konačni proizvod prirodno pjenušavo vino možemo ga proizvesti od mladog provrelog vina s ostatkom šećera i od provrelog zrelog vina.

Sekundarnom fermentacijom dosežemo tlak ugljičnog dioksida do 5 bara te vinu daje osobinu perlanja koja je bitna za vizualni dojam i daje mu jedan rezak i osvježavajući okus.

Ugljični dioksid je u većoj količini rastopljen ili se vezao za spojeve u vinu, a u manjoj količini slobodan što omogućava perlanje malih mjehurića u čaši.



Slika 3. Pjenušac kultivara Syrah (autor 2020.)

2.3.3. Prirodni pjenušac od mladog nepotpuno provrelog vina

U postupku proizvodnje mlado vino s neprovrelim šećerom puni se u boce za pjenušce nakon čega se odvija sekundarna fermentacija te dolazi do stvaranja ugljičnog dioksida i malog dijela taloga. Takvo mlado vino dobiva se od mošta kvalitetnog grožđa koje se taloži i bistri te ima lagano vrenje na manjoj temperaturi. Fermentaciju je potrebno prekinuti nizom filtracija koliko je potrebno da se sav mogući kvasac i njegovo djelovanje svedu do minimuma. Pjenušavo vino kakvo se proizvodi u mnogim zemljama dobit ćemo sekundarnom fermentacijom nakon više mjeseci. Takav najpoznatiji tip vina za naše područje je Bakarska vodica.

2.3.4. Prirodni pjenušac na bazi provrelog zrelog vina

U francuskoj pokrajini Champagni postupak proizvodnje na bazi provrelog zrelog vina primijenjen je prije više od 300 godina. Nizom godina proizvodnje postupak je mijenjan , poboljšan i usavršen. Francuska nakon prvog svjetskog rata međunarodnim ugovorima zaštitila je ime šampanjac koje se isključivo koristi za pjenušava vina proizvedena u pokrajini Champagni.

2.3.5. Proizvodnja osnovnog vina za pjenušac

Pinot crni je osnovna sorta vinove loze u proizvodnji šampanjskog pjenušca. Pinotu crnom može se dodati i neka druga vinska sorta u manjim omjerima kako bi dobili kvalitetnu sirovinu za mošt koji bi trebao imati sadržaj šećera oko 20% i 8 g / l kiseline. Kako bi dobili što manje boje iz pokožice u moštu pristupa se odmah prešanju.

Isprešanom soku iz grožđa, odnosno moštu, dodaje se sumpor i selekcionirani vinski kvasac koji podnosi niže temperature fermentacije. Po završetku fermentacije vino se miješa i tipizira te se vrši hladna stabilizacija. Prema potrebi vrši se pretakanje i bistrenje vina kako bi dobili pripremljen bazno vino za proizvodnju pjenušca.

2.3.6. Priprema i dodavanje šećernog sirupa i vinskog kvasca

Kada je potpuno završen proces vrenja baznog vina dodajemo mu šećerni sirup kako bi potaknuli naknadno vrenje. Priprema šećernog sirupa dobiva se otapanjem šećera (saharoze) u određenoj količini vina koncentracije od 50%. Vinski kvasac koji primjenjujemo za naknadnu fermentaciju u boci mora biti selekcionirani, čist i umnožen u maloj količini vina uz dodatak 10% saharoze.

Pažljivo i točno potrebno je odrediti količinu sirupa koju dodajemo vinu jer o tome ovisi kakvo pjenušavo vino ćemo dobiti s obzirom na udio ugljičnog dioksida. Kako bi izbjegli pucanje staklenih boca za pjenušava vina maksimalni tlak ugljičnog dioksida ne smije premašiti 5,5 bara. „Dobro homogenizirana smjesa vina, šećernog sirupa i kvasca pomoću kružnih miješalica razlijeva se u šampanjske boce, čepi plutenim čepom i kao osiguranje se preko čepa stavlja metalna kapica“ (Sokolić, 2006).

2.3.7. Naknadna fermentacija u boci

Boce položene vodoravno smještene su u prikladnim prostorijama uz konstantnu temperaturu između 10 i 12°C tijekom cijele godine te tim položajem pluteni čep ostaje vlažan, a na taj način sprječava gubitak ugljičnog dioksida. Početak sekundarne fermentacije započinje u vrlo kratkom vremenu ali se odvija sporije zbog utjecaja niže temperature i relativno visokog postotka alkohola u vinu koji se kreće između 11 i 12 vol%. Spora fermentacija omogućuje ugljičnom dioksidu dobro otapanje i kemijsko vezanje u vinu. Praćenje fermentacije vrši se mjerenjem nastalog tlaka ugljičnog dioksida prilagođenim manometrom kroz čep. Nakon provrelog cjelokupnog udjela šećera sadržaj alkohola porast će za 1 vol%. U slučaju prestanka fermentacije potrebno je potaknuti kvasac na nastavak fermentacije protresanjem boca. Nastali talog u boci i kamenac poslije fermentacije potrebno je ukloniti iz boce postupkom degoržiranja.

2.3.8. Degoržiranje

Postupak izbacivanja taloga nataloženog u grlu boce naziva se degoržiranje. Obavlja se pažljivim otvaranjem boce koja se nalazi pod tlakom ugljičnog dioksida koji izbacuje talog prikupljen u grlu boce. Talog prikupljen u grlu boce prethodno je potrebno zamrznuti utapanjem u rashlađeni medij glikola od -18°C. Tu operaciju obavljaju iskusni i spretni radnici.

Udio vina koji se prilikom degoržiranja izgubi nadopunjava se količinom ekspedicionog likera. Pripravak od temeljnog vina, šećera, finog vinskog destilata i limunske kiseline u propisanim omjerima naziva se ekspedicioni liker.

Poslije procesa degoržiranja i dodavanja ekspedicionog likera boce je potrebno zatvoriti prikladnim plutenim čepom koji se osigurava žičanom košaricom za pjenušac. Takvom pjenušavom vinu radi harmonizacije sadržaja potrebno je odležavanje u prikladnoj prostoriji od nekoliko mjeseci.

2.3.9. Industrijska proizvodnja pjenušaca u metalnim tankovima

Brži, jednostavniji i jeftiniji način proizvodnje pjenušaca je proizvodnja u metalnim tankovima.

Ta tehnologija danas se češće koristi zbog većeg iskorištenja proizvodnog prostora, manjom potrebom za iskusnom radnom snagom te manje utrošenog vremena.

Polovicom devetnaestog stoljeća u Francuskoj je započelo pojednostavljivanje procesa proizvodnje pjenušavog vina i prilagođavanje industrijskoj proizvodnji. U dvadesetom stoljeću osmišljen je brzi proces fermentacije u metalnim tankovima a do tada se fermentacija odvijala u autoklavima.

„Današnji pogoni vinarija za proizvodnju pjenušaca imaju uređaje za pasterizaciju, uređaje za rashlađivanje, baterije metalnih tankova sa dvostrukim stjenkama uređaje za izobaričnu filtraciju, uređaje za punjenje boca pod pritiskom, posude za pripremu kvasca i šećernih sirupa. Tu su još razne cijevi, pumpe, sisaljke i miješalice koje su potrebne u procesu.“ (Sokolić, 2006.)

U današnjoj modernoj proizvodnji pjenušaca ne dodaje se ekspedicioni liker pa treba voditi računa o količini dodavanja šećera. Baznom vinu dodaje se šećerni sirup i kvasac, a uz povoljnu temperaturu (12-15°C) pokrenuti će naknadnu fermentaciju.

