

Optimizacija procesa proizvodnje i karakterizacija voćnog vina od jabuke

Radiković, Emili

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:401499>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



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

Emili Radiković

**OPTIMIZACIJA PROCESA PROIZVODNJE I KARAKTERIZACIJA
VOĆNOG VINA OD JABUKE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2022.

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

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Projektiranje uređaja u prehrambenoj industriji
Tema rada je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./22., održanoj 27. svibnja 2022. godine
Mentor: prof. dr. sc. *Darko Velić*
Komentor: izv. prof. dr. sc. *Ante Lončarić*
Pomoć pri izradi: *Ana-Marija Gotal Skoko*, mag. ing. techn. aliment.

Optimizacija procesa proizvodnje i karakterizacija voćnog vina od jabuke

Emili Radiković, 0113143714

Sažetak:

Cilj rada bio je istražiti utjecaj odabranih komercijalnih kvasaca roda *Saccharomyces* (Zymaflore® 011 BIO i X16 te Actiflore® RMS2) i ne-*Saccharomyces* vinskih kvasaca (*Torulasporea delbrueckii*, Zymaflore® ALPHA TD) na kinetiku fermentacije, fizikalno-kemijska svojstva, udio ukupnih polifenola i antocijana te antioksidativnu aktivnost u soku/vinu od jabuke iz ekološkog uzgoja. Praćenje kinetike fermentacije provedeno je u laboratorijskom mjerilu primjenom serija mikrofermentacijskih eksperimenata. Rezultati istraživanja pokazali su kako se odabrani vinski kvasci mogu uspješno primijeniti u proizvodnji voćnih vina od jabuke. Primjenom komercijalnog kvasca Zymaflore® X16 postignuta je najveća specifična brzina fermentacije. Kod koinokulacijskog eksperimenta sa *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* vinskim kvascima (X16 i ALPHA TD) uočena je slabija fermentacijska aktivnost, što je rezultiralo voćnim vinom s manjim sadržajem alkohola. Metabolizam odabranih kvasaca tijekom alkoholne fermentacije, utjecao je na smanjenje udjela ukupnih polifenola te samim time i na smanjenje antioksidativne aktivnosti, ali je, s druge strane, došlo do povećanja koncentracije antocijana u vinu od jabuke.

Ključne riječi: *vino od jabuke, alkoholna fermentacija, kinetika fermentacije, ukupni polifenoli*

Rad sadrži: 57 stranica
15 slika
3 tablice
2 priloga
41 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

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

| | | |
|----|---|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | predsjednik |
| 2. | prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i> | član-mentor |
| 3. | izv. prof. dr. sc. <i>Ante Lončarić</i> | član-komentor |
| 4. | doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 23. rujan 2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Graduate program: Food Engineering
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Food Process Equipment Design
Thesis subject: was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII. held on May 27, 2022.
Mentor: Darko Velić, PhD, Full professor
Co-mentor: Ante Lončarić, PhD, Associate professor
Technical assistance: Ana-Marija Gotal Skoko, mag. ing. techn. aliment.

Optimisation of Fermentation Process and Characterisation of Apple Fruit Wine

Emili Radiković, 0113143714

Summary:

The aim of the study was to investigate the influence of selected commercial *Saccharomyces* (Zymaflore® 011 BIO and X16 and Actiflore® RMS2) and non-*Saccharomyces* wine yeasts (*Torulaspora delbrueckii*, Zymaflore® ALPHA TD) on fermentation kinetics, physicochemical properties, total polyphenols and anthocyanins content, and antioxidant activity in apple juice/wine from organic cultivation. Monitoring of fermentation kinetics was carried out on a laboratory scale using a series of micro-fermentation experiments. The research results showed that selected wine yeasts can be successfully used for the production of apple fruit wines. The highest specific fermentation rate was achieved with the commercial yeast Zymaflore® X16. In the co-inoculation experiment with *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wine yeasts (X16 and ALPHA TD), slower fermentation activity was observed, resulting in fruit wine with lower alcohol content. During alcoholic fermentation, the metabolism of selected yeasts affected the reduction of total polyphenols and, consequently, the reduction of antioxidant activity, but on the other hand, there was an increase in the concentration of anthocyanins in apple fruit wine.

Key words: *apple wine, alcoholic fermentation, fermentation kinetics, total polyphenols*

Thesis contains: 57 pages
15 figures
3 tables
2 supplements
41 references

Original in: Croatian

Defense committee:

| | | |
|----|--|--------------|
| 1. | Natalija Velić, PhD, Full professor | chair person |
| 2. | Darko Velić, PhD, Full professor | supervisor |
| 3. | Ante Lončarić, PhD, Associate professor | member |
| 4. | Krunoslav Aladić, PhD, Assistant professor | stand-in |

Defense date: September 23, 2022

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

Najprije se zahvaljujem svom dragom profesoru i mentoru, prof. dr. sc. Darku Veliću na velikoj pomoći, ljubaznosti, motivaciji te svim savjetima, kako tijekom pisanja diplomskog rada, tako i tijekom svih godina studiranja. Također, veliko hvala asistentici Ana-Mariji Gotal Skoko na pomoći i dijeljenju znanja prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada. Hvala svim profesorima i djelatnicima Prehrambeno – tehnološkog fakulteta Osijek na prenesenom znanju i vještinama na putu do ove diplome.

Zahvaljujem se svojim tetama, sestričnima i rodbini te prijateljima na vjeri i velikoj potpori tijekom studiranja.

Hvala mom dečku na razumijevanju, pruženoj ljubavi i ogromnoj podršci.

Posebno se zahvaljujem svojem bratu, na pravim savjetima i vodstvu kroz cijelo školovanje.

Na kraju, najveće od svih hvala ide mojim roditeljima, mami i tati, koji su vjerovali u mene, trudili se razumijeti me, pružili mi sve što sam ikada trebala, a najviše ljubav i podršku. Ovaj rad posvećujem njima.

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 4 |
| 2.1. VOĆNA VINA | 5 |
| 2.1.1. Podjela voćnih vina | 7 |
| 2.2. JABUKA | 8 |
| 2.2.1. Kemijski sastav jabuke | 10 |
| 2.2.2. Jabučno vino i cider | 11 |
| 2.3. STARTER KULTURE | 13 |
| 2.4. PROIZVODNJA VOĆNOG VINA OD JABUKE | 15 |
| 2.4.1. Priprema jabuke za preradu | 16 |
| 2.4.2. Usitnjavanje i prešanje jabuka | 16 |
| 2.4.3. Priprema mošta | 17 |
| 2.4.4. Alkoholna fermentacija | 17 |
| 2.4.5. Jabučno-mliječna fermentacija | 19 |
| 2.4.6. Pretok vina s taloga, bistrenje i filtracija | 20 |
| 2.4.7. Odležavanje voćnih vina | 20 |
| 2.4.8. Punjenje boca | 21 |
| 2.5. KEMIJSKI SASTAV VOĆNOG VINA | 21 |
| 2.5.1. Alkoholi | 21 |
| 2.5.2. Šećeri | 22 |
| 2.5.3. Organske kiseline | 22 |
| 2.5.4. Hlapljivi (aromatski) spojevi | 23 |
| 2.5.5. Vitamini i minerali | 23 |
| 2.5.6. Polifenolni spojevi i antioksidativna aktivnost | 24 |
| 2.6. FIZIKALNO-KEMIJSKI POKAZATELJI KAKVOĆE VOĆNIH VINA | 26 |
| 2.6.1. Relativna gustoća | 26 |
| 2.6.2. Alkoholna jakost | 26 |
| 2.6.3. Ukupni suhi ekstrakt | 27 |
| 2.6.4. Reducirajući šećeri | 27 |
| 2.6.5. Pepeo | 27 |
| 2.6.6. Ukupna kiselost | 28 |
| 2.6.7. Hlapiva kiselost | 28 |
| 2.6.8. pH vrijednost | 28 |
| 2.6.9. Ukupni i slobodni SO ₂ | 28 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 30 |
| 3.1. ZADATAK | 31 |
| 3.2. MATERIJALI | 31 |
| 3.3. OPREMA | 32 |
| 3.4. METODE | 33 |
| 3.4.1. Proces proizvodnje vina od jabuke u laboratorijskom mjerilu | 33 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.4.2. | Praćenje fermentacijske aktivnosti kvasca – određivanje mase CO ₂ oslobođenog tijekom mikrofermentacija | 36 |
| 3.4.3. | Određivanje refraktometrijske vrijednosti | 37 |
| 3.4.4. | Određivanje ukupnih polifenola | 38 |
| 3.4.5. | Antioksidacijska aktivnost DPPH metoda | 38 |
| 3.4.6. | Spektrofotometrijsko određivanje antocijana | 39 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA..... | 40 |
| 4.1. | UTJECAJ DODATKA <i>SACCHAROMYCES</i> I <i>NE-SACCHAROMYCES</i> VINSKIH KVASACA NA KINETIKU FERMENTACIJE..... | 41 |
| 4.2. | UDIO UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST VINA OD JABUKE | 44 |
| 4.3. | SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ANTOCIJANA..... | 47 |
| 4.4. | FIZIKALNO-KEMIJSKI POKAZATELJI KAKVOĆE VOĆNOG VINA OD JABUKE..... | 48 |
| 5. | ZAKLJUČCI | 49 |
| 6. | LITERATURA | 51 |
| 7. | PRILOZI..... | 56 |

Popis oznaka, kratica i simbola

| | |
|-------|--|
| AICV | European Cider and Fruit Wine Association |
| MP | Ministarstvo poljoprivrede |
| MPŠ | Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva |
| MPŠVG | Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva |
| °Bx | stupnjevi Brix-a |
| AF | alkoholna fermentacija |
| BMK | bakterije mliječne kiseline |
| MF | malolaktička fermentacija |
| DPPH | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil |
| v/v | volumni udio (engl. <i>volume per volume</i>) |
| TE | ekvivalent trolox kiseline |

1. UVOD

Prema Pravilniku o vinarstvu, voćno vino je prehrambeni proizvod dobiven alkoholnim vrenjem soka ili pulpe svježeg i za to pripremljenog koštičavog, jezgričavog, jagodičastog, bobičastog ili ostalog voća, isključujući vinsko i stolno grožđe, a koji ima sadržaj prirodnog alkohola od najmanje 1,2 % do najviše 18 % vol. (MP, 2022).

Kod proizvodnje voćnih vina, prvo se dobije sok (mošt) od željenog voća, koji zatim odlazi na fermentaciju (vrenje). Fermentaciju obavljaju kvasci, a dobiveno mlado vino, osim u spremnicima od nehrđajućeg čelika, može dozrijevati i u drvenim bačvama, kako bi se poboljšao okus i kvaliteta samog vina. Tipično vino sadrži etanol, šećer, kiseline, više alkohole, tanine, aldehide, estere, minerale, vitamine, antocijane i aromatične spojeve. Voćna vina, budući da su na bazi voća, fermentirana i nisu destilirana, zadržavaju većinu hranjivih tvari prisutnih u izvornom voćnom soku (Kosseva i sur., 2017). Najčešće upotrebljavano voće za proizvodnju voćnih vina u svijetu uključuje kupine, jagode, jabuke, marelice, kruške, šljive, breskve, trešnje, naranče, datulje, smokve, dok su tri najpopularnija voćna vina u Hrvatskoj kupinovo vino (proizvedeno od bobičastog voća), vino od višnje te vino od jabuke (Velić i sur., 2018a).

Velić i sur. (2018a) navode kako voćna vina obiluju antioksidansima, fitonutrijentima i mineralima te se smatraju funkcionalnom hranom koja može pomoći u očuvanju zdravlja i smanjenju rizika od mnogih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, moždani udar, hipertenzija, dijabetes, bubrežni kamenci i dr.

Na temelju zadržavanja i udjela ugljikovog dioksida, voćna vina mogu se podijeliti na mirna i pjenušava, dok im je dopuštena alkoholna jakost između 1,2 % i 14 % vol. (Kosseva i sur., 2017).

Sam tehnološki proces proizvodnje voćnih vina ne razlikuje se mnogo od tehnologije proizvodnje vina od grožđa (Tomić i sur., 2021). Tako proizvodnja voćnog vina uključuje osnovne operacije poput muljanja ploda, prešanja, maceracije (predfermentacije), fermentacije, stabilizacije, zrenja, odležavanja, filtracije i punjenja u ambalažu (Vine i sur., 1997). Uz to, postoje određene varijacije, koje se temelje na korištenom voću, a koje obično uključuju korekciju sadržaja šećera ili ukupne kiselosti voćnog soka za proizvodnju vina (Velić i sur., 2018a).

Poznati su različiti čimbenici o kojima ovise sastav i kvaliteta voćnog vina, a uključuju utjecaj okoliša (klima i tlo), utjecaj sorte, primarnu preradu voća, stupanj zrelosti plodova te uvjete fermentacije (pH, temperatura, soj kvasca). Da bi se proizvelo kvalitetno vino, važno je provođenje kontrolirane alkoholne fermentacije koja uključuje primjenu sojeva kvasaca poželjnih svojstava pa tako kod odabira samog kvasca, potrebno je razmotriti njihove enološke, tehnološke i kvalitativne karakteristike, budući da različiti sojevi kvasaca mogu svojim metabolizmom uvelike utjecati na senzorska svojstva vina (Tomić i sur., 2021).

Obzirom da su znanstvena istraživanja voćnih vina u Hrvatskoj prilično rijetka, cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj odabranih *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* vinskih kvasaca na kinetiku fermentacije, odrediti fizikalno-kemijska svojstva, udio ukupnih polifenola i antocijana te antioksidativnu aktivnost u soku/vinu od jabuke sorte Florina iz ekološkog uzgoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. VOĆNA VINA

Voćna vina se proizvode fermentacijom mošta koji se dobije prešanjem raznih vrsta voća kao što su jabuke, kruške, trešnje, višnje, ribiz, kupine, maline, itd. Samljevene jabuke, kruške ili drugi plodovi voća se najprije moraju prešati da se dobije sok (mošt), koji zatim ide na fermentaciju (vrenje). Za fermentaciju se najčešće koriste selekcionirani kvasci koji dobro funkcioniraju i na nižim temperaturama (Jemrić i sur., 2008). Različita voćna vina pokazala su se izvrsnim prehrambenim izvorom minerala, antioksidansa i fitonutrijenata, npr. karotenoida (karoten i lutein), fenolnih spojeva (antocijani, flavonoli, flavan-3-oli, proantocijanidini, elagitanini i fenolne kiseline) (Velić i sur., 2018b).

Vine i sur. (1997) navode kako je jedna od prednosti proizvodnje vina od jabučastog i bobičastog voća ta što mnoge vrste sazrijevaju tijekom proljetnih i ljetnih mjeseci, puno prije početka sezone berbe grožđa, što omogućuje veću učinkovitost i raznolikost u vinariji. Isto tako, mogućnost dodavanja različitih vrsta vina u portfelj proizvoda, privlači mnoge vinare.

Povećanje proizvodnje voćnih vina od "domaće" male proizvodnje do industrijske proizvodnje, odvija se mnogo sporije u usporedbi s proizvodnjom vina od grožđa (Velić i sur., 2018b). Ipak, interes za ovakve proizvode raste pa je 1968. godine osnovano Europsko udruženje cidera i voćnih vina (engl. *European Cider and Fruit Wine Association*) (AICV). AICV predstavlja proizvođače cidera i voćnih vina iz sljedećih europskih zemalja: Belgija, Danska, Finska, Francuska, Njemačka, Irska, Luksemburg, Poljska, Španjolska, Švedska, Nizozemska i UK. Članovi AICV-a predstavljaju sve glavne proizvođače cidera, uključujući Heineken, Carlsberg i C&C, što zajedno čini više od 80 % svih cidera prodanih diljem Europe, a obveza članova je proizvoditi cidere i voćna vina od fermentiranog voćnog soka. To se očituje u AICV Kodeksu prakse koji propisuje da voćna vina nastaju fermentacijom sokova voća, osim grožđa te da se cider i perry proizvode fermentacijom sokova jabuka i krušaka, odnosno bez dodatka destiliranog alkohola (AICV, 2021). Isto tako, Velić i sur. (2018b) ustvrdili su da je posljednjih godina povećana proizvodnja i potrošnja voćnih vina (osobito kupinovog vina) i u Hrvatskoj. Međutim, velika većina proizvođača su mala obiteljska gospodarstva koja ne uspijevaju osigurati potrebne količine za rastuće tržište. Stoga, voćna vina su još uvijek komercijalno nedovoljno zastupljena.

