

# Utjecaj dodataka na tvari boje i arome kupinovih vina

---

Zobundžija, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:235602>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Dora Zobundžija**

**UTJECAJ DODATAKA NA TVARI BOJE I AROME KUPINOVIH VINA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2016.

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

**Diplomski sveučilišni studij prehrambenog inženjerstva****Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Tehnologija sirovina biljnog podrijetla 2**Tema rada** je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 21. lipnja 2016.**Mentor:** doc. dr. sc. *Anita Pichler***Komentor:** doc.dr.sc. *Natalija Velić***Utjecaj dodataka na tvari boje i arome kupinovitih vina***Dora Zobundžija, 317-DI*

**Sažetak:** Kod ocjenjivanja klasiranja kupinovitih vina, velika se važnost pridaje tvarima boje i arome kao predstavnicima organoleptičkih svojstava. Kako bi dobili vino karakteristične, tamne boje i savršenog *bouqueta*, potrebno je precizno optimirati svaki korak u proizvodnji. Kupinovo vino proizvodi se isključivo od zrelih i zdravih plodova kupine, a za samu fermentaciju ploda presudno je koje ćemo dodatke koristiti i u kojoj količini. Osim standardnih dodataka kod maceracije vina, kao što su saharoza, K-metabisulfit i kvasci, sve je češća upotreba enzima u svrhu povećanja iskorištenja i optimizacije maceracije s ekstrakcijom polifenolnog potencijala, nježnijeg, punijeg i zaokruženijeg tipa. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj dodatka enzima pektinaze na boju i aromakupinovitog vina. U tu svrhu pripremljeni su uzorci vina sa i bez dodatka enzima. Rezultati istraživanja su pokazali da dodatak enzima pektinaze ima pozitivan učinak na ekstrakciju tvari boje i arome.

**Ključne riječi:** Kupinovo vino, enzimi, tvari boje, tvari arome**Rad sadrži:** 67 stranica  
17 slika  
3 tablice  
0 priloga  
40 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Mirela Kopjar</i> | predsjednik   |
| 2. doc. dr. sc. <i>Anita Pichler</i>  | član-mentor   |
| 3. doc. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | član-komentor |
| 4. prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i>   | zamjena člana |

**Datum obrane:** 26. listopada 2016.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

### Graduate program of Food Engineering Study

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Technology processing of raw materials of plant origin II

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on June 21, 2016

**Mentor:** *Anita Pichler*, PhD, assistant prof.

**Comentor:** *Natalija Velić*, PhD, assistant prof.

### The influence of additives on the colour and aroma compounds of blackberry wines

*Dora Zobundžija*, 317-DI

**Summary:** When assessing and grading blackberry wine, great importance is given to colour and aroma substances as representatives of the organoleptic characteristics. In order to obtain the wine of specific characteristics, i.e. dark colour and perfect *bouquet*, an accurate optimisation of every production step is essential. Blackberry wine is made entirely from mature and healthy blackberry fruits. When it comes to fermentation, the use and the quantity of additives is critical. Apart from common additives in wine maceration, such as sucrose, K-metabisulfite and yeasts, use of enzymes in purpose of increasing the utilization and optimization of maceration with polyphenol extraction potential, the gentler and more complete type is starting to be common practice. The aim of this study was to investigate the effect of pectinase addition on the colour and aroma of blackberry wines. For this purpose, samples of wine were prepared with and without addition of enzyme. The results showed that the addition of pectinase has a positive effect on the extraction of colour and aroma substances.

**Key words:** Blackberry wine, enzymes, colour compounds, aroma compounds

**Thesis contains:** 67 pages  
17 figures  
3 tables  
0 supplements  
40 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. <i>Mirela Kopjar</i> , PhD, full prof.       | chair person  |
| 2. <i>Anita Pichler</i> , PhD, assistant prof.  | supervisor    |
| 3. <i>Natalija Velić</i> , PhD, assistant prof. | co-supervisor |
| 4. <i>Darko Velić</i> , PhD, full prof.         | stand-in      |

**Defense date:** October 26, 2016

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

*Zahvaljujem mojoj mentorici, doc. dr. sc. Aniti Pichler, na prihvaćanju ovog diplomskog rada i mene kao svoje diplomantice.*

*Kroz razgovor i savjete dodatno ste mi potvrdili da sam odabrala pravi smjer u svom školovanju. Hvala na uloženom vremenu, trudu i pomoći oko izrade ovog rada te na vedrom duhu i sveprisutnom osmijehu.*

*Veliko hvala i doc. dr. sc. Nataliji Velić, mojoj drugoj mentorici, na ukazanom povjerenju i svemu što ste me naučili tokom izrade ovog rada ali i cijelog studija. Nadam se da ću jednog dana i ja imati priliku prenijeti svoje znanje i ljubav prema struci na način na koji ste Vi to prenijeli na mene.*

*Hvala i tehničarki Jelki Babić. Svačku minutu provedenu u laboratoriju učinili ste zanimljivom. Hvala Vam na pomoći i strpljenju.*

*Posebno hvala gospođi Jasni Marković. Vaša podrška, sve pohvale ali i pokude bile su mi dodatna motivacija tijekom studija.*

*Hvala svim mojim prijateljima, vrijeme provedeno na studiju učinili ste mi najsretnijim razdobljem u životu.*

*I na kraju, najveće hvala cijeloj mojoj obitelji. Hvala na svakom osmijehu za položeni ispit i guranju kad je trebalo. Bez vaše bezuvjetne podrške i ljubavi ništa od ovoga ne bih postigla sama.*

*Mama i tata, ovaj rad je za vas.*

# **SADRŽAJ**

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 KUPINA .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 KEMIJSKI SASTAV KUPINE .....	6
2.1.2 UTJECAJ PLODA KUPINE NA ZDRAVLJE .....	9
<b>2.2 KUPINOVO VINO .....</b>	<b>10</b>
2.2.1 PROIZVODNJA KUPINOVOG VINA.....	11
2.2.2 PARAMETRI KAKVOĆE KUPINOVOG VINA .....	17
<b>2.3 TVARI BOJE.....</b>	<b>18</b>
2.3.1 ANTOCIJANI.....	19
2.3.2 UTJECAJ PARAMETARA NA STABILNOST BOJE ANTOCIJANA.....	20
<b>2.4 TVARI AROME.....</b>	<b>24</b>
2.4.1 NOSITELJI AROME U VOĆU .....	24
2.4.2 PODJELA AROMATIČNIH SASTOJAKA U VOĆU.....	25
2.4.3 PROMJENE AROME TIJEKOM PROCESA PRERADE.....	26
2.4.4 ODREĐIVANJE SASTOJAKA AROME PLINSKOM KROMATOGRFIJOM .....	27
<b>2.5 UTJECAJ ENZIMA NA TVARI BOJE I AROME .....</b>	<b>34</b>
2.5.1 DEFINICIJA I PODJELA ENZIMA.....	34
2.5.2 ULOGA ENZIMA U TEHNOLOGIJI VINA .....	35
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 ZADATAK.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>37</b>
3.2.1 VINO OD KUPINE.....	37
3.2.2 PROCES PROIZVODNJE VINA OD KUPINE .....	37

3.2.3 ODREĐIVANJE TVARI BOJE .....	39
3.2.4 ANALIZA AROME VINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM PRIMJENOM SPME ANALIZE.....	43
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>45</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>51</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>53</b>

## **1. UVOD**



Kupinovo vino je voćno vino s malim postotkom alkohola, proizvedeno iz zrelih i zdravih plodova kupine. Kupina sadrži brojne nutrijente, između ostalog i veliku količinu željeza i vitamina C te se iz tog razloga vino kupine preporuča kao prirodni lijek za glavobolju, umor i bolesti krvožilnog sustava (Willforth, 1978.).

Proizvodnja kupinovog vina sastoji se od nekoliko osnovnih procesa: muljanje, maceracija (predfermentacija), fermentacija te zrenje i odležavanje, a o načinu na koji se provode ovisi kvaliteta dobivenog vina.

Osim toga, organoleptička svojstva vina ovise i o dodacima koje koristimo u procesu maceracije. Uz standardne dodatke kao što su saharoza, K-metabisulfid i kvasci, među vinarima je već postala uobičajena praksa koristiti enzime. Razvijeni su u svrhu povećanja ekstrakcije boje, tanina i prekursora arome.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj dodatka enzima pektinaze na zadržavanje tvari boje i arome kupinovog vina. Osim toga, u vinima je određen sadržaj tvari arome i određene su tvari boje: polifenoli, flavonoidi, antocijani, polimerna boja i antioksidacijska aktivnost.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### 2.1 KUPINA

Kupina (lat. *Rubus fruticosus*), grmolika biljka karakterističnog oblika i crne boje ploda, od davnina se koristi kao ljekovita biljka. Cijenjena je među brojnim narodima i civilizacijama: njezino ljekovito djelovanje opisano je u učenjima autora antičkih djela, u 16. st. opisana je kao sastavnica skupocjenog pića “*Moratum*”, pripremljenog od kupine, vina, meda i začina. Tijekom ratova listovi kupine služili su kao zamjena za ruski čaj, dok su Nijemci mješavinu lišća maline, kupine i šumske jagode koristili kao zamjenu za kineski čaj (Velić, 2015.).

Unatoč dugoj tradiciji korištenja kupine u raznolike svrhe, kupina se kao voćna kultura počela uzgajati relativno kasno: kao prva, plemenita sorta *Evergreen* u Europi se uzgaja od 1809. godine. Zatim je u Americi u kulturu uvedena sorta *Dorchester*, koja je otkrivena 1840. godine.

Do nedavno, uzgoj kupine u Republici Hrvatskoj bio je sveden samo na iskorištavanje samoniklih vrsta. U novije vrijeme započelo se s kultiviranim uzgojem, i to vrstama “*Thornless Logan*”, “*Thornfree*”, “*Black Satin*” i “*Tayberry*” koje predstavljaju najčešće uzgajane vrste kupine u Hrvatskoj (Velić, 2015.)

Prema podacima USDA (2016.), botanička klasifikacija kupine daje sljedeću kategorizaciju:

Carstvo: *Plantae* (biljke)

Podcarstvo: *Tracheobionta* (cijevnjače ili vaskularne biljke)

Odjeljak: *Spermatophyta* (sjemenjače)

Divizija: *Magnoliophyta* (cvjetnice)

Razred: *Magnoliopsida* (dvosupnice)

Red: *Rosales*

Porodica: *Rosaceae* (ruže)

Rod: *Rubus* L.

Oblikom, kupina je trajni grm koji raste na šumskih čistinama, uz rubove polja i među grmljem te može narasti 50 - 300 cm u visinu. Stablo mu je pokriveno trnjem i mjestimično odrvenilo, a bodlje služe za penjanje i kao obrambeni mehanizam protiv životinja koje se hrane lišćem. Cvjeta od lipnja do kolovoza i nakon toga se iz svakog pojedinačnog cvijeta razvija sitni jagodičasti plod crvene boje, koji kasnije potamni do tamnoplave i skoro crne boje (Velić, 2015.).

Plod kupine može biti različitog oblika (okruglast, kupast i ovalan) i krupnoće: vrlo krupan (mase preko 7 g), krupan ( 5 – 7 g), srednje krupan (3 – 5 g) i sitan (mase manje od 3 g).Boja površine zrelog ploda kupine je crna i sjajna (**Slika 1**). Zanimljivo je da se boja površine ploda i boja soka mogu razlikovati (npr. površina crna, a sok crven i sl.)



**Slika 1.** Plod kupine (<http://gardeners.s3.amazonaws.com>, 9.9.2016)

Kao posebno važna osobina ploda kupine smatra se čvrstoća jer o njoj u velikoj mjeri ovisi namjena ploda. Pri izboru sorti više se cijene one koje imaju čvršće plodove (Mratinić, 1998).

### 2.1.1 KEMIJSKI SASTAV KUPINE

Kemijski sastav kupine definira odnos suhe tvari i vode u plodu. Bitan je zbog određivanja svojstava, energetske i prehrambene vrijednosti dobivenih proizvoda te za odabir tehnoloških postupaka poput prerade i skladištenja.

U nutritivnom smislu, kupina sadrži velike količine šećera, organskih kiselina i biljnih vlakana te značajno manje proteina i masti. Osim toga, predstavlja izvor bogat biološki aktivnim tvarima kao što su polifenoli (tanini, antocijani), vitamini topljivi u vodi (B skupine i C) i mastima (npr. karotena) te minerala: kalija, kalcija, magnezija, fosfora, željeza i bakra (Amidžić Klarić, 2011.). Nutritivna vrijednost ploda kupine prikazana je u **Tablici 1**.

**Tablica 1** Nutritivna vrijednost ploda kupine i voćnih proizvoda dobivenih njezinom preradom izražena na 100 g proizvoda (Brodarec, 1976.)

Sastavnica	Svježa kupina	Smrznuta kupina	Sok od kupine
Voda (g)	82 – 86	74,3 – 82	85,8
Proteini (g)	0,7 – 1,3	0,8 – 1,0	0,8
Masti (g)	0,4 – 0,9	0,3 – 0,5	0,8
Ugljikohidrati (g)	11,5 – 12,9	15,7 – 24,4	12,1
Ukupna kiselost – lim.kis. (g)	1,5		
pH vrijednost	3,2		
Pepeo (g)	0,5	0,5	0,5
<b>Vitamini:</b>			
Karoteni	96 µg	66 µg	
Retinol (µg)	16	11	
α tokoferol (mg)	0,35 – 0,6		
L-askorbinska kis. (mg)	20 - 21	8	5 - 10

## 2. Teorijski dio

Tiamin (mg)	0,03	0,02	0,02 – 0,03
Riboflavin (mg)	0,04	0,1	0,03 – 0,05
Niacin (mg)	0,4	0,6	1,2
Piridoksin (mg)	0,05		0,06
Nikotinska kis. (mg)	0,4		0,3
Pantotenska kis. (mg)	0,25		
Biotin (µg)	0,4		
<b>Mineralni sastav:</b>			
K (mg)	170 – 210	105	160 - 170
Ca (mg)	32 – 63	17	20 – 25
Na (mg)	1 – 4	1	1
Mg (mg)	23 – 30	12	22
Fe (mg)	0,55 – 1	0,6	0,4 – 0,9
Cu (mg)	0,12		
Zn (mg)	0,27		0,25
P (mg)	19 – 25	17	17 – 30
Cl (mg)	22		
S (mg)	17		
Energetska vrijednost	29 – 58 kcal 121 – 253 kJ	72 – 96 kcal 200 – 400 kJ	54 kcal

### Ugljikohidrati

U Tablici 1 vidljivo je da najveći udio suhe tvari čine ugljikohidrati. Ugljikohidrati utječu na energetske vrijednosti ploda i aromu. Sadržaj ukupnih šećera u voću se kreće u rasponu od 3 - 20 %, dok je kod kupine to 6,4 % (Brodarec, 1976.), što kupinu svrstava u kiseliiju vrstu voća. Sadržaj ugljikohidrata ovisi o stupnju zrelosti, sorti, staništu, uvjetima skladištenja te načinu konzumacije ploda (svježi ili sušeni oblik).

