

# Proizvodnja i karakterizacija voćnog vina od sibirske borovnice (*Lonicera caerulea*) dobivenog upotrebom odabranih vrsta selekcioniranih vinskih kvasaca

---

Klobučar, Tomislava

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:109:099205>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Tomislava Klobučar

PROIZVODNJA I KARAKTERIZACIJA VOĆNOG VINA OD SIBIRSKE  
BOROVNICE (*Lonicera Caerulea*) DOBIVENOG UPOTREBOM ODABRANIH  
VRSTA SELEKCIONIRANIH VINSKIH KVASACA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo  
Franje Kuhača 18, 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.

**Proizvodnja i karakterizacija voćnog vina od sibirske borovnice (*Lonicera Caerulea*) dobivenog upotrebom odabranih vrsta selekcioniranih vinskih kvasaca**  
*Tomislava Klobučar, 0113141676*

**Sažetak:**

Cilj rada bio je istražiti različiti utjecaj selekcioniranih vinskih kvasaca roda *Saccharomyces* (Zymaflore® 011 BIO, RX60 i FX10) i ne-*Saccharomyces* (*Torulaspota delbrueckii*, Zymaflore® ALPHA TD) na kinetiku fermentacije, fizikalno-kemijska svojstva, udio ukupnih polifenola te antioksidativnu aktivnost u soku/vinu od sibirske borovnice iz ekološkog uzgoja. Istraživanje 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 sibirske borovnice. Primjenom komercijalnog kvasca Zymaflore® RX60 postignuta je najveća specifična brzina fermentacije. Kod koinokulacijskog eksperimenta sa *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* vinskim kvascima (FX10 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 ukupnih polifenola te posljedičnim smanjenjem antioksidativne aktivnosti. Također, uočeno je smanjenje koncentracije antocijana u voćnom vinu od sibirske borovnice u odnosu na polazni sok sibirske borovnice.

**Ključne riječi:** voćno vino od sibirske borovnice, fermentacija, *Saccharomyces*, ukupni polifenoli

**Rad sadrži:** 48 stranica  
15 slika  
2 tablice  
45 literaturnih referenci

**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:** 11. srpanj 2024.

**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 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.

**Production and Characterization of Siberian Blueberry (*Lonicera caerulea*) Fruit Wine Obtained Using Different Strains of Selected Wine Yeasts**  
*Tomislava Klobučar, 0113141676*

### Summary:

The aim of the study was to investigate the influence of selected wine yeasts *Saccharomyces* (Zymaflore® 011 BIO, RX60 I FX10) and non-*Saccharomyces* (*Torulaspota delbrueckii*, Zymaflore® ALPHA TD) on fermentation kinetics, physico-chemical properties, total polyphenols content and the antioxidant activity in the juice/wine of organic blueberries. The study 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 organic blueberry fruit wine. The highest specific fermentation rate was achieved with the commercial yeast Zymaflore® RX60. In the co-inoculation experiment with *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wine yeasts (FX10 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, as well as a reduction in anthocyanins concentration in blueberry wine.

**Key words:** *Fruit wine, Siberian blueberry, Fermentation, Saccharomyces, Total polyphenols*

**Thesis contains:** 48 pages  
15 figures  
2 tables  
45 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |  |             |
|--|-------------|
| 1. <i>Natalija Velić</i> , PhD, full prof.       | Chairperson |
| 2. <i>Darko Velić</i> , PhD, full prof.          | Supervisor  |
| 3. <i>Ante Lončarić</i> , associate prof., PhD   | member      |
| 4. <i>Krunoslav Aladić</i> , assistant prof. PhD | stand-in    |

**Defense date:** 11<sup>th</sup> July, 2024

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

## **Zahvala**

*Na početku, želim izraziti veliku zahvalnost svim profesorima na prenesenom znanju, posebno, prof. dr. sc. Darku Veliću, čiji su savjeti i podrška bili ključni za izradu ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima koji su uvijek bili tu i pružali podršku svojim riječima u pravo vrijeme.*

*Velika zahvala ide i mojim dragim kolegama i prijateljima, koji su uljepšali studentski život svojim prisustvom i pomogli da sve bude manje stresno čak i kad studentske obveze nisu stvarale stres.*

*Posebno želim zahvaliti svojoj mlađoj sestri Klari, njen zahtjevan, ali poticajan pristup potaknuo me da se razvijam i budem bolja osoba.*

*Naposljetku, želim zahvaliti i sebi jer nisam odustala i jer sam vjerovala u sebe.*

# Sadržaj

<b>I. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>II. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Voćna vina.....	4
2.2. Sibirska borovnica .....	6
2.2.1. Kemijski sastav sibirske borovnice.....	7
2.3. Starter kulture.....	10
2.4. Proizvodnja voćnog vina od sibirske borovnice .....	11
2.4.1. Berba sibirske borovnice .....	11
2.4.2. Probiranje i pročišćavanje .....	12
2.4.3. Usitnjavanje i prešanje .....	12
2.4.4. Priprema mošta za fermentaciju .....	12
2.4.5. Fermentacija.....	13
2.4.6. Pretok .....	15
2.4.7. Njega i bistrenje.....	15
2.4.8. Punjenje i označavanje boca .....	16
2.5. Kemijski sastav voćnog vina .....	16
2.5.1. Alkoholi.....	17
2.5.2. Šećeri .....	17
2.5.3. Organske kiseline.....	18
2.5.4. Hlapljivi (aromatski) spojevi .....	18
2.5.5. Vitamini i minerali .....	19
2.5.6. Polifenolni spojevi i antioksidativna aktivnost .....	19
2.6. Fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće voćnih vina .....	20
2.6.1. Relativna gustoća .....	20
2.6.2. Alkoholna jakost .....	20
2.6.3. Ukupni suhi ekstrakt.....	20
2.6.4. Reducirajući šećeri.....	21
2.6.5. Ukupna kiselost .....	21
2.6.6. Hlapiva kiselost .....	21
2.6.7. pH vrijednost .....	21
2.6.8. Ukupni i slobodni SO <sub>2</sub> .....	22
2.6.9. Pepeo.....	22
<b>III. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>23</b>
3.1. Zadatak .....	24
3.2. Materijali.....	24
3.3. Oprema .....	25
3.4. Metode .....	25
3.4.1. Proces proizvodnje vina od sibirske borovnice u laboratorijskom mjerilu.....	25

3.4.2. Praćenje fermentacijske aktivnosti kvasca – određivanje CO <sub>2</sub> oslobođenog tijekom mikrofermentacija .....	30
3.4.3. Određivanje refraktometrijske vrijednosti .....	31
3.4.4. Određivanje ukupnih polifenola .....	32
3.4.5. Antioksidacijska aktivnost DPPH metoda .....	32
3.4.6. Spektrometrijsko određivanje antocijana .....	32
<b>IV. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>34</b>
4.1. Utjecaj dodataka <i>Saccharomyces</i> i ne- <i>Saccharomyces</i> vinskih kvasaca na kinetiku fermentacije .....	35
4.2. Udio ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost vina od sibirске borovnice .....	37
4.3. Spektrofotometrijsko određivanje antocijana .....	39
4.4. Fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće voćnog vina od sibirске borovnice .....	41
<b>V. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>42</b>
<b>VI. LITERATURA.....</b>	<b>44</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

°Bx	stupnjevi Brix
AF	alkoholna fermentacija
BMK	bakterije mliječne kiseline
MLF	malolaktička fermentacija
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
v/v	volumni udio (engl. Volume per volume)
TE	ekvivalent trolox kiseline
AICV	European Cider and Fruit Wine Association
MP	Ministarstvo poljoprivrede
MPŠ	Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva
MPŠVG	Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva
C3G	cijanidin-3-glukozida
FW	masa svježeg proizvoda (engl. Fresh Weight)



## **I. UVOD**

Zakon o vinu definira vino kao poljoprivredni prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg ili za preradu u vino pogodnog grožđa (Zakon o vinu, NN 32/19). Ovaj rad bavit će se prvenstveno voćnim vinima, a prema Pravilniku o voćnim vinima, to je prehrambeni proizvod dobiven fermentacijom soka ili masulja od svježeg i za to pogodnog koštičavog, jezgričavog, jagodičastog, bobičastog ili ostalog voća i ima minimalni sadržaj prirodnog alkohola 1,2 % vol. (NN 81/22).

Voćna vina su izvor fenolnih i mineralnih tvari, a u njima, u malim količinama, mogu biti prisutni i vitamini A, C, D i K (Kosseva i sur, 2017).

Proizvodnja voćnih vina je tehnološki proces koji je vrlo sličan procesu proizvodnje vina (od grožđa) te često uključuje i dodatne korake prilagođene karakterističnim svojstvima voća, uključujući kontrolu ukupnih šećera i ukupne kiselosti (Velić i sur., 2018). Proizvodnja voćnih vina obuhvaća nekoliko ključnih faza, uključujući muljanje ploda, maceraciju (predfermentaciju), fermentaciju te procese zrenja i odležavanja. Suvremenim dostignućima u enologiji i enokemiji omogućeno je precizno upravljanje fermentacijom, bez obzira radi li se o intenzitetu vrenja ili temperaturi mošta i/ili vina. Također, u proizvodnji voćnih vina koriste se selekcionirani vinski kvasci i enzimski pripravci. Enzimi se dodaju jer pozitivno utječu na iskorištenje sirovine, ekstrakciju tvari boje i arome iz ploda te na stabilnost i okus voćnih vina, a najčešće korišteni enološki enzimi su pektinaze (Bautista i sur., 2005).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj odabranih selekcioniranih vinskih kvasaca (*Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces*) na kinetiku fermentacije, fizikalno-kemijska svojstva, udio ukupnih polifenola te antioksidativnu aktivnost u soku/vinu od sibirske borovnice iz ekološkog uzgoja.

