

# Utjecaj različitih vinskih kvasaca na kvalitetu destilata od jabuke i sibirske borovnice

---

Smoljan, Alen

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:109:544591>

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

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

REPOZITORIJ

PTF OS

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**

**Alen Smoljan**

**UTJECAJ RAZLIČITIH VINSKIH KVASACA NA KVALITETU DESTILATA  
OD JABUKE I SIBIRSKJE BOROVNICE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, siječanj, 2023.

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

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Tehnologija jakih alkoholnih pića

**Tema rada** je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022.) održanoj 27. svibnja 2022.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ante Lončarić

**Komentor:** prof. dr. sc. Darko Velić

**Utjecaj različitih vinskih kvasaca na kvalitetu destilata od jabuke i sibirске borovnice**

*Alen Smoljan, 0113143798*

**Sažetak:** Rakija od voća je jako alkoholno piće proizvedeno isključivo alkoholnom fermentacijom i destilacijom mesnatih plodova voća ili mošta od voća, bobica ili zelenih dijelova, destilirano na manje od 86% vol. alkohola tako da ima miris i okus destilirane sirovine. Cilj predloženog rada je istražiti utjecaj odabranih komercijalnih kvasaca roda *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* vinskih kvasaca, korištenih tijekom alkoholne fermentacije, na pojedine hlapljive spojeve srednjeg toka destilata dobivenog destilacijom vina od jabuke odnosno vina od sibirске borovnice. Najveća koncentracija alkohola etanola kod destilata sibirске borovnice se postiže korištenjem mješovite kulture kvasaca ALPHA TD (*Torulasporea delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) i FX10. Dok se kod destilata jabuke najveća koncentracija alkohola etanola postiže korištenjem kvasca 011 BIO (Zymaflore®, Laffort, FR).

**Ključne riječi:** rakija, destilacija, jabuka, haskap

**Rad sadrži:** 56 stranica  
14 slika  
11 tablica  
0 priloga  
32 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Datum obrane:** 30. siječnja 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

### Graduate program Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Technology of alcoholic beverages

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII. held on May 27, 2022

**Mentor:** *Ante Lončarić*, PhD, Associate professor

**Co-mentor:** *Darko Velić*, PhD, Full professor

### Influence of Different Wine Yeasts on the Quality of Apple and Siberian Blueberry Distillates

*Alen Smoljan, 0113143798*

**Summary:** Fruit brandy is a strong alcoholic drink produced exclusively by alcoholic fermentation and distillation of fleshy fruits or most of fruit, berry or green parts, distilled to less than 86 % alcohol by volume so that it has the smell and taste of the distilled raw material. The aim of the study was to investigate the influence of selected *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wine yeast, used during fermentation, on certain volatile compounds of the middle stream of fine spirit obtained by distillation of apple wine and haskap wine. The highest concentration of alcohol at haskap distillate is achieved by mixed culture of yeast ALPHA TD (*Torulasporea delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) and FX10. While with apple distillate the highest concentration is achieved by yeast 011 BIO (Zymaflore®, Laffort, FR).

**Key words:** brandy, distillation, apple, haskap

**Thesis contains:** 56 pages  
14 figures  
11 tables  
0 supplements  
32 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |                                                   |                       |
|---------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. <i>Natalija Velić</i> , PhD, prof.             | chair person          |
| 2. <i>Ante Lončarić</i> , PhD, associate prof.    | supervisor            |
| 3. <i>Darko Velić</i> , PhD, prof.                | member- co supervisor |
| 4. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof. | Stand-in              |

**Defense date:** January 30, 2023.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Najprije bih se želio zahvaliti svojim roditeljima što su mi bili podrška tijekom cijelog obrazovanja, motivirali me i poticali da uvijek težim boljem te njima pripada veliki dio zasluga za ovaj uspjeh.

Zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Anti Lončariću koji mi je omogućio svu potrebnu opremu i puno pomogao svojim korisnim savjetima i sugestijama tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Puno hvala mojim prijateljima, prijateljicama (d.b.o) i ostalim kolegama uz koje je studiranje bilo lakše i zabavnije.

## Sadržaj

1. UVOD .....	2
2. TEORIJSKI DIO .....	4
2.1. Jabuka .....	4
2.1.1. Berba i priprema sirovina .....	5
2.1.2. Muljanje plodova .....	6
2.1.3. Alkoholno vrenje masulja ili soka .....	7
2.2 Haskap .....	8
2.2.1. Berba, probiranje i pročišćavanje .....	10
2.2.2. Usitnjavanje i prešanje.....	10
2.2.3. Alkoholno vrenje soka ili masulja .....	10
2.3. Voćne rakije.....	10
2.3.1. Određivanje šećera .....	11
2.4. Fermentacija .....	14
2.5. <i>Saccharomyces</i> kvasci .....	19
2.6. <i>Ne-Saccharomyces</i> vinski kvasci.....	23
2.7. Destilacija .....	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	33
3.1. Zadatak.....	34
3.2. Materijali i metode.....	34
3.2.1. Sirovine .....	34
3.2.2 Postupak destilacije .....	34
3.2.3. Određivanje hlapivih spojeva plinskom kromatografijom .....	40
3.2.4. Određivanje udjela etanola .....	41
3.2.5. Određivanje hlapivih srodnih spojeva .....	42
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	45
4.1. Rezultati analize hlapivih spojeva haskape .....	46
4.2. Rezultati analize hlapivih spojeva Jabuke .....	49
5. ZAKLJUČAK.....	51
6. LITERATURA.....	53

## **1. UVOD**

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09), voćna rakija je jako alkoholno piće koje se stavlja na tržište kao gotov proizvod sa najmanje 37,5 % vol. alkohola. Dobiveno je isključivo fermentacijom i destilacijom voćne komine, odnosno mesnatih plodova voća te se ne smije aromatizirati. Smije sadržavati samo dodani karamel kao sredstvo za prilagodbu boje.

Voćne rakije u usporedbi s drugim vrstama jakih alkoholnih pića sadrže najviše hlapivih spojeva: esteri, aldehidi, viši alkoholi, hlapive kiseline. Kako bi se dobila voćna rakija zadovoljavajuće kvalitete, sirovina mora biti kvalitetna i odgovarajućeg kemijskog sastava te svaki od postupaka proizvodnje mora biti pravilno proveden.

Kvasci imaju značajnu ulogu u formiranju arome, ukoliko se radi o kontroliranoj alkoholnoj fermentaciji tada će formiranje arome ovisiti o kvaliteti i osobinama odabrane starter kulture. Korištenjem ne-*Saccharomyces* kvasaca ostvaruje se pozitivan učinak na kompleksnost i sastav arome. Zbog slabije otpornosti ovih kvasaca na etanol, alkoholnu fermentaciju nije moguće provesti do kraja te ih je stoga nužno koinokulirati s kvascima roda *S. cerevisiae* koji će dovršiti alkoholnu fermentaciju.

Tradicionalnom destilacijom u jednostavnim uređajima provodi se destilacija uz izdvajanje tri glavne frakcije od kojih je najbitnija srednja frakcija, jer se u njoj nalaze hlapivi spojevi u povoljnom omjeru koji doprinose pozitivnim organoleptičkim svojstvima destilata, odnosno rakije.

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj odabranih *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvasaca na pojedine hlapive spojeve srednje frakcije destilata dobivenog destilacijom vina od jabuke i vina od sibirske borovnice.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Jabuka

Jabuka (*Malus domestica*) je listopadno stablo iz porodice ruža (*Rosaceae*). Stablo može narasti i do 12 metara u visinu tvoreći gustu i razgranatu krošnju. Plod je okruglast, jezgričav, obično veći od 5 cm, zelene, žućkaste ili crvenkaste boje, na vrhu s ostacima čaške. Sadrži sjemenke koje su ovalno izdužene, suženog vrha, duge oko 7 mm. Dozrijeva ljeti ili u ranu jesen. Uzgaja se širom svijeta te je najviše uzgajana vrsta iz roda *Malus*. Jabuka je najrasprostranjenija voćka u Hrvatskoj te se najviše proizvodi u kontinentalnom dijelu. Biokemijska, fizikalna i organoleptička svojstva određuju kvalitetu ploda jabuke, dok su kod potrošača ipak najvažnija tekstura i okus (Abbott i sur., 2004.).

Jabuka u prosjeku sadrži 20 % suhe tvari i 80 % vode, dok se prosječan udio šećera kreće od 3 do 15 % ovisno o stupnju zrelosti i sorti.

Jabuka se smatra vrjednija kao voće za konzumiranje u svježem stanju nego kao sirovina za voćne rakije. Zbog toga se za proizvodnju rakije upotrebljavaju jabuke druge ili treće klase koje mogu biti oštećene, djelomično trule i prezrele. Postoji puno sorti jabuka od kojih se može proizvoditi rakija, ali ipak za kvalitetu rakije bitno je koliko su bogate šećerima i kiselinama i u takve sorte spadaju 'Zlatni Delišeš' i 'Jonatan' (Banić, 2006).

Tehnološki postupak prerade jabuke u rakiju obuhvaća slijedeće operacije:

- Berba plodova,
- Pranje jabuka,
- Muljanje jabuka,
- Alkoholno vrenje masulja ili soka,
- Destilacija prevrelog masulja,
- Odležavanje, dozrijevanje i dorada rakije (finalizacija).



**Slika 1** Plod jabuke (Izvor: Web 1)

### **2.1.1. Berba i priprema sirovina**

Kako bi se postigao najveći sadržaj šećera i stvaranje potrebnih aroma u jabukama za proizvodnju rakija, jabuke treba ostaviti na stablu što je moguće dulje. Berba se provodi ručno kako bi se smanjilo nepotrebno oštećenje plodova, ali uslijed nedostatka radne snage i olakšavanja berbe provodi se i strojno ubiranje plodova. Prilikom branja plodova bitno je ukloniti i peteljku jer ukoliko se ne uklone iz komine, tijekom fermentacije dolazi do neugodnog i lošeg mirisa uslijed oslobađanja nekih tvari iz peteljke. Tijekom destilacije i dobivanja destilata te tvari prelaze u destilat (rakiju) zbog čega se ne može dobiti rakija vrhunske kvalitete. Prije daljnje prerade plodove treba najprije oprati vodom čime se uklanjaju razne nečistoće koje bi mogle u daljnjem postupku dati rakiji nepoželjne mirise.

### **2.1.2. Muljanje plodova**

Muljanje plodova je potrebno provesti kako bi dobili homogenu kašu i time oslobodili šećer koji postaje dostupniji kvascima tijekom fermentacije. Ukoliko bi se koristio cijeli plod onda bi se vrlo sporo otpuštao sok iz plodova čime bi fermentacija trajala jako dugo, a šećer u jabukama se ne bi uspio u potpunosti pretvoriti u alkohol. Muljanje se provodi muljačom s valjcima, a može se obaviti i mlinovima za voće. Prilikom muljanja važno je odstraniti koštice, prolaskom preko sita, kako bi se spriječilo da komina dobije gorak okus, a time i rakija, što bi

bilo nepoželjno. Dobiveni jabučni masulj se prebacuje u posude u kojima se odvija vrenje i prema potrebi dodaje voda da se dobije žitka smjesa, a voda koja se dodaje može biti i topla čime ćemo podesiti željenu temperaturu masulja. Nakon muljanja slijedi alkoholno vrenje masulja, destilacija prevrelog masulja i na kraju odležavanje, dozrijevanje i finalizacija rakije.



Slika 2 Muljača za voće (Izvor: Web 2)

### **2.1.3. Alkoholno vrenje masulja ili soka**

Prije početka ili neposredno nakon početka alkoholnog vrenja masulja od jabuke preporučljivo je podešavanje kiselosti na pH vrijednost u rasponu 3,2 do 3,8. Podešavanje se provodi upotrebom kiselinskih pripravaka pri čemu se treba pridržavati uputa proizvođača. Moguć je i dodatak koncentrirane sumporne kiseline za podešavanje kiselosti. Nakon dodatka kiseline masulj je potrebno dobro izmiješati kako bi došlo do ravnomjerne raspodjele kiselina. Podešavanje kiselosti se preporučuje iz razloga što je jabuka relativno siromašna kiselinama i zbog toga može doći do razvoja mliječno kiselinskih bakterija u masulju, a to onda vodi fermentaciju u nepoželjni smjer i stvaranju nepoželjne arome. Jabuka je isto tako i siromašna spojevima s dušikom koji su važni za rast i razvoj kvasaca, ukoliko je niži udio dušičnih spojeva u masulju može doći do zastoja u procesu vrenja. Udio dušičnih spojeva u soku jabuke direktno

utječe na rast kvasaca i brzinu fermentacije (Albertil i sur., 2011). Jabučni sokovi sa 122, 59 i 163 mg/L dušika pokazali su maksimalan sadržaj od  $4,42 \times 10^7$ ;  $2,05 \times 10^7$  i  $8,66 \times 10^7$  CFU/mL. Stoga maksimalna brzina fermentacije bila je ovisna o početnoj razini dušika što odgovara 5,1; 1,4, i 9,2 g/L etanola u danu. Kao izvor dušika može se dodati amonijev sulfat, amonijev hidrogenfosfat, amonijev dihidrogenfosfat ili otopina amonijaka (Banić, 2006).

**Tablica 1** Poželjan kemijski sastav jabučnog mošta (Jerčić i sur., 2014)

<b>Organske tvari</b>	<b>Udio</b>
Fruktoza	70 – 110 g/L
Glukoza	15 – 30 g/L
Saharoza	20 – 45 g/L
Škrob	0 g/L (u nezrelim jabukama ga može biti do 2%)
Pektin	1 – 10 g/L
Aminokiseline*	0,5 – 2,0 g/L
Klorogenska kiselina	0,3 – 0,7 g/L
Epikatehin i procijadini	1,0 – 2,0 g/L
<b>Anorganske tvari</b>	
Kalij	1,2 g/L
<b>Kiselost i kiseline</b>	
pH	3,3 – 3,8
ukupna kiselost**	3 – 5 g/L

\*od aminokiselina najzastupljeniji su oblici asparaginske kiseline (aspartat/asparagin)

\*\* ukupna kiselost je izražena kao jabučna kiselina

Važno je da jabučni masulj čim prije prevrije kako bi se smanjila mogućnost nepoželjnih procesa u masulju što bi se odrazilo na kvalitetu rakije nakon destilacije.