Kada postignemo dovoljno visok tlak kojeg kontroliramo manometrom prekidamo vrenje rashlađivanjem vina u posudi sa spuštanjem temperature na -5°C. Istim zahvatom radimo stabilizaciju, kristalizaciju vinskog kamenca i odvajanje taloga. Izobaričnom filtracijom uklanjamo talog iz vina a pri tome ne gubimo ugljični dioksid. Tim postupkom dolazimo do završetka proizvodnje pjenušca u tanku.

Posljednji korak proizvodnje je punjenje boca pjenušcem koji je potrebno rashladiti na temperaturu od -1°C, a taj proces odrađujemo izobaričnom punilicom kako bi sačuvali prisutni ugljični dioksid.

U današnje vrijeme, unapređenjem tehnologije, proces proizvodnje je mehaniziran i traje svega 40-45 dana.

2.4. Biogeni amini

„Biogeni amini su skupina organskih dušičnih spojeva koji nastaju u organizmima ljudi, životinja, biljaka i mikroorganizama. Do nastanka biogenih amina može doći u svim prehrambenim proizvodima kod kojih tijekom proizvodnje, zriobe i čuvanja dolazi do mikrobioloških promjena bjelančevina. U velikoj mjeri može ih se naći u prehrambenim

proizvodima koji nastaju uz pomoć mikrobioloških procesa, ali i u pokvarenim proizvodima bogatim bjelančevinama. Konzumiranje biogenih amina u normalnim uvjetima ne predstavlja neposrednu opasnost za zdravlje, budući da ljudski organizam posjeduje nekoliko kontrolnih mehanizama. Kod viših koncentracija biogenih amina može pod određenim uvjetima doći do zakazivanja tih kontrolnih mehanizama, što dovodi do neželjenih efekata po zdravlje“ (Lemperle, 2009.).

"Europska Unija nije zakonski regulirala količinu biogenih amina u vinu, nego je samo dala preporuku, tzv. „Safety threshold values“ (EFSA, 2011.). Općenito, toksičnom količinom u alkoholnim pićima smatra se 8 – 20 mgL⁻¹ za histamin, 25 – 40 mgL⁻¹ za tiramin, no feniletilamin negativne fiziološke učinke može imati već pri udjelu 3 mgL⁻¹“ (Karovičova i Kohajdova, 2005.).

„Na udio biogenih amina u vinu utječe čitav niz vitikulturnih i enoloških faktora. Neki amini prisutni su već u bobicama grožđa (Bover-Cid i sur., 2006.; Kiss i sur., 2006.), a naknadno neki faktori mogu ili povećati ili smanjiti koncentraciju prekursora i biogenih amina kako u grožđu, tako i u vinu. Među faktorima koji pogoduju stvaranju amina u vinu su i neki postupci tijekom proizvodnje vina (primarna i sekundarna fermentacija), kojima nastaju slobodne aminokiseline – prekursori BA“ (Martin-Alvarez i sur., 2006.; Alcaide-Hidalgo i sur., 2007.; Vincenzini i sur., 2009.).

2.4.1. Prisutnost biogenih amina u vinu

Dva su glavna tehnološka procesa u vinifikacija grožđa – alkoholne i malolaktične fermentacije. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je uglavnom pokretač alkoholnog vrenja mošta, a stvara iz grožđanog šećera etanol i CO₂. Bakterije mliječne kiseline (rodovi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Oenococcus*) provode malolaktičnu fermentaciju u crvenim i nekim bijelim vinima što omogućava pretvorbu jabučne kiseline u mliječnu, modificira senzorne karakteristike vina i osigurava određeni stupanj mikrobiološke stabilnosti vina.

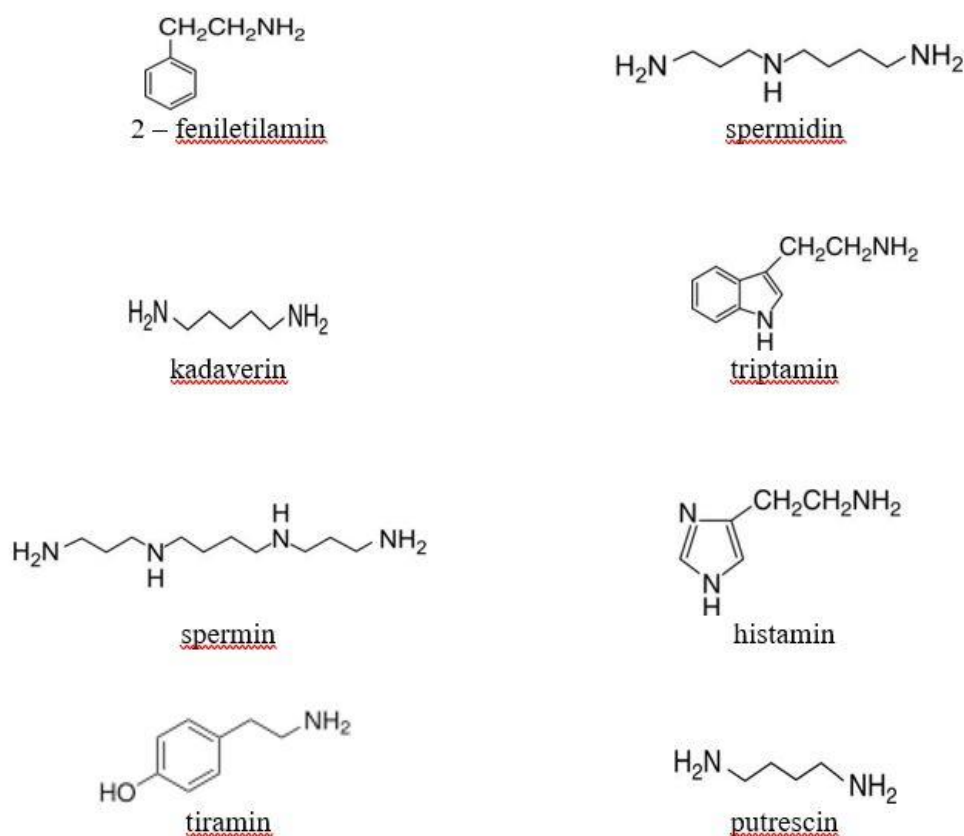
Lemperle (2009.) navodi kako biogeni amini mogu utjecati na zdravstveno stanje vina, a stvaraju ih pojedini mikroorganizmi tijekom fermentacije. Biogeni amini u vinu mogu nastati u tri moguće reakcije, a to su:

- dekarboksilacija aminokiselina

- aminiranje (dodavanje NH₂ – grupe) aldehida i ketona
- razgradnja dušičnih spojeva

„Većina primarnih amina nastaje dekarboksilacijom aminokiselina, sekundarni amini nastaju aminiranjem aldehida i ketona, dok razgradnjom dušičnih spojeva nastaju metil - , etil - , dimetil – i etanolamin. Najzanimljiviji su i – amilamin i etilamin koji nastaju kao nusproizvod alkoholnog vrenja. Osim njih javljaju se i ostali biogeni amini poput histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina, kadaverina, spermidina, spermina, agmatina i triptamina.“ (Lemperle, 2009.).

„Biogeni amini mogu imati alifatsku (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatsku (tiramin, feniletilamin) ili heterocikličnu kemijsku strukturu (histamin, triptamin).“ (Karovičova, 2005.)