### Prehrambena vlakna

Prehrambena vlakna su biljne tvari koje su neprobavljive za enzime probavnog sustava, uključujući tvari staničnih stijenki biljaka (pektin, lignin, celuloza) kao i međustanične polisaharide (gume, sluzi). Preporučeni dnevni unos za odrasle osobe je 25 - 30 g / dan. Prevelik unos uzrokuje smanjenu adsorpciju minerala i vitamina u stanice, dok nedovoljan unos uzrokuje probavne smetnje, pretilost, smetnje probave, dijabetes tip 2 i sl. (Katalinić, 2011.). Kupina sadrži 4,1 – 7,3 g /100 g dijetnih vlakana (Brodarec, 1976.) što ju svrstava u grupu namirnica s dobrim izvorom vlakana.

### Minerali

Minerali su tvari koji su neophodne za normalno odvijanje izmjene tvari u našem organizmu. Čine 4,5 % mase tijela, a najveći dio nalazi se u kostima, tkivu, tjelesnoj tekućini, enzimima, hormonima i hemoglobinu (Lovrić, 2004.). Najzastupljeniji minerali u svježem plodu kupine su kalij, kalcij i magnezij i fosfor, dok se ostali minerali nalaze u manjim količinama.

### Vitamini

Vitamini su prehrambene tvari koje su organizmu potrebne u malim količinama za odvijanje metaboličkih procesa i sprječavanje deficitarnih bolesti. Kako bi bila smještena u skupinu vitamina, promatrana komponenta se ne smije sintetizirati u organizmu, već se mora unositi hranom (Mandić, 2007.). U plodu kupine se u najvećoj količini nalazi vitamin C (20 mg/100 g).

### Tvari boje

Tvari boje voću daju prepoznatljivu boju i ukazuju nam na zrelost ploda, a osim toga utječu i na aromu. Najčešće boju voću daju pigmenti poput karotenoida, antocijana, flavonoida, i drugih. Neki pigmenti nemaju samo ulogu boje već i nutritivnu ulogu, kao npr.  $\beta$ -karoten (Pichler, 2011.). Za boju kod kupina odgovorni su spojevi iz grupe flavonoida koji kupinama daju crvenu boju koja zrenjem potamni do gotovo crne.

### 2.1.2 UTJECAJ PLODA KUPINE NA ZDRAVLJE

S obzirom na prikazani kemijski sastav, možemo reći da kupina ima izuzetno blagotvorno djelovanje na ljudski organizam. Svježi plodovi i sok kupine su odlično laksativno sredstvo, mineralne tvari i organske kiseline reguliraju pH krvi, poboljšavaju krvnu sliku i utječu na sniženje krvnog tlaka. Vitamini jačaju otpornost organizma, pektini doprinose zaštiti od ateroskleroze i infarkta dok celuloza utječe na poboljšanje probave hrane. Sitno izrezani korijen kupine pripremljen kao čaj može se koristiti kao pomoć kod pojave artritisa (gihta) (Willfort, 1978). Osim toga, plod kupine ima prednosti kao hrana nad ostalim namirnicama i po tome što je male energetske vrijednosti.

Plodovi kupine su pogodni za razne namjene: duboko zamrzavanje, potrošnju u svježem stanju i u kulinarstvu te za industrijsku preradu u sokove, sirupe, kompote i džemove (**Slika 2**). Od kupine se mogu proizvoditi i specijalna vina, ocat i drugi proizvodi (Mratinić, 1998).



**Slika 2.** Džem dobiven preradom kupine (<http://dijetaplus.com>, 9.9.2016.)



### 2.2 KUPINOVO VINO

Prema *Pravilniku o voćnim vinima*, voćno vino je prehrambeni proizvod dobiven fermentacijom soka ili masulja od svježeg koštičavog, jezgričavog, jagodičastog, bobičastog ili ostalog voća i ima minimalni sadržaj prirodnog alkohola 1,2 %vol. Voćna vina dijele se na desertno, aromatizirano, biser i pjenušavo voćno vino, voćni masulj, voćni mošt u fermentaciji, voćni sok i voćnu kominu.

Kupinovo vino je voćno vino s malim postotkom alkohola, pripravljeno iz zrelih, zdravih plodova kupine. Vino se odlikuje karakterističnom bojom (**Slika 3**), blagim mirisom i ugodnim okusom, što ga čini izuzetno pitkim. Voćno vino od kupine smatra se svakako najpoznatijim voćnim vinom, a ubraja se u „teža“ vina jer ga odlikuje ugodna trpkost te savršen sklad ukupnih kiselina, alkohola i ekstrakta karakterističnih za kupinu.



**Slika 3.** Kupinovo vino (<http://www.theotherandHamilton.com>, 9.9.2016.)

Kupina sadrži brojne nutrijente, a naročito je bogata željezom. Poznato je da nedostatak željeza u krvi čovjeka ima brojne negativne posljedice: slabokrvnost, umor, vrtoglavica i dr.,

stoga je radi normalnog razvoja i dobrog zdravlja potrebno unositi željezo u organizam za što se, između ostalog, preporuča kupinovo vino. Istraživanja su pokazala da konzumiranje kupinovog vina u malim količinama smanjuje tzv. „loš“ kolesterol u krvi. Također, djeluje povoljno na poboljšanje općeg stanja organizma: otklanja umor, otvara apetit, poboljšava cirkulaciju krvi, povisuje niski krvni tlak te povoljno djeluje kod bolesti krvožilnog sustava i ateroskleroze (Johnson i Gonzalez de Mejia, 2012.)

### 2.2.1 PROIZVODNJA KUPINOVOG VINA

Postupak za dobivanje kupinovog vina može se podijeliti na dvije faze: primarnu i sekundarnu, kako je shematski prikazano na **Slici 4**.

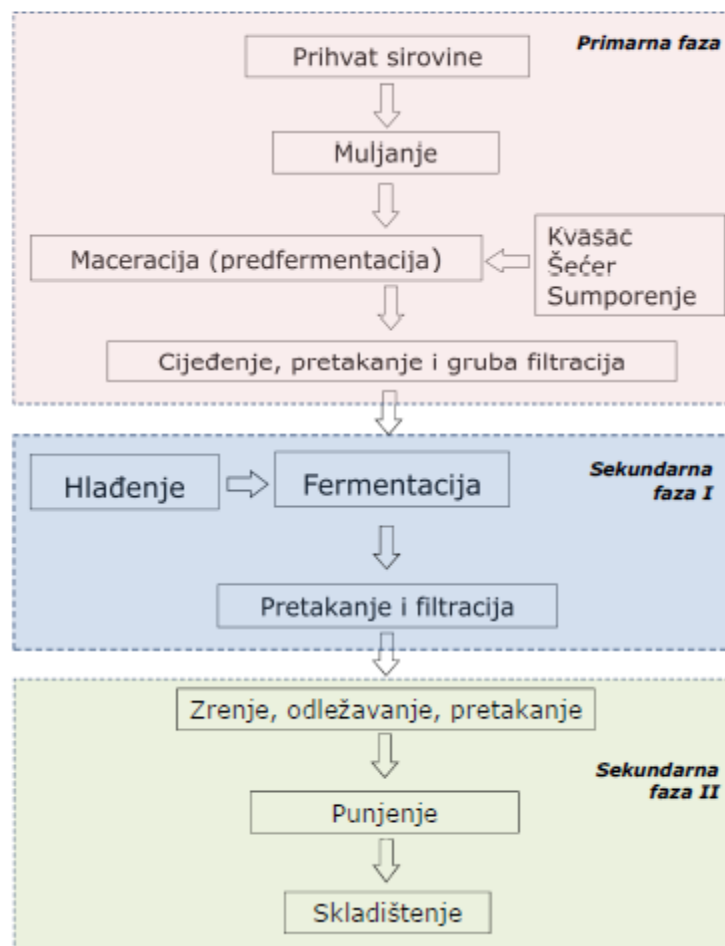
Tehnološke operacije koje provodimo tokom primarne faze su maceracija, periodično miješanje, dekantacija, filtracija i cijedenje mošta.

Nakon muljanja, tj. gnječenja kupina, masulj se ulijeva u posudu od nehrđajućeg čelika te mu se direktno dodaje šećer, 20 g selekcioniranog vinskog kvasaca i 5 g kalijevog metabilsufita na 100 L masulja. Temperaturu tijekom primarne fermentacije soka od kupine trebalo bi održavati na 17 do 19 °C. Pri visokim temperaturama vrenja masulj bi izgubio velik dio aromatičnih i mirisnih tvari te bi se fermentacija mogla zaustaviti. Iz istih razloga, nije poželjna niti preniska temperatura (ispod 10 °C).

Obično se plod i talog odvaja 7. – 10. dan. Fermentaciju na plodu ne bi trebalo provoditi duže od 10-tak dana jer u suprotnom dolazi do ekstrakcije neželjenih tvari. Pretok se provodi kada je došlo do razrjeđivanja, olakšanog miješanja i podizanja ostataka ploda te ako je boja mošta/soka primjerena. Tada je potrebno odvojiti mošt, tj. prekinuti vrenje na plodu, posebice ako se burno vrenje zaustavlja.

Sekundarnu fazu možemo podijeliti na dvije podfaze: u *fazi I* provodi se kontrolirana/hladna fermentacija uz pretakanje. Prije pretakanja vina dodaje se bistrilo (bentonit, pentagel) te po potrebi K-metabisulfit. Temperaturu treba spustiti na 18 °C nakon što se napravi pretok. U

*fazi II* dolazi do hladne stabilizacije – zrenje vina pri kontroliranim uvjetima u spremnicima od nehrđajućeg čelika pri temperaturi 12-14 °C, periodično pretakanje te razvoj *bouquet*-a tijekom vremena (Velić, 2015.).



**Slika 4.** Blok shema tehnološkog procesa proizvodnje kupinovog vina (Velić, 2015.)

### Muljanje

Kupina u svom plodu sadrži sastojke potrebne za njezinu preradu u vino: šećer sposoban za vrenje te autohtone kvasce. Dok su bobice čitave, u njima šećer ne može provreti, stoga je potrebno prvo mehanički osloboditi sok - mošt, kako bi se iz njega vrenjem dobilo vino. To se postiže gnječenjem ili muljanjem kupina kao inicijalnom radnjom nakon berbe i transporta kupina.

### Fermentacija

Fermentacija je faza koja nastupa nakon muljanja kupina odnosno cijedenja mošta. Tada kvasci (mikroorganizmi koji provode alkoholnu fermentaciju) koji su na pokožici bobice mirovali, došavši u tekućinu u kojoj je rastopljen šećer, počinju intenzivno razmnožavanje metabolizirajući šećer do alkohola, CO<sub>2</sub> i niz drugih sastojaka koji utječu na kvalitetu vina, kao što su glicerol, octena kiselina, jantarna kiselina, tvari arome i drugo. Istovremeno, nastaje određena količina energije koju kvasci koriste za svoje životne potrebe, dok se višak energije oslobađa u obliku topline.

Kupinovo vino, kao i vina proizvedena od drugog jagodastog voća, slabo su alkoholna, jer se postotak šećera u tom voću kreće od 5 - 12 %. To znači da će nakon vrenja soka s navedenom koncentracijom šećera dobiti vino sa sadržajem alkohola od oko 5 - 6 vol %. Stoga je neophodno provesti došećeravanje masulja, pri čemu je za povećanje udjela alkohola u budućem vinu za 1 vol % alkohola u 100 l mošta potrebno dodati 1,7 kg šećera.

Šećer se dodaje kako bi kao produkt nastalo dobro vino s dovoljno alkohola koji će ga čuvati od kvarenja. Dodaje se u dva navrata: 50 % od određene količine šećera za doslađivanje umiješa se te otopi u masulju, a zatim se dodaje selekcionirani suhi kvasac 30 g / 100 l i dobro promiješa. Drugo dodavanje šećera potrebno je obaviti nakon 3 - 4 dana od početka burne fermentacije. Dobiveni masulj u posudama sulfitira se s K-metabisulfitom neposredno prije došećeravanja, kako bi se spriječio rast i razvoj patogene mikroflore (bakterija) i divljih kvasaca prisutnih na plodu kupina. Nakon toga se dodaju enzimi - pektinaze.

Masulj kupina može fermentirati uz dodatak selekcioniranih kvasaca pri kontroliranoj temperaturi od 17-19 °C. Starter kultura korištena u eksperimentalnom dijelu ovog rada je selekcionirani kvasac *Saccharomyces cerevisiae* Uvaferm 299. Uz nju je kao dodatak korištena i hrana za kvasce Fermaid E, mješavina organskog i anorganskog dušika koja služi kako bi potaknula pravilan metabolizam kvasaca koji će dovesti do najboljih rezultata fermentacije.

Maceracija može trajati od 4 - 21 dan, uz svakodnevno miješanje masulja najmanje tri puta dnevno tijekom burne fermentacije. Vrenje masulja se treba provesti u zatvorenom tanku radi sprječavanja ulaska zraka (Opačić, 2010.).

Na sam proces fermentacije utječu fizikalni i kemijski čimbenici:

### 1. Fizikalni čimbenici

- temperatura- za kvalitetu vina jako je važna temperatura vrenja, potrebno ju je održavati unutar vrijednosti propisanih za pojedini soj kvasaca (uz pomoć hlađenja), te je tijekom cijele fermentacije kontrolirati. Pri fermentaciji masulja od kupine temperatura ne bi trebala prijeći 20 °C.
- tlak ugljikova(IV) oksida (CO<sub>2</sub>)

### 2. Kemijski čimbenici

- količina kisika - zračenjem se dodaje, a sumporenjem oduzima kisik
- količina sumporova(IV) oksida (SO<sub>2</sub>) - prisutnost iznad 25-30 mg/l sprječava početak vrenja
- količina dušika (N<sub>2</sub>) kojeg kvasci koriste za hranu
- količina teških metala- željezo, bakar, aluminij, cink
- alkohol - pojedini sojevi kvasaca podnose različite koncentracije alkohola
- ostaci pesticida - sprječavaju rad kvasca

### **Malolaktična fermentacija**

Malolaktična fermentacija je proces pretvorbe jabučne kiseline u mliječnu kiselinu. Mliječna kiselina znatno je slabija od jabučne kiseline. Malolaktičnu fermentaciju provode malolaktične bakterije, a najznačajnija vrsta je *Lactobacillus brevis*. Ukoliko se koriste autohtone sorte starter kultura bakterija, konačni proizvod biti će ujednačene i bolje kakvoće. Provodi se na temperaturi 20 –25°C (Pozderović, 2013.).