## **II. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Voćna vina

Voćna vina proizvode se fermentacijom mošta dobivenog prešanjem raznih vrsta voća kao što su šljive, kruške, jabuke, trešnje itd. Postupak proizvodnje voćnih vina sličan je proizvodnji vina od grožđa, ali razlikuje se ovisno o vrsti voća i željenim svojstvima konačnog proizvoda. Voće se prije prešanja samelje te se potom isprešani sok (mošt) podvrgava alkoholnoj fermentaciji. U tu svrhu koriste se selekcionirani kvasci koji imaju dobra fermentacijska svojstva i pri nižim temperaturama (Jemrić i sur., 2008). Voćna vina u posljednje vrijeme postala su popularna jer se smatraju funkcionalnom hranom. Funkcionalna hrana i nutraceutski pripravci postaju trend u industriji hrane koje karakterizira stalni porast u prodaji i lansiranje novih proizvoda. Različita voćna vina pokazala su se kao dobar izvor minerala, antioksidansa i fitonutrijenata, kao što su karotenoidi i fenolni spojevi (Velić i sur., 2018b).

Vine i sur. (1997) ističu jednu od prednosti proizvodnje vina od jabučastog i bobičastog voća. Takve voćne vrste sazrijevaju tijekom proljetnih i ljetnih mjeseci, odnosno puno prije početka sezone berbe grožđa, što im osigurava veću učinkovitost i raznolikost u samoj vinariji. Također, spajanje različitih vrsta vina u portfelj proizvoda itekako privlači mnoge vinare.

Percepcija potrošača jedna je od prepreka prodaje voćnih vina. Voćna vina često se povezuju s grupom proizvoda domaće izrade i niže kvalitete. U odnosu na proizvodnju vina od grožđa, povećanje proizvodnje voćnih vina od „domaće“ male proizvodnje do industrijske, odvija se puno sporije (Velić i sur., 2018b). U nekim zemljama Europske Unije (EU) proizvodnja cidera i voćnih vina raste te je 1968. godine osnovano Europsko udruženje cidera i voćnih vina (engl. *The European Cider and Fruit Wine Association*) (AICV). Belgija, Danska, Finska, Francuska, Njemačka, Irska, Luksemburg, Poljska, Španjolska, Švedska, Nizozemska i UK predstavljaju proizvođače cidera i voćnih vina. Članovi AICV-a uključuju trgovinska udruženja s najvećeg tržišta cidera diljem EU i predstavljaju sve glavne proizvođače cidera uključujući Heineken, Carlsberg, C&C i Kopparberg. Zajedno, to predstavlja više od 80 % svih cidera prodanih diljem Europe. Članovi se obvezuju proizvoditi cider i voćna vina od fermentiranog voćnog soka po AICV Kodeksu prakse koji propisuje da se cider i perry proizvode fermentacijom sokova jabuka i kruške, bez dodatka destiliranog alkohola (AICV, 2022). Voćna vina karakteristična za našu regiju s kontinentalnom klimom su prije svega ona od bobičastog voća (kupina, malina, jagoda, borovnica, ribizl), kao i višnje te jabuke. Posljednjih godina, proizvodnja i konzumacija voćnih vina (posebice kupinovog vina) u Hrvatskoj je povećana. Međutim, velika većina proizvođača

jesu mala obiteljska gospodarska koja imaju poteškoća osigurati potrebne količine za rastuće tržište. Shodno tome, voćna vina su još uvijek komercijalno nedovoljno zastupljena (Velić i sur. 2018).

Prema Pravilniku o vinarstvu (NN 81/22), voćno vino stavljeno 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,
- pepeo najmanje 1 g/L.

## 2.2. Sibirska borovnica

Lovrenčić i Šimunović (2014) navode da je haskap (*Lonicera caerulea* L.), još poznat pod nazivima kozja krv ili modra kozokrvina, jagodičasta voćna vrsta podrijetlom iz sjeveroistočne Azije. Raste u Rusiji, Kini i Japanu te u navedenim zemljama postoji duga tradicija uzgoja ove voćne vrste, dok se u novije vrijeme sve više uzgaja u Slovačkoj i Poljskoj. U Hrvatskoj su zasađene manje površine. S obzirom na porijeklo iz Sibira, podnosi vrlo niske temperature čak od -45 do -47 °C bez značajnih oštećenja same biljke.



**Slika 1** Sibirska borovnica iz ekološkog uzgoja (Izvor: Autor)

Haskap je otporan na hladnoću, štetočine, različite kiselosti tla i bolesti. Međutim, njegova privlačnost uglavnom je povezana s njegovim svojstvima za zdravlje (Gošba i sur., 2020). Haskap je listopadni grm koji može narasti i do 3 m u visinu, dok u širinu može narasti do 1,5 m. Dugovječna je biljka koja doživi otprilike od 25 do 30 godina. Sam plod haskapa je bobica duguljastog oblika i plavo ljubičaste boje dužine od 2 do 3 cm (Lovrenčić i Šimunović, 2014). Ovaj višegodišnji grm proizvodi jestive plave bobice koje se značajno razlikuju po okusu, obliku i veličini. Okus je opisan kao kombinacija maline (*Rubus* sp.) i borovnice (*Vaccinium* sp.), varirajući od blagog, slatkog, donekle kiselog, do blago gorkog okusa (Leisso i sur., 2021).

Lovrenčić i Šimunović (2014) ističu kako su za Kanadu i Ameriku najpopularnije kanadske sorte, a to su Aurora, Borealis, Tundra, Indigo Gem, Honey Bee, Berry Smart Blue. Neke od ovih sorti prikazane su na **Slici 2**.



Aurora

Borealis

Indigo Gem

**Slika 2** Sorte sibirske borovnice (Izvor: Lovrenčić i Šimunović, 2014)

Wang i sur. (2023) navode kako ovu bobicu nazivaju i eliksirom života zbog svog kemijskog sastava.

### 2.2.1. Kemijski sastav sibirske borovnice

Haskap bobice bogate su fenolnim spojevima i askorbinskom kiselinom, koji mogu djelovati kao antioksidansi u biološkim sustavima. Konzumacija bobica sibirske borovnice može doprinijeti uravnoteženoj prehrani te imati potencijalni doprinos u očuvanju zdravlja zbog svojih antiupalnih, antikancerogenih, antidijabetičkih, neuroprotektivnih i kardioprotektivnih svojstava. Prethodna istraživanja koja su upućivala na posljedice za ljudsko zdravlje temeljena su na *in vitro* analizama, kao i prekliničkim studijama na životinjskim modelima i ljudima. Bioaktivni sastojci haskap bobica uključuju antocijane i fenole poput cijanidin-3-glukozida, klorogenske kiseline, ferulne kiseline i rutina. Iako je poznato da su haskap bobice bogate antocijanima i ukupnim sadržajem fenola u usporedbi s nekim drugim bobicama, poput borovnica, utjecaj postupaka prerade na osnovne hranjive tvari bobica ostaje uglavnom neistražen (Wang i sur., 2023).

Isto tako, Leisso i sur. (2021) ističu kako su studije pokazale da bobice imaju veći antioksidativni kapacitet od mnogih drugih voćnih vrsta, uključujući borovnice, a pregled recentne literature navodi brojne zdravstvene prednosti, uključujući svojstva protiv dijabetesa, protuupalna

svojstva i svojstva protiv raka. Haskap voće sastoji se uglavnom od vlakana, proteina, kalcija i magnezija, ali također sadrži visoke koncentracije glukoze i fruktoze te tragove saharoze i sorbitola (Leisso i sur., 2021).

Haskap je bogat izvor višestruko nezasićenih masnih kiselina, s značajnim razinama linolne kiseline, te je također prepoznat po visokoj koncentraciji askorbinske kiseline. Često haskap nazivaju „super voćem“ jer je sadržaj askorbinske kiseline tri do deset puta veći nego u borovnicama, koje se smatraju jednim od najbogatijih izvora ove organske kiseline. Što se tiče fenolnih spojeva, ovo voće je posebno bogato fenolnim kiselinama poput klorogenske, neoklorogenske i kafeinske kiseline, antocijaninima, proantocijanidinima i drugim flavonoidima poput kvercetina (njegovih glikozida) i katehina (Molina i sur., 2019). Bogatstvo haskapa antocijaninskim spojevima prikazano je u različitim studijama, gdje je pokazano da je glavni antocijanin u ovom voću cijanidin 3-glukozid, čineći 79 – 92 % ukupnog sadržaja. Ostali antocijanini prisutni u manjim količinama su cijanidin 3,5-diglukozid (4,27 %), cijanidin 3-rutinozid (2,07 %), peonidin 3-glukozid (3,44 %) i pelargonidin 3-glukozid (0,83 %) (Molina i sur., 2019).