Slika 4. Kemijska struktura biogenih amina (Flamini, 2008.)

Biogeni amini, npr. putrescin, kadaverin, spermidin, nalaze se na grožđu dok u svježem moštu mjerimo malu razinu biogenih amina uglavnom spermidina i putrescina. U pravilu se u vinu nalazi veća koncentracija biogenih amina u usporedbi sa moštom. Tako je uobičajeno da se u crnom vinu nalazi mnogo više biogenih amina u odnosu na bijelo vino. Zahvaljujući malolaktičnoj fermentaciji koja se provodi u proizvodnji crnih vina dolazi do povećane koncentracije biogenih amina u odnosu na proizvodnju bijelih vina gdje malolaktična fermentacija nije učestala.

Koncentracija biogenih amina u vinu ovisi o vremenu maceracije, trajanju odležavanja vina na talogu i o mikroflori, koja sudjeluje u vrenju, a koja sadrži različite vrste kvasaca i bakterija.

2.4.2. Nastanak biogenih amina u vinu – mikroorganizmi

U proizvodnom procesu vina dolazi do pojave niza raznih mikroorganizama koji imaju učinak na formiranje biogenih amina. U odnosu na bakterije mliječne kiseline kvasci imaju manji utjecaj na koncentraciju biogenih amina u vinu, a isto tako kvasci i bakterije mliječne kiseline stvaraju različite vrste biogenih amina. U prilog tome ide i činjenica da postoji mnogo više podataka da bakterije mliječne kiseline doprinose nastanku biogenih amina u usporedbi s dostupnim podacima o djelovanju kvasaca. Gljivica *Botrytis cinerea* koja utječe na promjene u sastavu grožđa također ima djelovanje na povećanje amina.

Uz komercijalne sojeve *Saccharomyces cerevisiae* u alkoholnoj fermentaciji sudjeluju različite vrste autohtonih kvasaca. Smit i suradnici (2008.) navode da je „nekoliko istraživanja provedeno o utjecaju kvasaca na stvaranje biogenih amina u vinu u kojima su uspoređivane različite vrste kvasaca. Pojedini autori su utvrdili da ne dolazi do značajnog porasta koncentracije biogenih amina tijekom alkoholne fermentacije, te da kvasci nisu odgovorni za produkciju većine amina pronađenih u industrijskim crvenim vinima. U jednom istraživanju je čak utvrđeno smanjenje biogenih amina (posebno putrescina) tijekom alkoholne fermentacije“

Također je dokazano povećanje razine biogenih amina u vinu direktnim utjecajem autohtonih kvasaca prilikom fermentacije. U istraživanju količine biogenih amina koji su proizveli različiti sojevi *Saccharomyces cerevisiae* u roze vinima gdje je izmjeren lagani

porast putrescina, spermina, spermidina, feniletilamina i tiramina ovisno o soju. Dolazi se do zaključka da mošt u koji su dodani sojevi *Saccharomyces cerevisiae* daje vina s većim udjelom biogenih amina za razliku od spontane fermentacije koju provode autohtoni kvasci. Testiranjem pet rodova kvasaca izdvojenih iz grožđa i vina *Brettanomyces bruxellensis* uzrokovao je najvišu razinu amina, a slijedi ga *Saccharomyces cerevisiae* dok ostali nisu proizveli značajnije količine.

Godinama je pojava biogenih amina povezivana sa lošim higijenskim uvjetima vinarija te se smatra kao posljedica mane vina uzrokovane raznim sojevima bakterija mliječne kiseline koje pripadaju rodovima *Pediococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Te bakterije stvaraju biogene amine zbog prisutnosti njihovih prethodnika aminokiselina, gdje se ističe rod *Pediococcus* koji je najzastupljeniji u proizvodnji histamina. Dolazeći do zaključka da soj *Oenococcus oeni* koja se najčešće dovodi u vezu s malolaktičnom fermentacijom također provodi dekarboksilaciju histidina u histamin.

Postoje brojna istraživanja koja su dokazala da proizvedena količina amina pomoću bakterija mliječne kiseline ovisi o soju bakterija, a ne o specifičnim obilježjima vrste bakterija. Dokazano je da dodavanjem selekcioniranih bakterija u vino možemo smanjiti razvoj biogenih amina u usporedbi sa spontanom malolaktičnom fermentacijom.

Biotički stres uzrokovan gljivicom *Botrytis cinerea* kod vinove loze može dovesti do većeg udjela amina u grožđu. „Njena karakteristika je da prodire u kožicu bobice i značajno mijenja sastav i zastupljenost aminokiselina, ugljikohidrata i amina povećavajući njihovu koncentraciju, dok se udio vode smanjuje.“ (Smit i sur., 2008.) Takva pojava bilježi se kod predikatnog vina Tokaj iz Mađarske koje ima poseban proizvodni proces. U ovom načinu proizvodnje zdravom grožđu dodaje se određena količina plemenite plijesni. Istraživanje je pokazalo kako su u takvim predikatnim vinima u odnosu na klasična vina nalazi veća zastupljenost biogenih amina iako se proizvode od istog kultivara.

Direktan doprinos formaciji biogenih amina ima metabolička aktivnost gljiva (što se posebno odnosi na izoamilamin), a isto tako potiče aktivnost bakterija nepoželjnih u vinu.

2.4.3. Čimbenici koji utječu na nastanak biogenih amina

„Razina biogenih amina u vinu uvelike ovisi o količini prekursora aminokiselina, budući da s povećanjem sadržaja aminokiselina raste i sadržaj biogenih amina. Brojni čimbenici mogu

utjecati na zastupljenost aminokiselina u vinu, kao što su metoda vinifikacije, sorta grožđa, geografski položaj i godina berbe.“ (Košmerl i sur., 2013.)

„Pojedini amini kao što su putrescin i spermidin mogu biti prisutni već u samom grožđu. U sorti Cabernet sauvignon pronađena je visoka koncentracija putrescina, kadaverina i spermidina i to u perikarpu bobice, te u sjemenkama. Koncentracija putrescina u vinu više je uvjetovana geografskim položajem i sortom grožđa, nego postupkom proizvodnje vina. Stupanj zrelosti grožđa i vrsta tla također mogu utjecati na razinu amina u finalnom proizvodu, kao i gnojidba dušikom koja utječe na povećanje aminokiselina i amina u grožđu.“ (Smit i sur., 2008.).

Soleas i suradnici (1999.) navode kako značajne razlike postoje i između određenih kultivara gdje se može izdvojiti primjer Pinota crnog kod kojega je u nekoliko različitih istraživanja utvrđena viša koncentracija biogenih amina u odnosu na ostala crvena vina. Od godine do godine berbe i od različitih proizvodnih regija može varirati količina biogenih amina u moštu i vinu jer se koncentracija prethodnika aminokiselina može uvelike mijenjati ovisno o godini berbe isto kao i raznoliki sojevi kvasaca i bakterija koji se nalaze na grožđu.

Važan postupak u proizvodnji crnih vina je maceracija uz pomoć koje dolazi do izdvajanja komponenti iz grožđa kao što su fenoli, proteini, polisaharidi i aminokiseline. Dokazano je da vrijeme maceriranja uvelike utječe na količinu biogenih amina u vinu iz razloga dužeg kontakta kožice s moštom, a tome uvelike pridonosi maceracija pri manjim temperaturama zbog dužeg vremena ekstrakcije. U vinima koja su odležavala na talogu razina nekih amina, npr. metilamin i putrescin bila je viša. Razlog tome je činjenica da se proteini hidroliziraju do peptida različite molekularne težine, te se potom razgrađuju do aminokiselina i amina.