Vina napravljena od jabučastog i bobičastog voća nude mnogo veću paletu mirisa i okusa od vina od grožđa te će varirati u boji, okusu i profilu kiselosti, ovisno o tlu i klimi regije u kojoj

se uzgajaju i metodama hortikulture koje se implementiraju u voćnjacima. Dakle, s jednakim oprezom treba pristupati pri odabiru sorti voća kako bi se postigli vrhunski rezultati vina. Iako su opće metodologije uglavnom iste kao i za moštove od grožđa, treba izuzetno paziti pri primjeni tlaka na fermentirano bobičasto i jabučasto voće, jer čak i umjereni pritisci mogu izvući vrlo opore i gorke fenole iz koštica, pulpe, sjemenki i kože (Vine i sur., 1997). Početna temperatura fermentacije ne bi trebala ići ispod 18 °C pa je potrebno voditi računa o tome da se vrenje ne odvija ni prebrzo ni presporo. Optimalna temperatura ovisi u mnogome o odabranim kvascima koje primjenjujemo. Općenito, uz pomoć hlađenja ili grijanja, temperaturu je potrebno držati na oko 20 °C (Kolb i sur., 2007). Iako postoje iznimke, većina voćnog vina prilično je kratkog vijeka u usporedbi s vinima od crnog grožđa, stoga se ne preporučuju dugotrajni režimi odležavanja u bocama i drvenim bačvama (Vine i sur., 1997).

Odabir voća bitan je korak u proizvodnji, jer su aroma i okus voćnog vina najviše njima određeni. Voće bi trebalo imati viši sadržaj šećera, a slabu kiselost koja se korigira po potrebi. Ukoliko voće ne sadrži dovoljno prirodnog šećera, šećer se može dodati u mošt kako bi se ubrzalo vrenje (Velić i sur., 2018b).

Prema Pravilniku o vinarstvu (NN 81/22), voćno vino koje se stavlja na tržište mora imati:

- odgovarajuća organoleptička svojstva koja moraju zadovoljavati uvjete u pogledu izgleda (boje i bistroće), mirisa i okusa,
- ukupnu kiselost najmanje 3,5 g/L izražene kao jabučna kiselina,
- hlapljive kiseline najviše 1,5 g/L izražene kao octena kiselina,
- ekstrakta bez šećera najmanje 15 g/L,
- ukupni sumporov dioksid najviše 200 mg/L,
- slobodni sumporov dioksid najviše 30 mg/L te
- pepeo najmanje 1 g/L.

2.1.1. Podjela voćnih vina

Voće koje se koristi za proizvodnju voćnih vina u različitim dijelovima svijeta uključuje: jabuke, bobičasto voće, trešnje, divlje marelice, kruške, kivi, šljive, breskve, jagode, ribiz, banane, ananas, indijski orah, šipak, limun, mandarine, naranče, datulje i smokve. Slično kao kod vina od grožđa, postoje različite vrste voćnih vina ovisno o načinu pripreme, sa ili bez destilacije; korištenoj sirovini; i praksi vinifikacije (Kosseva i sur., 2017). Većina voćnih vina spada u skupinu tzv. mirnih vina jer ne zadržavaju ugljikov dioksid proizveden tijekom fermentacije. S druge strane, postoje pjenušava vina koja sadrže znatnu količinu ugljikovog dioksida. Cideri od jabuke i kruške najčešći su predstavnici pjenušavih voćnih vina. S obzirom na udio alkohola u vinu, vina se mogu kategorizirati kao stolna ili desertna vina. Stolna vina mogu sadržavati minimum od 7 % alkohola, ali obično se raspon kreće od 11 % do 16 %. Desertna vina općenito su vrlo slatka, s udjelom alkohola u rasponu od 16 % do 23 % (Velić i sur., 2018b).

Pravilnikom o vinarstvu, definirani su sljedeći tehnički zahtjevi i fizikalno-kemijska svojstva voćnih vina u odnosu na kategorije voćnih vina:

- *likersko voćno vino* je voćno vino kojem je dodan alkohol voćnog podrijetla i/ili voćna rakija, voćni sok i/ili koncentrirani sok čija je stvarna alkoholna jakost od najmanje 13 % vol., a ukupna alkoholna jakost ne više od 22 % vol.,
- *aromatizirano voćno vino* je prehrambeni proizvod dobiven od voćnog vina kojem je dodan voćni sok, koncentrirani voćni sok, alkohol voćnog podrijetla, voćna rakija i šećer (saharoza), pri čemu udio temeljnog vina mora iznositi najmanje 75 % vol. i u čijoj se proizvodnji koriste prirodne arome, prirodni aromatski pripravci kao i aromatične biljke i njihovi plodovi te je dopuštena uporaba aditiva i pomoćnih sredstava u skladu s posebnim propisima, a čija je stvarna alkoholna jakost najmanje 13 % vol., a ukupna alkoholna jakost ne više od 22 % vol.,
- *biser voćno vino* je voćno vino čija je stvarna alkoholna jakost najmanje 5 % vol., a u zatvorenim posudama ima tlak otopljenog ugljikovog dioksida 1,0 – 2,5 bara pri temperaturi od 20 °C,

- *pjenušavo voćno vino* je voćno vino koje je dobiveno vrenjem od voćnog soka ili sekundarnom vrenjem od voćnog vina koje, kada se otvori posuda, otpušta ugljikov dioksid koji potječe isključivo od vrenja i ima tlak od najmanje 3,0 bara kao posljedicu otapanja ugljikovog dioksida pri temperaturi zatvorene posude od 20 °C,
- *razblaženo voćno vino* je voćno vino kojem je dopušteno dodavanje aroma i bojila u skladu s posebnim propisima te je dobiveno razrjeđivanjem koncentriranog voćnog vina pri čemu ugljikov dioksid koji je sadržan u proizvodu ne mora u potpunosti potjecati od vrenja, a čija je stvarna alkoholna jakost 4 – 6 % vol. (MP, 2022).

2.2. JABUKA

Najrasprostranjenija vrsta voćaka u svijetu je upravo jabuka, biljna vrsta roda *Malus*, iz porodica ruža (*Rosaceae*). Kako se dobro prilagođava različitim ekološkim uvjetima, uzgoj jabuke je proširen na sve kontinente, a u svjetskoj proizvodnji zauzima mjesto iza banana i agruma. Pogodna je i za preradu pa neke od prerađevina koje se dobivaju su: sok, sirup, jabukovača, rakija, kompot, marmelada, džem, osušene jabuke, ocat, jabučna kiselina, pektin itd. (Miljković, 2021).

Jabuka se proširila po svijetu iz područja koje se prostire od Male Azije, preko Kavkaza do Središnje Azije, Himalajskog područja Indije i Pakistana i zapadne Kine. Na ovom velikom području raste čak 25 vrsta iz roda *Malus* (Jemrić i sur., 2008). Prema tome, najveći proizvođači jabuka se nalaze upravo u Aziji, a to su Kina, Turska, Iran i Indija, s time da je Kina najveći proizvođač u svijetu. Na području Europe najviše jabuka proizvode Italija, Francuska i Njemačka (Miljković, 2021).

Smatra se da je ključnu ulogu u širenju vrsta u nova područja imala vrsta *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem koja se odlikuje velikom raznolikošću u veličini plodova, zajedno s vrstama *Malus sylvestris* (L.) Mill. i *Malus baccata* (L.) Borkh. što je dovelo do nastanka jabuke na ovim prostorima danas (Jemrić i sur., 2008). Rod *Malus* obuhvaća 33 vrste jabuka od kojih samo neke po biološkim osobinama imaju određena poljoprivredna, odnosno gospodarska značenja. Sorta Florina (Querina) na **Slici 1** je najvažnija sorta iz skupine sorti otpornih prema čađavoj krastavosti, kako sa stajališta kvalitete ploda, također i s obzirom na rodnost i vrijeme zrenja. Preporučuje se za uzgoj samo u sjevernim područjima, gdje plodovi postižu intenzivniju i atraktivniju boju. Razvija bujna stabla uspravnog rasta, cvate kasno, a intenzitet

cvatnje je srednji. Rodnost joj je srednja do visoka. Plod joj je srednje veličine do srednje velik, promjenjiva oblika kratkog stošca do okruglast, asimetričan s lagano naznačenim rebrima na poprečnom presjeku. Kožica je srednje debela, žutozelene boje, a dopunska boja je svjetlucava, ali dva puta manje intenzivna na sredini ploda. Površina kožice je glatka, pomalo voštana, s hrđastim zrakama u udubljenju peteljke. Meso joj je bijelo-krem fine teksture, dosta konzistentno, sočno, srednje slatko-kiselkasto, lagano aromatično, ugodnog okusa. Berba ove sorte odvija se krajem rujna ili početkom listopada (Miljković, 2021).



Slika 1 Jabuka sorte Florina iz ekološkog uzgoja (Izvor: Autor)

Uspoređujući konvencionalni i ekološki uzgoj voća s obzirom na sigurnost hrane, ekološki uzgojeno voće pokazuje neke jasne prednosti, jer sadrži manje toksikanata poput pesticida, mikotoksina i nitrata. Također, prema dostupnoj literaturi, voće iz ekološkog uzgoja može sadržavati veći udio fenolnih spojeva (Velić i sur., 2018b).

Svaka sorta jabuke pogodna je za dobivanje jabučnoga vina, ali pojedine sorte daju nešto bolje rezultate. Ono što je važno kod sorte jabuke za proizvodnju jabučnoga vina je omjer šećera i kiselina, trpkost (astringencija), aroma i okus. Osim sadržaja alkohola, posebnu ulogu u očuvanju i senzoričkim svojstvima jabučnoga vina ima i kiselina. Za proizvodnju jabučnih vina poželjno je koristiti sorte jabuka bogate organskim kiselinama, a one se mogu podijeliti na četiri skupine, ovisno o količini tanina i kiselina što prikazuje **Tablica 1** (Jemrić i sur., 2008).

Tablica 1 Podjela sorti jabuka za proizvodnju vina prema udjelu kiselina i tanina u soku (Jemrić i sur., 2008)

| Skupina sorti | Količina kiselina (g/100 mL soka) | Količina tanina (g/100 mL soka) |
|---------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| Slatke | < 0,45 | < 0,2 |
| Gorko-slatke | < 0,45 | > 0,2 |
| Kisele | > 0,45 | < 0,2 |
| Gorko-kisele | > 0,45 | > 0,2 |

Jemrić i sur. (2008) navode kako se slatke sorte jabuke najčešće koriste za kupažiranje s aromatičnim sortama kako bi se ublažila aroma. Gorko-slatke sorte imaju mali udio kiselina, no viši udio tanina što im daje karakterističnu trpkost, a čiji intenzitet može varirati. S druge strane, sorte s visokim sadržajem organskih kiselina služe kao baza cideru u koji se dodaje do 10 % cidera pripremljenog od sorti s povećanim udjelom tanina. Sorte namijenjene proizvodnji jabučnoga vina značajno se razlikuju od jabuka za konzumaciju u svježem stanju, jer imaju grublji i trpki okus zbog povišenog sadržaja tanina. Takve sorte gube manje arome tijekom fermentacije od stolnih sorti. Također, i pojedine stolne sorte su prikladne za proizvodnju vina od jabuka, a rezultati istraživanja su pokazali kako se među njima ističu sorte Idared, Fuji, Gala i Granny Smith. Kod jabuka ili npr. trešanja, poželjnije je za proizvodnju vina koristiti pomalo prezrele plodove voća (Velić i sur., 2018b).

2.2.1. Kemijski sastav jabuke

Kemijski sastav jabuka varira ovisno o sorti i hortikulturnoj praksi, a poznavanjem sastava različitih sorti, posebice šećera, organskih kiselina, dušičnih spojeva i polifenola, prati se napredovanje fermentacije i organoleptička svojstva proizvedenog vina (Wicklund i sur., 2021). Glavni sastojci ploda jabuke čine voda i ugljikohidrati (šećeri, škrob, pektini, celuloza, hemiceluloza, organske kiseline, tanini), a oni u manjim količinama su proteini, lipidi, vitamini, minerali, fenolni i aromatski spojevi. Energetska vrijednost jabuke je mala, pa tako 100 grama svježeg ploda iznosi oko 58 kcal. Hranjivi sastojci otopljeni u vodi su šećeri,

organske kiseline, pektini, minerali, pojedini vitamini, aromatične i fenolne komponente (Miljković, 2021). Važnu skupinu kemijskih spojeva u jabuci zauzimaju bioaktivne tvari, posebice polifenoli, točnije flavonoidi. Polifenoli su od važnosti za okus i aromu, kako u jabukama, tako i u prerađevinama, a uključuju flavonole (uglavnom kvercetin glikozide), flavan-3-ole (katehine i procijanidine), klorogensku kiselinu, katehin, epikatehin, kumarnu kiselinu, antocijane i druge. Udio fenolnih komponenti ovisi o sorti, klimatskim uvjetima i uvjetima skladištenja nakon berbe (Wicklund i sur., 2021). Mendoza-Wilson i sur. (2016) tvrde kako su najzastupljeniji proantocijanidini koji se nalaze u kori, a imaju pozitivne učinke na zdravlje ljudi zbog antioksidativnih svojstava.

Zelena boja dolazi od klorofila a i klorofila b, crvena od cijanina, dok je za žuto-narančastu boju zaslužan ksantin. Kod svježih zrelih jabuka, udio ukupnih ugljikohidrata iznosi oko 15 %, od čega na šećere otpada oko 10 – 13 %, na vlakna (celuloza, hemiceluloza, lignin, pektini, pentozani) oko 2 %, a količina organskih kiselina (jabučna, limunska, askorbinska) iznosi 2 – 8 g/L. Udio fruktoze iznosi 5 – 9 %, glukoze 0,4 – 6 %, dok saharoze ima u udjelu od 0,6 – 6 %. Od ostalih šećera još su zastupljena galaktoza, monoza i maltoza. Proteina jabuke sadrže od 0,2 do 0,6 % (Miljković, 2021). Sadržaj dušika u jabukama ovisi o kvaliteti tla te o vrsti gnojiva, a dolazi u obliku aminokiselina od kojih su najzastupljeniji asparagin, asparaginska kiselina i glutaminska kiselina (Wicklund i sur., 2021). Miljković (2021) navodi da aminokiselina ima više u kožici ploda, nego u mesu. Lipidi dolaze u vrlo malim količinama, uglavnom u obliku kutinsko-voštane prevlake na kožici ploda, odnosno kutikule. Sjemenke sadrže 18 – 24 % ulja, koje kao važna rezerva osigurava klijanje i razvitak embrija jabuke. Od vitamina, ustanovljeno je da plodovi jabuke sadrže: vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin B1 (tiamin), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B3 (niacinamid), vitamin B5 (pantotenska kiselina), vitamin B6 (piridoksin), vitamin B12 (kobalamin), vitamin A, vitamin H (biotin), vitamin E (tokoferol). Ovisno o sorti, jabuka sadrži 0,2 - 0,7 % minerala (kalij, fosfor, magnezij, željezo, mangan, cink, bakar). Aromatski profil jabuke čine esteri, alkoholi, aldehidi, ketoni, kiseline, jednostavni šećeri, hlapljive tvari (olefin i etilen) (Miljković, 2021).

2.2.2. Jabučno vino i cider

Jabučno je vino fermentirano piće od svježeg ili koncentriranog soka jabuke. Ima dugu tradiciju u Europi i zauzelo je važno mjesto u globalnoj industriji voćnih vina (Wang i sur.,

2004). Kosseva i sur. (2017) navode kako se proces fermentacije soka od jabuke koji se koristi za dobivanje ugodnog alkoholnog pića prakticira u istočnom Sredozemlju više od 2000 godina. Najveći proizvođači jabučnog vina su Velika Britanija, Francuska, Irska, Španjolska, Njemačka i Švicarska. Od ostalih zemalja tu su Australija, Austrija, Belgija, Kanada, Kina, Novi Zeland. Čak 45 % ukupne proizvodnje jabuka u Velikoj Britaniji, namijenjeno je proizvodnji jabučnog vina (Jemrić i sur., 2008). Vine i sur. (1997) tvrde kako najbolja vina od jabuke imaju gotovo bezbojnu nijansu s velikom bistrinom, laganu aromu, a ravnotežom šećera i kiseline se postiže umjerena trpkost.

Razlika između vina od jabuke i cidera je ta što je udio alkohola u vinu veći od udjela alkohola u cideru pa je potrebno dodati izvor šećera (Kosseva i sur., 2017).

Prema Europskom udruženju cidera i voćnih vina (AICV, 2021) cider je alkoholno piće koje se dobiva isključivo potpunom ili djelomičnom fermentacijom:

- soka od svježih jabuka,
- rekonstituiranog soka koncentrata od soka jabuke ili
- mješavinom soka od svježe jabuke i rekonstituiranog soka koncentrata od soka jabuke.