Sadržaj cijanidin-3-glukozida (C3G) izmjeren za haskap sorte uzgajane u Kanadi kreće se između 68 i 649 mg/100 g svježe mase (engl. *Fresh weight - FW*). Ove vrijednosti značajno su veće u usporedbi s drugim uobičajenim bobicama poput jagoda (3,7 mg/100 g FW), borovnica (3,0 mg/100 FW), brusnica (0,7 mg/100 FW) i aronije (1,7 mg/100 FW). Još jedna značajna karakteristika haskapa je visok sadržaj vitamina C (askorbinske kiseline), koji varira između 29 i 187 mg/100 g FW. Zanimljivo je da je sadržaj vitamina C u nekim sortama haskapa značajno veći u usporedbi s nekim od najbogatijih izvora vitamina C, kao što su naranče (53.2 mg/100 g FW), jagode (58.8 mg/100 g FW), maline (26.2 mg/100 g FW) i kupine (21 mg/100 g FW) prema američkom Ministarstvu poljoprivrede (USDA). Zbog sadržaja C3G i vitamina C, haskap nesumnjivo ima potencijal za ostvarivanje veće zdravstvene koristi od drugih uobičajeno konzumiranih bobica. To je potaknulo trenutačni istraživački interes u proučavanje potencijala haskapa kao novog funkcionalnog hrskavog voća ili tzv. Super voća (Rupasinghe i sur., 2018).

Govoreći o sastavu organskih kiselina, važno je naglasiti njihovu važnost za senzorsku kvalitetu voća. Količina organskih kiselina negativno je povezana s intenzitetom svjetla, suprotno od količine akumuliranih šećera. Također je utvrđeno da je sadržaj organskih kiselina negativno povezan s ukupnim fenolima, što znači da kiseline opadaju kada se povećava sadržaj fenola.



Najrasprostranjenije organske kiseline pronađene u plodovima haskapa su već spomenuta limunska kiselina, koja čini 62 % ukupnih organskih kiselina, jabučna kiselina (30 %), kininska kiselina (6 %), vinska kiselina (1 %), šikimična i fumarinska kiselina. Ove vrijednosti odgovaraju ukupnom sadržaju organskih kiselina u plodovima haskapa od 6.55 do 8.85 mg/g, a rezultati ovise o lokaciji uzgoja voća. Fruktaza čini više od polovice (55 %) ukupnih šećera pronađenih u bobicama. Ostali šećeri prisutni u voću su glukoza (43 %) i saharoza (3 %). Smatra se da voće sadrži manje šećera nego, na primjer, borovnice, i može se preporučiti za dijabetičku prehranu. Ukupan sadržaj šećera kreće se od otprilike 15 mg/g do 25,85 mg/g svježeg voća, dok je vrijednost za borovnice 78,1 mg/g, za maline 45,5 mg/g, a za crveni ribiz 38,2 mg/g. Veća izloženost svjetlu i kasnije vrijeme berbe pozitivno koreliraju sa sadržajem šećera. Jedna sorta koja je siromašna šećerom je *honeybee*, koja sadrži 15,57 mg/g, dok se više razine mogu primijetiti kod sorti *tundra* (17,34 mg/g) i *aurora* (25,85 mg/g). Kada je riječ o sadržaju minerala, plodovi haskapa sadrže slične količine kalija, kalcija i magnezija kao ostalo bobičasto voće. Kalij je najrasprostranjeniji mineral pronađen u plodovima, slijede ga fosfor, magnezij i kalcij, dok natrij pokazuje najnižu koncentraciju. Sadržaj spomenutih minerala može znatno varirati. Niže vrijednosti minerala mogu proizaći iz razlika u uvjetima uzgoja i utjecaju klimatskih promjena. Minerali igraju važnu ulogu u procesima poput prijenosa živčanih impulsa, stvaranja hormona i regulacije otkucaja srca. Osim toga, oni su i strukturni dio brojnih enzima te su također među ključnim faktorima odgovornim za funkcioniranje imunološkog i moždanog sustava (Gołba i sur., 2020).

Na područjima gdje prirodno raste haskap, ljudi ga koriste u narodnoj medicini za tretiranje ateroskleroze, hipertenzije i probavnih problema, što potvrđuju nedavna znanstvena istraživanja (Lovrenčić i Šimunović, 2014).

### 2.3. Starter kulture

Starter kulture su pripravci koji sadrže žive mikroorganizme koji se primjenjuju za dobivanje različitih fermentiranih namirnica s krajnjim ciljem obogaćivanja tih namirnica s različitim produktima metabolizma upotrijebljenih starter kultura. Kvasci su mikroorganizmi koji se svrstavaju u rod gljiva te imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji. Tijekom fermentacije razlažu šećer u alkohol i CO<sub>2</sub> (osnovni produkti vrenja) (Petrovický, 2016). Kolb i sur. (2007) ističu kako je kod proizvodnje vina važno naglasiti činjenicu kako se na površini voća nalaze različiti mikroorganizmi kao što su kvasci, plijesni i bakterije koji preradom voća započinju sa svojom aktivnosti. Svi koriste šećer kao izvor energije te stvaraju različite produkte svojim metabolizmom. S obzirom da nam kvasci proizvode alkohol (etanol), potrebno je uvjete u supstratu prilagoditi njima, a ostale mikroorganizme potpuno eliminirati ili stvoriti otežane uvjete kako bi se spriječio njihov rast i razvoj. Petravić-Tominac i sur. (2013) u svom radu navode kako odabirom dobrih sojeva kvasaca s dobrim karakteristikama, pogotovo fermentativnim, utječu na kvalitetu proizvodnje vina. Jedno od velikih otkrića u proizvodnji je bolja fermentacijska kontrola upotrebom selekcioniranih sojeva kvasca. Prema Mesihović (2011) čiste starter kulture se mogu podijeliti na dva oblika a to su tekući kvasac ili aktivni suhi kvasac. Prevladava upotreba aktivnog suhog vinskog kvasca zbog osiguravanja bržeg početka fermentacije te je na tržištu dostupan u obliku granula. Fugelsang i Edwards (2007) navode čiste kulture kvasaca za proizvodnju vina koje su klonovi sojeva *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus*, a svojstvo ovih kvasaca je da dobro provode alkoholnu fermentaciju.

U ranim fazama vrenja prevladava rast kvasaca koji nisu *Saccharomyces*, a opisuje ih niska sposobnost fermentacije. Zatim, *Saccharomyces*, najjača fermentacijska vrsta, otporna na etanol, preuzima daljnju konverziju šećera u etanol. Jedna od tih ne-*Saccharomyces* vrsta je *Torulasporea delbrueckii* koja ima pozitivan učinak na okus i aromu alkoholnih pića te pokazuje nisku proizvodnju acetaldehida, octene kiseline i etil acetata. Njegova je upotreba u standardnim uvjetima, u mješovitoj ili sekvencijalnoj kulturi sa *S. Cerevisiae*, predložena kao način smanjenja koncentracije octene kiseline u vinu te proizvodi male količine alkohola i biomase (Bely i sur., 2008). Čuš i Jenko (2013) ističu kako *T. Delbrueckii* može poboljšati aromu vina pomoću enzima  $\beta$ -glukozidaze, također ima veliku sposobnost biotransformacije monoterpenskih alkohola i već navedenu proizvodnju niskog sadržaja octene kiseline. Osim

navedenog, upotrebom *T. Delbrueckii* može se povećati koncentracija glicerola, dolazi do većeg oslobađanja manoproteina i polisaharida, pospješuje se malolaktička fermentacija, također povećava količinu zanimljivih aromatskih spojeva (voćni esteri, laktoni, tioli i terpeni) i smanjuje količinu neželjenih aromatskih spojeva kao što su viši alkoholi (Ramírez i Velázquez, 2018). U mošt se dodaje oko 3 g/L aktivnog suhog kvasca pazeći na to da mošt nije mikrobiološki kontaminiran te da mu temperatura nije preniska. Tijekom samog procesa alkoholne fermentacije povećava se koncentracija etanola, temperatura, pH vrijednost i tlak, pa je važno naglasiti kako je bitna otpornost kvasca prema nepovoljnim uvjetima, a ne samo nastala koncentracija etanola (Radiković, 2022).

## **2.4. Proizvodnja voćnog vina od sibirske borovnice**

Tehnologija proizvodnje voćnih vina slična je procesu proizvodnje vina od grožđa (Tomić i sur., 2021). Prema Jurković (2018) faze proizvodnje voćnog vina od borovnice uključuju: berbu, probiranje i pročišćavanje, usitnjavanje i prešanje, priprema mošta za fermentaciju, fermentacija, pretok, njega i bistrenje te punjenje i označavanje boca.

### **2.4.1. Berba sibirske borovnice**

Jurković (2018) ističe kako se za vino kaže da nastaje u vinogradu, dok se u kontekstu voćnih vina može reći da ona proizlaze iz voćnjaka.

Berba borovnica obično traje između 6 i 8 tjedana, s obzirom na različite sorte koje se dijele na rane, srednje rane i kasne. Svaka sorta se bere tri do sedam puta tijekom razdoblja od 5 do 7 dana, ovisno o svojstvima sorte i vremenskim uvjetima. Za razliku od malina, plodovi borovnica nisu toliko osjetljivi na vremenske uvjete. Beru se samo potpuno zrele plave bobice jer crvene, poluzrele bobice imaju kiseli okus (Kantoci, 2009).

Također, Jurković (2018) navodi kako i kod obrade drugih sirovina, ključno je vrijeme koje prođe od berbe do transporta, prihvata u postrojenju i početka procesiranja. To bi trebalo biti minimalno, po mogućnosti unutar istog dana. Ako to nije izvodljivo, sirovinu treba čuvati u odgovarajućim uvjetima skladištenja.