„U procesu nastanka biogenih amina pH je važan čimbenik jer utječe na biološku aktivnost i različitost bakterija. pH djeluje selektivno na mikroorganizme u vinu, tako da je pri višem pH bakterijska mikroflora raznovrsnija, te dolazi do povećane produkcije biogenih amina. Tijekom alkoholne i malolaktične fermentacije također dolazi do promjene udjela biogenih amina u vinu, s tim da kod alkoholne fermentacije uglavnom ne dolazi do značajnijeg povećanja količine amina.“ (König i sur., 2009.). Nasuprot tome, smatra se da je produkcija većih količina biogenih amina povezana s malolaktičnom fermentacijom, te je zbog toga od iznimne važnosti da se spriječi aktivnost bakterija mliječne kiseline odmah po završetku malolaktične fermentacije kako bi se reduciralo formiranje biogenih amina tijekom odležavanja vina.

2.4.4. Toksičnost biogenih amina

U alkoholnim pićima od velike važnosti je prisutnost biogenih amina. Ta činjenica posebno dolazi do izražaja kod vina budući da etanol može pospješiti njihovo djelovanje inhibirajući enzime potrebne za detoksifikaciju tih tvari. Prekomjerno unošenje biogenih amina može izazvati negativne posljedice na ljusko zdravlje iako razlika kod ljudi na osjetljivost kod intoksikacije. Budući da je utvrđeno fiziološko djelovanje histamina (snižavanje krvnog tlaka, povećanje protočnosti krvnih žila, povraćanje, osjećaj mučnine, konstrikcija bronhija, ubrzavanje rada srca i dr.) tom spoju se pripisuju svi loši utjecaji poslije konzumiranja vina kao što su glavobolja i migrena.

Može se potvrditi sa sigurnošću direktni učinak histamina, feniletilamina i serotonina na ljudski organizam. Osim njih, važni su i spermidin, putrescin, agmatin, kadaverin i ostali koji ne djeluju direktno, ali mogu pojačati djelovanje histamina, feniletilamina i serotonina „Osim alergijskih reakcija, amini mogu uzrokovati i druge ozbiljne patološke probleme što uključuje neurološke poremećaje, stvaranje kancerogenih nitrozamina, hipertenziju, Parkinsonovu bolest, shizofreniju i promjene raspoloženja.“ (Smit i sur., 2008.).

„Alkohol i SO₂ pojačavaju djelovanje biogenih amina, a problematičnom se pokazala i konzumacija vina sa proizvodima koji sadrže dodatne amine poput sira, orašastih plodova ili čokolade. Toksična količina u alkoholnim pićima je između 8 i 20 mg/L za histamin, 25 – 40 mg/L za tiramin, ali već mala količina feniletilamina od 3 mg/L može uzrokovati negativne posljedice.“ (Smit i sur., 2008.).

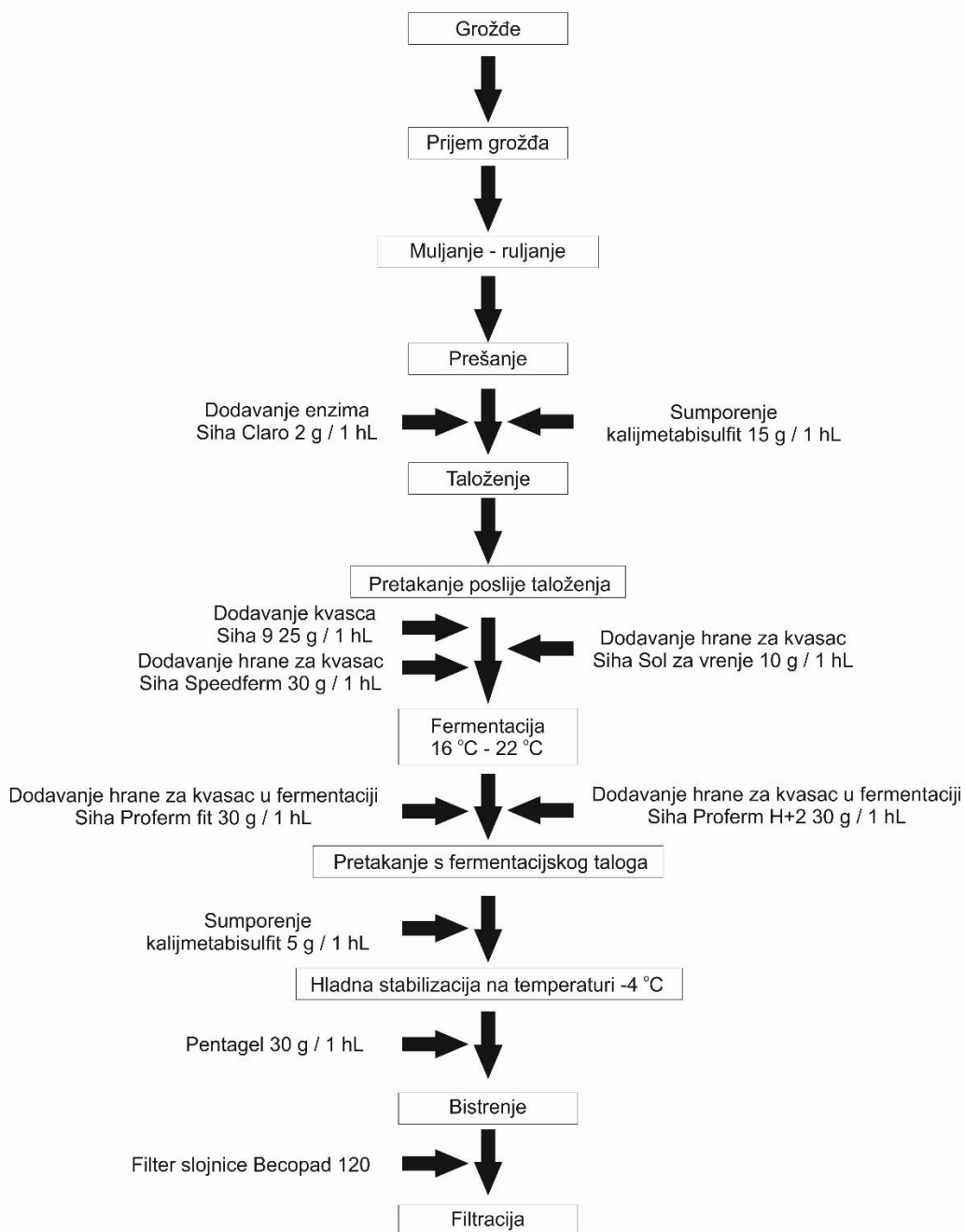
Kontroliranim vrenjem uz pomoć selekcioniranih kvasaca može se osigurati relativno nizak udio biogenih amina, te kod procesa malolaktične fermentacije korištenjem selekcioniranih bakterija. Jedna od boljih opcija za smanjivanje količine biogenih amina u vinu je bistrenje vina koje provodimo fizičkim metodama metoda – sedimentacije, flotacije, centrifugiranja i filtracije, pomoću bistrila (želatina, albumin, kazein), a isto tako i dodavanjem pektolitičkih enzima. Pojedinih istraživanja se dokazalo da je bentonit vrlo učinkovit u smanjivanju koncentracije biogenih amina pogotovo ako se primjenjuje dodavanjem u mošt. „Dodatkom bentonita u količini od 80 g/hl došlo je do smanjenja sadržaja histamina u crvenom vinu za 60%.“ (Košmerl i sur., 2013.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Postupak proizvodnje baznog vina

Vino kultivara Syrah proizvedeno je klasičnom metodom tehnološkog procesa fermentacije sa selekcioniranim kvascem Begerow Siha 9 uz kontrolirane uvjete, na način prikazan na slici br. 5.