Udio alkohola koji se nalazi u cideru kreće se u rasponu od 1,2 % do manje od 8,5 % vol., a zabranjeno je dodavanje destiliranog alkohola. Postoje i cidere sa smanjenim udjelom alkohola na tržištu i klasificirani su kao:

- cider bez alkohola (ili bezalkoholni cider), ukoliko je udio alkohola manji od 0,5 % vol.,
- cider s niskim postotkom alkohola, ukoliko ima više od 0,5 % vol. i manje od 1,2 % vol. (AICV, 2021).

U Sjevernoj se Americi riječ „cider“ odnosi na mutni nepasterizirani jabučni sok, dok pojam „hard cider“ podrazumijeva fermentirani proizvod od jabuke. Po organoleptičkim svojstvima cidere se uvelike razlikuju zavisno do sirovine, sorte jabuke koja se koristi te tehnoloških postupaka proizvodnje. Jabučna vina obično su proizvedena kupažiranjem vina pojedinih sorata jabuka, najčešće tradicionalno vezanih uz pojedino uzgojno područje, s time da odnos i zastupljenost pojedinih sorata te način prerade ovisi isključivo o samom proizvođaču (Jemrić i sur., 2008). Globalno gledajući, jabučno vino jest popularno, s različitim imenima

kao što su cidre (Francuska), sidre (Italija), sidra (Španjolska) i applewein u Njemačkoj i Švicarskoj (Kosseva i sur., 2017).

Francuska je najveća svjetska zemlja koja proizvodi cider, a sustižu je Ujedinjeno Kraljevstvo i SAD. Prema udjelu alkohola, cider se označava kao „soft cider“ (1 – 5 %) ili „hard cider“ (6 – 7 %). Isto tako, može se klasificirati kao „vintage cider“ ili bijeli cider, koji se proizvodi od soka jabuke blijede boje. Slatki cider ima zaostali šećer nakon vrenja ili se zaslađuje nakon fermentacije, a suhi je bez šećera i s udjelom alkohola od 6 – 7 %. Dodatkom hmelja i začina u cider, dobivamo proizvod s antimikrobnim djelovanjem, što je značajno za zdravlje potrošača (Kosseva i sur., 2017).

2.3. STARTER KULTURE

Kod proizvodnje voćnih vina, važno je naglasiti da se na površini plodova nalaze različiti (nativni) mikroorganizmi poput kvasaca, bakterija i plijesni koji pri preradi voća mogu započeti sa svojim aktivnostima. Takvi mikroorganizmi stvaraju različite produkte svojom izmjenom tvari, a svi koriste šećer kao izvor hrane. Budući da isključivo kvasci proizvode željeni alkohol (etanol), potrebno je uvjete u supstratu prilagoditi njima, a ostale mikroorganizme ukloniti ili stvorenim uvjetima otežati njihov rast i razvoj (Kolb i sur., 2007). Sojevi kvasaca uključeni u proces fermentacije utječu na brzinu vrenja, prirodu i količinu sekundarnih produkata fermentacije te na aromatski profil krajnjeg proizvoda, odnosno vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2000). Kvasci imaju veliki utjecaj na sastav i senzorska svojstva vina pa je odabir sojeva kvasaca za alkoholno vrenje od iznimne važnosti. Kvasci kao predstavnici prirodne ili divlje mikroflore na plodovima, mogu osigurati normalan tijek fermentacije, no ima i onih koji ometaju ovaj proces, stoga je došlo do izdvajanja pojedinih kvasaca iz prirodne mikroflore, odnosno do selekcioniranja kvasaca. Selekcioniranje se sastoji od odabiranja čistih kultura pojedinih vrsti ili sojeva koje se još zovu starter kulture (Radovanović, 1986). Čiste starter kulture dostupne su u dva oblika: tekući kvasac i aktivni suhi (liofilizirani) kvasac. Suhi kvasci (liofilizirani) pokazali su se vrlo učinkoviti, jer imaju duži rok trajanja (oko 6 mjeseci), dok je prije primjene tekućih kvasaca, potrebno njihovo umnožavanje dodatkom pasteriziranog soka. U mošt u kojem će se odvijati vrenje, potrebno je dodati 2 – 4 vol. % tekućeg kvasca (npr. na 20 000 L mošta se dodaje 400 – 800 L umnoženog kvasca). Razmnožavanje kvasaca odvija se u više stupnjeva, a ovisno o količini i

temperaturi, proces traje nekoliko dana dok se ne dobije dovoljna količina. Ukoliko koristimo suhi kvasac, razmnožavanje nije potrebno. Za fermentaciju 1000 L mošta, dodaje se 50 – 100 grama suhog kvasca. Takav kvasac potrebno je rehidrirati u 0,5 – 1 L tople vode (35 – 40 °C) i nakon 20 minuta može se dodati u supstrat (Kolb i sur., 2007). Danas se za provođenje procesa fermentacije obično koriste odabrane čiste starter kulture *Saccharomyces cerevisiae*, jer one mogu potisnuti divlju mikrofloru i dominirati procesom fermentacije (Marsico i sur., 2018). *Saccharomyces cerevisiae* nije jedina vrsta koja raste tijekom spontanih fermentacija vina. U ranim fazama fermentacije dominira rast kvasaca koji nisu *Saccharomyces*, a karakterizira ih niska sposobnost fermentacije. Kada dođe do povećanja koncentracije etanola, nakon prvih nekoliko dana vrenja, takvi kvasci odumiru, a daljnju konverziju šećera u etanol preuzima *Saccharomyces cerevisiae*, jer je vrsta otporna na visoke koncentracije etanola. Jedan od tih ne-*Saccharomyces* vrsta je *Torulasporea delbrueckii* koja ima pozitivan učinak na okus i aromu alkoholnih pića te omogućuje stvaranje manjih količina acetaldehida, octene kiseline i etil acetata. Uporaba ovog kvasca u standardnim uvjetima, u mješovitoj ili sekvencijalnoj kulturi sa *S. cerevisiae*, predložena je kao način smanjenja sadržaja octene kiseline u vinu. Unatoč tome, ovaj kvasac proizvodi male količine etanola i biomase, a fermentacija je s njim usporena pa se ne postiže potrebni udio etanola od 14 % vol., iako ova vrsta može preživjeti pri spomenutoj koncentraciji. Prema provedenim istraživanjima, mješovita kultura *T. delbrueckii* – *S. cerevisiae* je najbolja kombinacija za poboljšanje analitičkog profila slatkog vina, jer je u omjeru 20:1 proizvela 53 % manje hlapljivih kiselina i 60 % manje acetaldehida, nego čista kultura *S. cerevisiae* (Bely i sur., 2008). Isto tako, Čuš i Jenko (2013) navode kako *Torulasporea delbrueckii* može poboljšati aromu vina, jer ima značajnu aktivnost enzima β -glukozidaze, veliku sposobnost biotransformacije monoterpenskih alkohola te već spomenuto, proizvodnju niskog udjela octene kiseline. Neki od zanimljivih aromatskih spojeva čiju proizvodnju pospješuje *T. delbrueckii* su voćni esteri, laktoni, tioli i terpeni, a oni čiju proizvodnju inhibira su viši alkoholi (Ramírez i Velázquez, 2018).

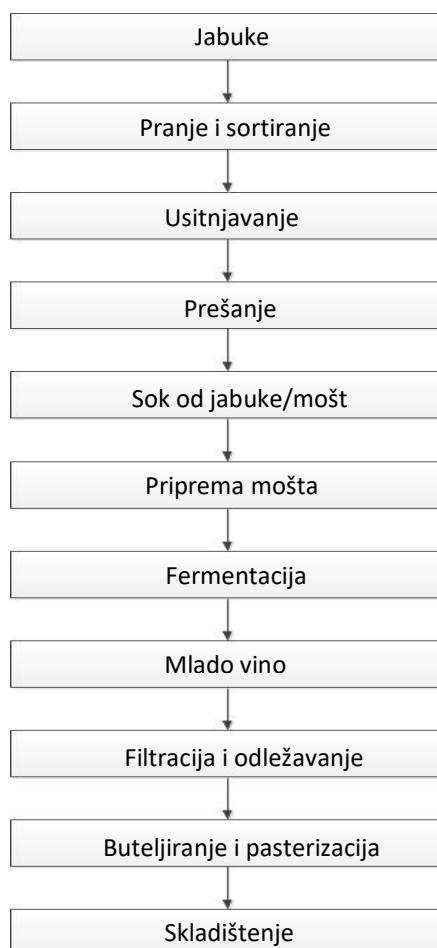
Prema Caridi i sur. (2004), vinski kvasci smanjuju sadržaj fenola u vinima tako što se uspostavljaju slabe i reverzibilne interakcije između stjenki kvasaca i antocijana putem apsorpcije. Različiti metaboliti kvasca, poput pirogroždane kiseline i acetaldehida, reagiraju s

različitim fenolima, što sugerira da oni nude važan način stabilizacije pigmenta tijekom sazrijevanja i starenja vina.

Obično se u mošt dodaje oko 3 g/L aktivnog suhog kvasca, podrazumijevajući da mošt nije kontaminiran mikroorganizmima te da temperatura fermentacije nije preniska. Tijekom procesa vrenja, povećava se sadržaj etanola, temperatura, pH i tlak te uz koncentraciju dobivenog etanola, važno je i da je kvasac otporan na takve nepovoljne uvjete (Husnjak, 2019).

2.4. PROIZVODNJA VOĆNOG VINA OD JABUKE

Tehnologija proizvodnje voćnih vina ne razlikuje se puno od procesa proizvodnje vina od grožđa (Tomić i sur., 2021). Proizvodnja jabučnog vina uključuje osnovne operacije vidljive na **Slici 2** poput prijema jabuka i njihovog pranja i sortiranja, usitnjavanja ploda, prešanja, pripreme mošta, odvijanja fermentacije ili vrenja, filtracije i odležavanja mladog vina, buteljiranja i pasterizacije te skladištenja (Jemrić i sur., 2008).



Slika 2 Shematski prikaz procesa proizvodnje voćnog vina od jabuke (Jemrić i sur., 2008)

2.4.1. Priprema jabuke za preradu

Jabuke korištene za proizvodnju vina moraju biti u punoj zrelosti, što znači da se sav škrob mora pretvoriti u glukozu koja fermentira te kako bi se aroma u kožici ploda što bolje razvila. Najprije se izdvajaju truli plodovi jabuke, a ostali idu na pranje hladnom vodom. Isto tako, poželjno je odstraniti oštećene i natučene dijelove ploda. Pranjem se uklanjaju prirodno prisutni mikroorganizmi na plodu koji mogu negativno utjecati na tijek fermentacije, a samim time i na kakvoću jabučnog vina. Naglasak je na redovitom održavanju cijele opreme koja se koristi za pranje plodova, jer ona često može biti izvor kontaminacije (Jemrić i sur., 2008).

2.4.2. Usitnjavanje i prešanje jabuka

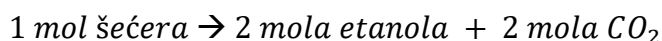
Usitnjavanje ploda jabuke direktno utječe na količinu tj. randman soka, odnosno mošta. Što su plodovi finije samljeveni, to će i količina mošta biti veća. Plodovi se melju cijeli, s korom i sjemenkama, a prilikom procesa dobije se pulpa (Jemrić i sur., 2008). Za usitnjavanje se rabe specijalni mlinovi za voće, kao što su mlinovi čekićari. Tijekom usitnjavanja plodova, važno je provesti sumporenje zbog sprječavanja nepoželjnih procesa oksidacije (posmeđivanja) pulpe, a time i iscijeđenog jabučnog soka. Prešanje se odvija pomoću različitih vrsta preša, od tradicionalnih do onih suvremenijih, uključujući hidrauličke preše, preše s vijcima, preše s košarama i pneumatske preše (Kosseva i sur., 2017). Razlika između tradicionalnih i suvremenih preša je što kod suvremenih dobivamo veće iskorištenje, ali jabučni mošt slabije kvalitete u odnosu na starije preše. Postupak je takav da se jabučna pulpa slaže u prešu preko jednog sloja slame ili se stavlja u jutene vreće (Jemrić i sur., 2008). Bitan kriterij kod ovog procesa je tlak, gdje nije bitna visina tlaka, već njegovo postepeno povećavanje u vremenskim intervalima (Kolb i sur., 2007). Tijekom prešanja, nastoji se što više smanjiti kontakt pulpe s kisikom, kako bi se smanjila aktivnost enzima polifenoloksidaze koja dovodi do posmeđivanja mošta. Zaštita od oksidacije može se obaviti i spomenutim sumporenjem pulpe te dodatkom askorbinske kiseline (vitamin C). Dobiveni jabučni mošt, potrebno je prebaciti u tankove od nehrđajućeg čelika s pripadnim poklopcima i vrenjačama u kojima će se provoditi alkoholna fermentacija (Jemrić i sur., 2008).

2.4.3. Priprema mošta

Kako bi se poboljšala kvaliteta mošta, potrebno ga je tretirati prije fermentacije da bi dobili vino visoke kakvoće i željenih svojstava. To podrazumijeva korekciju pojedinačnih organskih kiselina, šećera i hranjiva, čime se povoljno utječe na tijek vrenja i na kakvoću konačnog proizvoda. S obzirom na relativno nizak sadržaj šećera u moštu, dodaje se konzumni šećer (saharoza) koji će osigurati preporučenu razinu alkohola. Korekcija pH vrijednosti postiže se dodatkom jabučne, limunske ili neke druge organske kiseline, a mora biti u rasponu od 3,2 do 3,8 (Jemrić i sur., 2008). No, Downing (1989) napominje da se može osigurati dovoljna razina kiselosti mošta i odabirom srednje do visoko kiselih sorti jabuka u kupaži. Budući da Delicious jabuke imaju nisku kiselost, trebale bi se miješati sa sortama s visokim udjelom kiseline kao što su Gravenstein i Jonathan. Dopusštena dodana količina šećera i kiseline te vrsta kiseline ovisi o zakonodavstvu pojedine države. Tijekom faze doslađivanja moguće je još dodavanje različitih hranjiva za kvasce, prvenstveno dušika (Jemrić i sur., 2008) te različitih enzimskih pripravaka koji olakšavaju prešanje i povećavaju tako iskoristivost soka, a osim toga poboljšavaju i ekstrakciju boje tijekom vrenja te smanjuju viskozitet. Također, nakon prešanja, mošt je potrebno odmah zasumporiti. Ovisno o količini taloga, dodaje se 50 – 100 mL/L sumporovog dioksida (SO₂). Nakon punjenja u boce, vino bi trebalo sadržavati max. 25 mg/L SO₂ (Kolb i sur., 2007).

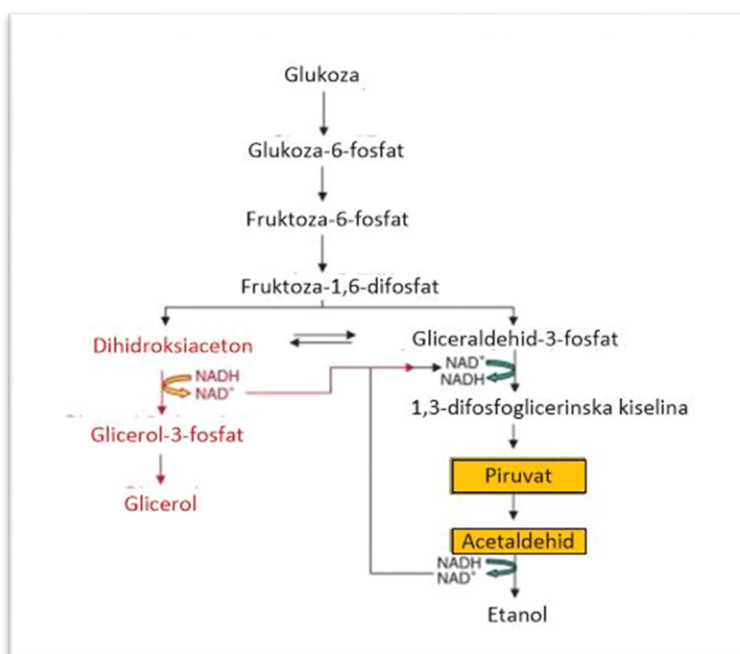
2.4.4. Alkoholna fermentacija

Iako je alkoholno vrenje ljudima poznato od davnina, tek 1778. godine je A. Lavoisier opazio da je to postupak tijekom kojeg se šećer prerađuje u alkohol etanol i CO₂. J. L. Gay Lussac je 1815. godine izračunao kvantitativne odnose u procesu prema **formuli (1)** koji su i danas aktualni:



Alkoholna fermentacija (AF) je biokemijski proces koji provode kvasci ili neke vrste bakterija kao što su bakterije mliječne kiseline (BMK), a konvertiraju šećer u etilni alkohol i ugljikov dioksid. Proces započinje razgradnjom šećera od strane kvasaca da bi se formirale molekule piruvata, što je poznato kao glikoliza. Glikolizom molekule glukoze nastaju dvije molekule pirogroždane kiseline. Dvije molekule pirogroždane kiseline zatim se reduciraju u dvije

molekule etanola i dvije molekule CO_2 . Pod anaerobnim uvjetima, piruvat se može transformirati u etanol, gdje se prvo pretvara u središnju molekulu zvanu acetaldehid uz pomoć enzima piruvat – dekarboksilaze, koja dalje oslobađa ugljikov dioksid, a acetaldehid se reducira u etanol uz pomoć enzima alkohol – dehidrogenaze. U alkoholnoj fermentaciji, akceptor elektrona NAD^+ reducira se u NADH . Razmjena elektrona koja se događa u procesu pomaže u stvaranju ATP-a (Malakar i sur., 2019). Biokemijski put dobivanja alkohola vrenjem, prikazan je na **Slici 3**.