Poseban naglasak stavlja se na redovito održavanje svih uređaja korištenih za pranje plodova, budući da takvi uređaji često mogu predstavljati izvor nečistoća (Jemrić i sur., 2008).

### **2.4.2. Probiranje i pročišćavanje**

Jurković (2018) navodi da je cilj probiranja voća ukloniti lišće, grančice, prašinu, zemlju, kemijske ostatke i ostale nečistoće koje su dospjele s polja, zraka ili tijekom berbe. Nevedene nečistoće mogu negativno utjecati na senzorske svojstva vina, a mogu dovesti i do oštećenja strojeva.

Voće prije usitnjavanja mora biti oprano. Ako u kućanstvima ne postoje uređaji za pranje voća, preporuča se da se jagodičasto, bobičasto i koštičavo voće najbolje opere pod mlazom vode dok je još u košarama. Nekim plodovima jagodičastog i bobičastog voća, potrebno je uklanjanje peteljki. Trulo i pljesnivo voće potrebno je izdvojiti s obzirom da od takvog voća nije moguće proizvest piće željene kvalitete (Kolb i sur., 2017).

### **2.4.3. Usitnjavanje i prešanje**

Kolb i sur. (2017) navode kako bi se oprano voće trebalo usitniti prije samog prešanja kako bi dobili veću iskoristivost soka, tj. mošta. Što su plodovi usitnjeni na finiji način, to će rezultirati većim izlazom mošta te se tijekom ovog postupka formira fina pulpa. Postupak usitnjavanja može se izvesti na različite načine, od tradicionalnog gnječenja drvenim alatima do korištenja modernih mlinova za voće (Jemrić i sur., 2008).

Nakon čišćenja i usitnjavanja, slijedi faza prešanja, kojom se odvaja sok od komine. Masulj, dobiven nakon usitnjavanja, ima spužvastu strukturu, ali unatoč deformaciji, ta struktura se održava s malim kanalčićima kroz koje sok istječe. Stoga je bitno odabrati odgovarajući postupak usitnjavanja koji održava ravnotežu između očuvanja stabilne strukture i uništavanja stanica. Ključni čimbenici za učinkovitost procesa ekstrakcije soka uključuju tlak, visinu sloja u preši, stupanj usitnjavanja voća i sam proces cijedenja. Kada je riječ o tlaku, naglasak nije na visini, već na postupnom povećanju tijekom vremenskih intervala. Različite vrste voća reagiraju različito na mehaničku obradu pa je teško definirati jedinstveni pristup procesu prešanja (Kurtanjek, 2022).

### **2.4.4. Priprema mošta za fermentaciju**

Da bi se unaprijedila kvaliteta mošta, nužno je izvršiti tretman prije fermentacije kako bi se postiglo visokokvalitetno vino s željenim svojstvima. Ovo uključuje prilagodbu pojedinačnih organskih kiselina, šećera i hranjivih tvari, što pozitivno utječe na tijek fermentacije i konačnu

kakvoću proizvoda. S obzirom na relativno nisku razinu šećera u moštu, dodaje se konzumni šećer (saharoza) kako bi se postigla preporučena razina alkohola. Prilagodba pH vrijednosti postiže se dodatkom jabučne, limunske ili drugih organskih kiselina, pri čemu se održava u rasponu od 3,2 do 3,8. Dozvoljena dodana količina šećera i kiseline, kao i vrsta kiseline, podložna je regulativama u svakoj pojedinoj državi. U fazi dodavanja šećera moguće je također uvesti razne hranjive tvari za kvasce, prije svega dušik, te različite enzimске pripravke. Ovi enzimski pripravci olakšavaju proces prešanja, povećavaju iskoristivost soka, unapređuju ekstrakciju boje tijekom fermentacije i smanjuju viskozitet (Jemrić i sur., 2008).

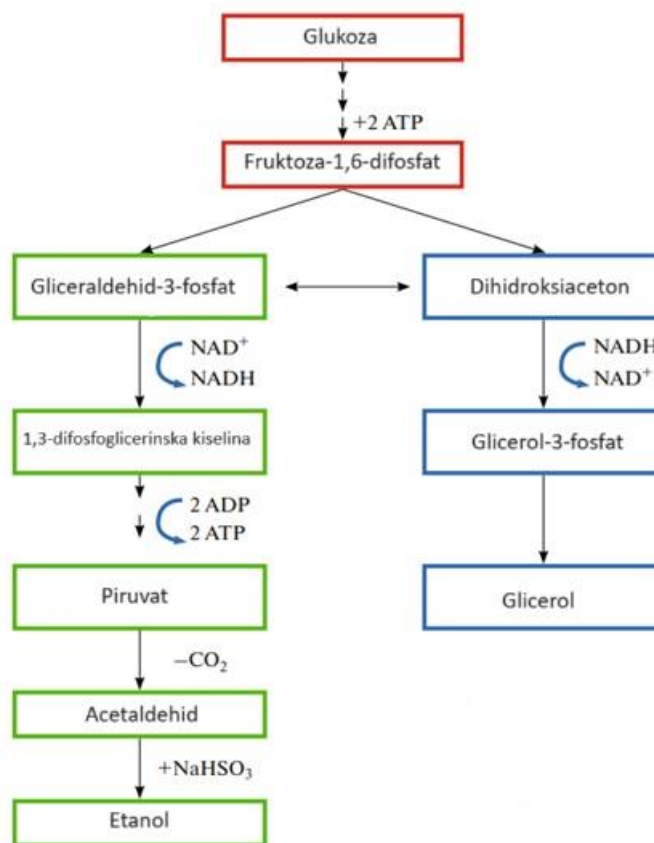
Nakon procesa prešanja, nužno je odmah dodati sumpor. Količina sumporovog dioksida (SO<sub>2</sub>) koja se dodaje varira ovisno o količini taloga, obično u rasponu od 50 do 100 mL/L. Nakon što se vino napuni u boce, trebalo bi sadržavati max. 25 mg/L SO<sub>2</sub> (Kolb i sur., 2007).

#### 2.4.5. Fermentacija

Iako je alkoholno vrenje bilo poznato ljudima tijekom povijesti, tek je 1778. godine A. Lavoisier primijetio da je to proces u kojem se šećer pretvara u alkohol i CO<sub>2</sub>. J. L. Gay Lussac izračunao je bruto omjere u tom procesu 1815. godine (Kolb i sur., 2007), a ti izračuni su i danas relevantni što prikazuje i **formula (1)**:



Alkoholna fermentacija (AF) predstavlja biokemijski proces koji izvode kvasci ili određene bakterije poput bakterija mliječne kiseline (BMK). Ovaj proces transformira šećer u etilni alkohol i ugljikov dioksid. Inicijalna faza uključuje razgradnju šećera od strane kvasaca, što rezultira stvaranjem molekula piruvata, poznatu kao glikoliza. Tijekom glikolize, molekule glukoze transformiraju se u dvije molekule pirogroždane kiseline. Nakon toga, dvije molekule pirogroždane kiseline reduciraju se u dvije molekule etanola i dvije molekula CO<sub>2</sub>. U anaerobnim uvjetima, piruvat može biti pretvoren u etanol, gdje prvo postaje acetaldehid uz pomoć enzima piruvat-dekarboksilaze. U ovom procesu oslobađa se ugljikov dioksid, a zatim acetaldehid reducira u etanol uz posredovanje enzima alkohol-dehidrogenaze. Tijekom alkoholne fermentacije, NAD<sup>+</sup> (nikotinamid adenin dinukleotid) reducira se u NADH (reducirani oblik NAD<sup>+</sup>). Ova razmjena elektrona koja se odvija u procesu pridonosi stvaranju ATP-a (Malakar i sur., 2019). Biokemijski put dobivanja alkohola fermentacijom, prikazan je na **Slici 3**.



**Slika 3** Biokemijski put alkoholne fermentacije. Plavi okviri: put nastajanja glicerola (Vustin, 2020)

Cijelokupan proces može se podijeliti u dvije faze: aerobnu i anaerobnu fazu. U aerobnim uvjetima, stanice kvasca koriste dostupni kisik za reprodukciju, a kada se postigne dovoljan broj stanica, dovod kisika se ograničava, pokrećući anaerobnu fazu. Tijekom ove faze, kvasac metabolizira šećere, što rezultira intenzivnim stvaranjem pjene i oslobađanjem CO<sub>2</sub> (Coton i sur., 2016). S porastom udjela alkohola, postupak fermentacije sve više usporava. Ovisno o otpornosti kvasca, fermentacija se potpuno zaustavlja kod 18 % vol. alkohola, a u nekim ekstremnim slučajevima i kod viših udjela alkohola. Uobičajena temperatura fermentacije održava se na otprilike 20 °C. Kod viših temperatura, očekuje se povećana proizvodnja viših alkohola (Kolb i sur., 2007), dok niže temperature fermentacije doprinose očuvanju lako hlapljivih spojeva arome (Jemrić i sur., 2008).