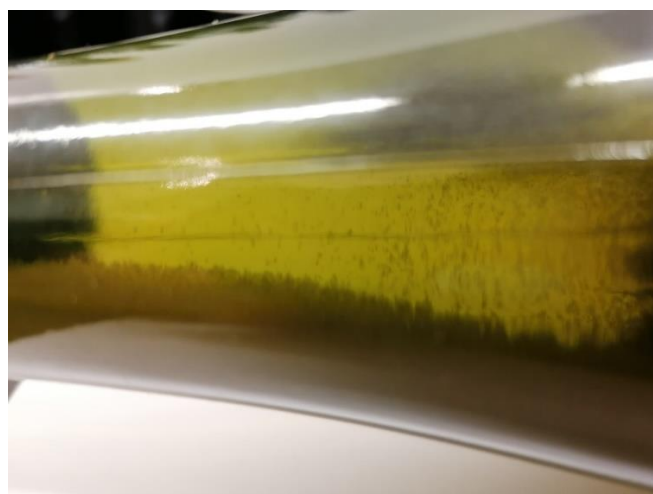
Slika 5. Shema proizvodnje baznog vina (autor: 2020.)

Bazno vino proizvedeno je klasičnim postupkom, muljanjem i runjenjem grožđa koje se na mjesto prerade dovozi u gajbama za grožđe. Nakon runjenja i muljanja, grožđe je prešano pneumatskom prešom. Potom je fermentacija provedena standardnim postupkom, dodavanjem selekcioniranog kvasca Siha 9 u kontroliranim termičkim uvjetima. Kontrola režima temperature postiže se hlađenjem s tekućim prehrambenim glikolom koji cirkulira u plaštu posude, a tokom vrenja kreće se u rasponu od 16 – 22 °C. Trajanja vrenja u ovim uvjetima bilo je od 40 do 58 dana.

3.1.2. Postupak proizvodnje pjenušaca klasičnom metodom

Poslije proizvodnje baznog vina u ovom pokusu izvršena je sekundarna fermentacija u predviđenim bocama za proizvodnju pjenušavih vina Šampanija classic 750 mL s izračunatim omjerom šećera od 22 g/L. Da bi u sekundarnoj fermentaciji mogli postići potrebnu količinu CO₂ baznom vinu je dodan selekcionirani vinski kvasac Siha 4 - 50 g / 1 hL. Osim dodavanja kvasca dodana je i hrana za kvasac Siha Speedferm – 40 g / 1 hL i Siha Proferm H+2 – 40 g / 1 hL te tanini Siha tanin 60 ml / 1 hL i preparat za taloženje Siha Brilliant – 80 ml / 1 hL. Boce su zatvorene inoks krunastim zatvaračem i postavljene u ležeći položaj u nastavnoj bazi „Klijet i spremište vina“ Veleučilišta u Požegi na konstantnu temperaturu intervala od 13 do 16°C.

Analitika je provedena prateći odredbe (Council Regulation (EC) No. 1493/1999) poslije proteka vremena odležavanja uzoraka 1 i 1* u trajanju od 30 mjeseci, te za uzorke 2 i 2* nakon 18 mjeseci.



Slika 6. Slika pjenušca klasična metoda (autor 2020.)

3.2. Metode

3.2.1. Fizikalno – kemijske metode

Temeljne analitičke metode primjenjene su za procjenu kvalitete vina. Iste temeljne analitičke metode u industrijskim kontrolnim laboratorijima predstavljaju osnovu za određivanje parametara kvalitete. Sljedeći parametri određeni su u svim uzorcima vina:

- specifična težina (20/20 °C) – piknometrijski
- alkohol (% vol.) – piknometrijski na 20 °C
- ukupni ekstrakt (g/L) – uparavanjem u vodenoj kupelji i sušenjem na 105 °C, do konstantne mase
- reducirani šećer (g/L) – gravimetrijski
- ukupna kiselost (g/L) - titrimetrijskom metodom po OIV – u
- pepeo (g/L) – spaljivanjem i mineralizacijom, pri 525 ± 25 °C
- slobodni SO₂ (mg/L) – titrimetrijskom metodom po OIV – u
- ukupni SO₂ (mg/L) – titrimetrijskom metodom po OIV – u
- ukupni dušik (mg/L)
- tlak (bar) - manometrom

3.2.2. HPLC (Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti)

Sadržaj biogenih amina određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti – metodom HPLC objavljenom u radu Proestosa i sur., 2008. Biogeni amini su izdvojeni upotrebom tekućinskog kromatografa HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) sa samouzorkivačem i UV/VIS detektorom promjenjive valne duljine te fluorescentnim detektorom. Separacija nakon Danzil klorid (Dns – Cl) derivatizacije provedena je na koloni ZOR – Bax Eclipse XDB C8 (150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 5 µm), s Meta Guard Inertsil C 18. zaštitnom kolonom. Standardi biogenih amina nabavljeni su od tvrtke Sigma – Aldrich, Steinheim, Njemačka, kao i (Dns – Cl), a analitički kitovi korišteni na fluorescentnom detektoru kupljeni su od tvrtke Merck, Darmstadt, Njemačka. U uzorcima vina utvrđen je sadržaj sljedećih biogenih amina:

- putrescin
- kadaverin
- 2 – feniletilamin
- spermidin
- triptamin
- serotoniniramin

➤ histamin

3.2.3. Statistička analiza

Provedena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i usporedni LSD test, na razini pouzdanosti od $P < 95\%$, kako bi se procijenile statističke razlike na izmjerenim fizikalno-kemijskim parametrima.

4. REZULTATI

4.1. Fizikalno kemijska analiza vina

Tablica 2. Rezultati fizikalno-kemijske analize pjenušaca

	1	1*	2	2*
Spec. masa (20/20 °C) (g/mL)	0.9918 ± 0.10	0.9924 ± 0.30	0.9940 ± 0.20	0.9935 ± 0.25
Alkohol (%vol.)	13.35 ± 0.15	13.25 ± 0.25	12.95 ± 0.20	12.85 ± 0.30
Ukupni ekstrakt (g/L)	19.60 ± 0.05	19.40 ± 0.25	24.62 ± 0.42	24.10 ± 0.40
Ukupni šećer (g/L)	2.55 ± 0.10	3.05 ± 0.30	2.65 ± 0.32	2.60 ± 0.30
Hlapiva kiselost (g/L)	0,49± 0.20	0,50± 0.10	0,45± 0.15	0,40± 0.10
Ukupna kiselost (g/L)	5.15 ± 0.08	5.25 ± 0.35	5.05 ± 0.35	5.00 ± 0.40
Pepeo (g/L)	1.65 ± 0.10	1.70 ± 0.18	2.10 ± 0.40	1.95 ± 0.15
Slobodni SO₂ (mg/L)	7.54 ± 0.18	7.74 ± 0.25	5.90 ± 0.18	6.10 ± 0.10
Ukupni SO₂ (mg/L)	118.60 ± 0.20	119.00 ± 0.20	120.60 ± 0.10	121.00 ± 0.18
Ukupni dušik (mg/L)	260.00 ± 0.20	259.50 ± 0.10	230.50 ± 0.10	220.50 ± 0.10
Tlak (bar)	5,15± 0.20	5,10± 0.20	5,00± 0.20	5,05± 0.20