Slika 3 Biokemijski put alkoholne fermentacije. Crna linija: alkoholni put; crvena linija: glicero-piruvični put; žuti okvir: intermedijarni metaboliti uključeni u blok alkoholne fermentacije (Ciani i sur., 2008)

Sam proces je moguće podijeliti na dvije faze: aerobnu i anaerobnu fazu. Pod aerobnim uvjetima, stanicama kvasca je dostupan kisik te dolazi do razmnožavanja kvasca, a nakon što je nastao dovoljan broj kvašćevih stanica, sprječava se dovod kisika i započinje anaerobna faza u kojoj svojim metabolizmom kvasac razgrađuje šećere pri čemu dolazi do intenzivnog pjenjenja i oslobađanja CO_2 (Coton i sur., 2016). Kako udio alkohola raste, tako se vrenje sve više usporava. Ovisno o otpornosti kvasca, kod 18 % vol. alkohola, a u nekim ekstremnim slučajevima i kod viših postotaka, vrenje se potpuno zaustavlja. Općenito se temperatura vrenja drži na oko 20 °C. Pri višim temperaturama, očekuje se veća količina viših alkohola (Kolb i sur., 2007), a niža temperatura fermentacije pridonosi očuvanju lako hlapljivih spojeva arome (Jemrić i sur., 2008). Brzina fermentacije ovisi o odabiru soja kvasca,

temperaturi, prisustvu kisika, pH vrijednosti, koncentraciji šećera, razini dušika i ostalih nutrijenata koji su potrebni stanicama kvasca za rast (Coton i sur., 2016).

Pored etanola i ugljikovog dioksida, kao primarni produkt AF nastaje i glicerol koji daje punoću okusa i tako poboljšava kvalitetu vina. Isto tako, stvaraju se i sekundarni produkti poput estera, organskih kiselina (jantarna, jabučna, octena, mliječna kiselina), masnih kiselina, aldehida, ketona, terpena i dr. Ukoliko je u moštu visoki sadržaj pektina, zbog dodatka pektinaza koje se koriste za bistrenje i povećanje prinosa soka, kao nusprodukt AF može pod određenim uvjetima nastati i metanol (Kosseva i sur., 2017).

Spremnici u kojima se provodi fermentacija različitih su oblika i volumena te moraju biti opremljeni odgovarajućim poklopcima i vrenjačama kako zrak ne bi ulazio u prostor spremnika. Tankovi su napravljeni od različitih materijala koji su otporni na koroziju, a najčešće od nehrđajućeg čelika ili drveta. Sadržaj šećera ili ° Brix-a se redovito mjere kako bi se pratio napredak fermentacije. Fermentacija se odvija sve dok se sav šećer u potpunosti ne potroši (obično Brix očitavanje od oko 8 °Bx). Kada je fermentacija završena, ne stvaraju se više mjehurići, zbog zaustavljanja proizvodnje CO₂ (Kosseva i sur., 2017).

2.4.5. Jabučno-mliječna fermentacija

Tijekom fermentacije, osim pretvorbe šećera u etilni alkohol, odvija se i pretvorba jabučne kiseline u mliječnu kiselinu. Prvi proces obavljaju kvasci, a drugi proces obavljaju specifične bakterije koje se zovu malolaktične bakterije, među kojima su najznačajnije vrste *Oenococcus oeni* i *Lactobacillus brevis*. Pretvorba jabučne kiseline u mliječnu pomoću malolaktičnih bakterija naziva se još i malolaktičnom fermentacijom (MF). Jabučna kiselina ima jak i oštar okus, dok je mliječna kiselina znatno blaža pa takva jabučna vina imaju manju kiselost, bolja organoleptička svojstva i mikrobiološki su stabilnija. U tradicionalno proizvedenim jabučnim vinima ne dodaju se malolaktične bakterije, nego se fermentacija jabučne kiseline odvija spontano i polako. Malolaktične bakterije su osjetljive na sumporov dioksid pa koncentracija od 30 do 50 ppm SO₂ uništava *O. oeni*. Optimalna temperatura za malolaktičnu fermentaciju je od 20 do 25 °C, a preporuča se temperatura od 22 °C, jer je tada pretvorba jabučne kiseline najveća. MF se odvija nakon AF i ne utječe značajno na količinu hlapljivih spojeva koji se najviše stvaraju u alkoholnoj fermentaciji (Jemrić i sur., 2008).

2.4.6. Pretok vina s taloga, bistrenje i filtracija

Po završetku alkoholne fermentacije mlado vino od jabuka se pretače, skida s taloga koji sadrži autolizirane stanice kvasca i enzime (ukoliko su dodani), a vrijeme pretoka razlikuje se zavisno od proizvođača. U Velikoj Britaniji pretakanje i bistrenje provodi se odmah po završetku fermentacije, dok u drugim zemljama vino ostaje na talogu nekoliko tjedana te se nakon toga pretače (Jemrić i sur., 2008). Predugo čuvanje voćnih vina na talogu nije korisno, jer postoji opasnost od stvaranja sumporovodika (H_2S). Pretok se često radi pomoću centrifuga, tako što se talog odvaja vrtnjom bubnja. Kontakt sa zrakom kod pretoka mora biti minimalan kako bi spriječili neželjenu oksidaciju (Kolb i sur., 2007).

Postupak bistrenja može se provesti na nekoliko načina, od najjednostavnijeg prirodnog bistrenja uslijed taloženja čestica mutnoće preko centrifugiranja pa do bistrenja dodatkom nekog od sredstava za bistrenje kao što su bentonit, želatina, agar-agar, tanin, aktivni ugljen, celuloza i dr. (Jemrić i sur., 2008).

Daljnji postupak bistrenja obuhvaća uporabu sustava za filtraciju koji osigurava kristalnu bistroću jabučnog vina. Najčešće se provodi prije punjenja jabučnog vina u boce, pri čemu se u većini slučajeva koristi sterilna pločasta filtracija (veličina pora manja od $0,2 \mu m$) (Jemrić i sur., 2008). Tijekom filtracije, dolazi do odvajanja najfinijih čestica koje su nakon bistrenja ostale u vinu, uz pomoć sloja poroznog materijala koji omogućava protok vina, ali ne i čestica taloga. Kod djelovanja filtracijskih materijala, treba razlikovati sitasto (pore filtracijskog sloja su manje od čestica taloga) i adsorpcijsko djelovanje. Od svakog materijala za filtriranje, očekuje se inertnost u svakom međudjelovanju, tj. da ne uzrokuje promjenu voćnog vina, kako u boji, tako i u okusu i mirisu (Kolb i sur., 2007).

2.4.7. Odležavanje voćnih vina

Mlado vino po završetku AF nije pogodno za konzumaciju jer je neharmonično, grubo i s naglašenim mirisom po kvascu. Potrebno je određeno vrijeme odležavanja vina, kako bi ono postiglo konačnu aromu i bouquet, što na kraju utječe i na kakvoću jabučnog vina. Odležavanje se odvija u dvije faze, gdje se prva faza odnosi na promjene nakon AF do punjenja u boce, a često traje od 6 do 24 mjeseca. Druga faza započinje punjenjem u boce i uklanjanjem kisika. Tijekom druge faze voćno vino dobiva svoj specifični blaži i voćni okus (Velić i sur., 2018b).

2.4.8. Punjenje boca

Zbog šećera kojeg sadržavaju, voćna vina moraju biti punjena vruća ili sterilno ili se boce nakon punjenja pasteriziraju. Vino koje se puni vruće ili se naknadno pasterizira, mora biti testirano na toplinsku stabilnost. Za tu svrhu, napune se tri prozirne boce vinom, zatvore i stave u vodu koja je na predviđenoj temperaturi za punjenje. Nakon toga, boce stavimo u hladnjak i nakon 24 sata provjeri se ima li u bocama taloga, ukoliko ima, potrebno je vino tretirati bentonitom. Voćna vina se u pravilu zatvaraju aluminijskim zatvaračima na navoj. Takvi zatvarači vrlo su rašireni, jer na prstenastom osiguraču, konzumentu je vidljivo je li ta boca originalno zatvorena ili je bila otvarana (Kolb i sur., 2007).

2.5. KEMIJSKI SASTAV VOĆNOG VINA

Kemijski sastav voćnog vina je prilično složen i raznolik, a uglavnom uključuje vodu, alkohole, šećere, organske kiseline te polifenole, više alkohole, estere, aldehide i ketone koji doprinose organoleptičkom karakteru vina (Kosseva i sur., 2017).

2.5.1. Alkoholi

Glavni predstavnik alkohola u voćnim vinima i primarni produkt alkoholne fermentacije je etanol, a njegov udio izražava se kao volumni postotak. Proizvodnja etanola najviše ovisi o: sadržaju šećera, temperaturi fermentacije i soju kvasca. Uloga etanola u vinu je višestruka: zajedno s vodom djeluje kao otapalo u ekstrakciji sastojaka voća, služi kao reaktant u stvaranju važnih hlapljivih spojeva (npr. etil estera) i ključan je za senzorna svojstva, stabilnost te tijekom odležavanja vina. Sekundarni produkti metabolizma kvasca uključuju i više alkohole (koji sadrže više od dva ugljika). Neki od predstavnika viših alkohola su n-propanol, izobutil alkohol (2-metil-1-propanol), 2-metil butanol, izoamil alkohol i 2-fenil etanol (Velić i sur., 2018a). Pored spomenutih alkohola, važan je i glicerol koji nastaje. Iako je spoj bez boje i mirisa, nehlapljiv i bez aromatičnih svojstava, može indirektno pridonijeti aromatskom profilu vina naglašavajući slatkoću, punoću okusa i teksturu vina. Različiti sojevi kvasca proizvode različite količine glicerola pa sposobnost proizvodnje glicerola treba uzeti u obzir pri odabiru sojeva vinskog kvasca (Velić i sur., 2018b). Glicerol se uglavnom proizvodi tijekom glicero-piruvičnog puta na početku alkoholne fermentacije, a njegova razgradnja može biti štetna za kvalitetu vina. Zabilježene koncentracije glicerola u cideru kreću se

između 3 – 6 g/L. Osim etanola i glicerola, u manjim koncentracijama može nastati i metanol u nekim vrstama voćnih vina. Međutim, budući da je toksičan za ljude, sadržaj metanola u komercijalno dostupnim voćnim vinima ne smije prelaziti 200 – 250 mg/L (Velić i sur., 2018a). Šećerni alkoholi, kao što su alditol, arabitol, eritritol, manitol, mioinozitol i sorbitol se isto tako mogu naći u voćnim vinima u manjim količinama (Kosseva i sur., 2017).

2.5.2. Šećeri

Fruktoza, glukoza i, u nekim vrstama voća, saharoza glavni su šećeri prisutni u voćnim vinima. Njih kvasci fermentiraju tijekom vrenja, proizvodeći prethodno spomenute glavne metabolite. Međutim, u usporedbi s grožđem, ostalo voće često ima puno niži sadržaj šećera u sastavu, što ga čini neprikladnim za proizvodnju voćnog vina, jer je šećer presudan za rast i metabolizam kvasca pa se sadržaj šećera korigira dodatkom saharoze (Velić i sur., 2018a). Nadalje, šećeri se također mogu metabolizirati u više alkohole, estere masnih kiselina i aldehide, koji uglavnom definiraju primarni aromatski karakter vina (Velić i sur., 2018b). Šećeri koji nisu fermentirani do kraja, nazivaju se neprevrelim šećerima koji se prvenstveno sastoje od pentoznih šećera, kao što su arabinoza, ramnoza i ksiloza. Prema sadržaju ukupnih šećera sva vina se svrstavaju u suha vina ako je sadržaj neprevrelih šećera manji od 1,5 g/L (Kosseva i sur., 2017).

2.5.3. Organske kiseline

Slično kao i kod šećera, sadržaj organskih kiselina u voću odgovara sadržaju organskih kiselina u voćnom vinu. Kiselost vina utječe na okus i ukupnu kvalitetu, a izražava se kao ukupna kiselost. Predstavnici organskih kiselina prisutnih u voćnim vinima uključuju jabučnu kiselinu (6,2 g/L), jantarnu (1,3 g/L), limunsku (0,3 g/L) i octenu kiselinu (Kosseva i sur., 2017). Od hlapljivih kiselina, najzastupljenija je octena kiselina koja se koristi kao parametar kvalitete vina. Ona je sekundarni metabolit dobiven iz piruvata tijekom AF. Povišena koncentracija octene kiseline može upućivati na infekciju i aktivnost bakterija octene kiseline. Jabučna kiselina također značajno pridonosi kiselosti vina, a njezina se koncentracija može smanjiti razgradnjom jabučne kiseline u mliječnu malolaktičnom fermentacijom (MF) (Velić i sur., 2018b).

2.5.4. Hlapljivi (aromatski) spojevi

Poznavanje hlapljivog, odnosno aromatskog profila vina je od velikog interesa, budući da su ti spojevi odgovorni za kvalitetu arome vina. Aroma voćnih vina uglavnom je određena hlapljivim spojevima koje proizvodi samo voće (aroma sortnog vina), ali mogu nastati i tijekom alkoholnog i malolaktičnog vrenja (aroma fermentativnog vina) ili tijekom punjenja, odležavanja i skladištenja. Esteri, viši alkoholi, acetati, organske kiseline i drugi spojevi skupine su hlapljivi spojevi koji najčešće pridonose profilu okusa i/ili arome vina. Osim navedenih, postoje i mnogi manji hlapljivi i nehlapljivi spojevi koji čine aromu voćnih vina, a to su aldehidi, ketoni, laktoni, terpeni i fenoli (Velić i sur., 2018a).

Na primjer, voćnom okusu trešnje u vinu pridonose etanol, butanol, pentanol, oktanol, geraniol, linalol, etil acetat, octena kiselina, izovalerijanska kiselina, oktanska kiselina i benzaldehid. Prema rezultatima analize, Kosseva i sur. (2017) navode kako su u kupinovom vinu sastav hlapljivih tvari arome činili etil heksanoat, etil acetat, etil oktanoat, izoamil alkohol, fenetil alkohol i octena kiselina. Aldehidi i ketoni nastaju u manjim količinama tijekom nepotpune alkoholne fermentacije ili oksidacije alkohola, ali su i dalje vrlo važni za stvaranje sortnih aroma. Unatoč tome, u većim koncentracijama imaju neželjene učinke. U vinu od jabuke nađeni su u količinama od 100 – 150 mg/L. Esteri su odgovorni za voćni bouquet vina, pri čemu pojedinačni esteri imaju veći intenzitet ili kvalitativna svojstva, nego kada dolaze u kombinaciji. U jabučnom vinu, ukupna količina estera kreće se oko 240 mg/L. U cideru su prisutni heksil-acetat, butil-acetat i 2-metilbutil-acetat, no ako su termički obrađeni, gube i do 30 % svog izvornog udjela estera i aldehida tijekom skladištenja (Kosseva i sur., 2017).