Brzina fermentacije ovisi o izboru kvasca, temperaturi, prisutnosti kisika, pH vrijednosti, koncentraciji šećera, razini dušika i drugih hranjivih tvari potrebnih za rast kvasca (Coton i sur., 2016). Uz etanol i ugljični dioksid, glicerol je također jedan od glavnih produkata alkoholne fermentacije (AF), pridonoseći punoći okusa i poboljšavajući kvalitetu vina. Također, stvaraju se sekundarni produkti poput estera, organskih kiselina (jantarna, jabučna, octena, mliječna

kiselina), masnih kiselina, aldehida, ketona, terpena i drugih spojeva. Ako mošt sadrži visok udio pektina, dodatak pektinaza za bistrenje i povećanje prinosa soka može rezultirati, pod određenim uvjetima, stvaranjem metanola kao nusproizvoda AF (Kosseva i sur., 2017).

U domaćoj (tzv. kućnoj) proizvodnji, alkoholna fermentacija može se izvoditi u staklenim demijonima ili raznim vrstama polietilenskih ili spremnika od nehrđajućeg čelika. U tradicionalnoj proizvodnji većih količina voćnih vina, fermentacija se odvija u drvenim bačvama ili spremnicima od nehrđajućeg čelika većeg kapaciteta (2000 – 9000 litara) (Jemrić i sur., 2008). Spremnik za fermentaciju mora biti opremljen s vrenjačom (Kolb i sur., 2007).

Kontinuirano se prati razina šećera ili stupnja Brix-a ( $^{\circ}\text{Bx}$ ) kako bi se pratio sam napredak fermentacije. Fermentacija se nastavlja sve dok se svi dostupni šećeri potpuno ne potroše, obično kada Brix očitavanje dosegne oko 8  $^{\circ}\text{Bx}$ . Kada fermentacija završi, prestaje stvaranje mjehurića, što je posljedica prestanka proizvodnje  $\text{CO}_2$  (Kosseva i sur., 2017).

#### **2.4.6. Pretok**

Nakon završetka alkoholne fermentacije, mlado vino prebacuje se iz spremnika, uklanjajući talog koji sadrži autolizirane stanice kvasca i enzime (ukoliko su dodani). Vrijeme procesa prebacivanja može varirati ovisno o proizvođaču. U Velikoj Britaniji, prebacivanje i bistrenje obavljaju se odmah nakon završetka fermentacije, dok u drugim zemljama vino ostaje nekoliko tjedana na talogu prije prebacivanja (Jemrić i sur., 2008). Dugotrajno zadržavanje voćnih vina na talogu nije preporučljivo zbog potencijalne opasnosti od stvaranja sumporovodika ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Proces prebacivanja često se izvodi korištenjem centrifuge, gdje se talog odvaja rotacijom bubnja. Minimalan kontakt sa zrakom tijekom prebacivanja važan je kako bi se spriječila neželjena oksidacija (Kolb i sur., 2007).

#### **2.4.7. Njega i bistrenje**

Upotrebom sredstava za bistrenje postiže se bistro i stabilno vino. Ovaj postupak olakšava proces filtracije, uklanja nepoželjne tvari koje bi inače mogle uzrokovati talog, te unapređuje okus i boju vina. Kako bi se ubrzao prirodni proces bistrenja, koriste se različita sredstva koja djeluju na vino kemijski, fizikalno-kemijski ili mehanički. Ovaj postupak uključuje čišćenje, centrifugiranje i često kombinaciju tih tehnika (Zoričić, 1996). Kako bi se postigla bistra pojava, primjenjuju se različite tvari poput želatine, agar-agara, tanina, bjelanjka jajeta, bentonita, aktivnog ugljena, inertnih filtracijskih sredstava, perlit ili celuloze (Kolb i sur., 2007).

Proces dodatnog bistrenja uključuje korištenje filtracijskog sustava koji osigurava da voćno vino postigne kristalnu bistroću. Ovaj korak obično se provodi prije nego što se voćno vino stavi u boce, a često se koristi sterilna pločasta filtracija s veličinom pora manjom od 0,2  $\mu\text{m}$  (Jemrić i sur., 2008). Tijekom filtracije, najfinije čestice koje su preostale u vinu nakon bistrenja se odvajaju, koristeći sloj poroznog materijala koji omogućuje protok vina, ali zadržava čestice taloga. Filtracijski materijali djeluju putem sitnih pora (gdje su pore filtracijskog sloja manje od čestica taloga) i adsorpcijskog djelovanja. Važno je da filtracijski materijali budu inertni i ne uzrokuju promjene u boji, okusu ili mirisu voćnog vina (Kolb i sur., 2007).

Nakon završetka alkoholne fermentacije, mlado vino još uvijek nije prikladno za konzumaciju jer je neharmonično, grube teksture i ima izražen miris kvasca. Potrebno je određeno razdoblje odležavanja kako bi vino razvilo svoj konačni miris i *bouquet*, što konačno utječe na kvalitetu voćnog vina. Odležavanje se provodi u dvije faze. Prva faza obuhvaća promjene nakon alkoholne fermentacije do trenutka punjenja u boce i često traje između 6 i 24 mjeseca. Druga faza počinje punjenjem u boce i uklanjanjem kisika. Tijekom ove druge faze, voćno vino postupno razvija svoj karakterističan, blagi i voćni okus (Velić i sur., 2018b).

#### **2.4.8. Punjenje i označavanje boca**

Zbog prisutnosti šećera, voćna vina se moraju puniti vruća, u sterilizirane boce ili podvrgnuta postupku pasterizacije nakon punjenja. Vino koje se puni vruće ili se kasnije pasterizira mora proći test toplinske stabilnosti. Za ovu svrhu, tri prozirne boce se pune vinom, zatvore, te postavljaju u vodu na određenoj temperaturi za punjenje. Nakon toga, boce se stavljaju u hladnjak te nakon 24 sata provjerava ima li taloga u bocama. Ako se primijeti talog, potrebno je tretirati vino bentonitom. Voćna vina obično se zatvaraju aluminijskim navojnim poklopcima koji su široko prihvaćeni zbog prstenastog osigurača koji omogućuje konzumentu da provjeri jesu li boce originalno zatvorene ili su već otvorene (Kolb i sur., 2007).

Na boce se lijepi etiketa i deklaracija su skladu sa zakonskom regulativom.

#### **2.5. Kemijski sastav voćnog vina**

Radiković (2022) u svom radu navodi kako je kemijski sastav voćnog vina složen i raznolik, a uključuje vodu, alkohole, šećere, organske kiseline te polifenole, više alkohole, estere, aldehide i ketone.



### 2.5.1. Alkoholi

Etanol je ključni proizvod alkoholne fermentacije koji ima važnu ulogu u formiranju okusa i stabilnosti vina, pri čemu se udio alkohola obično izražava kao postotak volumena. Proizvodnja etanola je kontrolirana pomoću nekoliko faktora, a to su koncentracija šećera, temperatura fermentacije i soj kvasca. Etanol igra značajnu ulogu u sastavu vina, zajedno s vodom djeluje kao otapalo u ekstrakciji sastojaka voća, služi kao reaktant u proizvodnji važnih hlapljivih spojeva (npr. etil estera) i ključan je za senzorska svojstva, stabilnost i starenje vina. Sekundarni produkti metabolizma kvasca podrazumijevaju i više alkohole (sastoje se od više od dva atoma ugljika). Neki od predstavnika viših alkohola su *n*-propanol, izobutil alkohol (2-metil-1-propanol), 2-metil butanol, izoamil alkohol i 2-fenil etanol. Glicerol je također jedan od primarnih produkata, pored etanola i ugljikovog dioksida, koji indirektno doprinosi senzornom karakteru vina. To je spoj bez boje, mirisa, nehlapljiv je i bez aromatičnih svojstava. Međutim, znatno pridonosi slatkoći, punoći okusa i teksturi vina. Postoj razlika nastajanja koncentracija glicerola pomoću različitih sojeva kvasaca i zbog toga bi se ovo trebalo uzeti u obzir pri odabiru vinskog soja kvasaca. Glicerol se uglavnom proizvodi u glicero-piruvičnom putu na početku alkoholnog vrenja, a njegova razgradnja može biti štetna za kvalitetu vina. Koncentracije glicerola od 5,976 i 4,491 određene su u dva kupinova vina, proizvedena u malom mjerilu (mikrofermentacijski eksperimenti) pomoću dva komercijalna vinska kvasca. Osim etanola i glicerola, metanol može biti prisutan u mjerljivim koncentracijama u nekim voćnim vinima (npr. vino od šljive). S obzirom da je toksičan za ljude, sadržaj metanola u komercijalno dostupnim voćnim vinima ne bi trebao biti veći od 200-250 mg/L (Velić i sur., 2018a).

### 2.5.2. Šećeri

Šećere koje nalazimo u voćnim vinima prije svega dolaze iz samog voća, a to su fruktoza, glukoza i u nekim vrstama voća, saharoza. Njih kvasci fermentiraju u već spomenute primarne produkte vrenja: etanol, ugljikov dioksid i glicerol (Velić i sur., 2018b). Međutim, drugo voće s obzirom na grožđe, sadrži manje količine šećera, što otežava proizvodnju vina ukoliko se ne odradi dodatno doslađivanje, u većini slučajeva sa saharozom. Šećeri mogu biti metabolizirani u više alkohole, estere masnih kiselina i aldehide, koji definiraju primarni aromatski karakter vina. Šećeri koji zaostaju, odnosno koji nisu fermentirani do kraja, nazivaju se rezidentnim

(neprevrelim) šećerima (Velić i sur., 2018a). U radu Amidžić Klarić i suradnika iz 2017. Godine, zabilježen je veliki raspon koncentracije reducirajućih šećera tijekom ispitivanja kupinovog vina i to od 13,5 do 177,6 g/L. Nadalje, autori zaključuju kako razlog velikog raspona koncentracija neprevrelog šećera upravo leži u čestom dodavanju saharoze, tj. konzumnog šećera tijekom različitih faza proizvodnje vina od kupine.