4.2. Analiza biogenih amina u vinu primjenom HPLC metode

Tablica 3. Rezultati HPLC analize udjela biogenih amina u pjenušcima

Biogeni amini (mg/L)	1	1*	2	2*
Putrescin	0.41 ± 0.19	0.39 ± 0.08	0.41 ± 0.06	0.40 ± 0.04
Kadaverin	0.35 ± 0.05	0.34 ± 0.05	0.42 ± 0.05	0.40 ± 0.05
β -Feniletillamin	2.37 ± 0.15	2.33 ± 0.15	2.64 ± 0.18	2.50 ± 0.18
Spermidin	0.58 ± 0.11	0.53 ± 0.09	0.65 ± 0.09	0.61 ± 0.09
Triptamin	1.66 ± 0.10	1.81 ± 0.12	1.82 ± 0.17	1.85 ± 0.17
Serotonin	0.13 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.18 ± 0.05	0.16 ± 0.05
Tiramin	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.25 ± 0.02
Histamin	3.36 ± 0.06	3.25 ± 0.09	3.49 ± 0.06	3.51 ± 0.06
Σ Biogeni amini	9,04	9,00	9,82	9,68

5. RASPRAVA

5.1. Fizikalno kemijske osobine vina

5.1.1. Utjecaj vremena odležavanja na kvascu na fizikalno-kemijske osobine pjenušavog vina kultivara Syrah

U Tablici 2. prikazani su rezultati fizikalno – kemijske analize vina, prikazani rezultati se odnose na uzorke koji imaju različito vrijeme odležavanja na kvascima.

Nema velikih odstupanja u rezultatima dobivenim za specifičnu težinu s obzirom na vrijeme odležavanja na kvascu (0,9918 g/mL do 0,9924 g/mL kod uzoraka 1 i 1*), značajne razlike nema ni kod rezultata za uzorke 2 i 2* iako su nešto veći i iznose (0,9940 g/mL do 0,9935 g/mL). Rezultat analize dobiven u ovom istraživanjem (Tablica 2.) pokazuje kako su svi uzorci pjenušavog vina imali nešto veći postotak alkohola (13,35 % prema 13,25 % kod uzoraka 1 i 1*, kao i 12,95% prema 12,850% kod uzoraka 2 i 2*). Postotak alkohola u oba uzorka u skladu je s hrvatskim pravnim normama (Pravilnik o vinu, NN 96/96). Sadržaj ukupnog ekstrakta pokazuje statistički značajne razlike, 19,60 g/L te 19,40 za uzorke 1 i 1*, a za uzorke 2 i 2* utvrđene su više vrijednosti, 24,62 odnosno 24,10. Iako je kod svih uzoraka pjenušca količina ukupnog ekstrakta bila u granicama preporučenog raspona. (OIV.2001., Pravilnik o vinu, NN 96/96) Količina ukupnog ekstrakta odgovara karakteristikama kvalitetnih vina proizvedenih iz grožđa sorte Syrah proizvedenog klasičnom metodom. Razine reduciranih šećera su za sve uzorke povišene, kod uzoraka 1 i 1* bio je u intervalu (2,95 g/L - 3,05 g/L), a kod uzoraka 2 i 2* bio je (2,65 g/L i 2,60 g/L). Među uzorcima obuhvaćenim ovim istraživanjem su utvrđene značajne razlike u udjelima ukupnih kiselina (5,15 g/L i 5,25 g/L) kod uzoraka 1 i 1* u odnosu uzoraka 2 i 2* (5,05 g/L i 5,00 g/L) što je sukladno s rezultatima istraživanja Delfini i sur. (2001). Rezultat koncentracije pepela kod uzoraka 1 i 1* je 1,65 g/L do 1,75 g/L dok je kod uzoraka 2 i 2* bio značajno viši (1,95 g/L - 2,10 g/L). Slobodni SO₂ je viši u uzorcima s kraćim vremenom odležavanja na kvascima (7,54 mg/L i 7,74 mg/L) nego što je bio u uzorcima proizvedenim klasičnom metodom (6,10 mg/L i 5,90 mg/L). No ukupni sadržaj SO₂ je niži u uzorcima s kraćim vremenom odležavanja na kvascima (118,60 mg/L i 119,00 mg/L), dok su se dobivene vrijednosti ukupnog SO₂ kretale u intervalu (120,60 mg/L i 121,00 mg/L) među uzorcima s kraćim vremenom odležavanja na kvascima. Viša koncentracija ukupnog dušika dobivena je u

uzorcima s dužim vremenom odležavanja (259,50 mg/L i 260,00 mg/L) dok su one koje su dobivene kraćim vremenom odležavanja na kvascima (230,00 mg/L i 220,50 mg/L).

Rezultat dobiven mjerenjem tlaka u bocama izražen je u barima. U uzorku 1 i 1* s kraćim vremenom odležavanja na kvascu tlak je nešto viši (5,15 bara- 5,10 bara) nego u uzorku 2 i 2* (5,00 bara odnosno 5,05 bara). Razlika tlaka u uzorcima može se pripisati nepotpunom brtvljenju krunastog zatvarača iako su oba rezultata su u okviru preporučenih vrijednosti za pjenušava vina. (OIV 2001.).

5.2. HPLC analiza biogenih amina osobine vina

Prisustvo biogenih amina u vinu predstavlja opasnost za zdravlje potrošača. Biogeni amini su dušične organske baze niske molekulske mase koje mogu imati alifatsku, aromatsku ili heterocikličku strukturu. Biogeni amini su uglavnom produkti dekarboksilacije slobodnih aminokiselina, koje su prekursori njihovog nastajanja (Vincenzini i sur., 2009.). Europska Unija nije zakonski regulirala količinu biogenih amina u vinu, nego je samo dala preporuku, tzv. „Safety threshold values“ (EFSA, 2011.). Općenito, toksičnom količinom u alkoholnim pićima smatra se 8 – 20 mgL⁻¹ za histamin, 25 – 40 mgL⁻¹ za tiramin, no feniletilamin negativne fiziološke učinke može imati već pri udjelu 3 mgL⁻¹ (Karovičova i Kohajdova, 2005.).

5.2.1. Utjecaj vremena odležavanja na kvascu na prisutnost biogenih amina u pjenušavom vinu kultivara Syrah

U vinu se najčešće nalaze histamin, putrescin, 2-feniletilamin i tiramin (Košmerl i sur., 2013.; Čuš i sur., 2013.; Soufleros i sur., 2007.; Marcobal i sur., 2005.). Na udio biogenih amina u vinu utječe čitav niz vitikulturnih i enoloških faktora. Neki amini prisutni su već u bobicama grožđa (Bover-Cid i sur., 2006.; Kiss i sur., 2006.), a naknadno neki faktori mogu ili povećati ili smanjiti koncentraciju prekursora i biogenih amina kako u grožđu, tako i u vinu. Među faktorima koji pogoduju stvaranju amina u vinu su i neki postupci tijekom proizvodnje vina (primarna i sekundarna fermentacija), kojima nastaju slobodne aminokiseline – prekursori biogenih amina (Martin-Alvarez i sur., 2006.; Alcaide-Hidalgo i sur., 2007.; Vincenzini i sur., 2009.).