2.5.5. Vitamini i minerali

Koncentracija vitamina prisutnih u voću opada tijekom proizvodnje vina zbog fermentacije, termičkih tretmana i odležavanja pa su njihove razine u voćnim vinima nedostatne da bi bile značajne u ljudskoj prehrani. Međutim, vitamin C se ponekad dodaje kao konzervans u proizvodnji ekoloških voćnih vina (Velić i sur., 2018b). S druge strane, razine nekih vitamina obično su dovoljne ili više nego dovoljne da podrže rast mikroba. Sadržaj biotina (vitamin H) i nikotinske kiseline (niacin, vitamin B3) je adekvatan za većinu sojeva kvasca (Velić i sur., 2018a). Voćno vino sadrži nešto vitamina B skupine (tiamin, riboflavin i B12) i, nažalost, vrlo

male količine vitamina A, C, D i K. Uzimajući sve ove činjenice u obzir, može se zaključiti da umjerena konzumacija vina ipak ne predstavlja dovoljan izvor vitamina potrebnih za održavanje optimalnog nutritivnog statusa i cjelokupnog zdravlja. Od minerala, kalij je dominantan element prisutan u svim vinima, u rasponu od 742 do 1201 $\mu\text{g/g}$, dok su ostali važni elementi kalcij, sumpor, fosfor, natrij i magnezij (Kosseva i sur., 2017).

2.5.6. Polifenolni spojevi i antioksidativna aktivnost

Polifenolni spojevi pripadaju raznovrsnoj skupini sekundarnih metabolita biljaka neophodnih za pravilan rast i razvoj. Imaju mnoge funkcije u fiziologiji biljaka, od strukturnih komponenti do obrane od patogena ili od pigmentacije do antioksidativne zaštite. Mnogi fenolni spojevi pokazuju antibakterijska, antifungalna, antivirusna, antikancerogena i protuupalna svojstva. Dokazan je i njihov učinak u liječenju raznih poremećaja poput kardiovaskularnih problema, astme, alergija, dijabetesa i hipertenzije, vjerojatno zbog njihovog antioksidativnog djelovanja (Kosseva i sur., 2017). Toj skupini pripadaju antocijani, flavonoli, katehini i dr. flavonoidi te djeluju na boju i trpkost vina. Fenolni spojevi mogu se klasificirati na različite načine jer se sastoje od velikog broja heterogenih struktura koje se kreću od jednostavnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva (Velić i sur., 2018a). Prije kromatografskih metoda, najčešći parametar koji se koristio za opisivanje potencijalne terapijske vrijednosti odabranog vina bio je ukupni sadržaj polifenola. Osim ukupnog sadržaja polifenola, daje se i procjena ukupne antioksidativne aktivnosti kao poveznica s bioaktivnim potencijalom bobičastog ili jabučastog voća ili proizvoda od istog (Kosseva i sur., 2017). Na temelju ukupnog sadržaja polifenola, vina se obično kategoriziraju u tri glavne skupine: (1) s visokim udjelom ukupnih polifenola, (2) sa srednjim udjelom ukupnih polifenola i (3) s niskim sadržajem ukupnih polifenola (Velić i sur., 2018a). Ukupni sadržaj polifenola u vinu od jabuke (451 mg galne kiseline/L) značajno je niži nego kod vina od trešnje (991 mg galne kiseline/L) i gotovo četiri puta niži nego kod vina od borovnice (1676 mg galne kiseline/L) (Kosseva i sur., 2017). Među fenolnim spojevima s poznatim antioksidativnim djelovanjem ističu se flavonoidi, fenolne kiseline i tanini, a glavni flavanol kod jabučnih vina je epikatehin, zatim ga slijedi katehin i njihov produkt polimerizacije procijanidin B₂. Fenolne kiseline dijele se na derivate hidroksibenzojeve kiseline (kao što su galna, hidroksibenzojeva, salicilna i protokatehuinska) i derivate hidroksicimetne kiseline. Poznato je da kupinovo vino ima visoke koncentracije benzojeve i cimetne kiseline, osobito galne, klorogenske, *p*-kumarinske i

kafeinske kiseline, dok su prevladavajuće hidroksicimetne kiseline u jabučnim vinima klorogenska i *p*-kumaroil kininska kiselina. Međutim, one su podložne brzom oksidaciji koju katalizira enzim polifenoloksidaza, dajući *o*-kinon, spoj odgovoran za tamnjenje soka/mošta od jabuka (Velić i sur., 2018a). Isto tako, Velić i sur. (2018a) naglašavaju da voće iz ekološkog uzgoja može imati veći sadržaj polifenolnih spojeva, što vjerojatno dolazi od činjenice da biljke pojačano sintetiziraju endogene prirodne obrambene tvari (fenole) zbog odgovora na biotički i abiotički stres, u nedostatku gnojiva i pesticida, koji se obično koriste tijekom konvencionalne proizvodnje. Antocijani su vodotopljivi pigmenti koji pripadaju skupini flavonoida, a odgovorni su za crvenu, plavu i ljubičastu boju voća, cvijeća, lišća, stabljike, gomolja i podanka. Jaki su antioksidansi, a biljke ih sintetiziraju i nakupljaju u stresnim uvjetima, kao što su ekstremne temperature, UV zračenje te gljivične i bakterijske infekcije. Prema strukturi, antocijani su glikozidi koji otpuštaju aglikonske antocijanidine pomoću glikozidaza, a glikozidni dio mogu činiti šećeri kao što su glukoza, galaktoza, ramnoza, ksiloza i arabinoza (Ruta i Farcasanu, 2019). Osnovnu strukturu antocijanidina čini flavilium kation, s metoksilnim i hidroksilnim skupinama prisutnima na različitim položajima osnovne strukture (Velić i sur., 2018a). Postoji šest antocijanidina koji prevladavaju u prirodi: cijanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin i petunidin, a najzastupljeniji su cijanidin i delfinidin. Ovi spojevi su vrlo osjetljivi te na njihovu stabilnost utječu: pH, temperatura, svjetlo, kisik, metalni ioni, intramolekularne veze ili intermolekularne veze s drugim spojevima (kopigmenti, šećeri, proteini, produkti razgradnje) (Ruta i Farcasanu, 2019). Proces kopigmentacije je interakcija između bezbojnih ili slabo obojenih molekula, koje se nazivaju kopigmenti, i antocijana gdje te interakcije vode do povećanja intenziteta boje. Najčešći kopigmenti su hidroksicimetna kiselina, katehini i flavonoli (Moreno i Peinado, 2012). Crna vina te voćna vina od bobičastog voća osobito su bogata antocijanima, jer su dobivena od sirovina s visokim udjelom antocijana. Antocijani su važni jer utječu na kvalitetu vina, igrajući ključnu ulogu u svojstvima boje i okusa vina, stabilnosti i u procesu dozrijevanja vina. Tijekom fermentacije, ali i tijekom sazrijevanja i odležavanja vina, koncentracija antocijana se stalno mijenja. Većina dosadašnjih studija pokazala je da antocijani tijekom fermentacije prolaze kroz različite biotransformacije, fizičke (npr. adsorpcija fermentacijskim mikroorganizmima, odnosno kvascima) te kemijske (npr. reakcije kondenzacije koje uključuju reakcije s glikolitičkim produktima kao što su piruvat i acetaldehid ili reakcije s drugim spojevima prisutnima tijekom vrenja, kao što su vinilfenoli dobiveni iz cimetnih kiselina

pomoću dekarboksilaza) što može dovesti do stabilizacije ili povećanja koncentracije antocijana. Isto tako, neki kvasci sudjeluju u *de novo* sintezi različitih spojeva pa tako i antocijana. Antocijani još prolaze kroz reakcije razgradnje i oksidacije, taloženja s proteinima, polisaharidima i kondenziranim taninima. Kao rezultat kondenzacije s različitim komponentama, spojevi izvedeni iz antocijana zadržavaju svoje početne dijelove bogate elektronima, zajedno sa spektralnim i antioksidativnim svojstvima (Ruta i Farcasanu, 2019).

2.6. FIZIKALNO-KEMIJSKI POKAZATELJI KAKVOĆE VOĆNIH VINA

Prema Pravilniku o vinu (NN 57/00), kakvoća vina se utvrđuje na osnovu sljedećih fizikalno-kemijskih pokazatelja: relativna gustoća, alkoholna jakost, ukupni suhi ekstrakt, reducirajući šećeri, pepeo, ukupna kiselost, hlapiva kiselost, pH, slobodni SO₂ i ukupni SO₂.

2.6.1. Relativna gustoća

Prema Pravilniku o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, gustoća je masa vina ili mošta po jedinici volumena pri temperaturi od 20 °C. Izražena je u gramima po mililitru i označena simbolom P_{20°C}. Relativna gustoća pri 20 °C (ili specifična težina pri 20 °C) je omjer gustoće nekoga određenog volumena vina ili mošta pri 20 °C prema gustoći istog volumena vode pri istoj temperaturi (MPŠVG, 2004).

2.6.2. Alkoholna jakost

Etanol je glavni produkt alkoholne fermentacije, odgovoran za aromu i stabilnost vina, dok se metanol i ostali alkoholi pojavljuju u manjim koncentracijama (Amidžić Klarić i sur., 2016). Alkoholna jakost izražena volumenom je broj litara etanola sadržanog u 100 litara vina, a oba volumena mjerena pri temperaturi od 20 °C. Izražava se simbolom »% vol.« kako navodi Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina (MPŠVG, 2004).

2.6.3. Ukupni suhi ekstrakt

Prema Pravilniku o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, ukupni suhi ekstrakt ili ukupna suha tvar uključuje sve tvari koje nisu hlapive pod specifičnim fizičkim uvjetima. Ovi fizički uvjeti moraju biti takvi da tvari koje čine ekstrakt pretrpe što je moguće manje promjene u tijeku izvođenja testa (MPŠVG, 2004). U ekstrakt spadaju ugljikohidrati, mineralne tvari, glicerol, butilen, glikol, nehlapive kiseline (vinska, jabučna, mliječna), tanini i tvari boje (Husnjak, 2019). Ekstrakt bez šećera je razlika između ukupnog suhog ekstrakta i ukupnih šećera, a reducirani ekstrakt je razlika između ukupnog suhog ekstrakta i ukupnih šećera iznad 1 g/L, kalijeva sulfata iznad 1 g/L, prisutnog manitola ili drugih kemijskih supstanci koje su možda bile dodane vinu. Ekstrakt se izražava u gramima po litri i treba biti određen unutar najbližih 0,5 g (MPŠVG, 2004).

2.6.4. Reducirajući šećeri

Prema Pravilniku o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, reducirajući šećeri su svi šećeri, koji imaju keto ili aldehidne funkcionalne skupine. Njihovo određivanje vezano je za redukciju alkalne otopine bakar (II) soli (MPŠVG, 2004). Slobodna aldehidna ili ketonska skupina omogućuje im da rade kao redukcijska sredstva. Svi monosaharidi su reducirajući šećeri, dok se disaharidi mogu klasificirati kao reducirajući i nereducirajući, gdje je npr. saharoza nereducirajući (Jain i sur., 2021).

2.6.5. Pepeo

Sukladno Pravilniku o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, sadržaj pepela definiran je kao ukupnost svih produkata koji ostaju nakon žarenja taloga preostalog od isparavanja vina. Žarenje se izvodi tako da se svi kationi (isključivši kation amonija) pretvore u karbonate ili druge bezvodne anorganske soli (MPŠVG, 2004). Amidžić Klarić i sur. (2016) navode da što je vino kvalitetnije, u njemu se nalazi veća koncentracija pepela i minerala.

2.6.6. Ukupna kiselost

Vrsta voća, klimatski uvjeti i geomorfološke karakteristike tla, određuju sadržaj organskih kiselina u voću pa u konačnici i u voćnom vinu (Velić i sur., 2018a). Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina navodi kako je ukupna kiselost vina suma njegovih titrabilnih kiselina kad ga se titrira do pH 7 sa standardnom alkalnom otopinom. Ugljikov dioksid nije uključen u ukupnu kiselost (MPŠVG, 2004). Prema Pravilniku o vinu, vino u prometu mora sadržavati ukupnu kiselost najmanje 4,5 g/L izraženu kao g/L vinske kiseline (MPŠ, 2000).

2.6.7. Hlapiva kiselost

Kako navodi Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, hlapiva kiselost predstavlja homologe octene kiseline prisutnih u vinu u slobodnom obliku ili u obliku soli (MPŠVG, 2004). Prema Pravilniku o vinu, hlapiva kiselost izražava se kao octena kiselina u g/L (MPŠ, 2000).

2.6.8. pH vrijednost

Kiselost voća jedan je od najvažnijih parametara u proizvodnji vina. pH vrijednost je pokazatelj jačine kiselosti soka ili vina, dakle mjera napredovanja zrelosti. Preciznije, pH je mjera koncentracije vodikovih iona i relativne sposobnosti neutralizacije alkalnih hidroksilnih iona. pH vrijednost se izražava na ljestvici od 0 (najkiselije) do 14 (najlužnatije), s neutralnošću na pH 7 (Vine i sur., 1997). Sukladno Pravilniku o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, pH se određuje tako da se mjeri razlika u potencijalu između dviju elektroda uronjenih u ispitivanu tekućinu. Potencijal jedne od elektroda je u funkciji pH vrijednosti tekućine, dok druga elektroda ima stalan i poznat potencijal te predstavlja referentnu elektrodu (MPŠVG, 2004).

2.6.9. Ukupni i slobodni SO₂

U industriji vina, SO₂ često se dodaje moštu i vinu kao konzervans, kako bi se spriječio rast bakterija i usporio proces oksidacije inhibicijom oksidativnih enzima. Također, SO₂ poboljšava voćne okuse i svježinu arome vina. Obično se dodaje kao kalijev ili natrijev metabisulfit. SO₂ u vinu dolazi u dva oblika: slobodni i vezani. Slobodni može reagirati i tako

pokazati i germicidna i antioksidativna svojstva. Vezani SO₂ je onaj koji je reagirao (i reverzibilno i ireverzibilno) s drugim komponentama unutar vina. Kombinacija vezanog i slobodnog SO₂ naziva se ukupni SO₂ (Monro i sur., 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj rada bio je istražiti utjecaj odabranih komercijalnih kvasaca roda *Saccharomyces* oznake 011 BIO (Zymaflore®, Laffort, FR), RMS2 (Actiflore®, Laffort, FR) i X16 (Zymaflore®, Laffort, FR) te utjecaj koinokulacije ne-*Saccharomyces* vinskog kvasca oznake ALPHA TD (*Torulaspora delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) sa X16 u omjeru 10:1 na kinetiku fermentacije, fizikalno-kemijska svojstva, udio ukupnih polifenola i antocijana te antioksidativnu aktivnost u soku/vinu od jabuke sorte Florina iz ekološkog uzgoja. Kinetika alkoholne fermentacije praćena je u laboratorijskom mjerilu primjenom serija mikrofermentacijskih eksperimenata. Nakon provedenih mikrofermentacija i analiza dobivenih uzoraka, provela se statistička obrada dobivenih rezultata s ciljem optimizacije procesa proizvodnje voćnog vina od jabuke.