### **2.5.3. Organske kiseline**

Jedan od sastojaka vina su i organske kiseline (hlapljive i nehlapljive), prisutne su kao normalni sastojci vina, ali i kao produkti kvarenja vina. U nehlapljive kiseline ubrajamo jabučnu, mliječnu, vinsku, limunsku, jantarnu, dioksimaleinsku i pirogrožđanu kiselinu (Sović, 2013). Velik udio organske kiseline sadržane u kupinovom vinu, vinu od trešnje i vinu od jabuke je jabučna kiselina, slijedi je limunska kiselina, dok od hlapljivih kiselina najzastupljenija je octena koja ujedno služi i kao parametar kvalitete vina. Octena kiselina je sekundarni metabolit dobiven iz piruvata tijekom alkoholnog vrenja. Povišena koncentracija octene kiseline može upućivati na infekciju i aktivnost bakterije octene kiseline. Osim octene kiseline, već spomenuta jabučna kiselina također doprinosi kiselosti voćnog vina, a njezina koncentracija reducira se malolaktičkom fermentacijom (MLF) (Velić i sur., 2018a).

### **2.5.4. Hlapljivi (aromatski) spojevi**

Prema Velić i sur. (2018a) sastav hlapljivih tvari u vinu je vrlo bitan s obzirom da te tvari igraju veliku ulogu u stvaranju arome vina. Aroma voćnih vina određena je hlapljivim tvarima iz samog voća kao i produktima nastalim putem AF i MLF te se formira tijekom pretoka, starenja i skladištenja. Esteri, viši alkoholi, acetati, organske kiseline i druge tvari su grupa hlapljivih tvari koje najviše pridonose okusu i aromatskom proilu voća. Osim navedene grupe spojeva, druge tvari (hlapljive ili nehlapljive) poput aldehida, ketona, laktona, terpena i fenola, također sudjeluju u formiranju arome voćnih vina (Velić i sur. 2018a). Rezultati istraživanja prema Kosseva i sur. (2017) pokazuju kako kupinovo vino sadrži hlapljive tvari arome: etil heksanoat, etil acetat, etil oktanoat, izoamil alkohol, fenetil alkohol i octena kiselina, dok aldehidi i ketoni nastali su u vrlo malim koncentracijama tijekom nepotpunog alkoholnog vrenja ili oksidacije alkohola, ali su vrlo bitni u stvaranju sortnih aroma, dok u većim koncentracijama imaju negativne učinke.

### **2.5.5. Vitamini i minerali**

Koncentracija vitamina opada procesom proizvodnje vina (fermentacijom i odležavanjem), te njihove koncentracije u voćnim vinima su nedostatne da bi bile značajne u ljudskoj prehrani. S druge strane, njihova koncentracija je dovoljna ili više nego dovoljna da podrže rast mikroba. Sadržaj biotina (vitamin H) i nikotinske kiseline (niacin, vitamin B3) je zadovoljavajuć za većinu sojeva kvasaca (Velić i sur., 2018a). Mineral kalij dominantan je element prisutan u svim vinima, dok su ostali važni elementi kalcij, sumpor, fosfor, natrij i magnezij (Kosseva i sur., 2017). Prema istraživanju Amidžić Klarić i sur. (2016) kupinovo vino dobiveno fermentacijom soka od kupine prirodni je izvor esencijalnih minerala i bioaktivnih fitokemikalija, zbog toga može se smatrati funkcionalnom hranom.

### **2.5.6. Polifenolni spojevi i antioksidativna aktivnost**

Polifenolni spojevi prema Kosseva i sur. (2017) raznovrsna su skupina sekundarnih metabolita biljaka neophodnih za rast i razvoj. Imaju brojne karakteristike u fiziologiji biljaka, nalaze se u strukturi biljke, sudjeluju u obrani od patogena, pigmentacije i antioksidativnoj zaštiti. Većina fenolnih spojeva pokazuju antibakterijska, antifungalna, antivirusna, antikancerogena i protuupalna svojstva. Potvrđen je i njihov utjecaj u liječenju raznih bolesti kardiovaskularnog sustava, astme, alergije, dijabetesa i hipertenzije i to zahvaljujući njihovom antioksidativnom djelovanju (Kosseva i sur., 2017). Kvaliteta vina značajno ovisi o fenolnom sastavu, odnosno o antocijanima, flavonolima, katehinima i drugim flavonoidi s obzirom na njihovo djelovanje na senzorni karakter vina, ponajviše boju i trpkost. Fenolni spojevi mogu se kategorizirati na različite načine jer sadrže velik broj heterogenih struktura koje se kreću od jednostavnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva. S obzirom na ukupni sadržaj fenola, vina dijelimo na tri glavne skupine: s visokim udjelom ukupnih polifenola, sa srednjim udjelom i s niskim udjelom. Sadržaj ukupnih fenola voćnih vina trešnje, maline, crnog ribizla, borovnice i jagode pokazala su se kao sličan ili veći izvor od vina crnog grožđa, dok voćna vina od jabuke, šljive i kruške pokazala su niski sadržaj ukupnih fenola. Od fenolnih spojeva s poznatom antioksidativnom aktivnošću ističu se flavonoidi, fenolne kiseline i tanini (Velić i sur., 2018a).

## **2.6. Fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće voćnih vina**

Prema Pravilniku o vinarstvu (NN 81/22; 75/23) kakvoća vina određuje se na osnovu sljedećih fizikalno-kemijskih parametara: relativna gustoća, alkoholna jakost, ukupni suhi ekstrakt, reducirajući šećeri, ukupna kiselost, hlapiva kiselost, pH vrijednost, slobodni SO<sub>2</sub>, ukupni SO<sub>2</sub> i pepeo.

### **2.6.1. Relativna gustoća**

Prema Pravilniku o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, gustoća se definira kao masa vina ili mošta po jedinici volumena pri temperaturi od 20 °C. Mjerna jedinica je gram po mililitru, a označena je simbolom P<sub>20°C</sub>. 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**

Tijekom alkoholnog vrenja nastaje nam primarni produkt etanol, ali i ostali sekundarni produkti važni za kvalitetu, stabilnost i čuvanje vina (Krušelj, 2014). Alkoholna jakost izražena volumenom je broj litara etanola sadržanog u 100 litara vina, a oba volumena mjerena pri temperaturi od 20 °C. Izražena je simbolom >>% vol.<< (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 (NN 81/22), ukupan 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. Prema Fotez (2017) u ekstrakt spadaju ugljikohidrati, mineralne tvari, glicerol, butilen, glikol, nehlapive kiseline (vinska, jabučna, mliječna), tanini i tvari boje. Također, navodi kako kvaliteta vina ovisi o sadržaju ekstrakta te da ekstrakt služi kao jedan od faktora za otkrivanje patvorenja vina. Ekstrakt se izražava u gramima po litri i treba biti određen unutar najbližih 0,5 g.

#### **2.6.4. Reducirajući šećeri**

Reducirajući šećeri definirani su prema Pravilniku o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina (NN 81/22) kao svi šećeri koji imaju keto ili adlehidne funkcionalne skupine. Fotez (2017) u svom radu navodi da su svi monosaharidi, bilo aldoze ili ketoze, reducirajući šećeri, dok je većina disaharida također reducirajuća, saharoza čini iznimku. Određuju se pomoću redukcije otopine alkalne bakrene soli (II).

#### **2.6.5. Ukupna kiselost**

Kiseline su važna sastavnica voća, mošta i vina. Sadržaj organskih i anorganskih kiselina u voću ovisi o vrsti voća, klimatskim uvjetima i geomorfološkim karakteristikama tla (Husnjak, 2019). Prema Pravilniku o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina ukupna kiselost vina definirana je kao suma njegovih titrabilnih kiselina kad ga se titrira do pH 7 sa standardnom alkalnom otopinom. CO<sub>2</sub> nije uključen u ukupnu kiselost. Prema Pravilniku o vinu, vino koje se prodaje mora imati sadržaj ukupnih kiselina, izraženih kao vinska kiselina, u rasponu od minimalno 4,5 g/L do maksimalno 14 g/L. (MPŠ, 1996).

#### **2.6.6. Hlapiva kiselost**

Husnjak (2019) navodi u svom radu kako hlapive kiseline nastaju kao sekundarni produkti alkoholnog vrenja, a mogu nastati i u procesu kvarenja vina. Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina (NN 81/22) definira hlapivu kiselost kao homologe octene kiseline prisutnih u vinu u slobodnom obliku ili u obliku soli, izražena u gramima octene kiseline po litri.

#### **2.6.7. pH vrijednost**

Fotez (2017) navodi da je pH vrijednost negativni logaritam koncentracije vodikovih iona i najviše ovisi o količini vinske kiseline u moštu i vinu. Prema 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.