## 2.2. Sibirska borovnica (haskap)

Sibirska borovnica (*Lonicera caerulea*) je nova vrsta bobičastog voća u Europi no duga tradicija uzgoja ove vrste vidljiva je u sjeveroistočnoj Aziji. U prirodi raste u Rusiji (Kamčatka i Sibir), Japanu i Kini te u tim državama postoji duga tradicija uzgoja. Kako je donedavno haskap bila nedovoljno poznata vrsta u Hrvatskoj tako ne postoji općeprihvaćeni naziv za ovu novu jagodičastu vrstu na europskom tlu. Haskap je izvorno ime iz naroda Ainu naroda s otoka Hokkaido u Japanu.

Haskap spada u kozokrvine (*Caprifoliaceae*) što je biljni rod poznat po ukrasnom grmlju. Otuda i hrvatski naziv za ovu vrstu, modra kozokrvina, ali može se još naći pod nazivom kamčatska borovnica, kamčatska jagoda, majska jagoda, sibirski borovnica. Iako bi se u skladu sa službenom taksonomijom hrvatske flore ovu vrstu trebalo nazivati modra kozokrvina (flora Croatica Database), nema razloga da u skladu s kozmopolitskom naravi današnjeg svijeta, i mi u Hrvatskoj ovu vrstu ne nazivamo originalnim Ainu imenom: haskap.

Haskap je listopadni grm koji može narasti do 3 metra u visinu te 1,5 metara u širinu, dugovječna je biljka te može doživjeti 25 – 30 godina. Izrazito je otporna na niske temperature te može podnijeti temperature do -47°C, ima rani cvat pri čemu otvoreni cvjetovi mogu preživjeti do -10°C. Punu rodnost grm haskapa daje sa 6 godina starosti pri čemu po jednom grmu može biti 3 do 5 kilograma ploda. Plod haskapa dozrijeva vrlo rano, već u svibnju što je najranije voće koje dolazi u stadij zrelosti nakon zimskog mirovanja. Plod je izduljenog oblika bobice plavo ljubičaste boje promjera 0,5 do 1 cm te dužine 2 – 3 cm. Meso zrelog ploda je tamnoljubičaste boje, slatko-kiselog okusa. Izrazito je bogat vitaminima, prije svega, A, E i C te antioksidansima i željezom. Plodovi su sitni 1 – 2 grama te su vrlo mekani i ne mogu se čuvati duže vremena, a budući da plod rano sazrijeva najčešće se konzumira sirov, ali se isto tako prerađuje u džemove, voćne sokove i sirupe, koristi se i u izradi sladoleda i jogurata te se može preraditi i u voćno vino.



**Slika 3.** Plod haskapa (Izvor: Web 3)

Sadrži 12 – 18 % suhe tvari od čega je 10 – 15 % šećera (Rupasinghe i sur. 2012).

Tehnološki postupak prerade haskapa u rakiju uključuje slijedeće operacije:

- Berba, probiranje i pročišćavanje,
- Usitnjavanje i prešanje
- Alkoholno vrenje soka ili masulja,
- Destilacija prevrelog masulja,
- Odležavanje, dozrijevanje i završna izrada rakije.

### **2.2.1. Berba, probiranje i pročišćavanje**

Berba se obavlja polovicom svibnja budući da rano dozrijeva. Beru se samo zdravi i zreli plodovi jer nezreli, oštećeni i truli plodovi smanjuju kvalitetu finalnog proizvoda. Bobičasto

voće često se prerađuje bez pranja, ali u slučaju prljavog materijala potrebno je provesti pranje pod blagim mlazom vode kako bi se smanjio rizik od nepoželjnih senzorskih karakteristika.

### **2.2.2. Usitnjavanje i prešanje**

Plodovi se usitnjavaju na mlinovima za voće kako bi se što više soka izdvojilo iz plodova. Nakon što se završi usitnjavanje vrši se prešanje masulja na prešama raznih oblika, a veličina čestica voćne mase regulira se veličinom rupica na plaštu (Kolb i sur., 2007). Primijenjeni tlak utječe na iskorištenje soka, bitno je postepeno povećanje tlaka u vremenskim intervalima dok visina tlaka nije toliko bitna. Budući da jagodičasto voće ima relativno visok udio pektina preporučuje se dodatak pektinaza tijekom prerade kako ne bi nastali jako viskozni supstrat koji se teško preša. Dodaju se i pektolitički enzimi koji olakšavaju prešanje i povećavaju iskoristivost soka. Nakon prešanja dobijemo mošt, izdvojena je tekuća frakcija od krute.

### **2.2.3. Alkoholno vrenje soka ili masulja**

S obzirom na vrstu voća provodi se vrenje soka (mošta) ili vrenje usitjenog voća (masulja). Treba provesti namještanje pH na 3,0 do 3,5 te se preporučuje i dodatak hrane za kvasce kako bi se proces fermentacije pravilno odvijao. Vrenje komine treba provesti postupno na temperaturi od 20 do 24 °C.



### 2.3. Voćne rakije

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) voćne rakije su proizvodi dobiveni isključivo alkoholnom fermentacijom i destilacijom mesnatih plodova voća ili mošta od voća, bobica ili zelenih dijelova. Destilat mora sadržavati manje od 86 % alkohola te imati aromu i okus destilirane sirovine. Na tržište se stavlja rakija alkoholne jakosti od najmanje 37,5 % te se ne smije aromatizirati. Dozvoljeno je jedino dodavanje karamela kao sredstvo za prilagodbu boje.

Za proizvodnju voćnih rakija mogu se koristiti sve vrste voća koje imaju dovoljnu količinu fermentabilnih šećera koje kvasac može fermentirati u alkohol. Da bi se dobila rakija vrhunske kvalitete voće mora biti neoštećeno, zrelo i dobro očuvano. Vanjski izgled voća (boja, veličina, oblik) u ovom slučaju nije od velike važnosti. Voće se ubire u fazi tehnološke zrelosti (kad ima najviše šećera i nije prezrelo) i prije upotrebe ga treba oprati.

Voće koje je prezrelo, oštećeno, koje nije prikladno za dulje skladištenje i svo ostalo voće lošije kvalitete koje se ne može drukčije iskoristiti isto tako može biti sirovina za proizvodnju dobre rakije, ali se od takvog voća ne može dobiti vrhunska rakija. Pri tome treba paziti da ipak bude veći postotak zdravijih i kvalitetnijih plodova.

U proizvodnji voćnih rakija prvenstveno treba voditi računa o kemijskom sastavu voća od kojeg se proizvodi rakija jer o tome ovisi kvaliteta rakije, zatim je bitna i aroma tog voća te zdravstvena ispravnost (ostaci pesticida, mikrobiološka kontaminacija). Najvažniji kemijski parametri jesu: količina šećera (što je veća količina šećera veće je iskorištenje – randman), vitamini, bjelančevine, razne organske kiseline (jabučna, limunska, octena), taninske tvari i aromatična ulja (Banić, 2006). Aroma se razvija tijekom dozrijevanja plodova te je najveća koncentracija arome pred kraj dozrijevanja. Ukoliko je voće prezrelo ili oštećeno aroma se počinje vrlo brzo gubiti.

Osnovna svojstva sirovine:

- Visoki sadržaj šećera,
- Očuvana aroma tipična za vrstu,
- Zdrav i čist plod, bez zemlje i drugih nečistoća, bez plijesni.

### 2.3.1. Određivanje šećera

Za određivanje udjela šećera u sirovini, odnosno u dobivenoj komini iz te sirovine koriste se jednostavni uređaji poput refraktometra i areometra.

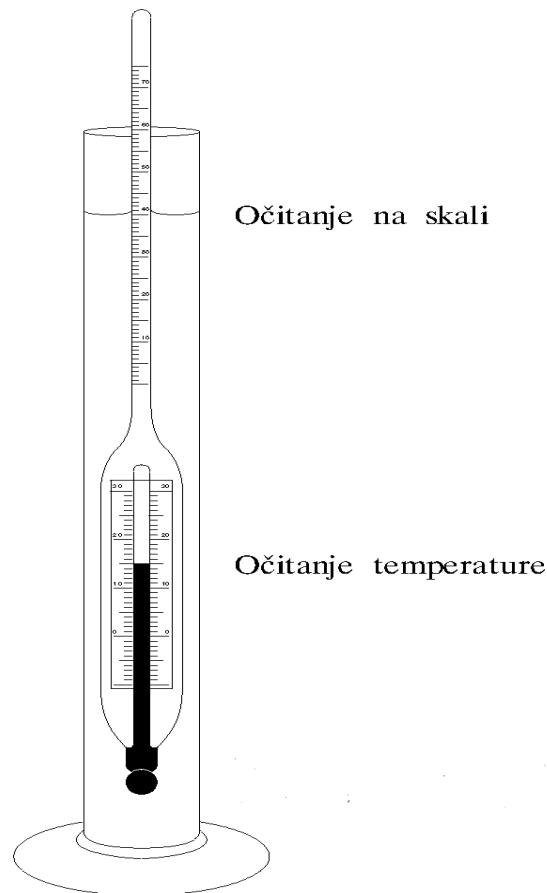
Refraktometar je optički uređaj čiji se način rada zasniva na očitavanju kuta loma svjetlosti ispitivane otopine. Kako se mijenja sadržaj otopljene suhe tvari u otopini (saharoza, fruktoza, glukoza) tako se mijenja i kut loma svjetlosti (Ugwu i sur., 2018). Vrijednost mjerenja se najčešće izražava u stupnjevima Brix-a ( $^{\circ}\text{Bx}$ ), pri čemu 1 stupanj Brix-a znači 1 g šećera na 100 g vodene otopine. Trebalo bi napomenuti da stupnjevi Brix-a izražavaju ukupne otopljene tvari u otopini, a ne samo šećere, međutim ostale otopljene tvari zanemarivo doprinose ukupnom sadržaju otopljenih tvari. Najčešće se koristi ručni refraktometar jer se njime najlakše rukuje, mjerenje se provodi na način da se na prizmu nakapa nekoliko kapi tako da se pokrije u potpunosti (otopina ne smije sadržavati nikakve krute tvari kako bi mjerenje bilo što preciznije). Provodi se nekoliko mjerenja te se uzima srednja vrijednost tih mjerenja. Refraktometar prije početka mjerenja treba baždariti destiliranom vodom. Uobičajeno je baždaren na temperaturi od  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  te ukoliko se temperatura komine razlikuje od te vrijednosti vrše se korekcije očitane vrijednosti. Za svaka  $3\text{ }^{\circ}\text{C}$  gore dodaje se  $0,2\%$  očitanoj vrijednosti, a ukoliko je  $3\text{ }^{\circ}\text{C}$  niža onda se oduzima  $0,2\%$  očitanoj vrijednosti.



**Slika 4.** Refraktometar (Izvor: Web 4)

Areometar je uređaj za mjerenje gustoće tekućine koji radi na principu Arhimedovog zakona. To je zatvorena staklena cjevčica sa proširenjem u donjem dijelu koje sadrži mali uteg (olovna sačma), a pri vrhu se sužuje u takozvani vrat na kojem je mjerna ljestvica, a vrlo često sadrži i termometar. Postoji više vrsta ovisno o tome koju tekućinu mjere, saharometar (za mjerenje saharoze u otopini), alkoholometri (za udio etanola) i drugi. Saharometar je baždaren u vodenim otopinama saharoze poznatih koncentracija na 20 °C. Ukoliko temperatura ispitivane tekućine nije 20 °C vrše se korekcije za očitane vrijednosti. Mjerenje se obavlja na način da se u menzuru napunjenu sa tekućinom koju želimo ispitati polako spušta saharometar. Menzura ne smije biti preuska tako da ne dolazi do dodira između saharometra i stjenke menzure, treba izbjegavati i pjenjenje i stvaranje mjehurića. Nakon što se saharometar umiri očita se

vrijednost i ukoliko temperatura nije 20 °C vrše se korekcije (za svaki stupanj iznad očitanoj vrijednosti dodaje se 0,06 %, a za svaki stupanj manje oduzima se 0,06 %) (Banić, 2006).



Slika 5. Saharometar (Izvor: Web 5)

## 2.4. Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija ili alkoholno vrenje je složeni anaerobni biokemijski proces koji se odvija u stanicama kvasca. Osim kvasaca važni su i enzimi koji razgrađuju velike molekule polisaharida na jednostavnije šećere tako da postanu dostupni kvascima. Kvasci u anaerobnim uvjetima koriste jednostavne šećere (glukoza, fruktoza) za rast i razmnožavanje pri čemu kao nusprodukti nastaju etanol, ugljični dioksid i toplinska energija. Može se prikazati jednostavnom formulom:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2 + \text{toplinska energija}$ . Oko 92 % šećera se potroši na alkohol etanol i ugljični dioksid, oko 3 % na glicerol, a ostatak na rast kvasaca i ostalih sporednih produkta alkoholnog vrenja (esteri, viši alkoholi, metanol).

Fermentacija može biti kontrolirana ili spontana. Spontana fermentacija podrazumijeva da se odvija uz pomoć prirodno prisutnih kvasaca i ostalih mikroorganizama na voću. Takva fermentacija traje duže i nema ujednačenu kvalitetu proizvoda jer je teško predvidjeti tijekom

takve fermentacije. Kvasci koji pokreću spontanu fermentaciju spadaju u ne-*Saccharomyces* vrste kvasaca koji se inhibiraju u kasnijim fazama sintetiziranim etanolom te onda daljnju fermentaciju provodi i završava *Saccharomyces cerevisiae*. Kontrolirana fermentacija se provodi tako da se komina inokulira sa selekcioniranim kvascima, najčešće je to *S. cerevisiae*. Upotreba selekcioniranih kvasaca osigurava brz početak fermentacija i ujednačenu kvalitetu jer su njihova svojstva dobro poznata te se u selekciji kvasaca izbjegavaju njihova nepoželjna svojstva.