### **Sumporenje mošta i masulja**

Suvremeno podrumarstvo nezamislivo je bez upotrebe sumpora i iako sesumporenje koristi od davnina, podrumari mu pristupaju snepovjerenjem i nerado sumpore svoj mošt i vino.

Mnogi smatraju da je SO<sub>2</sub> štetan za zdravlje ljudi, da uzrokuje glavobolju i neugodan miris vina.

Upotreba SO<sub>2</sub> regulirana je *Pravilnikom o voćnim vinima*, gdje je određena maksimalna dozvoljena količina ukupnog sumpornog dioksida 200 mg/L i slobodnog 30 mg/L.

Sumporov(IV)oksid dodan moštu ili vinu prelazi u sumporastu kiselinu koja se većim dijelom veže, a manjim dijelom ostaje slobodna. Slobodni dio sumporaste kiseline djeluje kao antiseptik (pogubno djeluje na štetne bakterije uzročnike bolesti vina, divlje kvasce, plijesni i gljivice uzročnike vinskog cvjeta) i antioksidans (sprječava nepoželjne oksidacije tj. posmeđivanje i vina).

Osim toga, sumporenjem se mošt i vino se čuvaju od suvišnih oksidacija, vina se bolje, sigurnije i dulje čuvaju te zadržavaju svježinu i *bouquet* - aromu.

Sumpor za potrebe u vinarstvu može se nabaviti kao:

- kalijev metabisulfit, vinobran (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): najčešće se koristi zbog jednostavne pripreme i doziranja.
- tekući sumporni dioksid: dolazi u promet u čeličnim bocama težine do 50 kg, a koriste ga vinarije za sumporenje vina i bačvi
- sumporasta kiselina: najčešće se priprema u koncentraciji 5 do 10 %, proizvodi se industrijski

Uloga sumpora je višestruka: ubrzava i potpomaže u taloženju nečistoća, kojene povoljno djeluju u masulju (zemlja, lišće, plijesan, ostaci sredstva za prskanje itd.), sprječava djelovanje štetnih mikroorganizama (divlji kvasci, bakterije) dok ne počne fermentacija sa selekcioniranim kvascem te sprječava enzimsko i neenzimsko posmeđivanje vina (Opačić, 2010.).

### **Dozrijevanje vina**

Iako je alkoholno vrenje mošta najvažnija biokemijska promjena koja se odvija u moštu tijekom proizvodnje vina, postoji još cijeli niz značajnih promjena u mladom vinu: biokemijske, kemijske, fizikalne i fizikalno-kemijske prirode. Te promjene uzrokuju bistrenje te izgradnju okusa i mirisa – dozrijevanje vina. Odležavanjem vina počinju brojni

procesiu kojima sudjeluju sastojci mladog vina u kombinaciji s vanjskim čimbenicima među kojima je na prvom mjestu kisik. Vino dolazi u kontakt s kisikom za vrijeme pretakanja i taj proces povoljno utječe na dozrijevanje vina, na razvoj aromatičnih i buketnih vina. Značajan utjecaj imaju i temperatura i vlažnost zraka upodrumu.

Nakon alkoholne fermentacije, u mladom vinu zaostajemala količina neprevrela šećera pa i kvasci nastavljaju proces dozrijevanja, ali posve mirno, što se očitujekao lagan šum izlazećeg CO<sub>2</sub>, tzv. tiho vrenje. Zbog tihog vrenja uposudi mora biti ostavljen prostor i posude se ne smiju čvrsto začepiti.

Kod proizvodnje suhog kupinovog vina, pretvorba šećera u alkohol se provodi do kraja, a kod proizvodnje slatkog, desertnog vina, vrenje se prekida kod željenog ostatka šećera. Fermentaciju se prekida naglim hlađenjem na temperaturu od oko 5 °C.

### **Stabilizacija vina**

Cilj stabilizacije je spriječiti mutnoću i taloženje pojedinih sastojaka vina. Nestabilnostu vino unose dušične tvari, bjelančevine, polifenoli - boje i tanini, mikroflora (kvasci i bakterije) i soli vinske kiseline. Prema tome, potrebno je poduzeti određene mjerekako bi vino poslije prvogpretoka i prije razlijevanja u boce bilo stabilno.

- Polifenoli: antocijani i tanini, tvari boje; tanini kod pijenja djeluju oporo i gorko. Polifenoli su podložni oksidaciji najprije u moštu a zatim u vinu, pa time dolazi do nestabilnosti vina, koja se očituje u promjeni boje vina od svijetložute do tamnosmeđe - posmeđivanje vina. Ove oksidacijske procese sprječavamo dodatkom sumporova(IV)oksida (K-metabisulfitom ili 5%-tnom otopinom sumporaste kiseline).
- Metali su također odgovorni za nestabilnost u vinu, i to posebice željezo, cink i bakar. Metali se u plodu mogu pojaviti na više načina: fiziološkim putem kroz korijen, a podrijetlo mu može biti iendogeno: loša zaštita željeznih dijelova na strojevima i posudama u podrumu, zatim mehaničkim putem - kišom i vjetrom nanesenom zemljom na kupine, kao i sredstvima za zaštitu. Vino uobičajeno sadrži 0,4 - 0,5 mg/L željeza, a veća količina dolazi u vino na opisani način.

- Mikroorganizmi (kvasci i bakterije) su uzročnici biološke nestabilnosti koja se sprječava pravilnom primjenom sumporova(IV)oksida. Kod prerade kupina djelujemo preventivno, uklanjajući bakterije, loše kvasce i ostale nepoželjne tvari koje u mladom vinu izazivaju biološku nestabilnost vina (Opačić, 2010.).

### 2.2.2 PARAMETRI KAKVOĆE KUPINOVOG VINA

Prema *Pravilniku o vinu* (2004.), kakvoća vina utvrđuje se na osnovi sljedećih elemenata:

- Fizikalno-kemijske analize: alkoholna jakost, ukupni suhi ekstrakt, gustoća, reducirajući šećeri, saharoza, ukupne kiseline, hlapljive kiseline, pepeo, pH, slobodni sumporni dioksid, ukupni sumporni dioksid;
- Dodatne analize:
  - Ugljični dioksid (prirodna pjenušava, biser i gazirana vina);
  - Mikrobiološko ispitivanje vina i taloga;
  - Provjere ponašanja vina pri izlaganju zraku i niskim i povišenim temperaturama;
  - Organoleptičko ocjenjivanje boje, bistroće, mirisa i okusa;
  - Odnos pojedinih sastojaka u vinu bitnih za pojedino vino.

Pojam kvalitete kupinovog vina obuhvaća organoleptička svojstva kupinovog vina: boju, aromu, bistrinu i ujednačenost okusa te određeni fizikalno-kemijski sastav.

Na senzorska i fizikalno-kemijska svojstva kupinovog vina utječu različiti čimbenici:

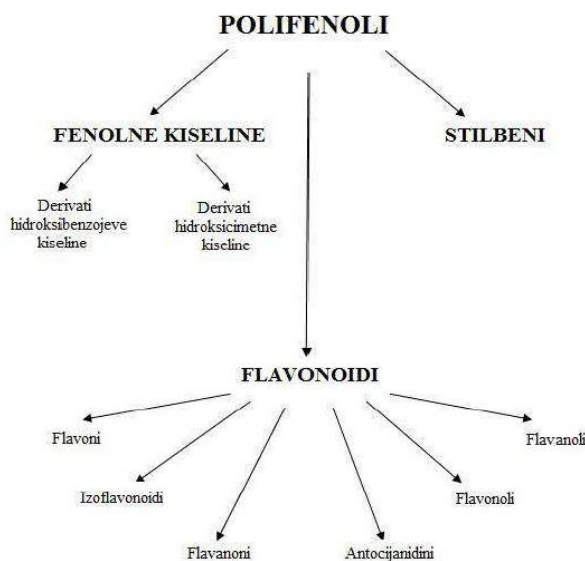
- uzgoj i odabir sorte te fiziološko stanje sirovine pri berbi
- sastav tj. udjel pojedinih komponenti kupine: šećera, organskih kiselina, fenola, biološki aktivnih tvari, arome i boje itd.
- postupci u proizvodnji vina: maceracija, enzimska obrada, izbor i selekcioniranje kvasca te uvjeti fermentacije i zrenja (Velić et al., 2013.).



### 2.3 TVARI BOJE

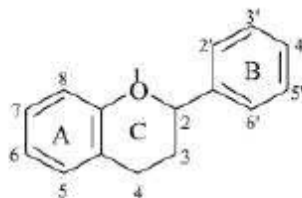
Klorofil je pigment koji biljkama daje zelenu boju, za žutu boju biljaka koja varira od žute do crvene boje zaduženi su karotenoidi dok antocijani (grč. *anthos* (cvijet) i *kyanos* (plavo)) daju raspon boja od svijetlo ružičaste do tamno ljubičaste. Smatra se da je glavna uloga pigmenta privlačenje insekata i drugih životinja u svrhu oprašivanja i raznošenja sjemena. Njemački kemičar Richard Willstätter, koji je za rad na izolaciji biljnih pigmenta dobio i Nobelovu nagradu 1915. godine, otkrio je da skoro sve biljke crvene, plave i ljubičaste boje sadrže antocijane ([http://www.hah.hr/arhiva/index\\_potrosacki.php?id=368](http://www.hah.hr/arhiva/index_potrosacki.php?id=368), 11.9.2016).

Polifenoli su spojevi koje su biljke sintetizirale kao odgovor na stresne uvjete, kao molekule specifičnih osobina koje su služile za obranu od insekata i nametnika. Imaju značajnu ulogu u obrani organizma djelujući antibakterijski, antivirusno, protuupalno, antimutageno, antikancerogeno, antialergijski te u zaštiti kardiovaskularnog sustava (Velić, 2015.). **Slika 5** prikazuje opću podjelu polifenola.



**Slika 5.** Opća podjela polifenola (Velić, 2015.)

Najrasprostranjenija skupina polifenola su flavonoidi. Njihovu osnovnu strukturu čini troprstenasta struktura sastavljena od dvije aromatske benzenske jezgre A i B spojena heterocikličnim prstenom s kisikom, prsten C (**Slika 6**).



**Slika 6.** Osnovna struktura flavonoida (Velić, 2015.)

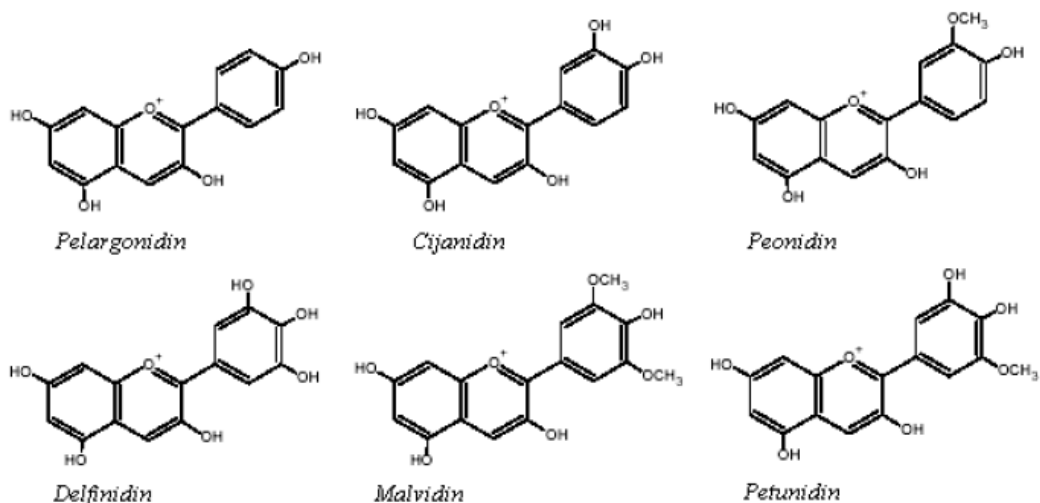
Fenolni spojevi pridonose senzorskim svojstvima i nutritivnoj vrijednosti namirnica biljnog podrijetla te brojnim proizvodima dobivenim njihovom preradom (Cheynier, 2005.).

Najzastupljeniji pigmenti iz grupe flavonoida u plodu kupine su antocijani.

### 2.3.1 ANTOCIJANI

Glavni dio molekule antocijana je antocijanidin koji je povezan s monosaharidima (glukoza, arabinoza, ksiloza) te kao takav odgovoran za boju. Antocijanidin se još naziva i flavilium kation (aglikon) te sadrži konjugirane dvostruke veze odgovorne za adsorpciju svjetla pri valnim duljinama oko 500nm, zbog čega ih ljudsko oko vidi obojene od crvene, narančaste do plavo crvene boje (Pichler, 2011).

Od 22 poznata antocijanidina, najznačajniji za hranu su: pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, malvidin i petunidin (**Slika 7**) i međusobno se razlikuju po broju hidroksiliranih i metoksiliranih grupa na B prstenu flavilium kationa.



Slika 7. Najznačajniji prirodni antocijanidini (Pozderović, 2013.)

Antocijani su najzastupljenija tvar boje u plodukupine i to u količini od 35 – 121 mg/L (Arozarena i sur., 2012.).

### 2.3.2 UTJECAJ PARAMETARA NA STABILNOST BOJE ANTOCIJANA

Antocijani su vrlo nestabilne molekule u matriksu poput hrane. Na stabilnost boje antocijana uvelike utječe pH, otapalo, temperatura, koncentracija antocijana i struktura, kisik, svjetlost, enzimi i drugi prisutni sastojci.

#### Utjecaj strukture

Glikozidne jedinice i acilne grupe vezane na aglikon te mjesto vezanja imaju značajan utjecaj na stabilnost i reaktivnost antocijana. Mjesto supstitucije na antocijanidinu te broj i pozicija hidroksilnih i metoksilnih grupa na aglikonu utječu na kemijsko ponašanje antocijana. Povećana hidroksilacija na aglikonu stabilizira antocijanidin; delfinidin je stabilniji od cijanidina u zakiseljenom metanolu. Ipak, postoje odstupanja od pravila utjecaja hidroksilacije aglikona na stabilnost molekule. U pufer otopini pH 3,1 cijanidin 3-glukozid je bio stabilniji od pelargonidin 3-glukozida, ali je delfinidin 3-glukozid bio manje stabilan nego cijanidin 3-glukozid. Također, petunidin 3-glukozid, sa dvije hidroksilne grupe na B prstenu je bio manje stabilan nego peonidin 3-glukozid koji ima samo jednu hidroksilnu skupinu u istom

prstenu (Pichler, 2011.). Povećanjem metilacije hidroksilnih skupina smanjuje se stabilnost antocijana.