3.2. MATERIJALI

Sirovine:

- sok od jabuke iz ekološkog uzgoja sorte Florina (Hrvatska)
- komercijalni kvasci roda *Saccharomyces*: **011 BIO** (Zymaflore®, Laffort, FR) (dalje u radu K1), **RMS2** (Actiflore®, Laffort, FR) (dalje u radu K2) i **X16** (Zymaflore®, Laffort, FR) (dalje u radu K3)
- mješovita kultura ne-*Saccharomyces* vinskog kvasca **ALPHA TD** (*Torulaspora delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) i kvasca **X16 (u omjeru 10:1)** (dalje u radu K4)

Kemikalije:

- kalijev metabisulfit ($K_2S_2O_5$)
- šećer saharoza (bijeli, rafinirani)
- Folin-Ciocalteu-ov reagens
- natrijev karbonat (Na_2CO_3)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) reagens
- etanol
- pufer KCl
- pufer natrijev acetat bezvodni

- klorovodična kiselina (HCl)
- destilirana voda

3.3. OPREMA

Tijekom pripreme uzoraka soka za AF korišteni su:

- ručno mješalo i plastična posuda
- Erlenmayerove tikvice volumena 2 L
- analitička vaga (Adam, model Nimbus) je korištena za vaganje enoloških preparata
- laboratorijska vaga (Kern PLE 420-3N) je korištena za vaganje pripremljenih uzoraka u Erlenmayerovim tikvicama
- pH metar (Mettler Toledo) za određivanje pH vrijednosti soka od jabuke
- digitalni refraktometar (HI 96813) za određivanje šećera (°Bx) u soku od jabuke
- termometar
- vrenjače

Tijekom analiza mladog vina korišteni su:

- digitalni refraktometar HI 96813 za određivanje šećera u vinu
- pH metar (Mettler Toledo) za određivanje pH vrijednosti mladog vina
- spektrofotometar (LLG-uniSPEC 2)

Tijekom pretoka mladog vina u boce korišteni su:

- električna pumpa Buon Vino (broj modela: GY-4U7R-6PYV)
- ručna čepilica zatvaranje boca
- tamne boce

3.4. METODE

3.4.1. Proces proizvodnje vina od jabuke u laboratorijskom mjerilu

Za proizvodnju vina od jabuke korišten je sok od jabuke iz ekološkog uzgoja sorte Florina. Sok je čuvan i transportiran u *bag-in-box* pakiranju. Iz takvog pakiranja priređen je jedan uzorak svježeg soka od jabuke ukupnog volumena od 12 L. U svježem, početnom soku je određen udio šećera od 12,5 °Bx pomoću refraktomera te pomoću pH metra (Mettler Toledo) određena je pH vrijednost 3,59. Kako utvrđena količina šećera nije bila dovoljna za proizvodnju vina, provedeno je doslađivanje do 20 °Bx s 107 g/L bijelog, rafiniranog šećera, tj. 1284 grama je dodano na ukupni volumen soka od 12 L. pH doslađenog soka iznosio je 3,73. Za potrebe provedbe serije mikrofermentacijskih istraživanja, sok od jabuke pripremljen na prethodno opisan način, razdijeljen je u osam (8) Erlenmeyerovih tikvica volumena 2 L. U svaku Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 1,5 L soka jabuke. Također, pripremljena je i tikvica s 1,5 L destilirane vode koja se koristila kao kontrola isparavanja tijekom AF. Ostala enološka sredstva su dodavana u Erlenmeyerove tikvice prema odvagama za 1,5 L soka pa je tako provedeno sumporenje sa 35 mg/L kalijevog metabisulfita ($K_2S_2O_5$), tj. u svaku tikvicu dodana je odvaga od 0,0525 g $K_2S_2O_5$ na 1,5 L soka. Za alkoholnu fermentaciju su upotrebljena četiri komercijalna vinska kvasca, čija se pakiranja mogu vidjeti na **Slici 4**. Uzorci su pripremljeni u paralelama uz kontrolnu tikvicu s destiliranom vodom. Aktivni suhi kvasci dodani su u koncentraciji od 30 g/hL (0,3 g/L), tj. u svaku tikvicu je dodano po 0,45 g kvasca na 1,5 L soka. U prve dvije tikvice, označene s K1 I i K1 II, dodan je odabrani kvasac roda *Saccharomyces* oznake 011 BIO (Zymaflore®, Laffort, FR), u druge dvije označene s K2 I i K2 II, dodan je također odabrani kvasac roda *Saccharomyces* oznake RMS2 (Actiflore®, Laffort, FR) te u tikvice označene s K3 I i K3 II, dodan je isto selekcionirani *Saccharomyces* vinski kvasac oznake X16 (Zymaflore®, Laffort, FR). Kod zadnje dvije tikvice označene s K4 I i K4 II, izvršena je koinokulacija s ne-*Saccharomyces* vinskim kvascem naziva ALPHA TD (*Torulasporea delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) uz K3 – X16 *Saccharomyces* kvasac u omjeru 10:1 pa je u navedene dvije tikvice dodano 0,4050 g ALPHA TD i 0,0450 g X16. Na sve tikvice postavljene su vrenjače, kako bi se spriječio ulazak zraka te pravilno provela fermentacija. Na takav način pripremljeni početni uzorci prikazani su na **Slici 5**.



Slika 4 Pakiranja odabranih *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvasaca (Izvor: Autor)



Slika 5 Pripremljeni uzorci u Erlenmeyerovim tikvicama s vrenjačama (Izvor: Autor)

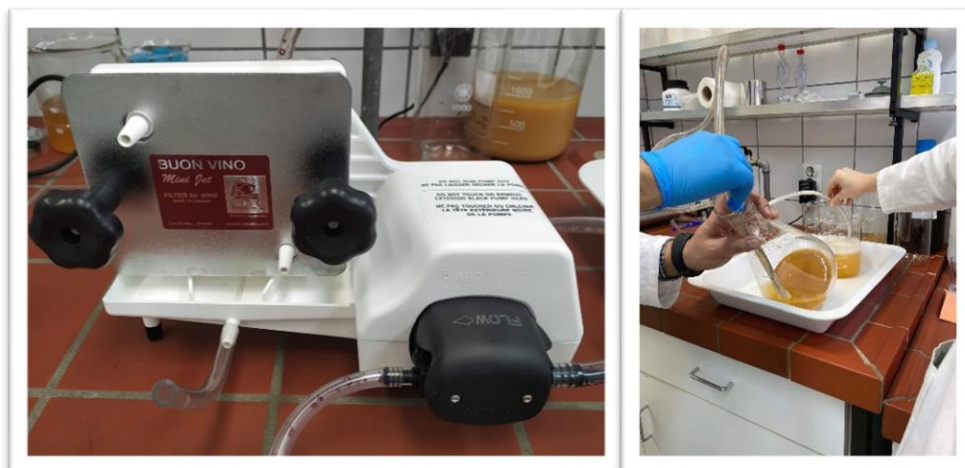
Mikrofermentacije su provedene na prosječnoj temperaturi od 21 °C u zamračenom prostoru kako je prikazano na Slici 6. Tikvica s vodom u koju je bio uronjen termometar korištena je za praćenje temperature fermentacije. Poslije 40 dana fermentacije, napravljen

je pretok mladog vina i odjeljivanje taloga. Pretok vina napravljen pomoću električne pumpe marke Buon Vino (GY-4U7R-6PYV) te zaostali talog prikazani su na **Slici 7**.

Mlado vino od jabuke pretočeno je u tamne boce u kojima je nastavljalo daljnje dozrijevanje i odležavanje na podrumskoj temperaturi (**Slika 8**).



Slika 6 Uzorci u zamračenom prostoru na početku alkoholne fermentacije
(Izvor: Autor)



Slika 7 Pretok mladog vina od jabuke pomoću pumpe i zaostali talog (Izvor: Autor)



Slika 8 Vино od jabuke u tamnim bocama na daljnjem dozrijevanju i odležavanju

(Izvor: Autor)

3.4.2. Praćenje fermentacijske aktivnosti kvasca – određivanje mase CO₂ oslobođenog tijekom mikrofermentacija

Za mjerenje mase tijekom provedbe mikrofermentacija, korištena je laboratorijska vaga (Kern PLE 420-3N), a vaganje je provedeno pri sobnoj temperaturi, što je prikazano na Slici 9. Praćenjem promjene mase uzoraka u Erlenmayerovim tikvicama tijekom intervala od 24 sata za vrijeme procesa AF od 40 dana, izračunata je količina CO₂ proizvedena metabolizmom kvasca.



Slika 9 Mjerenje mase uzoraka tijekom provedbe mikrofermentacije

(Izvor: Autor)

Masa oslobođenog CO₂ tijekom mikrofermentacija izračunata je kao razlika promjene mase tikvice u kojoj se provodila fermentacija i promjene mase tikvice slijepe probe (tikvica s vodom) prikazana **formulom (2)**:

$$m = m_1 - m_2 \text{ (g)} \quad (2)$$

gdje je:

m – masa oslobođenog CO₂ u fermentacijskoj tikvici [g]

m_1 – gubitak mase tikvice (razlika mase tikvice između dva mjerenja) [g]

m_2 – razlika mase tikvice slijepe probe između dva mjerenja [g].

Brzina nastajanja CO₂ određena je na način da je masa oslobođenog CO₂ u određenom vremenskom intervalu podijeljena s vremenom trajanja tog intervala i volumenom uzorka, prema **formuli (3)**:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{\Delta m}{V \times \Delta t} \text{ (g/L; 24h)} \quad (3)$$

gdje je:

$\frac{dCO_2}{dt}$ – brzina nastajanja CO₂ [g/L; 24h]

Δm – masa CO₂ oslobođenog u vremenskom intervalu Δt [g]

Δt – vremenski interval između dva mjerenja [24h]

V – volumen uzorka [L].

3.4.3. Određivanje refraktometrijske vrijednosti

Refraktometrija je određivanje indeksa loma svjetlosti (refrakcije) neke tvari, u ovom slučaju soka/vina od jabuke. Za mjerenje se koristi mjerni instrument (refraktometar), koji mjeri kut pod kojim se zraka svjetlosti lomi, prelaskom iz otopine u staklenu prizmu poznatog indeksa loma. Indeks loma otopine proporcionalan je njihovoj koncentraciji pa refraktometrija služi kao brza analitička metoda za određivanje koncentracije šećera u vinima i sokovima, alkohola u alkoholnim pićima i za određivanje koncentracije masti u mlijeku. Refraktometar daje rezultat obrađenih uzoraka u obliku stupnjeva Brix-a (°Bx). Za analizu je korišten refraktometar tvrtke Hanna Instruments (HI 96813 Wine Refractometer).



Slika 10 Refraktometar HI 96813 (Izvor: Autor)

3.4.4. Određivanje ukupnih polifenola

Prvo je potrebno pripremiti *Folin-Ciocalteu* reagens i otopinu natrijeva karbonata. Priprema *Folin-Ciocalteu* reagensa napravljena je tako da je otpipetirano 3,3 mL reagensa u odmjernu tikvicu od 100 mL te se tikvica nadopunila do oznake destiliranom vodom. Otopina natrijeva karbonata priređena je tako što se odvagalo 7,5 g anhidrida natrijeva karbonata u staklenu čašicu te se pomoću destilirane vode odvaga kvantitativno prenesla u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunila do oznake destiliranom vodom. Rezultati se preračunavaju iz kalibracijske krivulje galne kiseline.

Prema postupku, u epruvetu je otpipetirano 0,2 mL uzorka (vina od jabuke), 1,8 mL destilirane vode, 2,5 mL pripremljenog *Folin Ciocalteu* reagensa te 2 mL otopine natrijeva karbonata. Sadržaj epruvete je promućkan i ostavljen 2 sata na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Slijepa proba pripremljena je destiliranom vodom (2 mL). Apsorbancija uzoraka mjerena je na spektrofotometru (LLG-uniSPEC 2) pri 765 nm.

3.4.5. Antioksidacijska aktivnost DPPH metoda

Priređen je DPPH reagens na način da se otopilo oko 20 mg reagensa (na vrhu staklenog štapića) u etanolu, a apsorbancija mjerena na 517 nm trebala je biti oko 1. Spektrofotometar je 'nuliran' etanolom.

Otpipetirano je 0,2 mL vina od jabuke i dodano 3 mL DPPH reagensa te se reakcijska smjesa ostavila 15 minuta stajati. Nakon toga, mjerena je apsorbancu pri 517 nm, a za slijepu probu umjesto uzorka, korišten je etanol. Rezultat se preračunava iz kalibracijske krivulje troloxa.

3.4.6. Spektrofotometrijsko određivanje antocijana

Prvo je pripremljena otopina pufera KCl, pri čemu je otopljeno 0,186 g KCl-a u 50 mL prokuhane i ohlađene vode te se mjerila pH vrijednost uz podešavanje dodavanjem HCl-a do vrijednosti pH 1. Nakon što je dobivena željena pH vrijednost, nadopunila se odmjerna tikvica do 100 mL. Zatim je priređena otopina pufera bezvodnog natrijevog acetata, gdje se otopilo 3,28 g u 50 mL prokuhane i ohlađene vode, mjerila se pH i podešavana je s dodatkom HCl-a, dok pH nije bila 4,5. Na kraju, tikvica se nadopunila do 100 mL.

Prema zadanom postupku, otpipetirano je 0,2 mL uzorka (vina od jabuke) u dvije epruvete. U prvu epruvetu dodalo se 2,8 mL KCl-a (pH 1), a u drugu epruvetu 2,8 mL natrij acetat pufera (pH 4,5). Otopina uzorka se ostavila stajati 15 minuta te je nakon 15 minuta mjerena apsorbancu oba razrjeđenja pri 520 nm i 700 nm. Nula se na spektrofotometru podešavala destiliranom vodom.

Izračun je napravljen prema **formuli (4)**:

$$\text{Koncentracija antocijana} = \frac{A \cdot M \cdot FR \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l} \text{ (mg/L)} \quad (4)$$

gdje je:

A – apsorbancu uzorka, $A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$

M – 449,2

FR – faktor razrjeđenja (ukupni volumen/volumen uzorka)

ε – molarna apsorptivnost: 26900.

4. REZULTATI I RASPRAVA

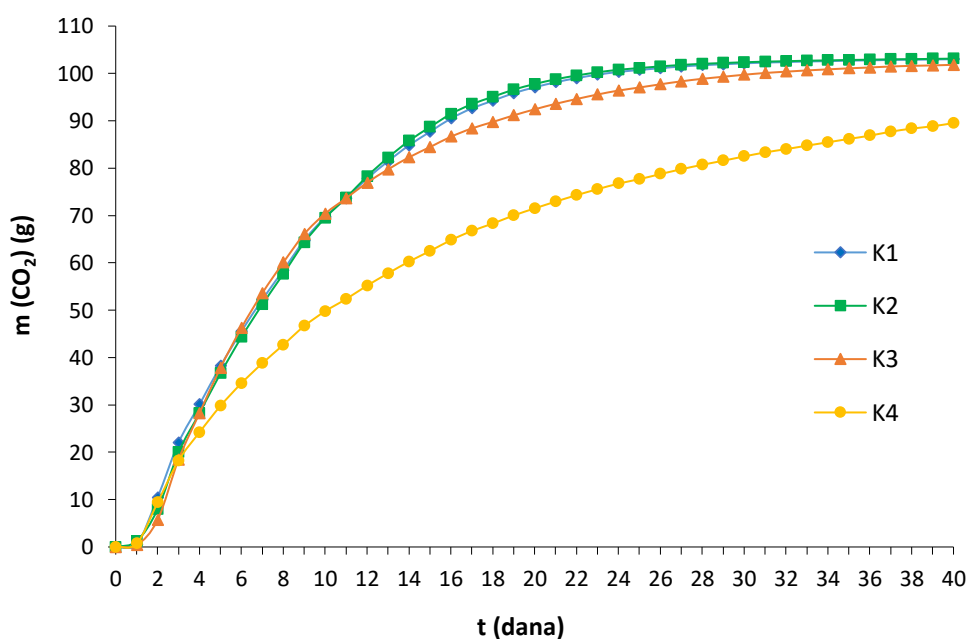
4.1. UTJECAJ DODATKA *SACCHAROMYCES* I *NE-SACCHAROMYCES* VINSKIH KVASACA NA KINETIKU FERMENTACIJE

Praćena je fermentacijska aktivnost selekcioniranih *Saccharomyces* i *ne-Saccharomyces* vinskih kvasaca u soku/vinu od jabuke tijekom alkoholne fermentacije. Istraživanje je provedeno u laboratorijskom mjerilu primjenom serija mikrofermentacijskih eksperimenata. Fermentacijska aktivnost kvasca se može pratiti posredno, jednostavnim određivanjem mase oslobođenog CO₂, što je u stehiometrijskom odnosu s potrošnjom šećera i proizvodnjom etanola (Petraović-Tominac i sur., 2013). Tijekom proizvodnje vina od jabuke, serijom mikrofermentacijskih eksperimenata, praćena je fermentacijska aktivnost odabranih komercijalnih kvasaca roda *Saccharomyces* kako je navedeno: 011 BIO (Zymaflore®, Laffort, FR) (K1), RMS2 (Actiflore®, Laffort, FR) (K2) i X16 (Zymaflore®, Laffort, FR) (K3) te koinokulacija sa *ne-Saccharomyces* kvascem ALPHA TD (*T. delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) uz X16 (Zymaflore®, Laffort, FR) u omjeru 10:1 (K4). Fermentacija je praćena tijekom 40 dana, pri srednjoj vrijednosti temperature uzoraka od 21 °C. Rezultati usporedbe aktivnosti kvasaca u uzorcima K1, K2, K3 i K4 prikazuju srednju vrijednost između dvije paralele uzorka u kojemu je provedena AF, a prikazani su grafički na **Slici 11** te na **Slici 12**, dok **Slika 13** grafički prikazuje promjenu specifične brzine fermentacije soka od jabuke kvascem K3 – X16.