Optimalna temperatura za rast kvasaca je 25 – 30 °C međutim tijekom fermentacije dolazi do oslobađanja topline jer je fermentacija egzoterman proces stoga treba paziti da temperatura komine na početku fermentacije ne prelazi 20 °C. Optimalna temperatura za fermentaciju voćnih komina je 18 – 22 °C, preniska temperatura usporava fermentaciju dok previsoka temperatura može dovesti do gubitka arome, a ukoliko temperatura previše poraste može zaustaviti fermentaciju (kvasac prestaje biti aktivan na 40 °C, a odumire pri 60 °C). Torija i suradnici (2003) istraživali su utjecaj temperature na rast *S. cerevisiae* te su rezultati pokazali da je pri nižim temperaturama (15 °C – 20°C) potrebno duže vremena da kvasci postignu maksimalni broj stanica te je i duža faza prilagodbe (lag faza) zbog čega i fermentacija počinje sporije. Dok je pri višim temperaturama (25 °C – 30 °C) sličan maksimalni broj stanica kvasca unatoč većoj brzini rasta nego pri nižoj temperaturi. Kod najviše ispitivane temperature od 35°C je odmah nastupila eksponencijalna faza te je najbrže dostignut maksimalni broj stanica, ali je najkraća stacionarna faza te je faza odumiranja nastupila najranije. Maksimalni broj stanica je iznosio za sva tri mjerenja ( $10^8$  CFU m/L).

Posude za vrenje moraju zadovoljavati ove kriterije:

- ne smiju reagirati s kominom na način da dolazi do promjene okusa, mirisa ili otapanja škodljivih tvari u kominu,
- moraju imati dovoljno veliki otvor za punjenje i pražnjenje,
- moraju biti čiste i moraju se lako čistiti.

Nekada je drvo bilo najčešći izbor, ali danas sve češće zamjenjuju nehrđajućim čelikom i plastičnim posudama. Zbog toga što drvo zahtjeva puno njege i dobro održavanje, teže se čisti od navedenih materijala te kod lošijeg čišćenja i održavanja moguće je da se u pore drveta nasele mikroorganizmi (plijesan, octene bakterije). Zdrave drvene bačve mogu se koristiti kasnije za dozrijevanje voćnih rakija. Plastične posude (HDPE) i nehrđajući čelik pokazali su se

kao najbolji za izradu posuda za vrenje. Prednosti plastičnih posuda jesu: lako čišćenje zbog glatke unutrašnje površine, dobro brtvljenje, male specifične mase, međutim mana im je što nisu preporučljivi za skladištenje destilata koji sadrži više od 25 % alkohola. Prednosti nehrđajućeg čelika (inox): dulji životni vijek, potpuna otpornost na kiseline, potpuna inertnost prema svim tvarima komine, potpuno nepropusno za zrak, prikladni su za odležavanje i skladištenje svih vrsta komine i destilata (Banić, 2006).

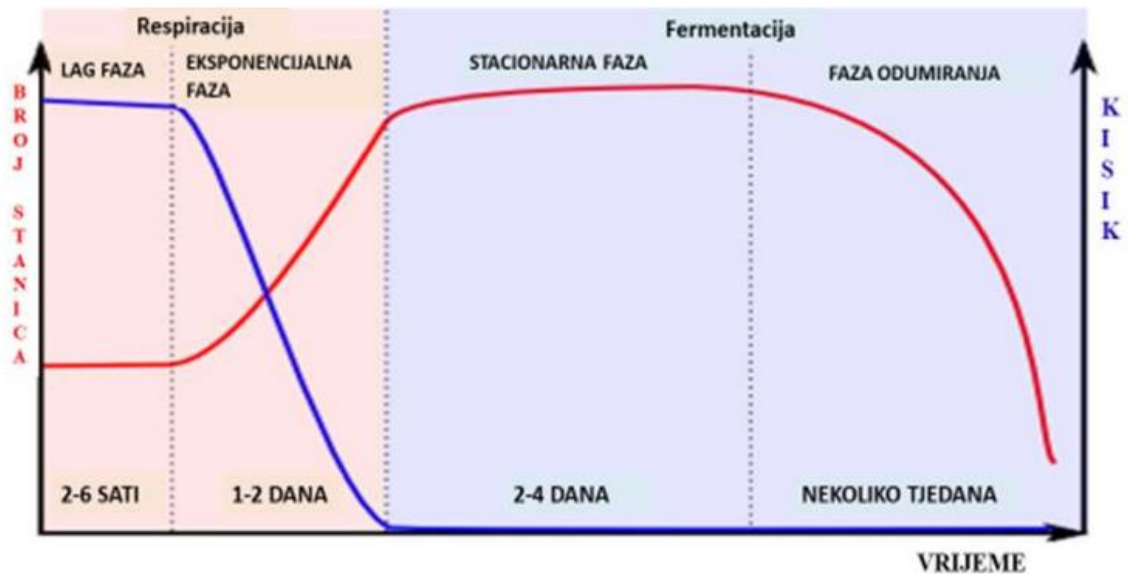
Punjenje komine u bačve za provođenje fermentacije provodi se tako da se ostavi prazan prostor između komine i poklopca (10 % do 20 % bačve se ostavi prazno). Preporučljivo je punjenje obaviti odjednom, izbjegavati punjenje u više navrata i nakon punjenja odmah zatvoriti posudu. Prazan prostor je bitan jer tijekom fermentacije dolazi do pjenjenja te bi inače došlo do prelijevanja ili do izlaska pjene kroz vrenjaču. Vrenjača je čep koji omogućuje da ugljični dioksid nastao fermentacijom izađe zbog povećanog tlaka i time se spriječi mogućnost eksplozije posude za fermentaciju, a sprječava ulazak vanjskog zraka.

Namještanje kiselosti komine bitno je jer utječe na kvalitetu i ispravnost buduće rakije jer osiguravamo čistu i pravilnu alkoholnu fermentaciju. U voćnim kominama pH se kreće u rasponu od 2,5 – 4,5. Slabije kisele komine su podložnije kvarenju zbog rasta nepoželjnih mikroorganizama stoga se mora vršiti korekcija kiselosti komina prije početka vrenja. Korekciju možemo vršiti organskim (limunska, jabučna, mliječna) ili anorganskim (fosforna, sulfatna) kiselinama. Optimalna pH vrijednost je približno 2,8 čime se osigura da neće doći do razvoja nepoželjnih bakterija i plijesni, a kvascima neće ometat rast i razmnožavanje budući da bolje podnose kiseliji pH od ostalih mikroorganizama. Ukoliko će se koristiti enzimski pripravci onda pH treba biti nešto viši, približno 3,2 zbog osjetljivosti enzima na niži pH.



**Slika 6.** Vrenjača (Izvor: Web 6)

Sam proces vrenja ne započinje odmah nakon dodatka kvasca, već je potrebno 24 – 72 sata kako bi se kvasac prilagodio i povećao svoju biomasu potrebnu za provođenje vrenja. Dolazi i do malog oslobađanja ugljičnog dioksida koji istiskuje zrak iz praznog prostora u posudi i time stvara anaerobne uvjete koji su potrebni za alkoholno vrenje. Nakon što završi početna faza prilagodbe kvasca i biomasa naraste u dovoljnoj količini započinje burno vrenje koje se manifestira naglim padom šećera u komini, oslobađanjem velike količine ugljičnog dioksida ( $\text{CO}_2$ ) te porastom temperature komine. U ovoj fazi se potroši (fermentira) većina šećera. Burno vrenje traje različito ovisno o temperaturi, količini šećera i drugo, prosječno traje oko 5 dana nakon čega slijedi period tihog vrenja. Dolazi do pada temperature, smanjuje se pjenušanje i smanjuje se količina  $\text{CO}_2$  i traje dok se ne potroši preostali šećer. U najpovoljnijem slučaju vrenje voćne komine traje 2 tjedna, a može trajati i do 6 tjedana.



**Slika 7** Razvojni ciklus kvasca (Izvor: Web 7)

Nastali etanol djeluje inhibitorno prema ostalim bakterijskim vrstama, a CO<sub>2</sub> iznad površine komine sprječava rast plijesni i aerobnih bakterija i takvi uvjeti pogoduju samo kvascima koji jedini zaostaju na kraju fermentacije. Kvasac prestaje biti aktivan kod 15 % alkohola te samo neke vrste mogu provoditi fermentaciju do koncentracije od 18 %. Kraj fermentacije se određuje mjerenjem zaostalog šećera u komini, ovisno od vrste voća 2 % do 6 % zaostalog šećera označuje kraj fermentacije. Nakon što se ustanovi da je fermentacija gotova treba odmah početi sa destilacijom prevrele komine. Svako odležavanje prevrele komine dovodi do gubitaka arome i povećava se rizik od kvarenja (oksidacija etanola do octene kiseline), posebno je osjetljiva kruška viljamovka. Postoje izuzeci poput nekih sorti trešanja gdje prilikom odležavanja dolazi do promjena koje povoljno utječu na kvalitetu. Ukoliko se destilacija ne može provesti odmah nakon završetka vrenja, prevrelu kominu treba skladištiti pri nižim temperaturama kako bi se spriječile nepoželjne promjene (Banić, 2006).

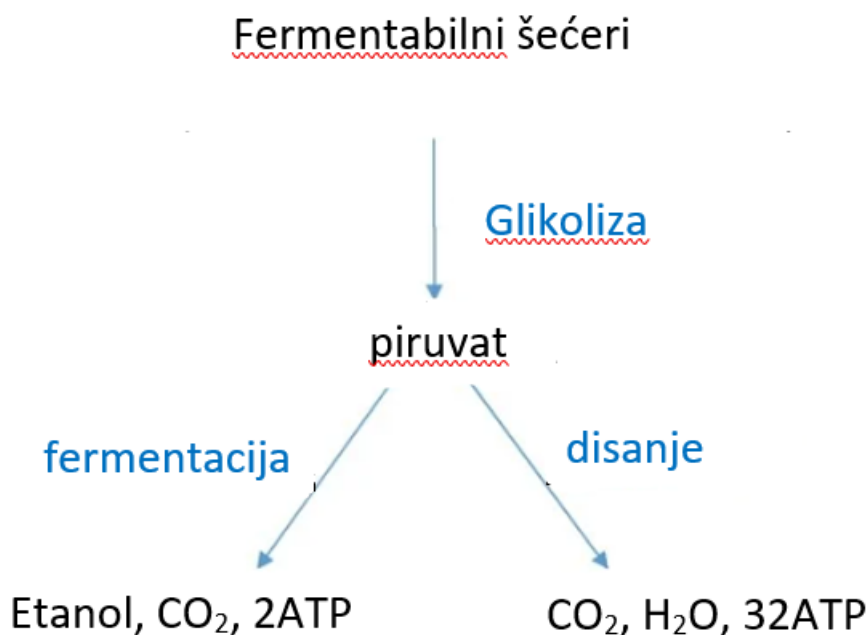




**Slika 8** Inox posuda za fermentaciju (Izvor: Web 8)

## 2.5. Kvasci roda *Saccharomyces*

Kvasci su jednostanični eukariotski organizmi koji spadaju u carstvo gljiva (*Fungi*), te se mogu dalje podijeliti na dva koljena: *Ascomycetes* i *Basidiomycetes*. Kvasci su heterotrofni organizmi budući da ne sadrže klorofil te do energije dolaze apsorpcijom iz okoline. Preferiraju šećere kao izvore ugljika, ali mogu koristiti i druge izvore kao što su: organske kiseline, aminokiseline, masne kiseline, ovisno od vrste kvasca. Kvasci roda *Saccharomyces* mogu metabolizirati šećere u prisustvu kisika (respiracijski metabolizam) i bez prisustva kisika (fermentativni metabolizam), ovisno o metaboličkom putu nastaju različiti produkti. Ukoliko koriste respiracijski metabolizam uz prisustvo kisika razgrađuju šećer do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  te se oslobađa 32 molekula ATP-a iz jedne molekule glukoze. Fermentativni metabolizam koriste u anaerobnim uvjetima te su konačni produkti etanol i  $\text{CO}_2$  te dvije molekule ATP-a iz jedne molekule glukoze.



**Slika 9** Metabolizam šećera (Izvor: Autor)

Neke vrste kvasca koriste fermentativni metabolizam i u prisustvu kisika ukoliko je koncentracija glukoze dovoljno visoka, to se opisuje Crabtree-ovim efektom (Pfeiffer i Morley, 2014). Mogu se razmnožavati spolno (mejozom) i nespolno (pupanjem). Imaju širok raspon pH u kojem mogu rasti od pH = 2,5 do pH = 8, dok u temperaturnom rasponu spadaju u mezofilne

organizme (optimalni raspon temperature od 25°C do 40°C). Svaka stanica kvasca koja se podijelila ima ožiljke na površini stanice koji odražavaju njenu starost jer se starost kvasca ne određuje kronološki već brojem diobe stanica. Hayflickov limit određuje maksimalni broj dioba, ovisno o vrsti može biti od 10 do 33. Danas je poznato oko 1500 vrsta, a najpoznatija je svakako *Saccharomyces cerevisiae*.