Prisutnost hidroksilnih i metoksilnih skupina ne utječe samo na stabilnost antocijana, već i na predodžbu boje. Boja antocijana se mijenja od ružičaste prema plavoj kako se broj hidroksilnih skupina povećava (Pichler, 2011.) Glikozilnom supstitucijom postiže se stabilnija molekula antocijana, ali na stabilnost utječe i sama pozicija glikozilacije te vrsta glikozilne jedinice.

### **pH**

Antocijani su stabilniji u kiselom mediju, nego u alkalnom mediju. Pokazuju široki raspon boja ovisno o pH vrijednosti. Ionska priroda antocijana omogućava promjenu strukture molekula s obzirom na pH, što rezultira različitim bojama i nijansama boja pri različitim pH vrijednostima.

U vrlo kiselom mediju crveni flavilium kation je dominantan oblik. Povećanjem pH dolazi do smanjenja intenziteta boje i koncentracije flavilium kationa zbog hidratacije preko nukleofilnih veza, te nastaje bezbojni karbinolni oblik. Karbinolni oblik gubi konjugirane dvostruke veze između A i B prstena i ne apsorbira vidljivu svjetlost. Također dolazi do brzog gubitka protona s flavilium kationa kako pH dalje raste i nastaje obojeni gvinoidalni oblik. Relativna količina svakog oblika varira ovisno o pH i strukturi svakog antocijana (Kopjar, 2007.).

### **Temperatura**

Na stabilnost antocijana utječe i temperatura. Brzina degradacije antocijana se povećava tijekom procesiranja i skladištenja kako se temperatura povećava. Povećanje temperature u pH intervalu 2-4 izaziva gubitak glikozilnih jedinica antocijana hidrolizom glikozidne veze, što dovodi do gubitka boje antocijana s obzirom da su aglikoni manje stabilni od svojih glikozidnih oblika. Stvaranje halkona prvi je korak tijekom termičke degradacije antocijana (Pichler, 2011.). Termička degradacija vodi ka stvaranju smeđih pigmenata, posebno u prisutnosti kisika.

### **Kisik**

Kisik pojačava utjecaj drugih degradacijskih procesa antocijana. Štetan utjecaj kisika na antocijane se može manifestirati kroz direktnu oksidaciju ili indirektnu oksidaciju gdje oksidirane komponente medija dalje reagiraju s antocijanima te se stvaraju bezbojni ili smeđi produkti. Antocijani reagiraju i sa radikalima kisika odnosno s peroksi radikalima. U takvim reakcijama antocijani djeluju kao antioksidansi te se smatra da je to svojstvo antocijana odgovorno za njihov pozitivan utjecaj na kardiovaskularna oboljenja (Kopjar, 2007.).

### **Svjetlost**

Svjetlost utječe na antocijane na dva različita načina. Neophodna je za biosintezu antocijana i ubrzava njihovu degradaciju (Pichler, 2011.) i upravo zbog toga, proizvode od kupine bolje je čuvati u mračnom prostoru.

### **Askorbinska kiselina**

Obogaćivanje voćnih sokova s askorbinskom kiselinom je uobičajena metoda zaštite od oksidacije i povećanje nutritivne vrijednosti proizvoda. Askorbinska kiselina ima nekoliko različitih uloga u stabilizaciji boje antocijana. Degradacija antocijana ubrzana je prisutnošću askorbinske kiseline jer ubrzava polimerizaciju pigmenata i uzrokuje obezbojenje. Smatra se da je mehanizam degradacije antocijana direktna kondenzacija između askorbinske kiseline i antocijana (Pichler, 2011.).

### **Šećeri**

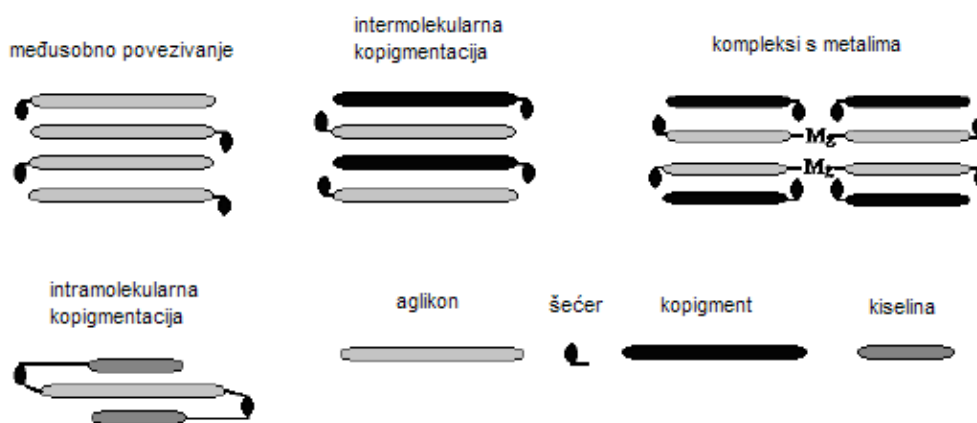
Šećeri su prirodno prisutni u voću, a vrlo često se dodaju tijekom procesiranja različitih proizvoda na bazi voća. Šećer, kao i njegovi produkti degradacije smanjuju stabilnost antocijana. Reakcijom između antocijana i degradacijskih produkata šećera i askorbinske kiseline nastaju smeđi pigmenti (Kopjar, 2007.). Također je ustanovljeno da šećer može i štititi antocijane. Ustanovljeno je da saharoza štiti antocijane tijekom skladištenja zamrzavanjem i sprječava posmeđivanje i stvaranje polimera vjerojatno zbog inhibicije enzimskih reakcija, ili pak smanjenja aktiviteta vode (Pichler, 2011.).

## Kopigmentacija

Boja antocijana se može stabilizirati i pojačati kopigmentacijskim reakcijama. Iako su antocijani obojeni u prirodi, njihov obojeni oblik je jako stabiliziran drugim prirodnim komponentama, tzv. kopigmentima, koji postoje u stanicama cvijeća i voća (Pichler, 2011.).

Kopigmentacija može biti vrlo koristan, odnosno prirodan način za poboljšanje boje prehrambenih proizvoda bogatih antocijanima. Uočeno je da je kopigmentacija intenzivnija u sokovima bobičastog voća nego s čistim antocijanima tih sokova, a što upućuje na činjenicu da i druge tvari soka imaju ulogu u fenomenu kopigmentacije (Kopjar, 2007.).

Kopigmentacija se može odvijati na nekoliko načina. Najznačajniji mehanizmi kopigmentacije su formiranje intermolekularnih i intramolekularnih kompleksa. Međusobno povezivanje i stvaranje metalnih kompleksa su također mogući mehanizmi za stvaranje kopigmenata.



Slika 8. Interakcije antocijana (Pichler, 2011.)

### 2.4 TVARI AROME

Kemijski gledano, aroma vina je rezultat hlapljivih spojeva odgovornih za miris i nehlapljivih spojeva koji više utječu na okusni doživljaj voća, pa stoga pod samim pojmom arome podrazumijeva se doživljaj mirisnih i okusnih karakteristika (Kopjar, 2014.). Aromu vina čine različiti hlapljivi sastojci koji se u istima nalaze u malim koncentracijama, reda veličine od nekoliko mg/L do nekoliko ng/L. Aroma vina je kompleksna i formira se tijekom zrenja, složenim kemijskim, biokemijskim i mikrobiološkim procesima (Vrdoljak, 2009.).

U nehlapljive komponente ubrajamo celulozu, šećere, proteine i slično, dok alkohole, etere, aldehide, ketone i sl. ubrajamo u hlapljive komponente. Kao jedna od najvažnijih osobina kvalitete, aroma ima velik utjecaj na kvalitetu i prihvatljivost hrane (Kopjar, 2014.).

Vrijednost arome ili aromatičnost se definira kao kvocijent udjela tvari u namirnici i praga osjetljivosti mirisa (Web 6). Tvari arome nemaju biološku funkciju u biljkama, već većina tvari arome nastaje kao posljedica degradacijskih promjena (Kopjar, 2014.).

Sve tvari arome se određuju instrumentalnim metodama: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija (GC), analitičkim metodama i senzorskim ocjenjivanjem (Vrdoljak, 2009.).

#### 2.4.1 NOSITELJI AROME U VOĆU

Aromatični sastojci nalaze se u različitim koncentracijama u voću i ovisno o tome pridonose aromatskom profilu voća. Obično se tvari arome detektiraju pri nižim koncentracijama nego što se prepoznaju (Kopjar, 2014.).

Aroma u voću može biti uzrokovana malim molekulama poput aldehida i ketona, velikim molekulama poput šećera i kiselina te interakcijom između malih i velikih molekula.

Općenito, aromatične tvari u voću su podložne isparavanju i sublimaciji te se najčešće izdvajaju procesom uparavanja.

Škrob i njegovi derivati, osim kao aditivi, primjenjuju se i kao nosači arome. Interakcije škrob - aroma vrlo su korisne za poboljšanje zadržavanja arome u proizvodima, ali i razvoj nosača za enkapsulaciju arome (Boutboul i sur, 2002.).

Male molekule kao što su alkoholi, aldehidi i kiseline su vrlo hlapljive molekule koje daju oštru, estersku, jaku, difuznu, kemijsku notu. Njihova nota je poželjna ukoliko su razrijeđeni. Veće molekule navedenih spojeva su blaže i poželjnije i u većim koncentracijama (Kopjar, 2014.).

Maillardovimreakcijama mogu nastati nepoželjne arome uzrokovane interakcijama među molekulama aminokiselina i šećera uz povišenu temperaturu. Osim Maillardovimreakcijama, nepoželjne arome u voću mogu nastati i procesom fermentacije.

### 2.4.2 PODJELA AROMATIČNIH SASTOJAKA U VOĆU

Tvari arome mogu se podijeliti u nekoliko skupina.

Prema hlapljivosti ih možemo podijeliti na lako, srednje i slabo hlapljive komponente.

Osim toga, Moslavac (2006) ističe da je najprikladnija podjela sastojaka arome po Gierscheneru (1964) na sljedeće kategorije:

- aromatski kompleks karakterističan za odliku voća u kojemu je kemijski kompleks arome karakterističan za određenu vrstu voća,
- aromatski kompleks karakterističan za vrstu voća gdje prisutnost kemijskog spoja daje određenu karakteristiku sorte te se bez njegove prisutnosti ne dobiva prepoznatljiva aroma sorte,



- opći aromatski kompleks koji čine teže aromatične tvari koje se u većini slučajeva zadržavaju i preradom, nosači arome su tvari poput voskova ili lipida koji predstavljaju otapalo za pojedine aromatske komponente,
- nepoželjni aromatski kompleks koji čine tvari nastale fermentacijom ili drugim nepoželjnim kemijskim reakcijama.

Tvari arome ne mogu se podijeliti prema kemijskoj strukturi jer svrstavanje pojedinog sastojka u pojedinu kemijsku skupinu ne predstavlja uvjet za određeni aromatski karakter. Ista funkcionalna skupina može dati različita aromatska svojstva, pa tako npr. ketoni zbog posjedovanja dvije slobodne grupe daju jaču aromu nego aldehidi koji posjeduju jednu slobodnu skupinu (iako oba spoja posjeduju istu CHO funkcionalnu skupinu).

### 2.4.3 PROMJENE AROME TIJEKOM PROCESA PRERADE

Proces prerade općenito intenzivira tvari arome jer tijekom prerade dolazi do usitnjavanja voća čime se razaraju stanice te aromatične tvari migriraju iz ploda u sok u kojem se daljnjim tehnološkim procesima dodatno aktiviraju.

Za tvorbu aromatskih spojeva najznačajniji su procesi toplinske obrade koji se provode u cilju dobivanja i pojačavanja arome, ali i konzerviranja proizvoda. Budući da je većina aromatskih sastojaka termolabilna, procese treba provoditi kontinuirano na temperaturama koje optimalno djeluju na oslobađanje aromatičnih sastojaka te u što kraćem vremenu. Važnu ulogu ima i kisik koji sudjeluje u procesima oksidacije i hidrolize. Ukoliko se proces prerade ne provodi pravilno, može doći i do gubitka arome zbog podložnosti hlapljenja i sublimacije određenih sastojaka, ali i stvaranja neugodne arome procesima poput fermentacije, Maillardovih reakcija ili Steckerove razgradnje aminokiselina (Čović, 2010.).

### 2.4.4 ODREĐIVANJE SASTOJAKA AROME PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci smjese raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna uvijek stacionarna, a druga pokretna (mobilna). Mobilna faza može biti plinovita, tekuća ili tekućina u superkritičnim uvjetima te joj je cilj prenositi komponente uzorka kroz stacionarnu fazu koja je u formi gela ili tekućine (ali čvršća od mobilne faze), a odjeljivanje dvaju faza se temelji na razlikama u brzini kretanja komponenti kroz stacionarnu fazu (Čupurdija, 2008.).

Kromatografija se koristi u svrhu:

- analize komponenata složenih uzoraka te proučavanja njihovih interakcija
- identifikacije ili određivanja komponenata baziranih na poznatim sastojcima
- pročišćavanja odnosno izdvajanja određenih komponenata u svrhu izoliranja onih koji su potrebni za daljnja istraživanja
- određivanja udjela (kvantifikacije) pri čemu se određuju koncentracija i udjeli pojedinih komponenti u uzorku.

Kromatografske metode mogu se podijeliti prema obliku kromatografske metode na plošnu i kolonsku kromatografiju te prema tipovima mobilnih i stacionarnih faza na plinsku kromatografiju (GC), tekućinsku kromatografiju (LC, HPLC) i fluidnu kromatografiju u superkritičnim uvjetima.

Plinska kromatografija (GC) je metoda razdjeljivanja višekomponentnih sustava pomoću kapilarne kolone koja je podvrgnuta određenoj temperaturi ili temperaturnom rasponu, a kao mobilna faza se koristi inertni plin. Na taj način se, na odgovarajućoj koloni, mogu vrlo uspješno razdvojiti smjese tvari. U plinskoj kromatografiji uzorak se injektira na početak kromatografske kolone, gdje isparava bez raspada (Cerjan-Stefanović i sur., 1999.)