U Tablici 3. prikazani su podaci prisutnosti biogenih amina u pjenušavim vinima određeni HPLC metodom tekućinske kromatografije. Prikazani rezultati potvrđuju da je vrijeme odležavanja na kvascu utjecalo na sadržaj biogenih amina u pjenušavim vinima. U pjenušcima (uzorci 1 i 1*) udio biogenih amina je 9,04 mg/L odnosno 9,00 mg/L dok je u uzorcima 2 i 2* taj sadržaj bio 9,82 mg/L, odnosno 9,68 mg/L. Najzastupljeniji biogeni amin u svim uzorcima bio je histamin sa 3,36 mg/L odnosno 3,25 mg/L (uzorci 1 i 1*) , dok je u uzorcima s duljim vremenom odležavanja iznosio 3,49 mg/L odnosno 3,51 mg/L, što se poklapa s prethodnim istraživanjima koja su utvrdila da na produkciju histamina utječe čitavi niz enoloških faktora a posebno uvjeti fermentacije, pa tako i vrijeme kontakta kvasca . (Halasz i sur., 1994., Bauza i sur., 1995., Gerbaux i Monamy, 2000., Landete i sur., 2005.). Nakon njega slijedi triptamin (1,66 i 1,81 mg/L), te (1,82 i 1,85 mg/L), što je sukladno rezultatima prikazanim u istraživanju Gloria i sur (1998.). Kako je prikazano u Tablici 3. koncentracija putrescina bila je relativno niska u svim uzorcima (0,39 mg/L do 0,41 mg/L), vjerojatno zato što je fermentacija provedena komercijalnom čistom kulturom (Gerbaux i Monamy, 2000.). Sličan trend pokazali su i ostali analizirani biogeni amini. Vrijeme fermentacije i vrijeme odležavanja na kvascu imalo je očiti utjecaj na koncentraciju putrescina, kadaverina i β-feniletilamina, pri čemu je značajno niži udio navedenih spojeva utvrđen kod uzoraka proizvedenih kraćim vremenom odležavanja na kvascu. Kadaverin je prisutan u koncentraciji (0,35 mg/L i 0,34 mg/L) u uzorcima broj 1 i 1* te (0,40 mg/L i 0,42 mg/L) u uzorku broj 2 i 2* koji su imali vrijeme odležavanja na kvascu od 18 mjeseci. β-feniletilamin pokazuje, istovjetni trend kretanja, odnosno veće rezultate ako se produljuje vrijeme odležavanja (2,37 mg/L) za uzorak 1 i (2,33 mg/L) za uzorak 1*, a za uzorak 2 vrijednosti su (2,64 mg/L) te (2,50 mg/L) za uzorak 2*. Spermidin je izmjereno u nižim vrijednostima (0,58 mg/L i 0,53 mg/L) u uzorcima s kraćim vremenom odležavanja, dok su u uzorcima s duljim vremenom odležavanja na kvascu izmjerene vrijednosti od (0,65 mg/L i 0,61 mg/L). Isti trend pokazuju i dobivene vrijednosti za serotonin i tiramin. I jedan i drugi uzorak imaju nižu vrijednost (serotonin 0,13 mg/L - 0,15 mg/L), tiramin (0,18 mg/L i 0,20 mg/L) u klasičnoj metodi sekundarne fermentacije s kraćim vremenom odležavanja u odnosu na postupak s produženim vremenom odležavanja na kvascu. (serotonin 0,18 mg/L i 0,16 mg/L, tiramin 0,21 mg/L i 0,25 mg/L)

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

- Vrijeme odležavanja na kvascima značajno utječe na fizikalno – kemijska svojstva i ukupnu kvalitetu pjenušavih vina.
- Pjenušci proizvedeni u tehnološkom postupku sa kraćim vremenom odležavanja na kvascima imaju povećan udio alkohola u odnosu na pjenušce proizvedene u tehnološkom postupku sa produženim vremenom odležavanja na kvascima. Dok je, ukupni ekstrakt redovito manji u pjenušcima proizvedenim po tehnološkom postupku sa kraćim vremenom odležavanja na kvascima.
- Vrijeme odležavanja na kvascima ima značajan utjecaj na sadržaj biogenih amina u pjenušcu kultivara Syrah.
- Udio biogenih amina kod svih uzoraka se povećao u tehnološkom postupku sa produženim vremenom odležavanja na kvascima.

7. LITERATURA

1. Alcaide-Hidalgo, J.M., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Alvarez, P.J., Polo M.C. (2007.): Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines, *Food Chem.* 103, 572-581.
2. Bauza, T., Blaise, A., Daumas, F., Cabanis, J.C. (1995.): Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallee du Rhone by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatisation and fluorimetric detection, *Journal of Chromatography A*, 707, 373–379.
3. Bover-Cid, S., Iquierdo-Pulido, M., Marina-Font, A., Vidal-Carou, M.C. (2006.): Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation, *Food Chem.* 96, 43-47.
4. Council Regulation (EC) No. 1493/1999 of 17 May 1999. on the common organisation of the market in wine. OJ L 179, 14.7.1999.
5. Čuš, F., Bach, B., Barnavon, L., Žnidaršič Pongrac, V. (2013.): Analytical determination of Dolenjska region wines quality, *Food control* 33, 274-280.
6. Delfini, C., Cocito, C.H., Bonino, M., Schellino, R., Gaia, P., Baiocchi, C. (2001.): Definitive evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of neutral precursors of grape aromas, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1789. – 1798.
7. EFSA Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 2393. European Commission. (2011.)
8. Flamini, R. (2008.): *Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, England.
9. Clarke, Oz; Margaret Rand 2008. *GRAPES AND WINES: A Comprehensive Guide to Varieties and Flavours*
10. Gerbaux, V., Monamy, C. (2000.): Biogenic amines in Burgundy wines. Content and origin in wines, *Rev. Fr. Oenol.* 183, 25-28.
11. Gloria, M.B.A., Watson, B.T., Simon-Sarkadi, L., Daeschel, M.A. (1998.): A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines, *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 279-282.
12. Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994.): Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends Food Sci. Technol.* 5, 42–49.
13. Jackson 2009.: *Wine Science*
14. König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (2009.): *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg.
15. Karovičova, J., Kohajdova, Z. (2005.): Biogenic amines in food, *Chemical Papers* 59(1), 70–79.
16. Kiss, J., Korbász, M., Sass-Kiss, A. (2006): Study of amine composition of botrytized grape berries, *J. Agr. Food Chem.* 53, 8909-8918.
17. Košmerl, T., Šučur, S., Prosen, H. (2013.): Biogenic amines in red wine: The impact of technological processing of grape and wine, *Acta agriculturae Slovenica* 101, 249 – 261.
18. Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I. (2005.): Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine, *J. Appl. Microbiol.* 99, 580-586.
19. Lemperle, E. (2009.): *Mane vina, ITD Gaudeamus d.o.o., Požega.*