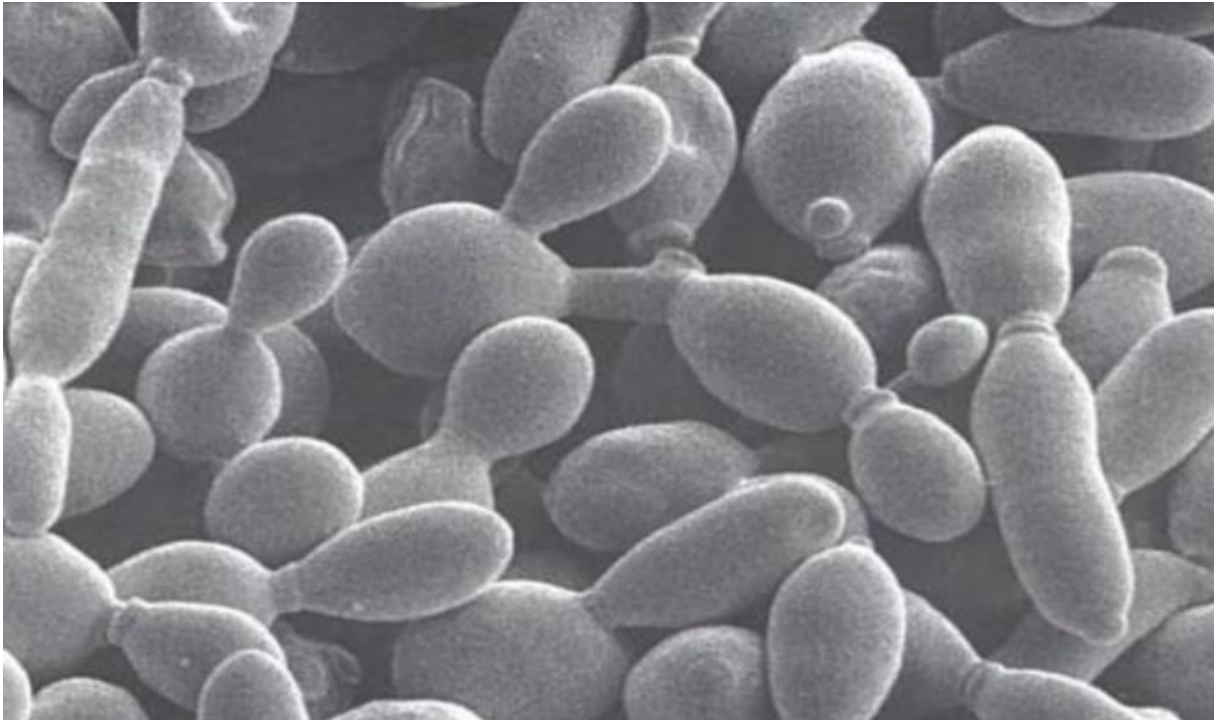
Postoji više vrsta kvasaca roda *Saccharomyces*: *S. bayanus*, *S. boulardii*, *S. bulderi*, *S. cariocanus*, *S. cariocus*, *S. cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. dairenensis*, *S. ellipsoideus*, *S. eubayanus*, *S. exiguus*, *S. florentinus*, *S. kluyveri*, *S. martiniae*, *S. monacensis*, *S. norbensis*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. spencerorum*, *S. turicensis*, *S. unisporus*, *S. uvarum*, *S. zonatus*.

Najpoznatija vrsta i najviše korištena u industriji jest *S. cerevisiae*, koja se još od davnina koristila u proizvodnji kruha, piva i vina. *S. cerevisiae* je najistraženiji eukariotski organizam (prvi eukariotski organizam kojemu je genom potpuno sekvencioniran) te se danas koristi kao modelni eukariotski organizam zbog svojih svojstava:

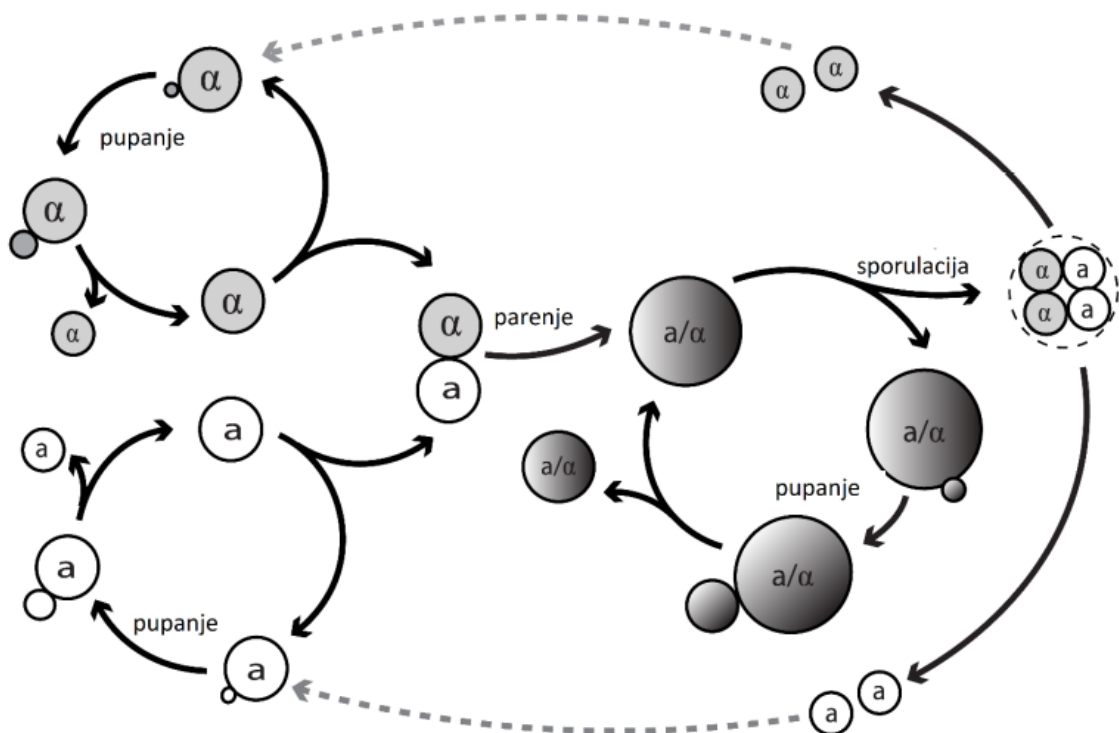
- mali jednostanični organizam s kratkim generacijskim vremenom (80 – 120 minuta),
- lako se genetički manipulira bilo dodatkom ili brisanjem gena,
- kao eukariot ima sličnu unutar staničnu građu kao biljke i životinje,
- ekonomski najbitniji mikroorganizam upotrijebljen na svijetu (Stewart, 2014).

*S. cerevisiae* ima GRAS status („Generally Recognized As Safe“) zbog svoje široke i dugogodišnje upotrebe te nepatogenosti. Kvasci ovog roda spadaju u malobrojne koji rastu u anaerobnim uvjetima te su manje osjetljivi na visoke koncentracije etanola za razliku od drugih fermentativnih kvasaca kao što su *Kluyveromyces* i *Candida*. Zbog tolerancije na povišene koncentracije etanola (podnosi i do 18 % alk.) *S. cerevisiae* je izvrstan za konverziju glukoze u etanol unatoč tome što ne može koristiti ugljikohidrate poput: laktoze, škroba, dekstrina, pentoze i L- šećera. Kvasci ovog roda su prvi puta selekcionirani prije 80ak godina, a osnovni kriterij selekcije: sposobnost provedbe fermentacije do kraja. Selekcijom kvasaca povećala se otpornost kvasaca na stresne uvjete, bolje iskorištenje šećera, brža fermentacija, sinteza viših alkohola koji doprinose aromi. Nekada su se kvasci selekcionirali izolacijom sa prirodnih staništa, međutim napretkom biotehnologije i molekularne biologije 1990-ih dolazi do genetičke modifikacije selekcioniranih kvasaca čime se poboljšavaju karakteristike tih

sojeva. Genetički modificirani kvasci moraju biti inokulirani zajedno sa *S. cerevisiae* jer većina ih nema sposobnost provest fermentaciju do kraja.



**Slika 10** *Saccharomyces cerevisiae* stanice tijekom pupanja (Arman Akšit, 2012)



**Slika 11** Životni ciklus *S. cerevisiae* (Wang i sur., 2017)

## 2.6. Ne-*Saccharomyces* vinski kvasci

Prvotno se smatralo da su ovi kvasci odgovorni za kvarenje vina tijekom proizvodnje zbog toga što su se izolirali iz pokvarenih vina, te su se smatrali nepoželjnim u proizvodnji vina (Van der Walt i Van Kerken, 1958). Iako se znalo da ne-*Saccharomyces* kvasci stvaraju neke poželjne metabolite ipak nije bilo dovoljno da se nadvladaju negativna mišljenja vinara te su zbog toga tijekom 20. stoljeća smatrani nepoželjnim. Međutim, novija istraživanja su pokazala da ipak imaju pozitivan učinak na kompleksnost i sastav arome (Canonico i sur., 2019). Većina ovih kvasaca ne može provesti fermentaciju do kraja jer ne podnose visoke razine etanola, imaju malu otpornost na CO<sub>2</sub>, imaju niski kapacitet pretvorbe šećera u etanol, zbog toga se smanjuje mogućnost provedbe fermentacije nekoliko dana nakon početka, a većina ih i odumire.

Iako se *S. cerevisiae* na kraju fermentacije nalazi u najvećem broju, na svježem plodu grožđa se ipak u najvećem broju nalaze ne-*Saccharomyces* vrste. Time su u boljem položaju da započnu fermentaciju. Da bi se spriječio njihov rast i mogućnost provedbe fermentacije u krivom smjeru mošt se inokulira sa velikom količinom *S. cerevisiae* kako bi preuzeo fermentaciju od početka. Tako se smanjuje mogućnost kvarenja vina ukoliko se fermentacija provodi u kontroliranim uvjetima, ali se dobije i manje aromatičnih spojeva i okusa u finalnom proizvodu. Danas se provodi ko-inokulacija *S. cerevisiae* i ne-*Saccharomyces* kvasca kako bi se postigle poželjne senzorske karakteristike zbog ne-*Saccharomyces* vrsta te sigurna i brza fermentacija zbog *S. cerevisiae*. Ne-*Saccharomyces* kvasci koji pokazuju obećavajuće karakteristike kao dio miješane starter kulture su *Torulasporea delbrueckii*, *Candida zemplinina*, *Candida pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, te vrste: *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*.

### 2. 6. 1. *Torulasporea delbrueckii*

U istraživanju autora Ramirez i suradnika (2018) pokazalo se da sojevi *T. delbrueckii* imaju slične fermentativne sposobnosti kao i *S. cerevisiae* te je zbog toga bio i prvi ne-*Saccharomyces* kvasac korišten u vinarstvu. Iako imaju slične fermentativne sposobnosti *T. delbrueckii* ima veću potrošnju O<sub>2</sub> i veću proizvodnju CO<sub>2</sub> što rezultira smanjenom količinom biomase u procesu fermentacije što je nedostatak za proizvodnju u većoj količini. U striktno anaerobnim uvjetima *T. delbrueckii* pokazuje sporiji rast u odnosu na *S. cerevisiae* što

predstavlja problem u proizvodnji pjenušavih i bijelih vina. Nakon inokulacije dominacija *T. delbrueckii* iznosi oko 50% ovisno o nizu faktora kao što su: količina inokuluma, količine i vrste divljih mikroba prisutnih u moštu, koncentraciji etanola i šećera, koncentraciji SO<sub>2</sub> i Cu (Ramirez i sur. 2018).

*T. delbrueckii* povećava kvalitetu vina jer se povećava ukupna količina estera koji daju mirisne arome u donosu na inokulaciju samo sa *S. cerevisiae*. Najbolji rezultati se ostvaruju ko-inokulacijom zajedno sa *S. cerevisiae* jer sam *T. delbrueckii* ne može provesti fermentaciju do koncentracije alkohola od 14% iako može preživjeti tu koncentraciju. Prednost *T. delbrueckii* je što podnosi veći osmotski tlak od *S. cerevisiae* i u takvom mediju ne započinje proizvodnju octene kiseline za razliku od *S. cerevisiae*.

### **2.6.2. *Candida zemplinina***

Kao i sve ne-*Saccharomyces* vrste ima utjecaj na aromu, ali ostaje aktivna kroz cijelu fermentaciju za razliku od većine ne-*Saccharomyces* vrsta. Proizvodi velike količine glicerola i do 14 g/L za razliku od *S. cerevisiae* koji proizvodi između 4 g/L i 10.4 g/L, glicerol u količini preko 5.4 g/L doprinosi slatkom okusu. U odnosu na *S. cerevisiae* koji koristi glukozu, *C. zemplinina* koristi fruktozu za fermentaciju. Kako je *S. cerevisiae* glukofilni kvasac nije neobično da se na kraju fermentacije pronađe zaostalog šećera fruktoze. Nakon što se *C. zemplinina* inokulira zajedno sa *S. cerevisiae* na kraju fermentacije nema rezidua šećera. Stoga, skraćuje se vrijeme fermentacije (Jolly i sur., 2014). U istraživanju koje su proveli Rantsiou i suradnici (2012) pokazalo se da ko-inokulacija sa *S. cerevisiae* dovodi do smanjenja proizvedene octene kiseline u proizvodnji slatkih vina. To se povezuje sa činjenicom da *S. cerevisiae* na visoki osmotski tlak odgovara na način da poveća proizvodnju octene kiseline te se to na ovaj način može kontrolirati.

### **2.6.3. *Metschnikowia pulcherrima***

Anamorfni oblik ovog kvasca je *Candida pulcherrima*, a stanice se pod mikroskopom ne razlikuju se od *S. cerevisiae*. Često se pojavljuje u spontanim fermentacijama te se može pronaći na svježem i trulom voću te se može prenositi i kukcima (Morata i sur., 2019). Zbog smanjene fermentativne sposobnosti mora se inokulirati sa *S. cerevisiae*, a u takvoj

kombinaciji pokazalo se i da dolazi do smanjenja količine hlapljivih kiselina i H<sub>2</sub>S. *M. pulcherrima* stvara puno estera, posebice etil oktanoata koji poboljšavaju aromu vina. *M. pulcherrima* pokazuje antagonističko djelovanje s drugim vrstama kvasaca te može poboljšati senzorski i aromatski profil. Također dolazi i smanjenja količine etanola korištenjem ovog kvasca u fermentaciji, a današnja velika briga u proizvodnji vina jest upravo velika alkoholna jakost nastalih vina. Zapravo jedina i najvažnija stvar kod ovog kvasca jest pravilna kombinacija sa drugim kvascima koji mogu provest fermentaciju do kraja te koji se segment fermentacije želi naglasiti, bilo da se radi o poboljšanju aromatskog profila, smanjenja količine etanola.

#### **2.6.4. *Lachancea thermotolerans***

Može se koristiti za povećanje ukupne kiselosti zbog toga što ima sposobnost proizvodnje mliječne kiseline. Promjena pH prelazi 0,5 jedinica te ovaj kvasac može biti koristan kada je početni pH mošta povišen, jer najviše mliječne kiseline proizvodi na samom početku fermentacije, a mošt je tada u najvećoj opasnosti od kvarenja uzrokovanog mikroorganizmima. Maksimalna koncentracija etanola kojeg može proizvesti iznosi oko 9% te se mora ko-inokulirati sa kvascima koji mogu provesti fermentaciju do potrebne koncentracije alkohola. U istraživanju kojeg su proveli Morata i suradnici (2018) pokazalo se da se količina proizvedene mliječne kiseline ne ovisi o koncentraciji glukoze. Međutim, u prisustvu octene kiseline od 2 g/L onda količina nastale mliječne kiseline ovisi o koncentraciji glukoze i što je veća koncentracija glukoze nastaje i više mliječne kiseline.