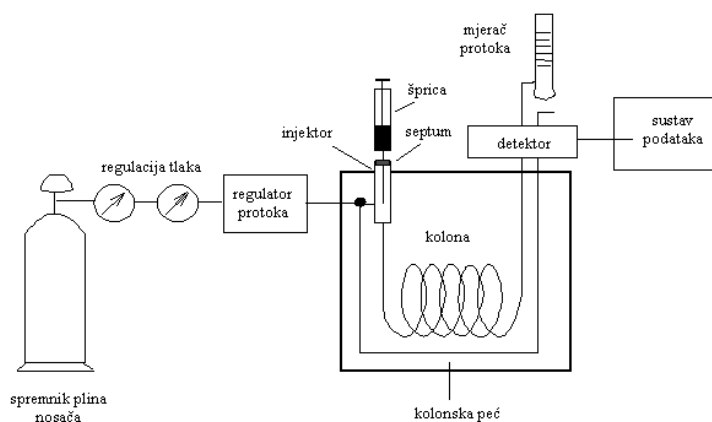
Odvajanje komponenata smjese može se provesti na 2 načina: plinskom adsorpcijskom kromatografijom (GSC) - diferencijalna adsorpcija na adsorbensu te plinskom

tekućinsko-razdjelnom kromatografijom (GLC) - diferencijalno otapanje ili razdjeljivanje u odgovarajućoj selektivnoj tekućini nanesej na veliku površinu u tankom sloju.

Analizirana tvar ne reagira s mobilnom fazom te zbog toga njegova brzina kretanja kroz kolonu ne ovisi o kemijskoj strukturi mobilne faze. Stacionarna faza odjeljuje komponente različitih molekulskih masa. Kod molekula male molekulske mase za odjeljivanje komponenti koristi se čvrsta tvar velike specifične površine na koju se adsorbiraju analizirane komponente. Kod molekula velike molekulske mase za odjeljivanje komponenti koristi se tekuća faza nanesej na površinu čvrstog nosača adsorpcijom ili kemijskim vezanjem. Eluiranje se obavlja pomoću protoka inertnog plina kao mobilne faze. Analizirana tvar se ubrizgava kao tekućina koja zbog visoke temperature u kromatografu prelazi u plinovito stanje. Temperatura ulaza instrumenta postavlja se na 50°C višu temperaturu od temperature vrelišta najslabije hlapljive komponente iz analizirane smjese (Cerjan-Stefanović i sur., 1999.).

Uređaj u kojem se vrši plinska kromatografija naziva se plinski kromatograf (**Slika 9**) i sastoji se od:

- spremnika plina nosača koji može biti boca ili generator,
- uređaja za unošenje uzorka (injektor sa špricom i septumom),
- kromatografske kolone smještene u prostoru peći,
- detektora koji utvrđuje određenu komponentu u struji plina nosača i
- sustava za ispis podataka (Deur – Šiftar, 1973.).



Slika 9. Kromatograf (Deur-Šiftar, 1973.)

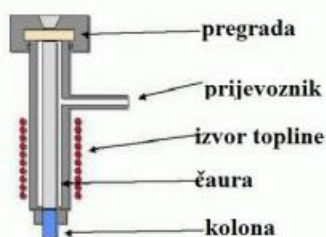
### Plin nositelj

Plin nositelj može biti bilo koji kemijski inertan plin, no najčešće se koriste helij, dušik i vodik pri čemu izbor ovisi o vrsti detektora koji se na plinskoj kromatografiji upotrebljava. Helij se upotrebljava uz detektore s toplinskom vodljivošću, a dušik uz detektor s plamenom ionizacijom (Deur-Šiftar, 1973.). Nadalje plin treba biti suh i pročišćen kako ne bi došlo do oštećenja uređaja, ne smije sadržavati ugljikovodike, mora imati reguliran tlak i protok te biti što jeftiniji.

### Injektor

Injektor je uređaj za unošenje uzorka koji je spojen s kolonom, a može biti izravni, prenosni, kolonski te injektor s isparivačem (Cerjan-Stefanović i sur., 1999.). Temperatura injektora mora biti viša od temperature kolone. Najčešće se radi o vrlo visokim temperaturama (150°C - 290 °C) što omogućava nagli prelazak tekućeg uzorka u plinovito agregatno stanje (Čupurdija, 2008.).

Plinovite uzorke najbolje je unositi u kolonu pomoću dozirnih ventila, a unošenje čvrstih uzoraka najčešće se provodi nakon otapanja (Pichler, 2011.).



**Slika 10.** Injektor (Čupurdija, 2008.)

### Kromatografske kolone

Kromatografska kolona predstavlja osnovu kromatografskog sustava. Smještena u termostatiranoj pećnici s mogućnošću zagrijavanja i kontrole temperature. Može biti izrađena od različitih materijala poput metala, plastike, stakla ili kvarca. Kao nosači koriste se inertne tvari, otporne na visoke temperature koje se sastoje od kuglastih zrnaca jednolične granulacije i malog promjera koje ne apsorbiraju sastojke uzorka. Kolone se dijele na

- preparativne;
- analitičke:
- punjene,
- mikropunjene i
- kapilarne (Deur-Šiftar, 1973.).

Kolona je definirana duljinom, promjerom i debljinom adsorpcijskog filma. Dimenzije kapilarnih kolona se kreću od 15m-60m, promjeri kolona kao i adsorbirani film mogu biti 0.25 $\mu$ m-0.50 $\mu$ m. Kolona se izabire prema grupama spojeva koji se analiziraju (Čupurdija, 2008.). Uporabom duljih kolona povećava se razmak među odijeljenim sastojcima smjese tako da se mogu odjeliti i sastojci koji izlaze zajedno. Duljina kolone ograničena je jakim padom tlaka i protoka kolone. Bolja djelotvornost kolone postiže se smanjenjem njezina promjera. Poznavajući sastav smjese koju kromatografiramo na osnovu podataka iz literature može se predvidjeti koju tekuću nepokretnu fazu treba upotrijebiti. Efikasnost kolone ovisi o tome koliko se puta uspostavlja ravnoteža između nepokretne i pokretne faze (Deur-Šiftar, 1973.)

### Detektor

Detektor je uređaj koji mjeri promjenu u sastavu eluata mjerenjem fizikalnih i kemijskih svojstava (Cerjan-Stefanović i sur., 1999.). Detektori u plinskoj kromatografiji s obzirom na selektivnost mogu biti: univerzalni (detektiraju svaki sastojak u eluatu osim za čistu mobilnu fazu npr. detektor toplinske vodljivosti) i selektivni (daju odziv samo na određene grupe komponenata u eluatu npr. plameno-ionizacijski detektor, alkalijski plameno-ionizacijski

detektor, detektor zahvata elektrona, foto-ionizacijski detektor, plameno fotometrijski detektor, detektor elektrolitičke vodljivosti).

### Spektrometrija masa

Instrumenti koji daju podatke o molekularnoj strukturi zovu se spektrometri. Razlikuju se infracrveni spektar (IC), spektar nuklearno – magnetske rezonancije (NMR), ultraljubičasti spektar (UV), spektar elektron-spinske rezonancije (ESR) i spektar masa.

Spektrometar masa je uređaj u kojem se molekule bombardiraju snopom elektrona bogatih energijom. Molekule se ioniziraju i cijepaju u mnogo fragmenata, od kojih su neki pozitivno nabijeni ioni. Svaka vrsta iona ima određenu masu i naboj, odnosno određeni odnos  $m/e$  što je karakteristična veličina za tu vrstu iona. Niz iona se analizira na način da se dobije signal za svaku vrijednost  $m/e$  koja je prisutna. Intenzitet svakog signala prikazuje relativnu količinu iona koja daje taj signal. Najviši signal ili maksimum (engl. peak) naziva se osnovni signal. Njegov intenzitet se označava sa 100. Spektar masa je dijagram koji pokazuje relativne intenzitete signala za različite vrijednosti  $m/e$ . Za dokazivanje identičnosti dvaju spojeva i kao pomoć pri određivanju strukture novog spoja može poslužiti spektar masa. Dva spoja su identična ako su im jednake fizikalne konstante (talište, vrelište, gustoća).

U kombinaciji plinskog kromatografa i masenog spektrometra, plinskom kromatografijom se razdvajaju sastojci, a maseni spektrometar služi kao detektor (Vrdoljak, 2009.).

### SPME analize

Zbog određenih nedostataka, kao što je dugotrajna priprema uzoraka i upotreba organskih otapala, analitičke tehnike poput ekstrakcije tekuće – tekuće ili ekstrakcije na čvrstoj fazi nisu bile zadovoljavajuće učinkovite. Stoga su Zhang i Pawliszyn 1993. godine razvili novu tehniku pripreme uzoraka poznatu kao mikroekstrakcija na čvrstoj fazi ili tzv. SPME (engl. solid phase

microextraction) tehnika. Ova tehnika se sve više primjenjuje za pripremu čvrstih i tekućih uzoraka poput vina, piva, voća, ulja i meda.

SPME se sastoji od dvije odvojene faze; apsorpcije (zaostajanje analita na stacionarnoj fazi) i desorpcije. Za uspješan postupak obje faze moraju biti optimizirane. Na desorpciju utječu temperatura i vrijeme desorpcije, dok na ekstrakciju utječe tip uzorka, vrijeme ekstrakcije, ionska jakost, pH uzorka, temperatura ekstrakcije i mućkanje uzorka.

Zbog visoke koncentracije teže hlapivih tvari može se dogoditi da kromatografski signali tragova budu neispravni. Ovom analizom to je moguće izbjeći, što omogućava analizu samo hlapivih sastojaka. HS-SPME je ekonomski prihvatljiva, brza i zahtijeva manju manipulaciju uzorcima. Stoga se koristi za analizu širokog spektra hrane, vina i alkoholnih pića. Također omogućuje otkrivanje tragova arome, koje nije moguće otkriti konvencionalnom ekstrakcijom tekuće-tekuće. Upotrebom modela vina uočena je primarna važnost kožice bobica grožđa kao izvora aromatičnih prekursora koji se lako otpuštaju u vino maceracijom, što je posebno izraženo kod crnog vina.

Kombinacija SPME analize i kapilarne plinske kromatografije na masenom spektrometru (GC-MS) koristi se za određivanje isparljivih komponenti vina. Kod vina je karakterističan skup identificiranih komponenti uz odgovarajuće relativne abundacije, tzv. "aromagrami". Za većinu komponenti granica detekcije je u  $\mu\text{g/l}$ . Lako se mogu identificirati alkoholi, terpeni i esteri (Vrdoljak, 2009.).

### Karakteristike SPME

SPME tehnikom je za velik broj organskih spojeva omogućeno koncentriranje sastojaka, prisutnih u tragovima, unutar sloja punila koje ima mali volumen, ali veliki koeficijent raspodjele sastojaka između punila i uzoraka. Osim kombiniranja ekstrakcije i koncentriranja, omogućen je i direktan prijelaz adsorbiranih sastojaka u injektor plinskog kromatografa. Zahvaljujući selektivnoj adsorpciji sloja punila, spriječen je ulaz kisika i vlage u kolonu plinskog kromatografa (Vrdoljak, 2009.).

### SPME aparatura

SPME aparatura je nužna za analizu uzoraka primjenom ove tehnike. Osnova ove aparature je kućište koje nalikuje olovci, a unutar kojeg se nalazi igla. Unutar igle na polimernoj stacionarnoj fazi prevučenoj preko silikatne niti dužine 1 cm odvija se adsorpcija sastojaka. Igla štiti punilo tijekom uporabe i čuvanja, te prilikom prolaza kroz septum injektora plinskog kromatografa i omogućava lakše rukovanje (Vrdoljak, 2009.).

### Eksperimentalni uvjeti SPME uzorkovanja

Uzorkovanje u SPME analizi je jednofazni proces. SPME tehnika je osjetljivija na eksperimentalne uvjete od uobičajenih ekstrakcija na čvrstoj fazi. Bilo kakva promjena eksperimentalnih uvjeta može utjecati na udio sastojaka adsorbiranih na punilo i na odgovarajuću reproducibilnost. Stoga je prilikom pripreme uzoraka određene uvjete, kao što su temperatura i vrijeme adsorpcije, potrebno pažljivo održavati konstantnim.

Postoje različita punila, ovisno o vrsti i debljini stacionarne faze. Najčešće se primjenjuju nepolarna punila s polidimetil-siloksanom koja su vrlo djelotvorna za molekule male i srednje molekulske mase, polarne i nepolarne.

Udio sastojaka adsorbiranih na SPME punilo ovisi o volumenu uzorka. Povećanjem volumena uzorka naglo se povećava trajanje adsorpcije koje kod većeg volumena uzorka ostaje gotovo konstantno te je vrlo važno da volumen tikvice, volumen uzorka i položaj igle u nadprostoru tikvice budu konstantni.

Na promjenu svojstava vezane faze te na smanjenje topljivosti hidrofobnih sastojaka u vodenoj fazi može utjecati prisutnost elektrolita u adsorpcijskom sustavu. S povećanjem koncentracije soli značajno se mijenja osjetljivost SPME tehnike. Povećanjem koncentracije soli kod većine sastojaka povećava se adsorpcija (benzaldehyd, linalol, neral). Kod etil-acetata i geraniala adsorpcija se u početku povećava, a potom kod veće koncentracije soli prestaje. Adsorpcija se smanjuje povećanjem koncentracije soli.



Konstantnim miješanjem vodenih uzoraka u cilju kontinuiranog postizanja svježije površine, a za manje hlapive sastojke i smanjenjem volumena nadprostora, te povišenjem temperature uzorka, brže se postiže ravnoteža između vodene i plinovite faze. Duže vrijeme ekstrakcije i viša temperatura injektora rezultiraju većim brojem pikova terpena. Kraće vrijeme ekstrakcije i niža temperatura injektora (5 min/250 °C) rezultiraju kromatogramom s većim i jasno odijeljenim pikovima sastojaka manje molekulske mase (acetaldehid) (Vrdoljak, 2009.).

### 2.5 UTJECAJ ENZIMA NA TVARI BOJE I AROME

Enzimi su biokatalizatori koji ubrzavaju biokemijske reakcije te ostaju nepromijenjeni tijekom reakcije. U prehrambenoj industriji imaju veliku važnost jer kataliziraju različite reakcije koje utječu na boju, okus ili teksturu te doprinose kvaliteti hrane. Neke od ovih reakcija mogu biti poželjne dok su druge nepoželjne i dovode do nepoželjnih promjena u boji ili okusu hrane.

#### 2.5.1 DEFINICIJA I PODJELA ENZIMA

Enzimi su proteini velike molekulske mase, te prema tome pokazuju karakteristično ponašanje proteina s obzirom na temperaturu i pH osjetljivost. Svi enzimi imaju optimalan raspon temperature i pH pri kojima se reakcija najbrže odvija. To je posebno važno za ciljanu upotrebu enzima, budući da se željena aktivnost svakog enzima može odvijati samo pod pravim uvjetima okoline. Nepovoljni temperaturni uvjeti i pH mogu denaturirati enzime što onemogućava vezivanje supstrata, tj. enzimi se deaktiviraju (Whitehurst, 2002.).