### **2.6.8. Ukupni i slobodni SO<sub>2</sub>**

SO<sub>2</sub> nalazi se u vinu u slobodnom i vezaom obliku, veže se sa šećerima, aldehydima i polifenolnim tvarima (Husnjak, 2019). Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina slobodni sumporni dioksid definira kao sumporni dioksid koji je prisutan u moštu ili vinu u sljedećim oblicima:  $H_2SO_3 \leftrightarrow HSO_3^-$ ; ravnoteža između ovih oblika je funkcija pH i temperature, a ukupni sumporni dioksid definiran je kao ukupnost svih različitih oblika sumpornog dioksida prisutnih u vinu, bilo u slobodnom stanju ili kombiniran sa sastojcima vina.

### **2.6.9. Pepeo**

Prema 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. Amidžić Klarić i sur. (2016) u svom radu ističu što je veća koncentracija pepela i minerala, to je vino kvalitetnije.

### **III. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Zadatak

Cilj rada bio je istražiti utjecaj odabranih komercijalnih kvasaca roda *Saccharomyces* oznake 011 BIO (Zymaflore®, Laffort, FR), RX60 (Zymaflore®, Laffort, FR) i FX10 (Zymaflore®, Laffort, FR) te utjecaj koinokulacije ne-*Saccharomyces* vinskog kvasca ALPHA TD (*Torulasporea delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) s FX10 u omjeru 10:1 na kinetiku fermentacije, fizikalno-kemijska svojstva, udio ukupnih polifenola te antioksidativnu aktivnost u soku/vinu od sibirske borovnice iz ekološkog uzgoja. Praćenje kinetike fermentacije provedeno 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 sibirske borovnice.

### 3.2. Materijali

Sirovine:

- sok od sibirske borovnice iz ekološkog uzgoja – Haskap (Hrvatska)
- komercijalni kvasci roda *Saccharomyces*: **011 BIO** (Zymaflore®, Laffort, FR) (dalje u radu K1), **RX60** (Zymaflore®, Laffort, FR) (dalje u radu K2) i **FX10** (Zymaflore®, Laffort, FR) (dalje u radu K3)
- mješovita kultura ne-*Saccharomyces* vinskog kvasca **ALPHA TD** (*Torulasporea delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) i kvasca **FX10 (u omjeru 10:1)** (dalje u radu K4)

Kemikalije:

- šećer saharoza (rafinirani, bijeli)
- natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- etanol
- pufer natrijev acetat bezvodni
- kalijev metabisulfit ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )
- Folin-Ciocalteu-ov reagens
- pufer KCl
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) reagens
- destilirana voda
- klorovodična kiselina (HCl)



### 3.3. Oprema

Tijekom pripreme uzoraka soka za alkoholnu fermentaciju korišteni su:

- analitička vaga (Adam, model Nimbus) za vaganje kvasaca
- digitalni refraktometar (HI 96813) za određivanje šećera (°Bx) u soku od sibirske borovnice
- Erlenmeyerove tikvice volumena 2 L
- laboratorijska vaga (Kern PLE 420-3N)
- pH metar (Mettler Toledo) za određivanje pH vrijednosti soka od sibirske borovnice
- ručno miješalo i plastična posuda
- termometar
- vrenjače

Tijekom analize mladog vina korišteni su:

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

Tijekom pretoka mladog vina u boce korišteni su:

- električna pumpa (Buon Vino)
- ručna čepilica za zatvaranje boca
- tamne boce

### 3.4. Metode

#### 3.4.1. Proces proizvodnje vina od sibirske borovnice u laboratorijskom mjerilu

Za proizvodnju vina od sibirske borovnice korišten je sok od sibirske borovnice iz ekološkog uzgoja. Sok je čuvan i transportiran u staklenim bocama od 1 L. Iz takvih boca priređen je jedan početni uzorak soka od sibirske borovnice ukupnog volumena od 12 L. U početnom soku je izmjeren udio šećera od 13,0 °Bx pomoću refraktometra te je određena pH vrijednost od 3,15 pomoću pH metra. S obzirom da utvrđena količina šećera nije bila dovoljna za proizvodnju vina, proveli smo doslađivanje do 21,1 °Bx sa 107 g/L bijelog, rafiniranog šećera, tj. 1284 g je dodano na ukupni volumen soka od 12 L. pH soka nakon doslađivanja iznosio je također 3,15.

Za potrebe provedbe serije mikrofermentacijskih istraživanja, sok od sibirске borovnice pripremljen na prethodno opisan način, razdijeljen je u osam (8) Erlenmeyerovih tikvica volumena 2 L. U svaku tikvicu dodano je 1,5 L soka od sibirске borovnice. Nadalje, pripremljena je i tikvica s 1,5 L destilirane vode koja se koristila kao kontrola isparavanja tijekom AF. Ostala enološka sredstva su pomiješana prema odvagama za 1,5 L soka te je provedeno i sumporenje s 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 AF upotrebljena su četiri komercijalna kvasca koja se mogu vidjeti na **Slici 4**. Uzorci su pripremljeni u dvije paralele uz kontrolnu tikvicu s destiliranom vodom. Aktivni suhi kvasci dodani su u koncentraciji od 30 g/hL (0,3 g/L), odnosno 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 RX60 (Zymaflore®, Laffort, FR) te u tikvice označene s K3 I i K3 II, dodan je također selekcionirani *Saccharomyces* vinski kvasac oznake FX10 (Zymaflore®, Laffort, FR). Kod zadnje dvije tikvice označene s K4 I i K4 II, izvršena je koinokulacija s ne-*Saccharomyces* vinskim kvascem ALPHA TD (*Torulaspota delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) i kvasca FX10 – K3 u omjeru 10:1 pa je u te dvije tikvice dodano 0,4050 g ALPHA TD i 0,0450 g FX10. Na svaku od tikvica su postavljene vrenjače, kako bi se spriječio ulazak zraka te kako bi se pravilno provela fermentacija. Na prethodno objašnjen način su pripremljeni početni uzorci prikazani na **Slici 5**.



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



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

Mikrofermentacije su provedene pri prosječnoj temperaturi od 21 °C u zamračenom prostoru prikazanom na **Slici 6**. Kontrolna tikvica s vodom imala je uronjen termometar koji je korišten za praćenje temperature fermentacije. Nakon 40 dana fermentacije, napravljen je pretok mladog vina te odvajanje taloga. Pretok mladog vina napravljen je pomoću električne pumpe prikazane na **Slici 7**. Mlado vino od sibirske borovnice pretočeno je u tamne boce u kojima je nastavljeno 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 sibirske borovnice pomoću pumpe i zaostali talog (Izvor: Autor)



**Slika 8** VINO od sibirske borovnice u tamnim bocama na daljnjem dozrijevanju i odležavanju (Izvor: Autor)

### 3.4.2. Praćenje fermentacijske aktivnosti kvasca – određivanje CO<sub>2</sub> oslobođenog tijekom mikrofermentacija

Tijekom provedbe mikrofermentacija mjerena je masa Erlenmayerovih tikvica uz pomoć laboratorijske vage, a vaganje je provedeno pri sobnoj temperaturi (**Slika 9**). Za vrijeme procesa AF tijekom 40 dana uz 24-satne intervale praćena je promjena mase uzoraka u Erlenmayerovim tikvicama te je pomoću toga izračunata količina CO<sub>2</sub> proizvedena metabolizmom kvasca.



**Slika 9** Mjerenje mase uzoraka tijekom provedbe mikrofermentacije (Izvor: Autor)

Masa oslobođenog CO<sub>2</sub> izračunata je kao razlika promjene mase tikvice u kojoj se provodila fermentacija i promjene mase kontrolne tikvice (slijepa proba s vodom) prikazana **formulom (2)**:

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

gdje je:

***m*** – masa oslobođenog CO<sub>2</sub> u fermentacijskoj tikvici [g]

***m*<sub>1</sub>** - gubitak mase tikvice (razlika mase tikvice između dva mjerenja [g])

$m_2$  - razlika mase tikvice slijepe probe između dva mjerenja [g]

Brzina nastajanja CO<sub>2</sub> određena je na način da je masa oslobođenog CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> [g/L; 24h]

$\Delta m$  – masa CO<sub>2</sub> oslobođenog u vremenskom intervalu  $\Delta t$  [g]

$\Delta t$  – vremenski interval između dva mjerenja [24h]

$V$  – volumen uzorka [L]

### 3.4.3. Određivanje refraktometrijske vrijednosti

Refraktometrija je određivanja indeksa loma svjetlosti (refrakcije) neke tvari, u ovom slučaju soka/vina od sibirske borovnice. Za mjerenje korišten je 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 ova metoda služi i kao brza analitička metoda određivanja koncentracije šećera u vinima i sokovima, alkohola u alkoholnim pićima te za određivanje koncentracije masti u mlijeku. Daje rezultat izmjeren u obliku stupnjeva Brix-a (°Bx). Korišten je refraktometar sa **Slike 10**.



**Slika 10** Refraktometar (Izvor: Autor)

#### **3.4.4. Određivanje ukupnih polifenola**

Priprema Folin-Ciocalteu reagensa: odpipetira se 3,3 mL u odmjernu tikvicu od 100 mL, tikvicu nadopuniti do oznake destiliranom vodom.

Priprema otopine natrijeva karbonata: odvaži se 7,5 g anhidrida natrijeva karbonata u staklenoj čašici te se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te destiliranom vodom nadopuni do oznake. Rezultati se preračunavaju iz kalibracijske krivulje galne kiseline.