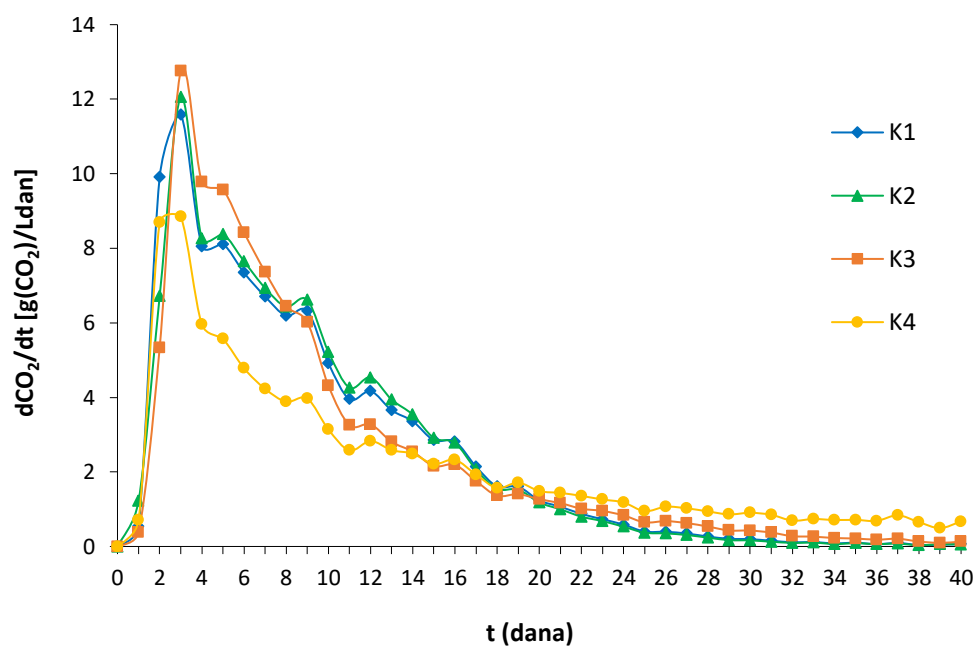
Slika 11 prikazuje fermentacijsku aktivnost kvasaca K1, K2, K3 i K4 te je vidljivo kako je fermentacija započela već prvog dana u svim uzorcima. Nadalje, vidljivo je da je profil krivulje gotovo isti za sve uzorke, no kod uzoraka K4 gdje je izvršena koinokulacija, primjećuje se manji nagib krivulje, što upućuje na to da se u tim uzorcima oslobodilo manje ukupnog CO₂, u odnosu na ostale ispitane uzorke. Sličan trend i oblik krivulje je dobiven u radu Bely i sur. iz 2008. kod istraživanja utjecaja mješovite kulture *Torulasporea delbrueckii* – *Saccharomyces cerevisiae* na fermentaciju s visokim udjelom šećera, gdje je vidljivo da mješovita kultura ima nižu sposobnost fermentacije od čistih kultura kvasaca. Nakon 40 dana AF, masa nastalog CO₂ je gotovo podjednaka u svim ispitanim uzorcima. Kvasac K2 pokazao je najveću katalitičku moć s 103,13 g ukupno nastalog CO₂, slijedi ga uzorak K1 s 103,00 g, zatim uzorak K3 s 101,82 g, a mješovita kultura u uzorku K4 proizvela je najmanje ukupnog CO₂ od 89,51 g.

Slika 12 prikazuje proizvodnju CO₂ u vinu od jabuke unutar intervala od jednog dana te je vidljivo da je najveća brzina nastajanja CO₂, odnosno fermentacije postignuta treći dan

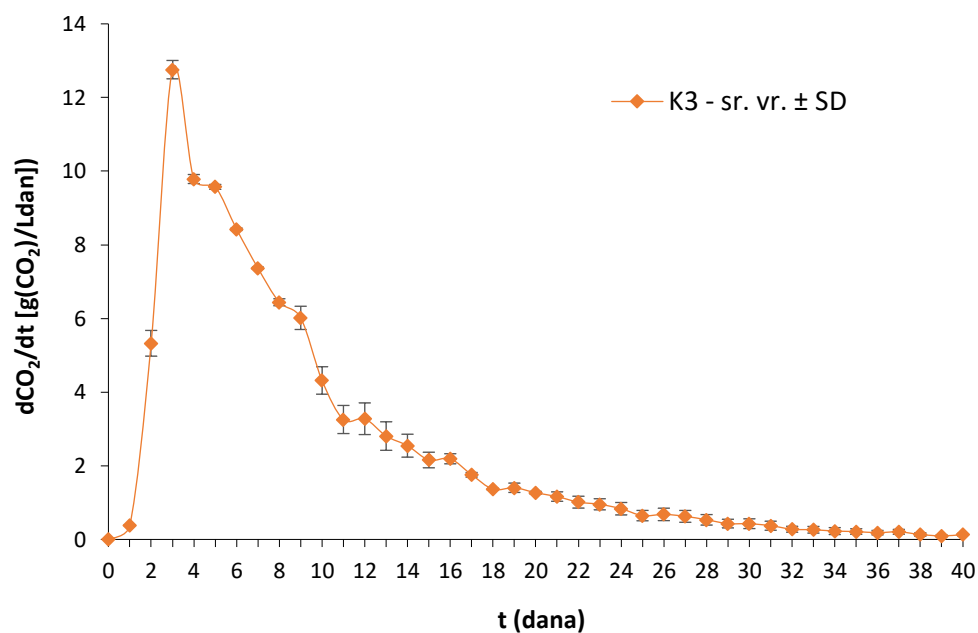
vrenja. Produkcija CO₂ bila je najviša u K3 uzorku i iznosila je 12,76 g (CO₂)/L dan te slijede K2, K1 i K4 uzorci s iznosima od 12,05, 11,58 i 8,85 g (CO₂)/L dan. Faza burnog vrenja trajala je oko tjedan dana, nakon čega slijedi tiho vrenje i usporavanje specifične brzine fermentacije. Vidljivo je iz grafičkog prikaza da se krivulje kvasaca K1 te K2 praktički preklapaju, odnosno njihova je fermentacijska aktivnost gotovo jednaka. Kvasac K3 pokazivao je najveću promjenu specifične brzine fermentacije tijekom prvih osam dana, a nakon toga, veću promjenu specifične brzine fermentacije, sve do osamnaestog dana, pokazuju kvasci K1 te K2 zajedno. Poslije osamnaestog dana pa sve do kraja fermentacije, iako malu vrijednost specifične brzine fermentacije, no veću od svih ostalih kvasaca, pokazuje mješovita kultura kvasaca K4. Razlog tomu je što selekcionirani kvasci K1, K2 i K3 brže provode fermentaciju, odnosno njihova aktivnost se u tome periodu već postupno zaustavlja, dok kvasci K4 još uvijek provode fermentaciju, jer je njihova aktivnost bila sporija u odnosu na ostale ispitane kvasce tijekom alkoholne fermentacije. Sličan trend fermentacijske kinetike imali su Petravić-Tominac i sur. (2013) tijekom proizvodnje voćnog vina od kupine te Husnjak (2019) tijekom proizvodnje voćnog vina od kruške.



Slika 11 Fermentacijska aktivnost odabranih komercijalnih kvasaca 011 BIO (Zymaflore®, Laffort, FR) (**K1**), RMS2 (Actiflore®, Laffort, FR) (**K2**) i X16 (Zymaflore®, Laffort, FR) (**K3**) te ALPHA TD (Zymaflore®, Laffort, FR):X16 (10:1) (**K4**) tijekom proizvodnje voćnog vina od jabuke



Slika 12 Promjene specifične brzine fermentacije soka od jabuke primjenom odabranih komercijalnih kvasaca O11 BIO (Zymaflore®, Laffort, FR) (**K1**), RMS2 (Actiflore®, Laffort, FR) (**K2**) i X16 (Zymaflore®, Laffort, FR) (**K3**) te ALPHA TD (Zymaflore®, Laffort, FR):X16 (10:1) (**K4**)



Slika 13 Promjena specifične brzine fermentacije soka od jabuke kvascem K3 – X16 (točke označavaju srednje vrijednosti ± SD za dvije tikvice s kvascem K3 – paralele)

4.2. UDIO UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST VINA OD JABUKE

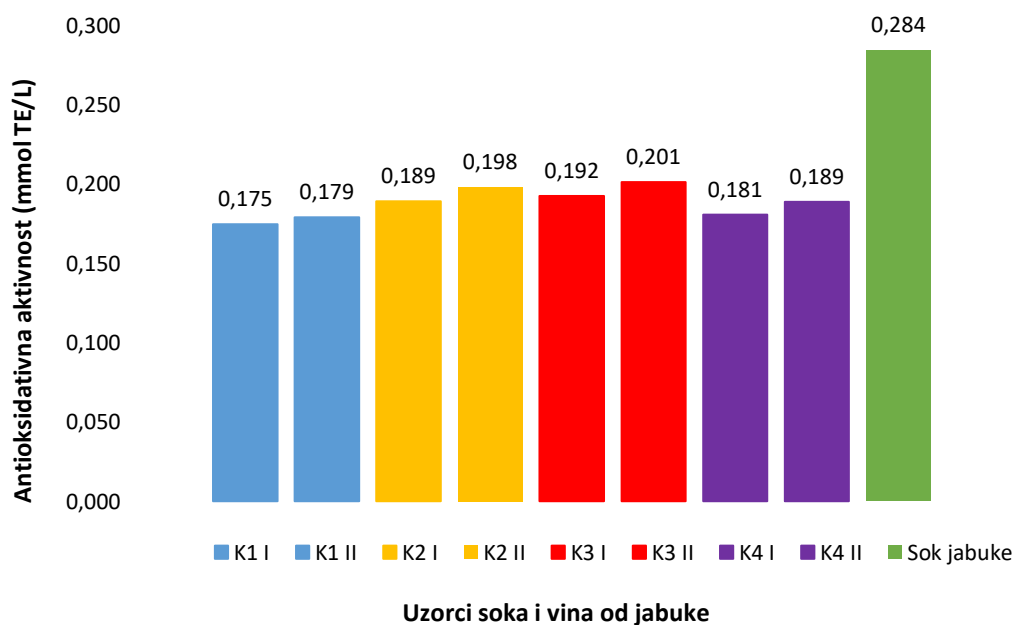
Nakon analize ukupnih polifenola prikazane **Tablicom 2**, vidljivo je da dolazi do smanjenja udjela ukupnih polifenolnih spojeva u vinu od jabuke u odnosu na sok od jabuke. Jabučni sok tako ima najvišu koncentraciju ukupnih polifenola te srednja vrijednost iznosi 204,940 mg galne kiseline/L, a najmanje polifenola je nađeno u K1 I uzorku u iznosu od 121,231 mg galne kiseline/L. Koinokulacija sa *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvascem u uzorcima K4 nije utjecala na koncentraciju ukupnih polifenola, jer nije primijećen značajan pad ili porast same koncentracije. Kelebek i sur. (2009) navode sličan trend smanjenja ukupnih polifenola u voćnom vinu od naranče u odnosu na sok od naranče u svom istraživanju, točnije došlo je do smanjenja koncentracije ukupnih polifenola s 317 mg galne kiseline/L u soku na 162 mg galne kiseline/L u vinu. Čakar i sur. (2016) određivali su ukupne polifenole u jabučnom vinu sa šećerom i u jabučnom vinu bez šećera, a rezultati su pokazali da je koncentracija ukupnih polifenola bila za oko pet puta viša, nego u vinu od jabuke u ovom radu, odnosno 770,89 mg galne kiseline/L za jabučno vino sa šećerom i 584,28 mg galne kiseline/L za jabučno vino bez šećera. Prema Amidžić Klarić i sur. (2020), u analiziranim uzorcima kupinovog vina, ukupni polifenoli kretali su se u rasponu od 868 – 2581 mg galne kiseline/L, što je puno više u odnosu na vina od jabuke. Također, Velić i sur. (2018a) u svom radu odredili su koncentracije ukupnih polifenola u rasponu od 733 – 2698 mg galne kiseline/L za vino od kupine, 584 – 743 mg galne kiseline/L za vino od trešnje te 160 – 470 mg galne kiseline/L za vino od jabuke. Iz navedenih podataka, vidljivo je kako vina od bobičastog voća sadrže veći udio polifenolnih spojeva od voćnog vina od jabuke. S tehnološkog aspekta proizvodnje voćnog vina od jabuke, polifenolni spojevi utječu na razvoj boje, trpkosti, gorčine te neki od njih posjeduju i antioksidativno djelovanje.

Tablica 2 Koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima preračunata na mg/L galne kiseline

| Oznaka uzorka | X ₁ (apsorbancija) | X ₂ (apsorbancija) | UP ₁ (ukupni polifenoli) | UP ₂ (ukupni polifenoli) | Srednja vrijednost ukupnih polifenola |
|---------------|----------------------------------|----------------------------------|--|--|---------------------------------------|
| K1 I | 0,313 | 0,302 | 121,231 | 121,231 | 121,231 |
| K1 II | 0,315 | 0,319 | 126,231 | 127,769 | 127,000 |
| K2 I | 0,348 | 0,349 | 138,923 | 139,308 | 139,120 |
| K2 II | 0,357 | 0,357 | 142,385 | 142,385 | 142,380 |
| K3 I | 0,333 | 0,330 | 133,154 | 132,000 | 132,580 |
| K3 II | 0,341 | 0,350 | 136,231 | 139,692 | 137,960 |
| K4 I | 0,306 | 0,304 | 122,769 | 122,000 | 122,380 |
| K4 II | 0,336 | 0,330 | 129,231 | 132,000 | 130,620 |
| Sok od jabuke | 0,303 | 0,310 | 202,692 | 207,179 | 204,940 |

Na **Slici 14**, za antioksidativnu aktivnost voćnog vina i soka od jabuke, prisutan je isti trend kao i kod određivanih polifenola. Sok od jabuke ima najvišu antioksidativnu aktivnost u vrijednosti od 0,284 mmol TE/L, slijedi ga uzorak K3 II s 0,201 mmol TE/L, a najmanju antioksidativnu aktivnost pokazao je uzorak K1 I u vrijednosti od 0,175 mmol TE/L, iz čega je vidljiva poveznica između ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti, odnosno jabučni sok koji ima najviše polifenola, ističe se i najjačom antioksidativnom aktivnošću. Razlog najviših koncentracija upravo u neprerađenom soku, najvjerojatnije leži u tome što se dio polifenola gubi tijekom fermentacije. S druge strane, u istraživanju koje su proveli Heinonen i sur. (1998), gdje su određivali antioksidativnu aktivnost za preko 44 različita voćna vina, nije ustanovljena korelacija ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti. No, rezultati su pokazali da svi uzorci voćnih vina (vina od bobičastog voća te vina od jabuke) posjeduju značajno antioksidativno djelovanje. Kalkan Yildirim (2006) izvijestio je o smanjenju antioksidativne aktivnosti voćnih vina ovim redoslijedom: vino od borovnice, kupine, crnog dudu, višnje, jagode, maline, marelice, dunje, jabuke i naposljetku, dinje. Slično tome, Ljevar i sur. (2016) izvijestili su da vina od kupine, višnje, maline i crnog ribiza imaju značajno veći antioksidativni kapacitet od vina od jagode i jabuke. Potvrđena je jaka pozitivna korelacija između udjela polifenola u voćnim vinima i njihove antioksidativne aktivnosti. Tako su vina od kupine, višnje i crnog ribiza s najvećim udjelom ukupnih polifenola, očekivano, pokazala

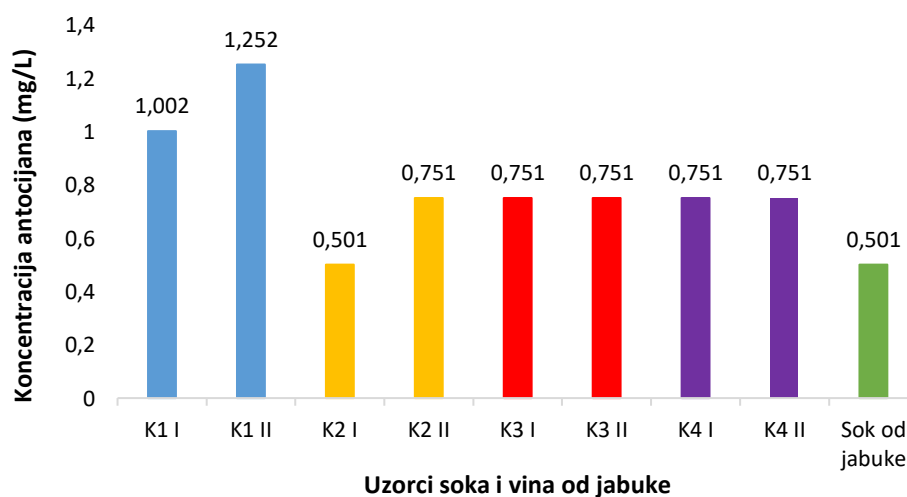
najveću antioksidativnu aktivnost. No, unatoč nešto nižem sadržaju ukupnih polifenola u vinu od maline, antioksidativni kapacitet bio je u skladu s trima gore navedenim vinima. Ovi rezultati upućuju na to da bi neki pojedinačni polifenolni spojevi ili skupine ovih spojeva, osobito ako su prisutni u većem omjeru u ukupnom sadržaju polifenola, mogli pridonijeti antioksidativnim svojstvima vina. Na primjer, pokazalo se da se veliki postotak antioksidativne moći crnog vina može izravno povezati s njegovim koncentracijama flavonoida i katehina. Također, skupini slobodnih antocijana se isto pridaje velika važnost. Unatoč tome, antioksidativni kapacitet voćnih vina nije bio u korelaciji s određenom fenolnom skupinom (antocijani, fenolne kiseline, ukupni flavan-3-oli ili kvercetin). Međutim, doprinos ovih skupina u odnosu na njihove relativne količine i predloženu antioksidacijsku učinkovitost, kao i njihov sinergistički učinak u ukupnom antioksidativnom kapacitetu vina, ne može se isključiti.