Možemo ih klasificirati prema prirodi reakcija koje kataliziraju i prema identitetu njihovih supstrata i proizvoda u šest glavnih skupina:

1. Oksidoreduktaze kataliziraju reakcije oksidacije i redukcija.

2. Transferaze kataliziraju prijenos funkcionalnih grupa sa jedne molekule na drugu.
3. Hidrolaze kataliziraju hidrolitičko cijepanje C-C, C-N, C-O, C-S ili O-P veza
4. Liaze kataliziraju reakcije eliminacije, te dolazi do cijepanja C-C, C-N, C-O ili C-S veza, stvaraju dvostruke veze ili obrnuto, te dodaju skupine na dvostruke veze.
5. Izomeraze kataliziraju reakcije izomerizacije (racemizacija, epimerizacija, *cis-trans*-izomerizacija, tautomerizacija).
6. Ligaze kataliziraju stvaranje veza, zajedno s hidrolizom fosfatne veze visoke energije, u ATP-u ili sličnim fosfatima (Hui, 2006.).

Tkiva biljaka i životinja su tradicionalni izvori enzima prehrambene tehnologije. Iako se još uvijek široko koriste u proizvodnji hrane, postoje mnogi utjecaji koji upravljaju proizvodnjom enzima za hranu i koriste se kao mikrobiološka alternativa uključujući i genetski modificirane derivate tih organizama (Vaclavik, 2008.).

### 2.5.2 ULOGA ENZIMA U TEHNOLOGIJI VINA

Enzimi igraju ključnu ulogu u proizvodnji vina. Vino se može smatrati kao proizvod nastao pomoću enzimske promjene soka od kupina. Enzimi ne potječu samo od kupina, već i od kvasaca i drugih mikroorganizama.

Enzimi koji potječu od mikroorganizama, koji su slučajno inficirali kupinu, također igraju važnu ulogu. Endogeni enzimi, koji su prisutni u kupini, imaju bitnu ulogu u zrenju. Ipak, njihova je uloga vrlo ograničena pri uvjetima proizvodnje vina zbog vrlo slabih i ograničenih aktivnosti. Stoga se egzogeni enzimi koriste kao pomoćnici u procesu proizvodnje jer mogu pojačati ili nadomjestiti aktivnosti enzima kupine.

Glavni industrijski enzimi koji se danas primjenjuju u proizvodnji vina su pektinaze, hemicelulaze i pripravci glukanaze. Enzimski pripravci se nalaze u obliku granula, tekućine ili praha. Nije poželjno koristiti pripravke u obliku praha zbog mogućnosti alergije. Enzimski pripravci u obliku granula ne stvaraju prašinu zbog toga jer su čestice enzima čvrsto povezane. Ostale prednosti granuliranih pripravaka su te što ne sadrže konzervanse i stabilni

su tijekom skladištenja. Tekući enzimski pripravci obično sadrže konzervanse (Whitehurst, 2002.).

Tijekom proizvodnje crnog vina, enzimi djeluju na stanice pulpe i kore kupine. Enzimi se dodaju na samom početku maceracije vina. Količina enzima ovisi o kvaliteti kupina prilikom branja (vrlo zrelo, zrelo, nezrelo, oštećeno) i o vrsti vina (kratka ili duga fermentacija). S obzirom na tanine kupine posebno je zanimljivo selektivno djelovanje enzima na polisaharide koji se nalaze u kori. Otpušteni su samo slobodni tanini u vakuolama i tanini, zajedno sa polisaharidima, prisutni u složenim strukturama. Otpuštanje kompleksa ugljikohidrat – tanin ima pozitivni učinak na crno vino koje je ocijenjeno kao manje oporo i manje gorko u usporedbi sa netretiranim vinom. Veća količina dodanih enzima i duže vrijeme inkubacije rezultira intenzivnijim djelovanjem enzima, a time i većom ekstrakcijom sastojaka kore. Prema tome, moguća je proizvodnja više sorti crnih vina s obzirom na količinu dodanih enzima, te na vrijeme inkubacije. Pri većim količinama enzima veći je i doprinos iz tanina (Whitehurst, 2002.).

Uporaba enzima u fazi maceracije postala je uobičajena praksa među vinarima.

Opna ploda kupine predstavlja barijeru koja zaustavlja oslobađanje polifenolnih tvari u mošt tokom procesa fermentacije. Kako bi došlo do ekstrakcije polifenola, potrebno je degradirati opnu i osloboditi stanice, a nakon toga degradirati i opnu same stanice. Poroznost opne može se povećati djelomičnom hidrolizom polisaharida (pektina, hemiceluloze, celuloze), što se postiže mehaničkom maceracijom i korištenjem kemikalija: SO<sub>2</sub> i enzima maceracije.

Enzimi koji su se prvi počeli primjenjivati u enologiji su enzimi pektinaze, ali proizvođači sve više proizvode i razne modifikacije pektinaze dodavajući malu količinu celulaze ili hemicelulaze kako bi postigli učinkovitije i cjelovitije uništenje opne stanice i kako bi poboljšali ekstrakciju boje.

Enzimi maceracije također utječu na stabilnost, okus i strukturu crvenih vina, jer se iz opne ne oslobađaju samo antocijani već i tanini koji stabiliziraju boju vina i utječu na suh i opor okus nakon konzumacije vina (Bautista et al., 2005.)

U industriji voćnih sokova i vina najviše se koriste fungalne pektinaze i to najčešće dobivene pomoću plijesni *Aspergillus niger* (Landbo i Meyer, 2004.).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1 ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj dodatka enzima pektinaze na zadržavanje tvari boje i arome vina od kupine te u vinima odrediti sadržaj tvari arome pomoću tehnike GC/MS, primjenom SPME analize. Potrebno je odrediti i tvari boje: polifenole, flavonoide, antocijane, polimernu boju te antioksidacijsku aktivnost u uzorcima vina.

### 3.2 MATERIJAL I METODE

#### 3.2.1 VINO OD KUPINE

Analizirana su dva vina od kupine dobivena istim tehnološkim postupkom proizvodnje, uz opasku da je jedno vino proizvedeno uz dodatak enzima pektinaze, dok je drugo proizvedeno bez istog.

#### 3.2.2 PROCES PROIZVODNJE VINA OD KUPINE

Za pripremu kupinovog vina upotrijebljene su kupine sorte Boysen u smrznutom stanju i pripremljena su 4 uzorka.

U prvoj fazi proizvodnje kupinovog vina provedeno je muljanje, tj. gnječenje kupina u plastičnim posudama voumena 7 L i na taj način je mehanički oslobođen sok iz plodova.

U posude je zatim dodano 157,5 g konzumnog šećera, saharoze (15% na masu ploda kupine) te je sadržaj izmiješan. Nakon 4 sata odmrzavanja kupina, u posude je dodano 0,11 g K-metabisulfita (10 g na 100 L masulja), kako bi se spriječili negativni oksidacijski procesi i suzbila proliferacija nativne mikroflore prisutne na plodu kupine. U dvije posude dodano je 0,02 g komercijalnog enzimskog pripravka pektinaze, Lallzym OE (Lallemand, Austrija), prethodno suspendiranog u 10 mL vode. Na kraju, u sve četiri posude dodano je 0,32 g selekcioniranog vinskog kvasca S. C. Uvaferm 299 (Lallemand, Austrija) prethodno rehidratiranog u 10 mL tople vode (max 40 °C) kroz 10 min i 0,32 g hrane za kvasce Fermaid E.

Fermentacija na plodu (maceracija), uz periodično miješanje, provodila se 6 dana. Masulj dobiven nakon maceracije procijeđen je, grubo profiltriran kroz sloj platna i dobiveno mlado vino (800 mL) je pretočeno u Erlenmayerove tikvice i zatvoreno gumenim čepom i vrelnjačama (**Slika 11**) te ostavljeno na tamnom i na sobnoj temperaturi 8 dana.



**Slika 11.** Procijeđeno kupinovo vino nakon maceracije

Nakon što je fermentacija završila, izbistreno vino je odekantirano s taloga i pretočeno u nove tikvice. Provedena je korekcija šećera, odnosno dodano je 8% saharoze na volumen vina u tikvicama. Na kraju je dodan K-metabisulfit i pentagel, sredstvo za bistrenje (10 g/hL preračunato na volumen vina u tikvici nakon pretakanja) te je vino ostavljeno u hladnjaku na 2 °C, kako bi se što bolje izbistriilo.

Nakon 4 dana, izbistreno vino je pretočeno u tamne boce i ostavljeno da zrije i odležava u hladnjaku na 5 °C do provođenja analiza. Tijekom odležavanja, vino je u dva navrata pretakano.

#### 3.2.3 ODREĐIVANJE TVARI BOJE

##### **Određivanje sadržaja polifenolnih spojeva**

Koncentracija ukupnih fenola se određuje Folin-Ciocalteu metodom. Folin-Ciocalteu metoda temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja (apsorbance) pri valnoj duljini od 765 nm (Ough, & Amerine, 1988). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline a pri oksidaciji fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Folin-Ciocalteu reagens (1:10) pripremljen je tako da je otpipetirano 3,3 ml Folin-Ciocalteu reagensa u odmjernu tikvicu od 100 ml i do oznake dopunjeno s destiliranom vodom. Otpipetirano je 0,2 ml uzorka uzorka određenog razrjeđenja, te dodano 1,8 ml destilirane vode, 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa te nakon stajanja 30 sekundi do 8 minuta dodano 8 ml 7,5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (ukupni volumen mora biti 20 ml). Za slijepu probu otpipetira se 2 ml destilirane vode u epruvetu, te doda 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 8 ml 7,5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Nakon stajanja u mračnom prostoru 2-20 sati, pri čemu dolazi do razvijanja boje, mjeri se apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm. Sadržaj polifenolnih spojeva je interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/L uzorka.

##### **Određivanje ukupnih flavonoida**

Određivanje ukupnih flavonoida učinjeno je prema metodi Kim, Jeong i Lee (2003.) s modifikacijom (Blasa i sur., 2005.). Za kalibraciju su uzete različite koncentracije kvercetina (5-114  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a linearnost je 0,9953 ( $R^2$ ). Postupak određivanja izvršen je na načinda je 1 ml otopine vina (1 mg/mL) pomiješan s 0,3 ml  $\text{NaNO}_2$  (5%), a nakon 5 min je dodano 0,3 ml  $\text{AlCl}_3$  (10%). Uzorci su pomiješani te su nakon 6 minuta neutralizirani s 2 ml otopine NaOH (1M). Apsorbancija je izmjerena za sve uzorke pri 510 nm, a kvantifikacija izvedena koristeći



kalibracijsku krivulju. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata kvercetina (QE) / 100 g vina, kao srednja vrijednost triju ponavljanja.

#### Određivanje sadržaja antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda. pH-diferencijalna metoda se zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra absorpcije. pH-diferencijalna metoda za određivanje antocijana omogućava brzo i točno mjerenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenta i drugih tvari koje bi mogle smetati.

Antocijani su određivani metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001.) s malom modifikacijom. Otpipetirano je 0,2 mL ekstrakta uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 1 mL pufera pH 1, a u drugu 1 mL pufera pH 4,5. Nakon stajanja od 15 min uzorcima je pomoću spektrofotometra mjerena absorpcija pri valnim duljinama od 508 nm i 700 nm. Sadržaj antocijana je izračunat prema slijedećoj formuli:

$$C \text{ (antocijana) (mg/kg)} = (A \times M \times FR \times 1000) / \epsilon \times l$$

gdje je:

A - absorpcija uzorka, a izračunava se prema izrazu:

$$A = (A_{508} - A_{700})_{pH 1} - (A_{508} - A_{700})_{pH 4,5}$$

M - 449,2

FR - faktor razrjeđenja

$\epsilon$  - molarna absorptivnost; 26 900

l - duljina kivete; 1 cm

(M i  $\epsilon$  su uzeti za dominantnu vrstu antocijana odnosno za cijanidin-3-glukozida).

#### Određivanje polimerne boje

Polimerna boja odnosno smanjenje intenziteta crvene boje ( $A_{508}$ ) i povećanje posmeđivanja ( $A_{420}$ ) se izračunava prema formuli:

Gustoća boje kontrolnog uzorka (tretiranog vodom):

$$\text{Gustoća boje} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{508} - A_{700})] \times \text{FR}$$

Boja nastala polimerizacijom (uzorak tretiran bisulfitom):

$$\text{Boja nastala polimerizacijom} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{508} - A_{700}) \times \text{FR}]$$

FR – faktor razrjeđenja

$$\% \text{ boje nastale polimerizacijom} = \text{boja nastala polimerizacijom} / \text{gustoća boje} \times 100$$

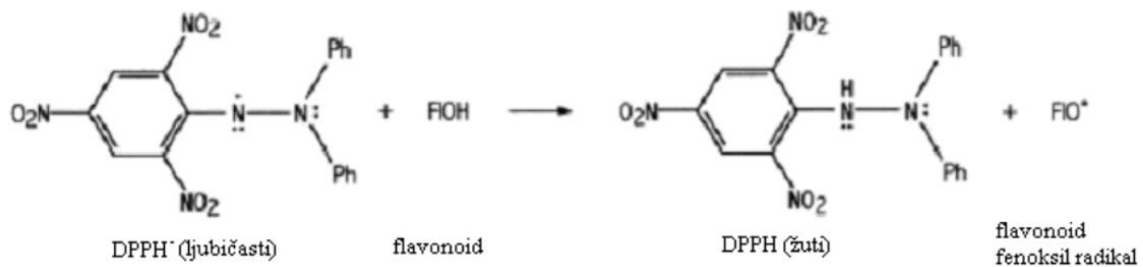
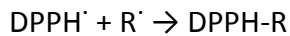
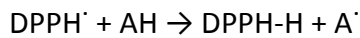
#### Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Glavni mehanizam djelovanja antioksidansa u hrani je uklanjanje radikala. Voće i povrće, kao jedna od važnijih komponenti uravnotežene prehrane, glavni su izvor antioksidanata potrebnih ljudskom organizmu.

Nekoliko metoda je razvijeno za određivanje antioksidacijske aktivnosti na osnovi uklanjanja sintetskih radikala u polarnom organskom otapalu (npr. metanolu) pri sobnoj temperaturi. One koje su najčešće, koriste 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i 2, 2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina) (ABTS) radikale.

Antioksidacijska aktivnost je određivana primjenom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) reagensa. Kod DPPH testa, uklanjanje DPPH radikala je praćeno smanjenjem absorbancije na 515 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa (AH) ili reakcije s radikalima ( $R\cdot$ ).

Prva reakcija s DPPH radikalima odvija se s nekom od fenolnih tvari, ali spora sekundarna reakcija može izazvati progresivno smanjenje absorbance, te se ravnotežno stanje ne može postići nekoliko sati.