20. Marcobal, A., Polo, M.C., Martin-Alvarez, P.J, Moreno-Arribas, M.V. (2005.): Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines, *Food Res. Int.* 38, 387-394.
21. Martin-Alvarez, P.J., Macrobal, A., Polo, C., Moreno-Arribas, M.V. (2006): Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wine, *Eur. Food Res. Technol.* 222, 420-424.
22. O.I.V. (2008.): *International Code of Oenological Practices*
23. O.I.V. (2008): *Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Mouts.* Organisation Internationale de la Vigne et du Vin Paris
24. Radovanović, V. (1986.): *Tehnologija vina, Građevinska knjiga, Beograd.*
25. Rose, A.H., Harrison, J.S. (1993.): *The yeast, Academic Press, London*
26. Simon, J. (2004.): *Velika knjiga o vinu, Profil International d.o.o., Zagreb.*
27. Smit, A.Y., du Toit, W.J., du Toit, M. (2008.): Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache, *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 29, No. 2.
28. Sokolić, I. (2006.): *Veliki vinogradarsko – vinarski leksikon, vlast. nakl. Ivan Sokolić, Novi Vinodolski.*
29. Soleas, G.J., Carey, M., Goldberg, D.M. (1999): Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines, *Food Chem.* 64, 49-58.
30. Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Zotou, A., Loukou, Z. (2007): Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration, *Food Chem.* 101, 704–716.
31. Vincenzini, M., Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L. (2009): Amino Acid Metabolisms and Production of Biogenic Amines and Ethyl Carbamate. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 167-176.
32. <https://www.mladina.hr/mala-skola-pjenusaca/>
33. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2018_07_74_1723.html
34. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2004_11_159_2780.html
35. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2003_06_1219.html
36. <http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/265401.html>
37. <http://www.oiv.int/oiv/cms/index?lang=en>
38. <https://www.hgk.hr/>
39. [https://juliofrangenfoto.com/2019/05/05/svijet-vina-2018-2019/: Željko Suhadolnik](https://juliofrangenfoto.com/2019/05/05/svijet-vina-2018-2019/:%D0%Zeljko%20Suhadolnik)

8. SAŽETAK

Trendovi na području sigurnosti hrane povećali su fokus na elemente i spojeve u tragovima koji mogu utjecati na ljudsko zdravlje, u koje se ubrajaju i biogeni amini. Biogeni amini su biološki aktivni dušični spojevi male molekulske mase. U vinu mogu nastati iz prekursora, djelovanjem mikroorganizama u bilo kojoj fazi proizvodnje. Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj vremena odležavanja na kvascima na sadržaj biogenih amina u pjenušcu kultivara Syrah. Kvantitativno određivanje biogenih amina provedeno je pomoću RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography), te je utvrđeno da je vrijeme odležavanja na kvascima ima značajan utjecaj na sadržaj biogenih amina u pjenušcu kultivara Syrah. Uzorci s kraćim vremenom odležavanja na kvascima sadržavali su niži udio biogenih amina ($5,41 \text{ mgL}^{-1}$ u odnosu na $7,24 \text{ mgL}^{-1}$).

Ključne riječi: biogeni amini, imobilizirani kvasci, pjenušac

9. SUMMARY

Trends in food safety have increased the focus on trace elements and compounds that can affect human health, including biogenic amines. Biogenic amines are biologically active, low molecular weight nitrogen compounds. In wine, they can arise from precursors by the action of microorganisms at any stage of production. The aim of this study was to investigate the influence of yeast aging time on the biogenic amine content of Syrah sparkling wine. Quantification was performed using RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography) and it was found that yeast aging time significantly influence on biogenic amine content in Syrah cultivars sparkling wine. Samples with shorter yeast aging time contained a lower proportion of biogenic amines (5.41 mgL⁻¹ versus 7.24 mgL⁻¹)

Key words: biogenic amines, immobilized yeasts, sparkling wine

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Utjecaj sadržaja alkohola na odmjeravanje šećera pri šampanizaciji (Radovanović, 1970.).

Tablica 2. Rezultati fizikalno-kemijske analize pjenušca.

Tablica 3. Rezultati HPLC analize udjela biogenih amina u pjenušcima.

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Syrah - <https://www.wine-searcher.com/m/2016/10/syrah-wine-s-international-success-story>

Slika 2. Syrah - <https://www.austrianwine.com/our-wine/grape-varieties/red-wine/syrah>

Slika 3. Pjenušac kultivara Syrah (izvor: autor)

Slika 4. Kemijska struktura biogenih amina (Flamini, 2008.)

Slika 5. Shema proizvodnje osnovnog vina (izvor: autor)

Slika 6. Slika pjenušca klasična metoda (izvor: autor)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,

Fakultet Agrobiotehničkih znanosti Osijek

Diplomski rad

Diplomski sveučilišni studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

Utjecaj vremena odležavanja na kvascu na udio biogenih amina u pjenušcima kultivara Syrah
(*Vitis Vinifera* L.)

Ivan Malčić

Sažetak: Novi trendovi na području sigurnosti hrane povećali su fokus na elemente i spojeve u tragovima koji mogu utjecati na ljudsko zdravlje, u koje se ubrajaju i biogeni amini. Biogeni amini su biološki aktivni dušični spojevi male molekulske mase. U vinu mogu nastati iz prekursora, djelovanjem mikroorganizama u bilo kojoj fazi proizvodnje. Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj vremena odležavanja na kvascima na sadržaj biogenih amina u pjenušcu kultivara Syrah. Kvantitativno određivanje biogenih amina provedeno je pomoću RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography), te je utvrđeno da je vrijeme odležavanja na kvascima ima značajan utjecaj na sadržaj biogenih amina u pjenušcu kultivara Syrah. Uzorci s kraćim vremenom odležavanja na kvascima sadržavali su niži udio biogenih amina ($5,41 \text{ mgL}^{-1}$ u odnosu na $7,24 \text{ mgL}^{-1}$)

Naziv fakulteta pri kojem je izrađen rad: Fakultet Agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Borislav Miličević

Broj stranica: 36

Broj slika: 6

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 39

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biogeni amini, imobilizirani kvasci, pjenušac

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

Izv. prof. dr. sc. Mato Drenjančević, predsjednik

Prof. dr. sc. Borislav Miličević, mentor

Izv. prof. dr. sc. Vladimir Jukić, član

Rad je pohranjen u: Fakultet Agrobiotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga 1,

31 000 Osijek

BASIS DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Final paper

Diplomski sveučilišni studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

**Influence of yeast aging time on the content of biogenic amines in the sparkling wines
of Syrah cultivar (*Vitis vinifera* L.).**

Ivan Malčić

Summary: New trends in food safety have increased the focus on trace elements and compounds that can affect human health, including biogenic amines. Biogenic amines are biologically active, low molecular weight nitrogen compounds. In wine, they can arise from precursors by the action of microorganisms at any stage of production. The aim of this study was to investigate the influence of yeast aging time on the biogenic amine content of Syrah sparkling wine. Quantification was performed using RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography) and it was found that yeast aging time significantly influence on biogenic amine content in Syrah cultivars sparkling wine. Samples with shorter yeast aging time contained a lower proportion of biogenic amines (5.41 mgL⁻¹ versus 7.24 mgL⁻¹)

Name of the faculty where the paper was written: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Borislav Miličević

Number of pages: 36

Number of pictures: 6

Number of tables: 3,

Number of literature citations: 39

Original language: croatian

Keywords: biogeni amini, imobilizirani kvasci, pjenušac

Date of defense of the thesis:

Expert Committee:

Izv. prof. dr. sc. Mato Drenjančević, president

Prof. dr. sc. Borislav Miličević, mentor

Izv. prof. dr. sc. Vladimir Jukić, member

Name of the faculty with the address where the paper is stored: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Vladimira Preloga 1, 31 000 Osijek