Ima pozitivan utjecaj na aromatski profil, odlikuje se i niskom sintezom hlapljivih kiselina te dovodi i do smanjenja hlapljivih kiselina. Umjereno proizvodi etil acetat i više alkohole koji u višim koncentracijama imaju loš utjecaj na aromu. Ukoliko se koristi u ko-inokulaciji sa *S.cerevisiae* proizvodi i glicerol, a da pritom ne dolazi do povećanja hlapljive kiselosti i sinteze octene kiseline. Na sintezu glicerola utječe temperatura te raste s povećanjem prisutnog kisika. Glicerol utječe pozitivno na kompleksnost arome i organoleptiku.

#### **2.6.5. *Schizosaccharomyces pombe***

Generacijsko vrijeme iznosi od 2 do 4 sata što za posljedicu ima malu brzinu rasta u moštu te ima vrlo dugu lag fazu i velike potrebe za vitaminima, ali ima niže potrebe za dušikom. Podnosi veliki osmotski tlak te može rasti u prisustvu velike količine šećera, a raste i okolišu sa niskim aktivitetom vode (Loira i sur., 2018). Ima odlične fermentativne sposobnosti te može provesti fermentaciju do kraja, koncentracija alkohola na kraju iznosi između 10% i 15%. Brzina fermentacije je spora te je ponekad potrebno više od 31-og dana da se privede kraju. Međutim, proizvodi velike količine sumporovodika (H<sub>2</sub>S) i hlapljive kiseline i to zajedno sa sporom brzinom rasta su limitirajući faktori za veće korištenje u procesima fermentacije. *S. pombe* ima sposobnost pretvorbe jabučne kiseline u etanol i CO<sub>2</sub> čime se može podešavati pH jer se može ukloniti sva jabučna kiselina (Loira i sur., 2018). Nikada se ne uklanja sva jabučna kiselina već se prati njena količina i kada se dostigne željena količina uklanja se imobilizirani *S. pombe* i završetak fermentacije provodi *S. cerevisiae*. Malolaktičnu fermentaciju koju provode bakterije mliječne kiseline prate problemi stvaranja biogenih amina koji mogu uzrokovati određene zdravstvene probleme. Malolaktična fermentacija se koristi iz razloga pretvorbe jabučne kiseline u mliječnu pri čemu se osigurava veća mikrobiološka stabilnost i smanjuje se ukupna kiselost jer je mliječna kiselina manje kisela. Prednost korištenja *S. pombe* za provedbu uklanjanja jabučne kiseline jest što nema stvaranja biogenih amina. Također, ima jaku aktivnost ureaze pri čemu dolazi do razgradnje uree koja je prekursor etil-karbamata, poznati karcinogen i njegova količina u alkoholnim pićima je regulirana pravilnicima. Korištenjem *S. pombe* može se reducirati ili u potpunosti spriječiti stvaranje etil-karbamata.

#### **2.6.6. Rod *Hanseniaspora***

Kvasci ovog roda su dominantni na zrelom grožđu i imaju veliki utjecaj na početku fermentacije. Imaju značajnu ulogu u formiranju aromatskih spojeva čime se poboljšavaju osobine poput mirisa, okusa i boje. Imaju slabe fermentativne sposobnosti, ali stvaraju širok spektar hlapljivih spojeva koji utječu pozitivno na kemijski sastav i organoleptiku. Moguće je i da dođe do zastoja u fermentaciji prilikom korištenja kvasaca ovog roda sa *S. cerevisiae*, jer kvasci roda *Hanseniaspora* imaju velike potrebe za kalcijem i vitaminom B1 što onda inhibira rast *S. cerevisiae*. Prilikom korištenja ove kombinacije kvasaca treba koristiti hranu za kvasce koja će spriječiti nedostatak minerala i vitamina. *Hanseniaspora uvarum* se najčešće nalazi u vinogradima te ima najveći utjecaj na kvalitetu vina. U vinima fermentiranim kombinacijom



*S.cerevisiae* i *H.uvarum* zabilježeno je povećanje masnih kiselina srednjeg lanca, povećanje koncentracije viših alkohola i povećanje koncentracije etilnih estera (Martin i sur., 2018).

## 2.7. Destilacija

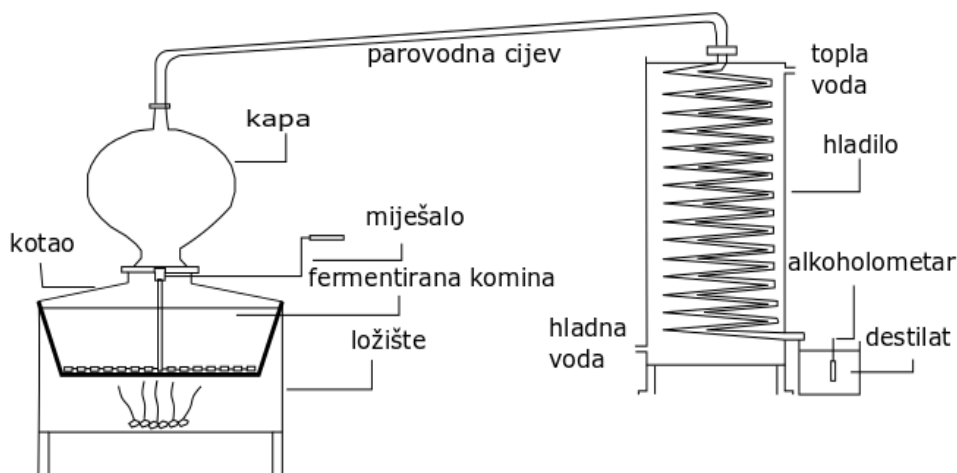
Destilacija je postupak odjeljivanja smjese komponenti na temelju različitih vrelišta pojedinih komponenti u smjesi. Zagrijavanjem smjese, komponenta s nižim vrelištem brže isparava te je veći njen udjel u nastaloj pari i nakon kondenzacije nastale pare u hladilu dobije se ukapljena smjesa s većim udjelom komponente s nižim vrelištem u odnosu na početnu smjesu. U slučaju destilacije prevrele komine glavne komponente su etanol s točkom vrelišta 78,3 °C i voda sa točkom vrelišta 100 °C (pri normalnom atmosferskom tlaku). Zagrijavanjem će uvijek isparavati više alkohola u odnosu na vodu, ali ukoliko se povisi temperatura bliže vrelištu vode isparavat će sve više vode što nije potrebno jer se želi dobiti destilat sa što više alkohola. Međutim, tu su i razne druge hlapljive tvari koje prelaze u destilat, a važne su za kvalitetu dobivenog destilata poput: viših alkohola, estera, etera, aldehida, hlapljivih kiselina. Neke od tih tvari su poželjne za aromu rakije, a neke treba što više ukloniti.

Destilacija se smatra najvažnijim korakom u proizvodnji rakije jer u najvećoj mjeri kvaliteta završnog proizvoda (rakije) ovisi o pravilnoj provedbi destilacije, ali ukoliko se ne pripremi kvalitetna prevrela komina neće se niti pomoću kvalitetno provedene destilacije moći dobiti kvalitetan završni proizvod.

Destilacija se može provoditi kontinuirano ili diskontinuirano, u manjim postrojenjima i kućnim uvjetima koriste se diskontinuirani uređaji (kotlovi) tipa *alambic*. S takvim uređajima mora se provoditi dvostruka destilacija voćnih komina jer se u jednokratnoj destilaciji ne može postići dovoljna čistoća mirisa destilata (Arvid Berglund, 2004).

Jednostavni destilacijski uređaji sastoje se od:

- kotla s dijelom za zagrijavanje i dijelom za destilaciju,
- kape (poklopca),
- parovodne cijevi,
- hladila.



**Slika 12.** Uređaj za jednostavnu destilaciju tipa alamibic (Izvor: Autor)

**Kotao** je izgrađen od elektrolitičkog bakra čistoće 99,99 % iz više razloga:

1. bakar dobro provodi toplinu te se time ubrzava grijanje i hlađenje kotla,
2. otporan je na prisutne organske kiseline,
3. ima povoljan utjecaj na miris i okus destilata jer na sebe veže sumporne spojeve.

Kotao je najvažniji dio destilacijskog uređaja i najčešće je cilindričnog oblika. Kotlovi mogu biti s jednostrukom stjenkom ili dvostrukom stjenkom (duplikator). Kod kotlova sa jednostrukom stjenkom imamo direktno zagrijavanje te je veća mogućnost zagorijevanja komine što onda negativno utječe na destilat. Kako bi se to spriječilo u kotao se postavlja miješalica ili rešetka koja sprječava direktan kontakt čvrstih dijelova komine i kotla. Tanko dno bakrenih kotlova (2,0 – 2,5 mm) predstavlja problem jer brzo dolazi do pregrijavanja dna komine te se zbog toga preporučuje deblje dno kotla od barem 5 mm (Banić, 2006). Kako bi se izbjegli problemi pregrijavanja i zagorijevanja koriste se kotlovi s dvostrukom stjenkom. Ovdje se koristi indirektno zagrijavanje gdje se između stjenki nalazi ulje ili voda, voda se pokazala boljim medijem jer je brži prijenos topline. Kotao sa indirektnim zagrijavanjem je sporiji u usporedbi sa kotlom s direktnim zagrijavanjem, ali ne dolazi do zagorijevanja te osigurava bolje odvajanje alkohola.

**Kapa** je gornji, pomični dio kotla čija je funkcija prikupljanje nastalih para i usmjeravanje u parovodnu cijev. Kapa se također izrađuje od bakra te zbog svojih toplinskih svojstava

predstavlja i brzog hlađenja dolazi do djelomične kondenzacije para tvari višeg vrelišta od etanola i njihovog povratka u kominu.

**Parovodna cijev** služi za spajanje kape sa hladilom, trebalo bi da bude blago uzdignuta prema hladilu kako bi se kondenzirane pare u njoj mogle vraćati nazad u kapu. Nehrđajući čelik je bolji materijal od bakra za parovodnu cijev zbog toga što kod bakra može doći do pojave zelenog taloga ukoliko komina sadrži veći sadržaj octene kiseline što onda dovodi do pojave plavozelene boje destilata.

Za **hladilo** se također preporučuje izrada od nehrđajućeg čelika zbog moguće pojave zelenog taloga kod korištenja bakra. Funkcija hladila jest kondenzirati, odnosno ukapljiti nastale pare. Hladilo može biti u obliku spirale ili vertikalnih cijevi uronjenih u spremnik kroz koji protječe voda od dna prema vrhu. Spremnik s vodom na dnu mora biti hladan, u sredini mlak, a na vrhu topao. Najvažnije kod hladila jest da su cijevi dovoljno dugačke kako bi se para u potpunosti kondenzirala inače dolazi do gubitka alkohola i aroma. Destilat koji izlazi iz hladila mora biti hladan, oko 15 °C dok voda koja izlazi iz hladnjak treba biti oko 65 °C.

Prije početka destilacije važno je da su svi dijelovi uređaja čisti inače destilat može poprimiti nepoželjne mirise koji onda smanjuju kvalitetu dobivenog destilata. Čišćenje se odvija sa deterdžentom i četkom te se na kraju ispiru čistom vodom. Nakon što očistimo sve dijelove i sastavimo aparaturu u kotao ulijemo običnu vodu i pustimo da para djeluje određeno vrijeme kroz cijeli sustav i izlazi iz hladila te se na taj način rješavamo svih zaostalih mirisa. Ovakvo temeljito pranje se obavezno mora obaviti nakon destilacije komine grožđa ili voćnih vina, ukoliko se prelazi na destilaciju komine druge voćne vrste te ukoliko se uređaj nije koristio dulje vremena (Banić, 2006). Nije potrebno temeljito pranje ukoliko se vrši destilacija iste vrste već je dovoljno samo dobro isprati sa običnom vodom.

Kod proizvodnje voćnih rakija u jednostavnom uređaju za destilaciju koristi se dvostruka destilacija:

1. destilacija, dobije se sirovi destilat (meka rakija),
2. destilacija, dobije se čisti destilat (buduća rakija).

**Prva destilacija:** odnosno proizvodnja meke rakije; kotao se puni 65 % – 75 % ukupnog volumena kako bi se spriječilo da nastala pjena prilikom zagrijavanja ne prekupi. Ukoliko je komina gusta potrebno ju je razrijediti sa 20 – 30% vode na količinu koma kako bi se spriječilo

zagorijevanje. Destilacija se provodi postupno kako bi se spriječilo jako pjenjenje i kako bi se očuvalo što više voćnih aroma i obično traje 2 – 3 sata. Na početku destilacije alkoholna jakost iznosi 40-60 % i s vremenom jakost opada do 2-3 % i time se završava prva destilacija jer nakon toga nije isplativo zbog troškova grijanja, a uzrokovalo bi i nepotrebno razrjeđivanje destilata. Količina nastalog destilata iznosi 25-30 % količine komine. Meka rakija, odnosno sirovi destilat sadrži alkohol i vodu te ostale poželjne i nepoželjne hlapive komponente poput: metanola, acetaldehida, viših alkohola, masnih kiselina. Takav destilat je obično mutan i neugodnog mirisa. Nakon završene prve destilacije u kotlu zaostaje voda, nehlapive komponente i teško hlapive komponente te se može reći da je osnovni cilj prve destilacije odvajanje hlapivih od nehlapivih komponenti. Prije početka druge destilacije aparatura se mora temeljito očistiti.

**Druga destilacija:** svrha joj je pročišćavanje destilata od nepoželjnih komponenti i jačanje alkoholne jakosti. Provodi se puno pažljivije nego prva destilacija te je zagrijavanje polaganije od prve destilacije, potrebno je oko sat vremena da destilat krene kapati. U drugoj destilaciji provodimo frakcijsku destilaciju, odnosno hvatamo 3 toka destilata.

Prvi tok (prvijenac), dolazi do izdvajanja najhlapljivijih komponenti: metanol, acetaldehid i etil-acetat koji imaju jako oštar i neugodan miris te mogu uzrokovati određene zdravstvene probleme. Odvaja se 1-2 % od ukupne količine destilata ovisno o kvaliteti komine (ukoliko sadrži više octene kiseline potrebno je veće odvajanje) i sadržaju hlapivih tvari. Prvijenac je prepoznatljiv po zamućenju te se prestanak zamućenja može smatrati krajem prvog toka. Međutim, najbolje je organoleptički odrediti kraj prvog toka te početak sakupljanja drugog toka.