**Slika 12.** Prikaz reakcije DPPH radikala s flavonoidima

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti primijenjena je metoda po Shimadu i sur. (1992.) s malim modifikacijama (Shimada i sur., 1992.). U kivetu je otpipetirano 0,2 mL uzorka, 2 mL metanola i 1 mL otopine DPPH. Reakcijska smjesa je ostavljena stajati 15 minuta te je absorbancija mjerena na spektrofotometru pri valnoj duljini od 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol.

Antioksidacijska aktivnost je izračunata prema sljedećem izrazu:

$$aa(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) * 100$$

gdje je:

$A_0$  – absorbancija slijepa probe

$A_1$  – absorbancija uzorka.

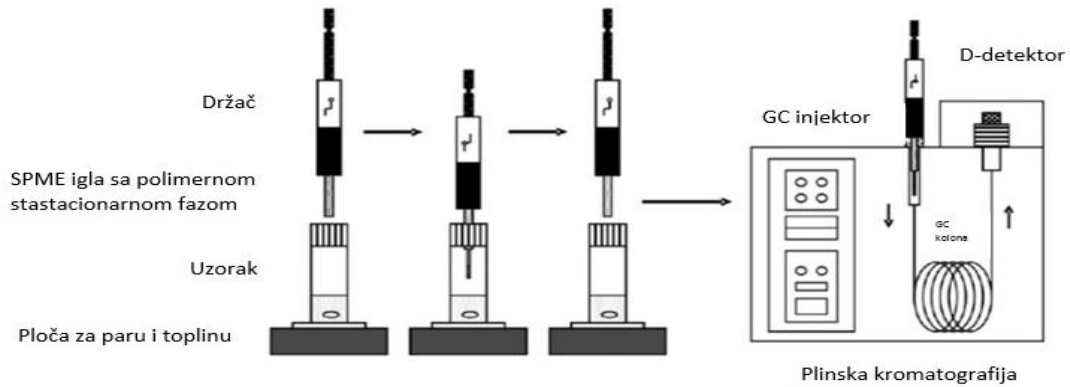
#### 3.2.4 ANALIZA AROME VINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM PRIMJENOM SPME ANALIZE

Priprema uzoraka za analizu:

Tehnika korištena prilikom pripreme uzorka je tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME) za koju je neophodna SPME aparatura. Osnova SPME aparature je igla unutar koje se na polimernu stacionarnu fazu adsorbiraju aromatični sastojci. U radu je za pripremu uzoraka korišteno punilo od polidimetilsiloksana-divinilbenzena (polimerna stacionarna faza) debljine 65  $\mu\text{m}$ .

Postupak pripreme uzorka:

U bočicu od 10 mL odvaže se 5 g uzorka vina. Kako bi adsorpcija aromatičnih sastojaka bila bolja dodaje se 1 g NaCl. U bočicu se ubaci magnet, te se hermetički zatvori teflonskim čepom. Bočica se postavi u vodenu kupelj, te se uz stalno miješanje uzorka magnetskom miješalicom, aromatični sastojci adsorbiraju na polimernu stacionarnu fazu unutar igle. Prije samog ispuštanja igle u nadprostor uzorka, uzorak se 5 minuta miješa na vodenoj kupelji (40 °C) radi zasićenja nadprostora sa svrhom što bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka. Adsorpcija se provodi na temperaturi od 40 °C (vodena kupelj) u trajanju od 45 minuta. Po završetku adsorpcije igla s adsorbiranim sastojcima odmah se stavlja u injektor plinskog kromatografa te slijedi njihova toplinska desorpcija (**Slika 13**). Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka vina od kupine provedeno je primjenom instrumentalne plinske kromatografije. U radu je korišten plinski kromatograf tvrtke Agilent 5890 B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5971A.



**Slika 13.** Korištenje SPME držača za uzorkovanje i analizu

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

Parametri ekstrakcije:

- Temperatura ekstrakcije: 40 °C
- Vrijeme ekstrakcije: 45 minuta
- Tip mikroekstrakcijske igle: 65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB (Supelco).

GC-MS analitički uvjeti:

Kolona: HP5; 60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (Agilent)

- Početna temperatura: 40 °C (2 minuta)
- Temperaturni gradijent: 6 °C/min

Plin nosač: helij (čistoće 5,0) s protokom 1 mL/min pri 40 °C

- Konačna temperatura: 230 °C
- Temperatura injektora: 250 °C
- Temperatura detektora: 280 °C
- Desorpcija uzorka u injektor: 7 min

U izradi kromatografske analize korišten je *splitless mode*.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

---

**Tablični prikaz rezultata****Tablica 2** Tvari boje u vinima od kupine

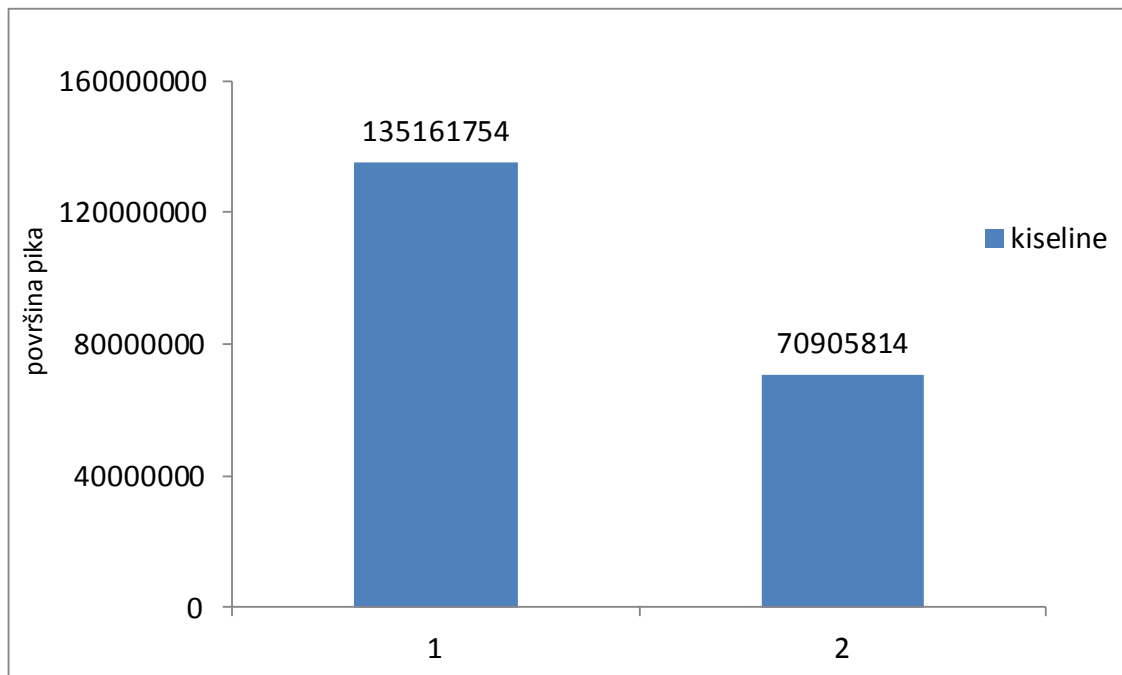
	Vino od kupine	
	1	2
Polifenoli (mg/L)	1480	1550
Flavonoidi (mg/L)	387	421
Antocijani (mg/L)	175,34	218
Polimerna boja (%)	29,46	22,02
Antioksidacijska aktivnost (mg/100g)	71,88	88,02

**Tablica 3** Aromatični sastojci identificirani u vinima od kupine

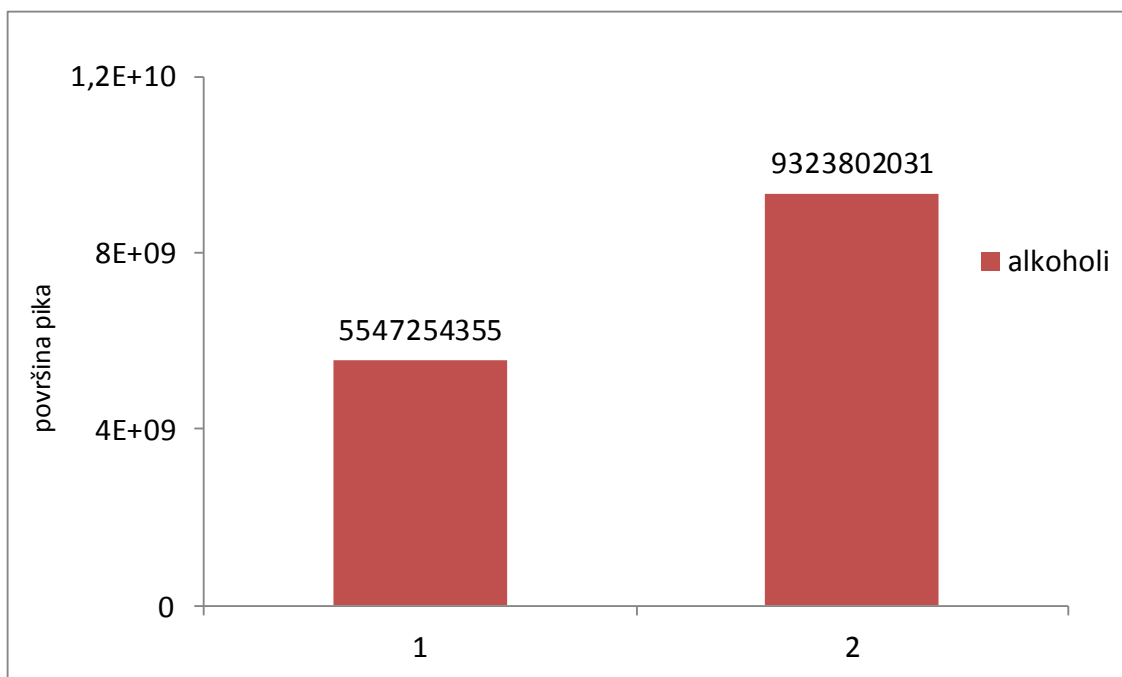
Sastojak	RT*
<b>Esteri</b>	
Etil acetat	1,38
Etil oktanoat	13,53
Fenetil acetat	15,96
Etil dekanooat	21,43
Etil dodekanoat	29,61
Etil heksanoat	43,37
Etil palmitat	43,38
Izopropil heksadekanoat	44,35
Etil linoleat	48,95
Etil oleat	49,23
<b>Kiseline</b>	
Kaprionska kiselina	12,17
Oktanska kiselina	12,48
Dekanska kiselina	20,58
<b>Alkoholi</b>	
1-butanol	1,49
1-pentanol	2,16
1-heksanol	2,20
Etanol	2,48
Izoamilalkohol	2,99
3-metil-2-butanol	8,08
Fenetil alkohol	10,21
<b>Terpeni</b>	
Linalool	8,81
$\alpha$ -dimetilstiren	9,36
$\alpha$ -terpinolen	13,01

RT\* (retencijsko vrijeme) – vrijeme zadržavanja aromatičnih sastojak (min)

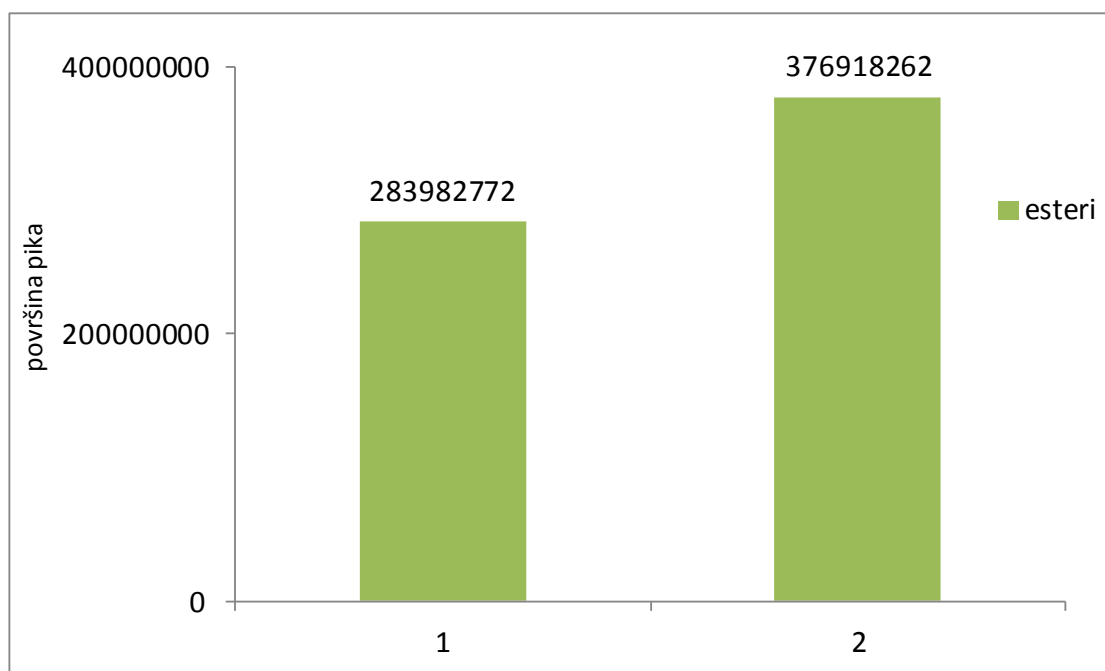




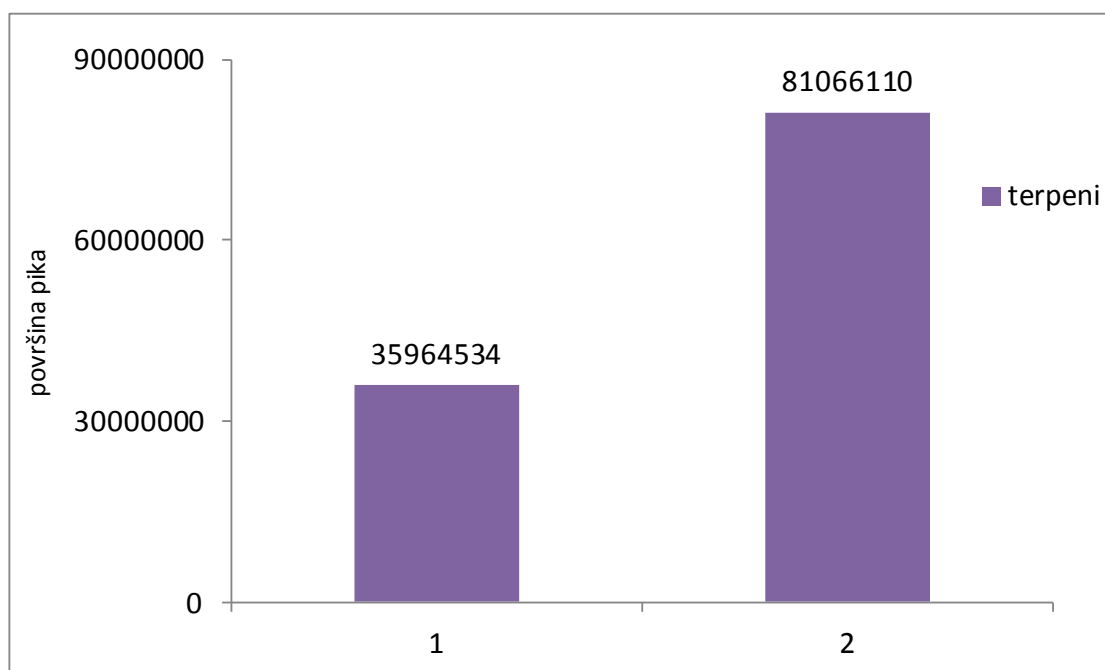
**Slika 14.** Zadržavanje kiselina u vinu od kupine bez dodatka enzima (1) i s dodatkom enzima pektinaze (2)



**Slika 15.** Zadržavanje alkohola u vinu od kupine bez dodatka enzima (1) i s dodatkom enzima pektinaze (2)



**Slika 16.** Zadržavanje estera u vinu od kupine bez dodatka enzima (1) i s dodatkom enzima pektinaze (2)



**Slika 17.** Zadržavanje terpena u vinu od kupine bez dodatka enzima (1) i s dodatkom enzima pektinaze (2)

### Rasprava

Rezultati istraživanja utjecaja dodatka enzima pektinaze na sadržaj tvari boje i arome u vinu od kupine prikazani su u **Tablicama 2 i 3** te na **Slikama 14, 15, 16 i 17**.