Slika 14 Antioksidativna aktivnost soka od jabuke te vina od jabuke izražena kao mmol TE/L određena DPPH metodom

4.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ANTOCIJANA

Koncentracija antocijana u mg/L u soku od jabuke te u uzorcima vina prikazana je grafički na **Slici 15**. Vidljivo je da je najviše antocijana pronađeno u uzorku K1 II u koncentraciji od 1,252 mg/L, a najmanju koncentraciju imali su sok od jabuke i uzorak vina K2 I od 0,501 mg/L. Ruta i Farcasanu (2019) navode kako tijekom vrenja, antocijani prolaze kroz različite biotransformacije te stupaju u kemijske reakcije s drugim spojevima prisutnima tijekom procesa fermentacije, što može dovesti do stabilizacije ili povećanja koncentracije antocijana u finalnom proizvodu. Alpeza (2008) navodi kako u mladim vinima njihova koncentracija može biti visoka (preko 1 g/L), no zbog brojnih reakcija u kojima sudjeluju (prvenstveno s drugim polifenolima), njihov sadržaj opada dozrijevanjem. S druge strane, istraživanja su pokazala kako može doći do povećanog gubitka antocijana tijekom proizvodnje vina i procesa dozrijevanja, koje može biti uzrokovano različitim mehanizmima, uključujući kopigmentaciju, polimerizaciju ili oksidaciju (Liu i sur., 2015). Iako su vrijednosti koncentracija dobivene u ovom radu male, nasuprot drugih istraživanja su vrlo značajne. Ljevar i sur. (2016) ustanovili su u svom radu da najviše antocijana ima vino od crnog ribiza, zatim vino od višnje, maline, kupine i jagode, dok u vinu od jabuke antocijani nisu bili utvrđeni. Isto tako, Velić i sur. (2018a) nisu pronašli antocijane u vinu od jabuke. U istraživanju na uzorcima kupinovog vina kojeg su proveli Amidžić Klarić i sur. (2020), koncentracija antocijana kretala se u širokom rasponu od 5,07 mg/L do 217 mg/L. Iz navedenih podataka, vidljivo je da vina od jabuke sadrže značajno manje koncentracije antocijana, u odnosu na vina od bobičastog voća.



Slika 15 Koncentracija antocijana u mg/L u soku i vinu od jabuke

4.4. FIZIKALNO-KEMIJSKI POKAZATELJI KAKVOĆE VOĆNOG VINA OD JABUKE

Rezultati provedene fizikalno-kemijske analize voćnog vina od jabuke dani su u **Tablici 3**. Uočeni je manji sadržaj alkohola kod uzoraka s mješovitom kulturom kvasaca (ALPHA TD i X16) (K4 I i K4 II), a samim time takvi uzorci imaju i veći sadržaj neprevrelog šećera, u odnosu na ostale ispitane uzorke s čistim starter kulturama. Svi dobiveni uzorci voćnog vina od jabuke zadovoljavaju Pravilnik o vinarstvu (NN 81/22).

Tablica 3 Rezultati analize fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće vina od jabuke nakon provedenih mikrofermentacija

| Oznaka uzorka | Sadržaj alkohola (vol %) | Sadržaj ukupnog suhog ekstrakta (g/l) | Sadržaj ukupnih kiselina (g/l) | Sadržaj hlapivih kiselina (g/l) | Sadržaj ukupnog sumporovog dioksida (mg/l) | Sadržaj slobodnog sumporovog dioksida (mg/l) | pH | Ukupni šećeri (g/l) | Sadržaj neprevrelog šećera (g/l) |
|---------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--|--|------|---------------------|----------------------------------|
| K1 I | 12,65 | 20,30 | 4,88 | 0,62 | 40,96 | 22,40 | 3,73 | 1,92 | 1,60 |
| K1 II | 12,78 | 20,20 | 5,18 | 0,66 | 34,56 | 20,48 | 3,74 | 1,92 | 1,60 |
| K2 I | 12,62 | 21,20 | 5,18 | 0,57 | 40,96 | 21,76 | 3,73 | 2,55 | 1,59 |
| K2 II | 12,67 | 21,30 | 5,25 | 0,59 | 38,40 | 21,12 | 3,75 | 1,90 | 1,62 |
| K3 I | 12,48 | 21,70 | 5,18 | 0,71 | 35,84 | 21,76 | 3,76 | 2,47 | 1,54 |
| K3 II | 12,52 | 21,00 | 5,18 | 0,71 | 32,00 | 21,12 | 3,76 | 2,55 | 1,59 |
| K4 I | 11,09 | 44,50 | 5,48 | 0,66 | 40,96 | 19,20 | 3,72 | 38,90 | 20,80 |
| K4 II | 11,14 | 44,80 | 5,40 | 0,66 | 42,24 | 19,84 | 3,71 | 41,37 | 21,60 |

5. ZAKLJUČCI

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

Proizvedeno voćno vino od jabuke zadovoljava parametre kakvoće vina propisane Pravilnikom o vinarstvu (NN 81/22).

Tijekom provedbe mikrofermentacija, najveću količinu ukupnog CO₂ proizveo je komercijalni kvasac Actiflore® RMS2 (intenzivnija fermentacija), dok je mješovita kultura kvasaca Zymaflore® ALPHA TD i Zymaflore® X16 proizvela najmanje ukupnog CO₂.

Odabrani komercijalni kvasac Zymaflore® X16 imao je veću specifičnu brzinu fermentacije na samom početku vrenja (treći dan fermentacije), dok su nakon faze burnog vrenja (deveti dan fermentacije) veću specifičnu brzinu fermentacije imali kvasci Actiflore® RMS2 te Zymaflore® 011 BIO.

Mješovita kultura odabranih komercijalnih kvasaca Zymaflore® ALPHA TD i Zymaflore® X16 pogodna je za proizvodnju poluslatkih te slatkih voćnih vina od jabuke s nižim udjelom alkohola.

Nakon provedene alkoholne fermentacije, došlo je do smanjenja udjela ukupnih polifenola u vinu od jabuke u odnosu na sok, pri čemu nije utvrđena jasna korelacija između koncentracije ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti.

Uzorak voćnog vina od jabuke proizveden pomoću kvasca Actiflore® RMS2 ima najveći sadržaj ukupnih polifenola, dok najvišu antioksidativnu aktivnost ima uzorak proizveden pomoću kvasca Zymaflore® X16.

Utvrđeno je povećanje koncentracije antocijana u svim uzorcima proizvedenog voćnog vina od jabuke u odnosu na polazni sok od jabuke. Najveća koncentracija antocijana izmjerena je u uzorcima voćnog vina od jabuke koja su proizvedena pomoću odabranog komercijalnog kvasca Zymaflore® 011 BIO.

6. LITERATURA

- AICV, European Cider and Fruit Wine Association: *European cider trends 2021*. AICV, Brussels, 2021.
- Alpeza I: Temelji kemijskog sastava vina. *Glasnik zaštite bilja* 6, 147, 2008.
- Amidžić Klarić D, Klarić I, Mornar A, Velić D, Velić N: Blackberry wines mineral and heavy metal content determination after dry ashing: multivariate data analysis as a tool for fruit wine quality control. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 67:514-523, 2016.
- Amidžić Klarić D, Klarić I, Mornar A, Velić N, Velić D: Assessment of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of blackberry wines. *Foods* 9:1623, 2020.
- Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D: Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122:312–320, 2008.
- Caridi A, Cufari A, Lovino R, Palumbo R, Tedesco I: Influence of yeast on polyphenol composition of wine. *Food Technology and Biotechnology* 42:37-40, 2004.
- Ciani M, Comitini F, Mannazzu I: Fermentation. *Encyclopedia of Ecology*, 1548-1557. Academic Press, 2008.
- Coton E, Coton M, Guichard H: Cider (Cyder; Hard Cider): The Product and Its Manufacture. *Encyclopedia of Food and Health*, 119–128. Elsevier Ltd, Amsterdam, 2016.
- Čakar U, Petrović A, Živković M, Vajs V, Milovanović M, Zeravik J, Djordjevic B: Phenolic profile of some fruit wines and their antioxidant properties. *Chemistry and Industry* 70:661–672, 2016.
- Čuš F i Jenko M: Influence of yeast on quality of Gewürztraminer wine, *Food Technology and Biotechnology* 51:547–553, 2013.
- Downing DL: Apple cider. *Processed Apple Products*, 168-186, Springer, New York, 1989.
- Heinonen IM, Lehtonen PJ, Hopia AI: Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:25-31, 1998.

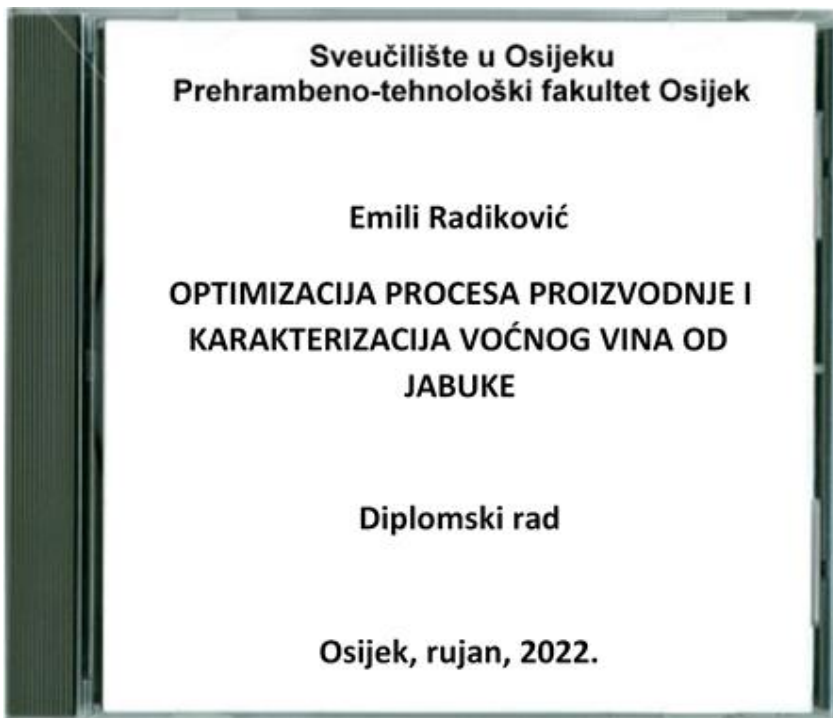
- Husnjak B: Optimizacija procesa proizvodnje i karakterizacija voćnog vina od kruške. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2019.
- Jain BP, Goswami SK, Pandey S: Chapter 2 – Carbohydrate. *Protocols in Biochemistry and Clinical Biochemistry*, 5-22. Academic Press, 2021.
- Jemrić T, Šindrak Z, Skendrović Babojelić M, Fruk G, Mihaljević Žulj M, Jagatić Korenika AM: *Proizvodnja jabučnog vina na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima*, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, 2008.
- Kalkan Yildirim H: Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57:47–63, 2006.
- Kelebek H, Selli S, Canbas A, Cabaroglu T: HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal* 91:187-192, 2009.
- Kolb E, Demuth G, Schurig U, Sennewald K: *Voćna vina – Proizvodnja u kućanstvu i obrtu*. ITD Gaudeamus d.o.o., Požega, 2007.
- Kosseva MR, Joshi VK, Panesar PS: *Science and technology of fruit wine production*, Elsevier, 2017.
- Liu S, Yang H, Li S, Zhang J, Li T, Zhu B, Zhang B: Polyphenolic compositions and chromatic characteristics of bog bilberry syrup wines. *Molecules* 20:19865–19877, 2015.
- Ljevar A, Ćurko N, Tomašević M, Radošević K, Gaurina Srček V, Kovačević Ganić K: Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cytotoxicity assessment of fruit wines. *Food Technology and Biotechnology* 54:145–155, 2016.
- Malakar S, Paul SK, Pou KRJ: Biotechnological Interventions in Beverage Production. *The Science of Beverages Volume 19: Biotechnological Progress and Beverage Consumption*, 1-37. Elsevier Science, 2019.

- Marsico AD, Perniola R, Cardone MF, Velenosi M, Antonacci D, Alba V, Basile T: Study of the influence of different yeast strains on red wine fermentation with NIR spectroscopy and principal component analysis. *J. 1:133-147*, 2018.
- Mendoza-Wilson AM, Castro-Arredondo SI, Espinosa-Plascencia A, Robles-Burgueño Mdel R, Balandrán-Quintana RR, Bermúdez-Almada Mdel C: Chemical composition and antioxidant-prooxidant potential of a polyphenolic extract and a proanthocyanidin-rich fraction of apple skin. *Heliyon 2:e00073*, 2016.
- Miljković I: *Jabuka*. Vlastita naknada autora, Zagreb, 2021.
- Monro TM, Moore RL, Nguyen MC, Ebendorff-Heidepriem H, Skouroumounis GK, Elsey GM, Taylor DK: Sensing free sulfur dioxide in wine. *Sensors 12:10759–10773*, 2012.
- Moreno J, Peinado R: *Enological chemistry*, 53-77, Elsevier, 2012.
- MP, Ministarstvo poljoprivrede: *Pravilnik o vinarstvu*. Narodne novine 81/22, 2022.
- MPŠ, Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva: *Pravilnik o vinu*. Narodne novine 96/96, 07/97, 117/97, 57/00, 2000.
- MPŠVG, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva: *Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina*. Narodne novine 106/04, 2004.
- Petravić-Tominac V, Mesihović A, Mujadžić S, Lisičar Vukušić J, Oros D, Velić D, Velić N, Srećec S, Zechner Krpan V, Petrović Z: Production of blackberry wine by microfermentation using commercial yeasts Fermol Rouge and Fermol Mediterranée. *Agriculturae Conspectus Scientificus 78:49-55*, 2013.
- Radovanović V: *Tehnologija vina*. Građevinska knjiga, Beograd, 1986.
- Ramírez M, Velázquez R: The yeast *Torulaspora delbrueckii*: An interesting but difficult-to-use tool for winemaking. *Fermentation 4:94*, 2018.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A: *Handbook of Enology Volume 1: The microbiology of wine and vinifications*. John Wiley & Sons Ltd., Paris, 2000.

- Ruta LL, Farcasanu IC: Anthocyanins and anthocyanin-derived products in yeast-fermented beverages. *Antioxidants* 8:182, 2019.
- Tomić A, Stublić K, Štambuk P, Fruk G, Mihaljević Žulj M: Utjecaj kvasaca na kakvoću voćnog vina od šljive. *Glasnik zaštite bilja*, 72-78, 2021.
- Velić D, Amidžić Klarić D, Velić N, Klarić I, Petravić-Tominac V, Mornar A: Chemical constituents of fruit wines as descriptors of their nutritional, sensorial and health-related properties. *Descriptive Food Science*, 59-91. IntechOpen, 2018a.
- Velić D, Velić N, Amidžić Klarić D, Klarić I, Petravić-Tominac V, Kosmerl T, Vidrih R: The production of fruit wines – a review. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 10:279-290, 2018b.
- Vine RP, Harkness EM, Browning T, Wagner C: *Winemaking – From grape growing to market place*, Chapman & Hall, New York, 1997.
- Wang D, Xu Y, Hu J, Zhao G: Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing* 110:340–346, 2004.
- Wicklund T, Guyot S, Le Quéré JM: Chemical composition of apples cultivated in Norway. *Crops* 1:8-19, 2021.

7. PRILOZI

Prilog 1 Izgled omota CD-a za diplomski rad



Prilog 2 Izgled prednje strane CD-a za diplomski rad