Drugi ili srednji tok (srce), alkoholna jakost destilata na početku iznosi 70 – 80 % i s vremenom opada. U ovoj frakciji se većinom nalaze poželjni spojevi i ostale komponente arome te je ovo najkvalitetniji dio destilata. Ovisno o vrsti voćnog destilata kraj drugog toka je kada alkoholna jakost padne na 60 - 45 %, ali kao i kod odvajanja prvijenca najbolje je kraj odrediti organoleptički. Kada se primijeti lagano zamućenje destilata tada je definitivno vrijeme za sakupljanje trećeg toka jer su počeli izlaziti viši alkoholi, masne kiseline i njihovi esteri koji uzrokuju zamućenje.

Treći tok (patoka), ovdje se može ubrzati destilacija te se destilira do alkoholne jakosti od 5%. U trećem toku se odvaja patočno ulje koje sadrži uljaste komponente neugodnog okusa i

mirisa. Treći tokovi se za razliku od prvijenca mogu sakupljati i ponovo destilirati u tri toka budući da sadrže veću količinu etanola.



**Slika 13.** Alkoholometar (Izvor: Web 9)

Alkoholometar je mjerni uređaj za određivanje postotnog udjela alkohola u destilatu. Baždaren je na 20 °C te ukoliko je temperatura destilata viša ili niža od 20 °C vrše se korekcije. Koristi se tako da se uroni u menzuru koja sadrži destilat kojem želimo odrediti jakost te se pazi da ne dira stjenke menzure i kada se umiri očitamo vrijednost sa skale. Očitavanje bi trebalo vršiti tako da je menzura u visini očiju kako bi se što pravilnije očitala vrijednost.

**Dozrijevanje destilata:** nakon završene destilacije dobiveni destilat je oštrog i grubog okusa i mirisa te treba ga ostaviti određene vrijeme da dozrije. Što je duže dozrijevanje to je u pravilu veća kvaliteta rakije, dozrijevanje treba trajati barem 6 – 8 tjedana. Prilikom dozrijevanja dolazi do kemijskih promjena koje pozitivno utječu na destilat poput: esterifikacije, oksidacije te reakcije između acetaldehida i etanola u spoj ugodnog mirisa. Odvija se na sobnoj temperaturi, a posude su ovisno o vrsti destilata: staklo, inox ili drvo. Pošto se tijekom dozrijevanja odvija lagana oksidacija posude pune  $\frac{3}{4}$  volumena te se posuda ne bi trebala hermetički zatvoriti kako bi mala količina zraka mogla ulaziti (pluteni čep je poželjan). Dozrijevanjem u drvenim bačvama dolazi do otapanja tvari iz drva koje utječu na boju, okus i miris buduće rakije. Za neke vrste rakija, poput šljivovice, komovice, rakije od jabuke, je uobičajeno da dozrijevaju u drvenim bačvama. Hrast je najbolji izbor, jer osim boje daje i druge tvari koje pozitivno utječu na okus i miris rakija. Može se još koristiti i dud koji utječe na boju, ali ne i na okus i miris te se može koristiti i jasen koji za razliku od hrasta i duda ne utječe na boju rakije. Ostale rakije koje trebaju ostati bezbojne dozrijevaju u staklenim ili inox posudama. Nakon dozrijevanja vrši se razrjeđivanje na alkoholnu jakost propisanu Pravilnikom o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09). Razrjeđivanje se provodi destiliranom vodom koja mora biti iste temperature kao i destilat te se voda mora ulijevati polako uz stalno miješanje destilata jer se voda i destilat ne miješaju brzo. Ukoliko se ne koristi destilirana ili meka voda (tvrdoća ne veća od 7 njemačkih stupnjeva) može doći do pojave zamućenja te je onda potrebna filtracija kako bi se dobila bistra rakija.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. Zadatak

Cilj predloženog rada bio je istražiti utjecaj odabranih komercijalnih kvasaca roda *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* vinskih kvasaca, korištenih tijekom fermentacije, na pojedine hlapljive spojeve srednjeg toka destilata dobivenog destilacijom vina od jabuke odnosno vina od askape. Nakon provedenih analiza dobivenih uzoraka provedena je statistička obrada dobivenih rezultata s ciljem određivanja optimalnog kvasca za proizvodnje voćnih rakija od jabuke odnosno askapa.

### 3.2. Materijali i metode

#### 3.2.1. Sirovine

Vino od jabuke i vino od askapa dobiveno je alkoholnom fermentacijom primjenom odabranih komercijalnih vinskih kvasaca u seriji mikrofermentacijskih eksperimenata.

Odabrani komercijalni kvasci korišteni za fermentaciju soka od jabuke iz ekološkog uzgoja bili su:

1. **011 BIO** (Zymaflore®, Laffort, FR) (dalje u radu **K1**),
2. **RMS2** (Actiflore®, Laffort, FR) (dalje u radu **K2J**),
3. **X16** (Zymaflore®, Laffort, FR) (dalje u radu **K3J**),
4. mješovita kultura ne-*Saccharomyces* vinskog kvasca **ALPHA TD** (*Torulasporea delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) i kvasca **X16** (u omjeru 10:1) (dalje u radu **K4J**)

Odabrani komercijalni kvasci korišteni za fermentaciju soka od sibirske borovnice (askapa) iz ekološkog uzgoja bili su:

1. **011 BIO** (Zymaflore®, Laffort, FR) (dalje u radu **K1**),
2. **RX 60** (Zymaflore®, Laffort, FR) (dalje u radu **K2H**)
3. **FX 10** (Zymaflore®, Laffort, FR) (dalje u radu **K3H**)
4. mješovita kultura ne-*Saccharomyces* vinskog kvasca **ALPHA TD** (*Torulasporea delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) i kvasca **FX10** (u omjeru 10:1) (dalje u radu **K4H**)

### 3.2.2. Postupak destilacije

Postupak destilacije je proveden na laboratorijskom uređaju za destilaciju koji se sastojao od:

- Grijaćeg plašta na struju (WiseTherm),
- Tikvice sa okruglim dnom volumena 2500 mL,
- Deflegmatora,
- Nastavak za destilaciju tzv. „račva“,
- Termometar,
- Liebigovo hladilo,
- Nastavak za hvatanje destilata tzv. „lula“,
- Menzura od 100mL za sakupljanje destilata.

Ukupno je destilirano osam (8) različitih uzoraka, četiri (4) vina askapa i četiri (4) vina jabuke. Tijekom destilacije, prvih 0,5 % se odvajalo kao I. tok (prvijenac) kod svih uzoraka te se nakon toga počelo sa hvatanjem II. toka (srce). Kod vina askapa se u II. toku uzimalo (hvatalo) 150 mL jer su se nakon toga počeli pojavljivati neugodni mirisi patoke te se nakon toga počelo sa hvatanjem III. toka (patoka). Kod destilacije vina jabuke u II. toku se hvatalo 160 mL prije nego su se počeli pojavljivati neugodni mirisi patoke. Nakon završene destilacije pripremljeni su uzorci za određivanje hlapivih spojeva na plinskom kromatografu.

**Tablica 2.** Fizikalni parametri destilacije vina od askapa

Uzorak	Haskap K1
Volumen	1 L
Vrijeme do početka destilacija	10 minuta
I tok (mL) 0,5 %	50 mL
II. tok (mL)	150 mL
Konačna alkoholna jakost II toka (% vol)	43 %
Patoka (mL) < 50 % vol	800 mL
Temperatura destilacije	70 – 95 °C

**Tablica 3.** Fizikalni parametri destilacije vina od haskapa

Uzorak	Haskap K2H
Volumen	1 L
Vrijeme do početka destilacija	10 minuta
I. tok (mL) 0,5 %	50 mL
II. tok (mL)	150 mL
Konačna alkoholna jakost II. toka (% vol)	42%
Patoka (mL) < 50 % vol	800 mL
Temperatura destilacije	70 – 90 °C

**Tablica 4.** Fizikalni parametri destilacije vina od haskapa

Uzorak	Haskap K3H
Volumen	1 L
Vrijeme do početka destilacija	11 minuta
I. tok (mL) 0,5 %	50 mL
II. tok (mL)	150 mL
Konačna alkoholna jakost II. toka (% vol)	44 %
Patoka (mL) < 50 % vol	800 mL
Temperatura destilacije	72 – 91 °C

**Tablica 5. Fizikalni parametri destilacije haskapa**

Uzorak	Haskapa K4H
Volumen	1L
Vrijeme do početka destilacija	10 minuta
I. tok (mL) 0,5%	50mL
II. tok (mL)	150mL
Konačna alkoholna jakost II. toka (% vol)	41%
Patoka (mL) < 50% vol	800mL
Temperatura destilacije	72 – 92°C

**Tablica 6. Fizikalni parametri destilacije vina od jabuke**

Uzorak	Jabuka K1
Volumen	1 L
Vrijeme do početka destilacija	15 minuta
I. tok (mL) 0,5 %	50 mL
II. tok (mL)	160 mL
Konačna alkoholna jakost II. toka (% vol)	48 %
Patoka (mL) <50 % vol	790 mL
Temperatura destilacije	73 – -91 °C

**Tablica 7. Fizikalni parametri destilacije vina od jabuke**

Uzorak	Jabuka K2
Volumen	1 L
Vrijeme do početka destilacija	13 minuta
I. tok (mL) 0,5 %	50 mL
II. tok (mL)	160 mL
Konačna alkoholna jakost II. toka (% vol)	49 %
Patoka (mL) <50 % vol	790 mL
Temperatura destilacije	73 – 91 °C

**Tablica 8 Fizikalni parametri destilacije vina od jabuke**

Uzorak	Jabuka K3
Volumen	1L
Vrijeme do početka destilacija	13 minuta
I. tok (mL) 0,5 %	50 mL
II. tok (mL)	160 mL
Konačna alkoholna jakost II toka (% vol)	48 %
Patoka (mL) < 50 % vol	790 mL
Temperatura destilacije	73 – 92 °C

**Tablica 9 Fizikalni parametri destilacije vina od jabuke**

Uzorak	Jabuka K4
Volumen	1 L
Vrijeme do početka destilacija	13 minuta
I. tok (mL) 0,5 %	50 mL
II. tok (mL)	160 mL
Konačna alkoholna jakost II. toka (% vol)	42 %
Patoka (mL) < 50 % vol	790 mL
Temperatura destilacije	73 – 92 °C



**Slika 14.** Laboratorijski uređaj za destilaciju (Izvor: Autor)

### 3.2.3. Određivanje hlapivih spojeva plinskom kromatografijom

Udio etanola (stvarna alkoholna jakost, % vol.) u uzorcima destilata određen je prema metodi Wang i sur. (2003) dok je udio metanola, etil acetata, propan-1-ola, 2-metil-propan-1-ola i 3-metil-butan-1-ola određen prema metodi za određivanje hlapivih srodnih spojeva plinskom kromatografijom, odnosno aldehida, viših alkohola, etil acetata i metanola, opisanoj u Prilogu 1. Pravilnika o analitičkim metodama za jaka alkoholna i alkoholna pića (MPŠVG, 2005).

Analiza je provedena na Shimadzu GC-2010 Plus uređaju za plinsku kromatografiju. Korišteni uređaj se sastoji od pećnice s temperaturnim rasponom od + 4 do + 450 °C, auto injektora AOC-20i, automatskog uzorkivača AOC-20s i plameno-ionizacijskog detektora (FID). Sustav je spojen s izvorima plinova vodika, dušika i zraka, a upravljanje se vrši pomoću specijalnog računalnog programa LabSoulution GCsolution (Release 2.41SU1). Određivanje hlapivih spojeva se vrši direktnim injektiranjem alkoholnog pića, odnosno njegovog odgovarajućeg razrjeđenja uz interni standard u kromatograf. Odjeljivanje spojeva je postignuto temperaturnim programiranjem kolone uz plameno-ionizacijski detektor. Za odjeljivanje sastojaka uzorka korištena je GC kolona InertCap Pure-Wax dimenzija 0,53 mm×30 m, debljine filma 1,0 µm. Temperature injektora i detektora iznosile su 250 i 260 °C. Volumen injektiranja uzorka iznosio je 1 µL (cijepanje 1:10). Početna temperatura kolone iznosila je 45 °C. Nakon 8 minuta uslijedio je porast temperature od 15 °C/min do konačne temperature od 200 °C, na kojoj je kolona održavana još 5 min. Kao plin nosioc korišten je dušik (N<sub>2</sub>) protoka 2,42 mL/min.

### 3.2.4. Određivanje udjela etanola

Određivanje udjela etanola provedeno je prema metodi Wang i sur. (2003). Identifikacija etanola provedena je na osnovu vremena zadržavanja usporedbom s vremenom zadržavanja standarda etanola (Dr. Ehrenstorfer, Njemačka) čistoće 99,9 %, a udio etanola određen je metodom unutarnje (interne) kalibracije. Kao interni standard (I.S.) korišten je acetonitril, čistoće ≥ 99,9 % (J.T. Baker, Nizozemska). Prije određivanja udjela etanola u uzorcima, određen je faktor odziva detektora (engl. *relative response factor*, RRF). U tu svrhu pripremljene su otopine osnovne otopine etanola (E) i acetonitrila (ACN) u koncentraciji od 1 % (w/v) s destiliranom vodom. Za izračun RRF-a iz osnovnih otopina etanola i acetonitrila napravljene su otopine sljedećih omjera (E/ACN) 15:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 i 1:15. Svaka otopina je injektirana u plinski kromatograf i napravljen je pravac linearne regresije. Na pravcu linearne regresije ordinata predstavlja omjer površina E i ACN, a apscisa je omjer



njihovih masenih koncentracija. Faktor odziva detektora (RRF) za etanol u odnosu na interni standard predstavlja nagib dobivenog pravca linearne regresije. Za analizu uzorka vinskog destilata otpipetirano je 0,1 mL uzorka i dodano 1 mL otopine 1 %-tnog internog standarda (I.S.) i otopina direktno injektirana u plinski kromatograf. Masena koncentracija etanola ( $\gamma_E$ ) izračunava se prema **formuli (1)**:

$$\gamma_E \text{ (mg/mL)} = (A_E/A_{(I.S.)}) * (m_{(I.S.)}/RRF) * 1/V \quad (1)$$

gdje je:  $A_E$  - površina pika etanola

$A_{I.S.}$  - površina pika internog standarda

$m_{I.S.}$  - masa internog standarda (mg)

RRF - faktor odziva detektora za etanol

V - volumen uzorka vinskog destilata (mL)

Stvarna alkoholna jakost (% vol.) dobivena je množenjem masene koncentracije etanola,  $\gamma_E$  (mg/mL) s faktorom 0,1167. Analiza uzoraka destilata provedena je u dva ponavljanja, a svaka otopina injektirana dva puta.