Enzimi su specifični kemijski spojevi koji ubrzavaju reakcije razgradnje točno određenih organskih spojeva u voću. Oni imaju važnu ulogu u dozrijevanju ploda, i uslijed njihovog djelovanja plod mekša tijekom tog razdoblja.

Enzimi u vinarstvu najčešće se koriste iz dva razloga. Prvi razlog je kvalitetnije i bolje taloženje mošta te bolji randman pri prešanju masulja. Drugi razlog je poboljšano izlučivanje tvari arome i boje iz kožice ploda.

Enzimi se svrstavaju u više skupina ovisno o tome koje vrste reakcija kataliziraju. Najzastupljeniji enzim koji se koristi u vinarstvu je pektinaza. Ona djeluje na razgradnju pektina. Pektin je tvar koja se pojavljuje u grožđu, ulazi u sastav stanične stijenke i uzrokuje „sluzavost“ u mesu bobice. Ovisno o vrsti, sorti, zdravstvenom stanju i zrelosti ploda, varira i količina pektina. Ranije ubran plod ima više pektina. Pektin je tvar koja uzrokuje veći viskozitet mošta i otežava njegovo taloženje. Nakon muljanja plodova, negativno nabijene molekule pektina tvore zaštitni omotač oko pozitivno nabijenih čestica koje uzrokuju mutnoću mošta. Time se sprječava povezivanje tih čestica u veće i njihovo taloženje u moštu. Dodatkom pektinaza razgrađuje se taj omotač i omogućava efikasno i brzo taloženje.

U **Tablici 2** prikazan je sadržaj polifenola, flavonoida, antocijana te antioksidacijska aktivnost ispitivanih vina od kupine.

Fenolne tvari imaju zaštitnu ulogu u organizmu jer uklanjaju slobodne radikale i tako umanjuju njihovo štetno djelovanje. Udio fenola u kupinovom vinu ovisi o svojstvima plodova kupina koje se koriste za proizvodnju istog kao i o načinu proizvodnje vina. Glavni fenolni spojevi većine kupinovitih vina su antocijani i tanini. Fenoli su važni za izgled i okus vina, a time i njegovu kakvoću. O njihovom sadržaju ovisi gorčina i trpkost vina. Na udio

fenolnih spojeva u plodu utječu sorta, područje uzgoja i klimatski čimbenici tijekom vegetacije.

Veća koncentracija polifenola nađena je u uzorku vina s dodatkom enzima pektinaze (2) u odnosu na vino bez dodatka enzima (1). Utjecaj procesnih parametara ogleda se u količini prisutnih polifenola u kupinovom vinu kao i u dodatku pektinaze.

Iz rezultata u **Tablici 2** vidljivo je da veći sadržaj flavonoida također posjeduje vino 2 u odnosu na vino 1. Veće vrijednosti flavonoida u vinu 2 vjerojatno su posljedica različitih interakcija između sastavnih komponenata koje ovise o sorti, načinu manipulacije sirovine te procesu proizvodnje vina.

Iz **Tablice 2** također je vidljivo da antioksidacijska aktivnost uzoraka slijedi trend porasta koncentracije flavonoida i polifenola, a da je % polimerne boje obrnuto proporcionalan u korist vina 2.

Aromu kupinovog vina čini niz spojeva različitih vrsta i koncentracija koji nastaju u plodovima kupina tijekom zrenja, a još više tijekom fermentacije i starenja. To su različiti esteri, viši alkoholi, masne kiseline, aldehidi, ketoni, terpeni i drugi spojevi. Kombinacija različitih tvari arome važna je za oblikovanje okusa i mirisa kupinovog vina. Većina aromatskih tvari se izgubi tijekom prerade iz svježih kupina, tako da se glavnina arome oblikuje tijekom fermentacije i prerade. Viša temperatura fermentacije će proizvesti više estere tijekom proizvodnje kupinovog vina. Aroma ima značajnu ulogu u kakvoći vina, a hlapive komponente odgovorne su za miris vina. Iz tog razloga jako je važno razumjeti doprinos svake komponente arome na kakvoću vina od kupine. Dobro poznavanje ključnih aromatičnih sastojaka može poboljšati tehnologiju prerade i konačnu kakvoću samog vina.

Kao što se može vidjeti u **Tablici 3**, u vinu od kupine identificirana su dvadeset i tri aromatična sastojka. Radi boljeg prikaza pojedinih identificiranih aromatičnih sastojaka, sastojci su podijeljeni u četiri skupine. To su kiseline, alkoholi, esteri i terpeni.

Kiseline potječu iz sirovine te nastaju alkoholnom fermentacijom. Na **Slici 14** prikazan je udio kiselina u vinima 1 i 2. U ispitivanim uzorcima vina identificirane su tri kiseline. Sve tri kiseline

nisu imale toliko velik utjecaj na ukupnu kvalitetu vina, ali su svakako imale važnu ulogu u složenosti sastava arome vina. Vino 1 imalo je veći sadržaj kiselina u odnosu na vino 2.

Alkoholi su aromatični spojevi koji nastaju kao sekundarni produkti metabolizma kvasca. U ispitivanim vinima identificirano je 7 alkohola. Iz **Slike 15** vidljivo je da je vino 2 imalo veći sadržaj alkohola u odnosu na vino 1. Etanol, nađen u vinima, doprinosi strukturi i teksturi vina, a viši alkoholi odgovorni su za aromu. Fenetil alkohol sudjeluje u stvaranju slatkastog okusa i mirisa ruže. Nastaje tijekom fermentacije šećera i to 1/4 procesom katabolizma šećera, a 3/4 degradacijom aminokiselina.

Esteri su glavni hlapivi sastojci koji daju voćni okus vina. Potječu manjim dijelom iz ploda kupine, a većim dijelom nastaju u procesu sekundarnog metabolizma kvasca tijekom alkoholne fermentacije. Esteri s bazom etanola i masnih kiselina kao oktanska, dekanska, dodekanska najviše doprinose stvaranju voćne i vinske arome. Na **slici 16** prikazan je udio estera u vinima 1 i 2. Vino 2 imalo je veći sadržaj estera u odnosu na vino 1.

Terpeni su kemijski spojevi karakteristični za aromatske sorte i glavni su nositelji primarnih ili sortnih aroma. Koncentracija tih sastojaka u vinu pored toga ovisna je još i o tehnološkom postupku prerade i njege vina, te većeg broja drugih čimbenika kao što su maceracija, ekstrakcija, hidroliza, oksidacija, uporaba bentonita i pektolitičkih enzima.

Sadržaj terpena u vinima 1 i 2 prikazan je na **Slici 17**. Vino 2 imalo je veći sadržaj terpena u usporedbi s vinom 1.

## **5. ZAKLJUČCI**

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

- Procesni parametri (temperatura i vrijeme), kao i tijekom alkoholne fermentacije utječu na tvari boje i arome vina od kupine.
- Dodatak enzima pektinaze također je imao pozitivan učinak na ekstrakciju tvari boje i arome u kupinovom vinu.
- Rezultati ispitivanja pokazali su da su vina proizvedena pri strogo kontroliranim uvjetima fermentacije, jer je zadržan veliki broj estera. Oni, kao izrazito lako hlapivi spojevi, u slučaju loše vođene fermentacije ishlape u procesu anaerobne fermentacije.
- Sadržaj ostalih tvari arome slijedi trend porasta sadržaja tvari boje. Vino 2 imalo je veći udio aromatičnih spojeva, ali je vidljivo da oba ispitivana vina imaju visok sadržaj navedenih tvari.
- Vina od kupine dobivena fermentacijom smrznutog ploda kupine pokazala su visoku antioksidacijsku aktivnost. To im daje ulogu zdravog pripravka u primarnoj prevenciji zdravlja ljudi jer pomaže u sprječavanju bolesti anemije, krvožilnog sustava i upalnih procesa u organizmu.

## **6. LITERATURA**



- Amidžić Klarić D: Utjecaj ekološkog uzgoja kupine na udio nutritivnih i biološki aktivnih sastavnica kupinovog vina. *Doktorski rad*. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2011.
- Arozarena I, Ortiz J, Hermosin-Gutierrez I, Urretavizcaya I, Salvatierra S, Cordova I, Remedios Marin-Arroyo M, Jose Noriega M, Navarro M: Color, Ellagitannins, Anthocyanins, and Antioxidant Activity of Andean Blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) Wines. *Journal of agricultural and food chemistry* 7463–7473, 2012.
- Boutboul A, Lenfant F, Giampaoli P, Feigenbaum A, Ducruet V: Use of inverse gas chromatography to determine thermodynamic parameters of aroma – starch indicators. *Journal of Chromatography A* 969: 9-16, 2002.
- Bautista-Orti A, Martinez-Cutillas A, Ros-Garcia M, Lopez-Roca J M, Gomez-Plaza E: Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology* 40, 867–878, 2005.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, P. M., Albertini, M.C., Piatti, E. (2005): Raw Mille fiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry* 97: 217-222.
- Brodarec A: *Tablice o sastavu i prehrambenosti vrijednosti namirnica i pića*. 3. izdanje, Zavod za zaštitu zdravlja Republike Hrvatske, Zagreb, 1976.
- Cerjan – Štefanović C, Drevenkar V, Jurišić B, Medić- Šarić M, Petrović M, Šegudović N, Švob V, Turina S: *Kromatografsko nazivlje*. HINUS i sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999.
- Cheynier V: Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81(Suppl): 223S-229S, 2005.
- Čović M: Utjecaj skladištenja na aromu pasta od maline s dodatkom šećera i hidrokoloida. *Diplomski rad*. Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, str. 5-32, 2010.
- Čupurdija E: *Kromatografija u analizi vode*. Prehrambeno- biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.
- Deur-Šiftar Đ: Chromatography. U *Nouvels Research Domine Composes of Macromolekulars*, Ceausecsu E (aut.), USA, 1973.

- Giusti MM, Wrolstad RE: Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. U *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. R.E. Wrolstad, S.J. Schwartz (ur.). John Wiley & Sons, Inc. New York, NY. Pogl. 1.2.1 – 1.2.13., 2001.
- Hui YH, Nip WK, Nollet LM, Paliyath G, Simpson BK: *Food biochemistry and food processing*. Blackwell publishing, Iowa, 2006.
- Kim, D. O., Jeong, S. W., Lee, C. Y., (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81: 321–326.
- Kopjar M: Aroma. *Nastavni materijali*, Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Kopjar M: Utjecaj dodatka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda. *Doktorski rad*. Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Landbo A; Meyer A: Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5, 503– 513, 2004.
- Lovrić T: *Procesi u prehrambenoj industriji*. Hinus, Zagreb, 2004.
- Mandić M, Nosić M: *Funkcionalna svojstva prehrambenih dodataka*. Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, 2009.
- Mandić M: *Znanost o prehrani: Hrana i prehrana u čuvanju zdravlja*. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Michelle H. Johnson and Elvira Gonzalez de Mejia: Comparison of Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Commercially Available Blueberry and Blackberry Wines in Illinois. *Journal of Food Science*, 2012.
- Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, *Pravilnik o voćnim vinima*, „Narodne novine“ br. 73/06, 24/11, 120/12, 59/13
- Mratinić, E: *Kupina*. Novi Beograd, 1998
- Ough CS, Amerine MA: *Phenolic Compounds. Methods for Analysis of Musts and Wines*. (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons Inc., str.196-221, 1988.
- Opačić, T: Tehnološki proces proizvodnje kupinovog vina. *Završni rad*, Prehrambeno – tehnološki fakultet u Osijeku, 2010.

Pichler A: Utjecaj dodataka i skladištenja na kvalitetu, reološka i termofizikalna svojstva paste od maline. *Doktorski rad*, Prehrambeno – tehnološki fakultet u Osijeku, 2011.

Pozderović A: *Tehnologija vina*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.

Shimada K, Fujikawa K, Yahara, Nakamura T: Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 945–948, 1992.

USDA, United States Department of Agriculture: *National Resources Conservation Service*, 2016. <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=RUBUS>, pristupljeno 1. 9. 2016

Vaclavik VA, Christian EW: *Essentials of food science*. Springer, New York, 2008.

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

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

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

Web 1: [http://gardeners.s3.amazonaws.com/p/FRBLA21041\\_3.jpg](http://gardeners.s3.amazonaws.com/p/FRBLA21041_3.jpg) [preuzeto 9.9.2016.]

Web 2: <http://dijetaplus.com/wp-content/uploads/2015/06/slatko-dzem-pekmez-kupina-recept.jpg> [preuzeto 9.9.2016.]

Web 3: <http://www.theotherandyhamilton.com/wp-content/uploads/2012/08/blackberry-wine.jpg> [preuzeto 9.9.2016.]

Web 4: [http://www.hah.hr/arhiva/index\\_potrosacki.php?id=368](http://www.hah.hr/arhiva/index_potrosacki.php?id=368) [preuzeto 11.9.2016.]

Web 5: <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/aromaticne-tvari-voca-i-povrca> [preuzeto 11.9.2016.]

Whitehurst RJ, Law BA: *Enzymes in food technology*. Sheffield academic press, Sheffield, 2002.

Willfort, R: *Ljekovito bilje i njegova upotreba*. Zagreb, Mladost, 1978.