### 3.2.5. Određivanje hlapivih srodnih spojeva

Određivanje udjela metanola, etil acetata, propan-1-ola, 2-metilpropan-1-ola i 3-metilbutan-1-ola određen prema metodi za određivanje hlapivih srodnih spojeva plinskom kromatografijom iz Priloga 1. Pravilnika o analitičkim metodama za jaka alkoholna i alkoholna pića (MPŠVG, 2005). Metoda je prikladna za određivanje aldehida, alkohola i estera u različitim alkoholnim pićima (whiskey, vinjaka, rum, rakija od grožđa, voćna rakija i lozovača). Identifikacija srodnih spojeva provedena je na osnovu vremena zadržavanja usporedbom s vremenom zadržavanja standarda, a kvantifikacija metodom internog standarda. Kao interni standard (I.S.) korišten je pentan-1-ol (Dr. Ehrenstorfer, Njemačka), čistoće  $\geq 99,8$  %. Standardi hlapivih srodnih spojeva kupljeni su od firme Dr. Ehrenstorfer, Njemačka, a čistoća spojeva bila je prikladna za GC analizu ( $\geq 98,5$  %). Kao i kod određivanja udjela etanola, određeni su faktori odziva detektora za pojedini hlapivi srodni spoj. Interni standard pripremljen je na način da je otpipetirano 3 mL pentan-1-ola u tikvicu od 100 mL i dopunjeno 40 % (V/V) etanolom. Zabilježena je masa internog standarda i ukupna masa tikvice. Za pripremu otopine hlapivih srodnih spojeva otpipetirano je po 3 mL otopine svakog spoja u odmjernu tikvicu od 100 mL, zapisana je masa svakog dodanog spoja pojedinačno nakon čega je

tikvica dopunjena 40 % (V/V) etanolom. Zapisana je ukupna masa tikvice. Za pripremu otopine za injektiranje (otopina A) otpipetirano je 1 mL otopine hlapivih srodnih spojeva i 1 mL internog standarda u odmjernu tikvicu od 100 mL i dopunjeno 40 % (V/V) etanolom. Zapisana je masa tikvice, masa svake dodane komponente i ukupna masa tikvice. Faktor odziva detektora (RRF<sub>x</sub>) za svaki hlapivi srodni spoj izračunava se prema **formuli (2)**:

$$RRF(x) = \left(\frac{A_{I.S.}}{A_x}\right) * \left(\frac{w_x}{w_{I.S.}}\right) \quad (2)$$

gdje je: A<sub>I.S.</sub> – površina pika internog standarda

A<sub>x</sub> – površina pika hlapivog srodnog spoja

w<sub>x</sub> – maseni udio hlapivog srodnog spoja u otopini A (μg/g)

w<sub>I.S.</sub> – maseni udio internog standarda u otopini A (μg/g).

Za analizu uzorka destilata izvagana je prvo vialica za uzorak. Zatim je otpipetirano 0,9 mL uzorka vinskog destilata, i zabilježena masa. U vialicu za uzorak otpipetirano je 0,1 mL I.S. te ponovo zabilježena masa. Prilikom vaganja treba se zabilježiti i temperatura prostorije obzirom da se u konačni izračun udjela hlapivog srodnog spoja uzima gustoća etanola pri temperaturi vaganja (ρ) koji se očitava iz Tablice: Gustoća kao funkcija temperature i alkoholne jakosti izražene volumenom dane u Prilogu 2. Pravilnika o analitičkim metodama za jaka alkoholna i alkoholna pića (MPŠVG, 2005). Izvagana otopina uzorka se promiješa i direktno injektira u plinski kromatograf. Analiza uzorka destilata provedena je u dva ponavljanja, a svaka otopina injektirana dva puta. Maseni udio hlapivog srodnog spoja (w<sub>x</sub>) izračunava se pomoću **formule (3)**:

$$w_x = \left(\frac{A_E}{A_{I.S.}}\right) * \left(\frac{m_{I.S.}}{m_{uzorka}}\right) * w_{I.S.} * RRF_x \quad (3)$$

gdje je: w<sub>x</sub> – maseni udio hlapivog srodnog spoja u otopini za analizu (μg/g)

A<sub>x</sub> – površina pika hlapivog srodnog spoja

A<sub>I.S.</sub> – površina pika internog standarda

m<sub>I.S.</sub> - masa internog standarda (g)

m<sub>uzorka</sub> – masa uzorka vinskog destilata(g)

w<sub>I.S.</sub> – maseni udio internog standarda u otopini za analizu (μg/g)

RRF<sub>x</sub> – faktor odziva detektora za hlapivi srodni spoj

Konačni prikaz rezultata, odnosno masena koncentracija hlapivog srodnog spoja ( $\gamma_x$ ) u uzorku izračunava se prema **formuli (4)**:

$$\gamma_x = w_x * \rho \frac{10}{alk.jakost_{uzorka} * 1000} \quad (4)$$

gdje je:  $\gamma_x$  – masena koncentracija hlapivog srodnog spoja (g/100 L a.a.)

$w_x$  – maseni udio hlapivog srodnog spoja u otopini za analizu ( $\mu\text{g/g}$ )

$\rho$  – gustoća alkohola ( $\text{kg/m}^3$ )

alkoholna jakost uzorka – stvarna alkoholna jakost uzorka vinskog destilata (% vol.)

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Rezultati analize hlapivih spojeva haskapa

**Tablica 10** Utjecaj *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* vinskih kvasaca, korištenih tijekom fermentacije, na pojedine hlapljive spojeve srednjeg toka destilata dobivenog destilacijom vina od haskapa

Haskap	K1			K2H			K3H			K4H		
	I tok	II tok	III tok	I tok	II tok	III tok	I tok	II tok	III tok	I tok	II tok	III tok
<b>Etanol % vol</b>	68.50	42.36	16.98	66.71	48.33	21.69	62.91	42.51	24.06	86.74	52.98	19.77
<b>γ (uzorka)</b>	889.252	944.1482	976.8141	920.0992	933.3696	971.7398	902.5145	943.8974	969.1402	839.6251	924.1685	973.8106
<b>Acetaldehid</b>	0.00	0.00	0.00	41.20	0.00	0.00	46.80	0.00	0.00	105.33	0.00	0.00
<b>Metanol</b>	476.02	620.34	1140.03	483.89	528.55	984.91	512.02	606.24	919.39	381.71	484.60	984.83
<b>1-Propanol</b>	56.12	42.05	0.00	60.20	40.76	0.00	46.80	34.72	0.00	57.04	40.61	0.00
<b>Etil-acetat</b>	430.11	0.00	0.00	663.24	0.00	0.00	574.35	253.66	0.00	547.55	127.05	95.00
<b>2-butanol</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>2-metil-propanol</b>	232.40	97.89	0.00	385.56	144.60	0.00	337.32	0.00	43.33	226.32	97.11	0.00
<b>Butanol</b>	0.00	0.00	76.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.13	0.00	0.00
<b>Acetal</b>	144.76	0.00	0.00	200.21	0.00	0.00	150.68	0.00	0.00	186.87	0.00	93.53
<b>3-metil-butanol</b>	1610.52	755.57	241.04	1647.65	699.17	191.54	1814.05	838.57	259.09	1121.04	552.40	265.08
<b>2-metil-butanol</b>	353.89	135.07	117.97	463.09	170.67	96.99	387.81	159.58	80.66	325.18	136.31	100.43
<b>hlapive komp</b>	2827.80	1030.59	435.77	3461.16	1055.20	288.53	3357.82	1286.53	383.08	2579.46	953.48	554.04

Iz dobivenih rezultata u Tablici 10 vidi se da je najveća koncentracija alkohola etanola u I. toku za sva četiri uzorka, što se može objasniti time što su pare na početku zasićenije etanolom i sakuplja se manji volumen. U II. toku najveća koncentracija etanola je ostvarena pomoću K4H kvasca od 53 % vol. alkohola, ali također ima veću količinu etil-acetata i manju količinu ukupnih hlapivih spojeva u usporedbi sa K2H kvascem. K2H kvascem postignuta je alkoholna jakost od 48 % vol. alkohola uz odsustvo etil-acetata. Ostalim kvascima se postiže alkoholna jakost od 42 % vol. alkohola. Međutim, sva četiri uzorka zadovoljavaju Pravilnik o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) prema kojem finalni proizvod mora imati minimalnu alkoholnu jakost od 37,5% vol.

Acetaldehid se nalazi samo u I. toku zbog toga što je izuzetno hlapljiv spoj sa točkom vrelišta na 21 °C zbog čega se sav ukloni u prvom toku.

Metanol se nalazi u svim tokovima te je redoviti sastojak vinskih destilata. Nastaje enzimskom hidrolizom pektina čime dolazi do hidrolize metiliranih karboksilnih grupa pektina (Nykänen, 1986). Metanol je toksični spoj te je njegova koncentracija u jakim alkoholnim pićima regulirana Pravilnikom o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) i iznosi 1500 grama po hektolitru preračunato na 100 % vol. alkohola. U svim uzorcima udio metanola je bio ispod maksimalno dopuštene količine određene Pravilnikom.

Najzastupljenija grupa arome jesu viši alkoholi koje kvasac sintetizira tijekom fermentacije. Pri nižim koncentracijama viši alkoholi pridonose kompleksnosti arome dok pri višim koncentracijama narušavaju aromatski profil destilata (Tsakiris i sur., 2014). U malim količinama odgovorni su za ugodnu aromu jakih alkoholnih pića dok u većim količinama daju jak i neugodan okus i miris. Iz priloženih podataka vidi se da 3-metil-butanol i 2-metil-butanol čine većinu viših alkohola te u II. toku dolazi do njihove redukcije što rezultira ugodnom aromom finalnog destilata.

Etil-acetat je najzastupljeniji ester u rakijama s točkom vrelišta 77,1 °C što rezultira time da se izdvaja u I. toku. Pri niskim koncentracijama odgovoran je za cvjetnu i voćnu aromu dok pri višim koncentracijama daje miris na ljepilo. U II. toku ga kao što se vidi iz priloženih podataka nema ili se nalazi vrlo malim koncentracijama koje kromatograf nije mogao detektirati, ali budući da ima niski prag osjetljivosti može se pretpostaviti da utječe pozitivno na aromu dobivenog destilata.

Ukupno hlapivi spojevi imaju najvišu koncentraciju u I. toku što se pripisuje tome što se u njemu nalaze hlapivi spojevi sa niskom točkom vrelišta, a imaju loš utjecaj na kvalitetu destilata, poput: acetaldehida, etil acetata, metanol. Njihovim uklanjanjem u II. tok dospijevaju većinom poželjni spojevi koji pozitivno utječu na aromu destilata dok se nepoželjni spojevi nalaze u vrlo malim koncentracijama kojima ne narušavaju kvalitetu. Zatim se u III. toku izdvajaju zaostali viši alkoholi i ostali spojevi koji imaju visoku temperaturu vrelišta i smanjuju kvalitetu dobivenog destilata. Svi uzorci zadovoljavaju Pravilnik o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) koji definira sadržaj ukupnih hlapivih spojeva od minimalno 200 grama po hektolitr preračunato na 100 % vol. alkohola.

## 4.2. Rezultati analize hlapivih spojeva Jabuke

**Tablica 11** Utjecaj *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* vinskih kvasaca, korištenih tijekom fermentacije, na pojedine hlapljive spojeve srednjeg toka destilata dobivenog destilacijom vina od jabuke

Jabuka	K1			K2J			K3J			K4J		
	I tok	II tok	III tok	I tok	II tok	III tok	I tok	II tok	III tok	I tok	II tok	III tok
<b>Etanol % vol</b>	75.37	51.85	23.95	78.61	46.97	25.96	66.63	48.54	25.51	63.76	40.94	15.94
<b>γ (uzorka)</b>	871.8065	926.4521	969.2687	863.0963	932.1532	967.0111	926.8788	943.8438	967.5192	900.5394	924.2439	977.9327
<b>Acetaldehid</b>	103.38	0.00	0.00	77.60	0.00	0.00	113.68	0.00	0.00	243.60	0.00	0.00
<b>Metanol</b>	65.72	78.60	135.60	55.73	92.50	107.41	77.47	0.00	120.25	90.97	95.54	160.27
<b>1-Propanol</b>	99.61	41.85	0.00	95.28	98.37	44.21	133.67	0.00	0.00	198.12	131.56	90.99
<b>Etil-acetat</b>	517.31	0.00	0.00	491.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1043.42	46.76	0.00
<b>2-butanol</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>2-metil-propanol</b>	37.71	155.77	0.00	310.93	166.08	37.88	401.73	0.00	42.25	626.81	216.76	70.68
<b>Butanol</b>	113.60	69.36	0.00	102.18	85.87	0.00	130.42	0.00	0.00	171.40	90.16	115.31
<b>Acetal</b>	308.38	0.00	0.00	256.02	0.00	0.00	272.76	0.00	0.00	555.02	0.00	0.00
<b>3-metil-butanol</b>	1873.77	860.17	217.84	1521.76	948.70	226.44	2016.09	0.02	244.97	3077.16	1182.17	419.59
<b>2-metil-butanol</b>	386.85	163.89	43.17	353.96	170.53	35.29	512.70	0.00	46.70	639.64	229.28	64.59
<b>hlapive komp</b>	3440.60	1291.04	261.00	3209.00	1469.54	343.82	3581.05	0.03	333.92	6555.18	1896.69	761.17



Iz priloženih podataka u Tablici 11 najveća koncentracija etanola je u I. toku za sva četiri uzorka, kao i kod rezultata vina haskapa rezultat toga jesu zasićenije pare etanolom na početku destilacije i sakupljanjem manjeg volumena u odnosu na II. tok. Međutim, svi uzorci u II. toku zadovoljavaju Pravilnik o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) da finalni proizvod mora imati najmanje 37,5 % vol. alkohola. Najveća koncentracija alkohola u II. toku postigla se korištenjem K1 kvasca dok je najmanja postignuta kod kvasca K4. Uz K1 kvasac postiže se najveća alkoholna jakost od 52 % vol. alkohola i dobiveni destilat sadrži najmanju količinu metanola, n-propanola i butanola u odnosu na ostale destilate (K2J, K3J, K4J).

Acetaldehid se pojavljuje samo u I. toku što znači da se uspješno uklonio na početku destilacije. Koncentracije metanola su niske u svim uzorcima i zadovoljavaju Pravilnik o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09), da u rakiji od jabučnog vina ne smije biti više od 1000 grama metanola po hektolitr preračunato na 100% vol. alkohola.

Sadržaj viših alkohola je kod rakije od jabuka znatno viši u odnosu na rakije od ostalog voća. U II. toku dolazi do znatne redukcije svih viših alkohola što jasno pokazuje da je destilacija dobro provedena i da je pravilno odvojen I tok. 3-metil-butanol i 2-metil-butanol čine većinu viših alkohola, pri koncentraciji većoj od 500 grama po hektolitr oni daju negativni utjecaj na destilat koji se senzorski opisuje kao „alkoholni“ okus i miris. Butanol ne pridonosi okusu i mirisu destilata, ali ukoliko se pojavljuje u koncentraciji većoj od 50 grama po hektolitr 100 % vol. alkohola ukazuje na kontaminaciju octenim bakterijama. Prema Winterova i sur. (2008) koncentracije n-propanola u rakiji od jabuka kreću se u rasponu od 12,1 g/100 L a.a. do 229 g/100 L a.a. Povišena koncentracija n-propanola može biti pokazatelj mikrobiološkog kvarenja sirovine.

Acetal je spoj koji nastaje vezivanjem etanola sa acetaldehidom, acetal se može oksidirati u acetaldehid koji daljnjom oksidacijom prelazi u octenu kiselinu. Tijekom destilacije acetal se uklonio u I. toku kao što je vidljivo iz rezultata u Tablici 11.

Etil-acetat se nalazi samo u I. toku zbog niske točke vrelišta, iako se kod kvasca K4 nalazi i u II toku što bi se moglo pripisati lošoj provedbi destilacije i nedovoljnom uklanjanju I toka ili lošoj sirovini. Zbog nešto višeg sadržaja n-propanola pretpostavka je da je došlo do bakterijskog kvarenja sirovine.

Ukupno hlapivi spojevi u II. toku zadovoljavaju Pravilnik o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) koji definira najmanje 200 grama hlapivih spojeva na 100 % vol. alkohola.

## **5. ZAKLJUČAK**

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

- Proizvedeni destilati vina od jabuke i vina od haskapa zadovoljavaju kakvoću propisanu Pravilnikom o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09).
- Analizom svih frakcija pokazalo se da se najviše štetnih tvari nalazi u prvijencu za sve ispitivane uzorke što je rezultat pravilne provedbe destilacije. Pravovremenim početkom sakupljanja II. toka osigurava se maksimalna količina etanola i tvari arome u destilatu (rakiji), bez tvari koje narušavaju kvalitetu finalnog proizvoda (rakije).
- Mješovita kultura odabranih komercijalnih vinskih kvasaca Zymaflore® ALPHA TD i Zymaflore® FX10 (K4H), kod vina od haskapa, daje najveću alkoholnu jakost u destilatu (53 % vol. alkohola). S druge strane destilat sadrži veću količinu etil-acetata i manju količinu ukupno hlapivih spojeva u usporedbi s komercijalnim kvascem Zymaflore® RX60 (K2H), koji je postigao alkoholnu jakost od 48 % vol. alkohola uz odsustvo etil-acetata te veću ukupnu količinu hlapivih spojeva. Blaga prednost korištenja u proizvodnji ipak odlazi na stranu kvasca K4H (koinokulacija) zbog veće količine nastalog etanola. Ostalim kvascima postiže se alkoholna jakost od 42 % vol. alkohola čime su ovi kvasci inferiorniji za upotrebu u proizvodnji navedene rakije.
- Zymaflore® 011 BIO (K1) u proizvodnji destilata vina od jabuke daje najveću alkoholnu jakost od 52 % vol. alkohola. Destilat dobiven destilacijom vina od jabuke fermentiranog kvascem K1 sadrži najmanju količinu metanola, n-propanola i butanola u odnosu na ostale destilate (K2J, K3J, K4J), što upućuje da je ovaj kvasac najpogodniji za provedbu alkoholne fermentacije i proizvodnju rakije od jabuke.

## **6. LITERATURA**

- Abbott, Judith A, Robert A Saftner, Kenneth C Gross, Bryan T Vinyard, and Jules Janick. 2004. "Consumer Evaluation and Quality Measurement of Fresh-Cut Slices of 'Fuji,' 'Golden Delicious,' 'GoldRush,' and 'Granny Smith' Apples." *Postharvest Biology and Technology* 33 (2): 127–40. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.12.008>.
- Alberti, Aline, Renato Giovanetti Vieira, Jean Françoise Drilleau, Gilvan Wosiacki, and Alessandro Nogueira. 2011. "Apple Wine Processing with Different Nitrogen Contents." *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54 (3): 551–58. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000300017>.
- Caballero, Benjamin, Paul M. Finglas, and Fidel Toldrá. 2015. *Encyclopedia of Food and Health*. Burlington, United Kingdom: Elsevier Science.
- Canonico, Laura, Edoardo Galli, Enrico Ciani, Francesca Comitini, and Maurizio Ciani. 2019. "Exploitation of Three Non-Conventional Yeast Species in the Brewing Process." *Microorganisms* 7 (1): 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010011>.
- Jermić, Tomislav, Zoran Šindrak, Marina Skenderović, Goran Fruk, Marin Mihaljević Žulj, and Ana-Marija Jagatić korenika. 2014. *Proizvodnja Jabučnog Vina Na Obiteljskim Poljoprivrednim Gospodarstvima*. Zagreb: Agronomski fakultet.
- Jolly, Neil P., Cristian Varela, and Isak S. Pretorius. 2014. "Not Your Ordinary Yeast: Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production Uncovered." *FEMS Yeast Research* 14 (2): 215–37. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>.
- Kellerhals, Markus. 2009. "Introduction to Apple (*Malus × Domestica*)." In *Genetics and Genomics of Rosaceae*, edited by Kevin M. Folta and Susan E. Gardiner, 73–84. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6_4).
- Keršek, Emil. 2006. *Ljekovito bilje u vinu i rakiji: kako možete sami prirediti ljekovite eleksire i travarice*. 2. dop.izd. Zagreb: V.B.Z.
- Kocaefe-Özşen, Nazlı, Bahtiyar Yilmaz, Ceren Alkım, Mevlüt Arslan, Alican Topaloğlu, Halil İbrahim Kısakesen, Erdinç Gülsev, and Z. Petek Çakar. 2022. "Physiological and Molecular Characterization of an Oxidative Stress-Resistant *Saccharomyces Cerevisiae*

- Strain Obtained by Evolutionary Engineering." *Frontiers in Microbiology* 13 (February): 822864. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.822864>.
- Kolb, Erich, and Ante V. Miličević. 2007. *Voćna vina proizvodnja u kućanstvu i obrtu*. Požega: ITD Gaudeamus.
- Lee, Yeon-Ju, Yu-Ri Choi, So-Young Lee, Jong-Tae Park, Jae-Hoon Shim, Kwan-Hwa Park, and Jung-Wan Kim. 2011. "Screening Wild Yeast Strains for Alcohol Fermentation from Various Fruits." *Mycobiology* 39 (1): 33–39. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2011.39.1.033>.
- Loira, Iris, Antonio Morata, Felipe Palomero, Carmen González, and José Suárez-Lepe. 2018. "Schizosaccharomyces Pombe: A Promising Biotechnology for Modulating Wine Composition." *Fermentation* 4 (3): 70. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030070>.
- Maicas, Sergi. 2020. "The Role of Yeasts in Fermentation Processes." *Microorganisms* 8 (8): 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>.
- Martin, Valentina, Maria Valera, Karina Medina, Eduardo Boido, and Francisco Carrau. 2018. "Oenological Impact of the Hanseniaspora/Kloeckera Yeast Genus on Wines—A Review." *Fermentation* 4 (3): 76. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030076>.
- Morata, Antonio, Carlos Escott, María Bañuelos, Iris Loira, Juan del Fresno, Carmen González, and José Suárez-Lepe. 2019. "Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine Freshness. A Review." *Biomolecules* 10 (1): 34. <https://doi.org/10.3390/biom10010034>.
- Morata, Antonio, Iris Loira, Carlos Escott, Juan Manuel del Fresno, María Antonia Bañuelos, and José Antonio Suárez-Lepe. 2019. "Applications of Metschnikowia Pulcherrima in Wine Biotechnology." *Fermentation* 5 (3): 63. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030063>.
- Morata, Antonio, Iris Loira, Wendu Tesfaye, María Bañuelos, Carmen González, and José Suárez Lepe. 2018. "Lachancea Thermotolerans Applications in Wine Technology." *Fermentation* 4 (3): 53. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>.

- Padilla, Beatriz, José V. Gil, and Paloma Manzanares. 2016. "Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity." *Frontiers in Microbiology* 7 (March). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>.
- Parapouli, Maria, Anastasios Vasileiadi, Amalia-Sofia Afendra, Efstathios Hatziloukas, 2020. "Saccharomyces Cerevisiae and Its Industrial Applications." *AIMS Microbiology* 6 (1): 1–32. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>.
- Pfeiffer, Thomas, and Annabel Morley. 2014. "An Evolutionary Perspective on the Crabtree Effect." *Frontiers in Molecular Biosciences* 1 (October). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>.
- MPŠVG, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva: Pravilnik o analitičkim metodama za jaka alkoholna i alkoholna pića. Narodne novine 38/05, 2005.
- MPŠVG, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva: Pravilnik o jakim alkoholnim i alkoholnim pićima. Narodne novine 61/09.
- Pretorius, Isak S. 2000. "Tailoring Wine Yeast for the New Millennium: Novel Approaches to the Ancient Art of Winemaking." *Yeast* 16 (8): 675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B).
- Ramírez, Manuel, and Rocío Velázquez. 2018. "The Yeast *Torulaspota Delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking." *Fermentation* 4 (4): 94. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040094>.
- Rantsiou, Kalliopi, Paola Dolci, Simone Giacosa, Fabrizio Torchio, Rosanna Tofalo, Sandra Torriani, Giovanna Suzzi, Luca Rolle, and Luca Cocolin. 2012. "Candida Zemplinina Can Reduce Acetic Acid Produced by *Saccharomyces Cerevisiae* in Sweet Wine Fermentations." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (6): 1987–94. <https://doi.org/10.1128/AEM.06768-11>.
- Rupasinghe, H. P. Vasantha, Li Juan Yu, Khushwant S. Bhullar, and Bob Bors. 2012. "Short Communication: Haskap ( *Lonicera Caerulea* ): A New Berry Crop with High Antioxidant



Capacity.” *Canadian Journal of Plant Science* 92 (7): 1311–17.  
<https://doi.org/10.4141/cjps2012-073>.

Stewart, G.G. 2014. “SACCHAROMYCES | *Saccharomyces Cerevisiae*.” In *Encyclopedia of Food Microbiology*, 309–15. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5>.

Thompson, Maxine M. 2006. “Introducing Haskap, Japanese Blue Honeysuckle” 60 (4): 164–68.

Torija, M. 2003. “Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces Cerevisiae*.” *International Journal of Food Microbiology* 80 (1): 47–53.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00144-7).

Ugwu, K.C., C.C. Mbajorgu, W.I. Okonkwo, and A.O. Ani. 2018. “Design, Fabrication and Performance Evaluation of a Portable Hand-Held Refractometer.” *Nigerian Journal of Technology* 37 (2): 537. <https://doi.org/10.4314/njt.v37i2.33>.

Van Der Walt, J. P., and Amelia E. Van Kerken. 1958. “The Wine Yeasts of the Cape: Part I.—A Taxonomical Survey of the Yeasts Causing Turbidity in South African Table Wines.” *Antonie van Leeuwenhoek* 24 (1): 239–52. <https://doi.org/10.1007/BF02548451>.

Wang, Yanli, Wing-Cheong Lo, and Ching-Shan Chou. 2017. “A Modeling Study of Budding Yeast Colony Formation and Its Relationship to Budding Pattern and Aging.” Edited by Natalia L. Komarova. *PLOS Computational Biology* 13 (11): e1005843.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005843>.

Web 1: <https://www.vrtlarica.hr/jabuka-sadnja-uzgoj/>

Web 2: <https://strojevi-gospodarstvo/muljaca-grozde-voce-inox-el-alu-valjicima>

Web3:<https://agrosavjet.com/sibirska-borovnica-gajenje-rasprostranjenost-i-lijeovitost/>

Web 4: <https://zarucene.sk/produkt/vinarsky-refraktometer-0-40-brix-0-25-alkohol/>

Web5:

[https://www.krizevci.net/vinograd/htm/sav\\_odredjivanje\\_alkohola\\_u\\_destilatima.html](https://www.krizevci.net/vinograd/htm/sav_odredjivanje_alkohola_u_destilatima.html)

Web6:[https://static.kupindoslike.com/Vrenjaca-univerzalna-do-50l\\_slika\\_XL\\_25453893.jpg](https://static.kupindoslike.com/Vrenjaca-univerzalna-do-50l_slika_XL_25453893.jpg)

Web7:<https://www.polsinelli.it/fr/fermenteur-de-bi%C3%A8re-r%C3%A9frig%C3%A9r%C3%A9-inox-200-l-fond-plat-P1899.htm>

Web 8: <https://enolog.rs/mikrobiologija-vina/vinski-krvasac-ciklus-razvika/>

Web 9: <https://gospodarski.hr/wp-content/uploads/slika-17-766x1024.jpg>