Postupak:

U epruvetu se odpipetira 0,2 mL uzorka (vino od sibirske borovnice), 1,8 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL otopine natrijeva karbonata. Promućka se i ostavi da stoji 2 sata na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija otopine se određuje na spektrofotometru pri 765 nm. Slijepa proba pripravi se destiliranom vodom (2 mL).

#### **3.4.5. Antioksidacijska aktivnost DPPH metoda**

Priprema DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) reagensa: uzme se oko 20 mg DPPH reagensa (na vrh staklenog štapića) i otopi u etanolu, apsorbancija mjerena na 517 nm mora biti oko 1. Spektrofotometar 'nuliramo' s etanolom.

Postupak:

Odpipetiramo 0,2 mL uzorka i dodamo 3 mL DPPH reagensa, te reakcijsku smjesu ostavimo 15 minuta stajati. Nakon toga mjerimo apsorbanciju pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka koristimo etanol. Rezultat se preračunava iz kalibracijske krivulje troloxa.

#### **3.4.6. Spektrometrijsko određivanje antocijana**

Priprema pufera:

KCl – otopimo 0,186 g u 50 mL prokuhane i ohlađene vode, mjerimo pH vrijednost i podešavamo je dodavanjem HCl-a do vrijednosti od pH 1. Nakon što dobijemo željenu vrijednost pH nadopunimo tikvicu do 100 mL.



Natrijev acetat bezvodni – otopimo 3,28 g u 50 mL prokuhane i ohlađene vode, mjerimo pH vrijednost i podešavamo je dodavanjem HCl-a dok ona ne bude pH 4,5. Nakon što dobijemo željenu vrijednost pH nadopunimo tikvicu do 100 mL.

Postupak:

Odpipetira se 0,2 mL uzorka (vina od sibirske borovnice) u 2 epruvete. U prvu epruvetu doda se 2,8 mL KCl-a (pH 1), a u drugu epruvetu 2,8 mL natrij acetat pufera pH 4,5. Otopina uzorka se ostavi stajati 15 minuta, te se nakon 15 minuta mjeri apsorbanca oba razrjeđenja pri 520 nm i 700 nm. Nula se na spektrofotometru podešava destiliranom vodom.

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

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

Gdje je:

$A$  – apsorbanca 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)

$\epsilon$  – molarna apsorptivnosti: 26900

## **IV. REZULTATI I RASPRAVA**

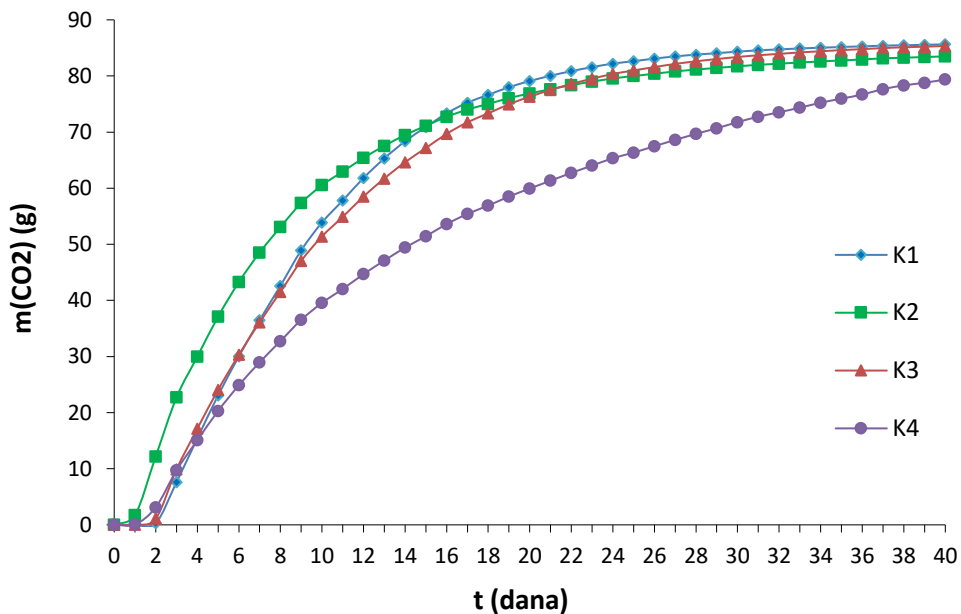
#### 4.1. Utjecaj dodataka *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* vinskih kvasaca na kinetiku fermentacije

Praćena je fermentacijska aktivnost selekcioniranih *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* vinskih kvasaca u soku/vinu od sibirske borovnice tijekom alkoholne fermentacije. Istraživanje je provedeno u laboratorijskom mjerilu primjenom serija mikrofermentacijskih eksperimenata. Tijekom proizvodnje vina od sibirske borovnice, serijom mikrofermentacijskih eksperimenata, praćena je fermentacijska aktivnost odabrani komercijalnih kvasava roda *Saccharomyces* kako je navedeno: 011 BIO (Zymaflore®, Laffort, FR) (K1), RX60 (Zymaflore®, Laffort, FR) (K2) i FX10 (Zymaflore®, Laffort, FR) (K3) te mješovita kultura ne-*Saccharomyces* vinskog kvasca ALPHA TD (*Torulaspota delbrueckii*) (Zymaflore®, Laffort, FR) i kvasca FX10 (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 uzoraka u kojima je provedena AF, a prikazani su na **Slikama 11 i 12**, dok **Slika 13** grafički prikazuje promjenu specifične brzine fermentacije soka od sibirske borovnice kvascem K2 – RX 60.

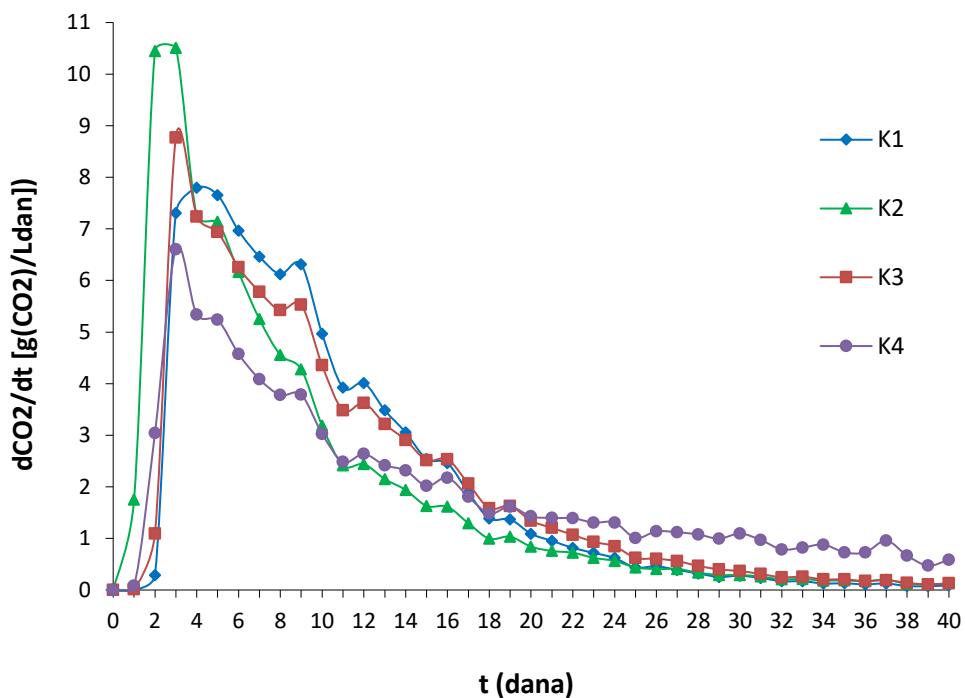
**Slika 11** prikazuje fermentacijsku aktivnost kvasaca K1, K2, K3 i K4 te je vidljivo kako je fermentacija započela već prvog dana u svim uzorcima. Također, vidimo da je profil krivulje gotovo isti za sve uzorke, dok je kod uzoraka K4 provedena koinokulacija te se uočava manji nagib krivulje što nam govori da se u tim uzorcima oslobodilo manje ukupnog CO<sub>2</sub>, u odnosu na ostale uzorke. Nakon 40 dana AF, masa nastalog CO<sub>2</sub> gotovo je podjednaka u svim ispitivanim uzorcima. Kvasac K1 pokazao je najveću katalitičku moć i vrlo blizu su mu kvasci K3 i K4, dok je mješovita kultura K4 proizvela najmanje ukupnog CO<sub>2</sub>.

**Slika 12** prikazuje proizvodnju CO<sub>2</sub> u vinu od sibirske borovnice (mjereno svaki dan tijekom 40 dana fermentacije) te je primjetno da je najveća brzina nastajanja CO<sub>2</sub>, odnosno fermentacije postignuta treći dan vrenja. Nastanak CO<sub>2</sub> bio je najviši u K2 uzorku, te ga slijede uzorci K3, K1 i K4. Oko tjedan dana je trajala faza burnog vrenja, te je nakon toga uslijedilo tiho vrenje, ali i usporavanje specifične brzine fermentacije. Kvasac K2 pokazivao je najveću promjenu specifične brzine fermentacije tijekom prvih šest dana. Nakon osamnaestog dana pa do kraja fermentacije, iako male vrijednosti specifične brzine fermentacije, ali veće od ostalih kvasaca, pokazuje mješovita kultura K4. Razlog je taj što selekcionirani kvasci K1, K2 i K3 brže provode vrenje, tj. Njihova aktivnost se u tom razdoblju postupno snižava, dok K4 kvasci još uvijek

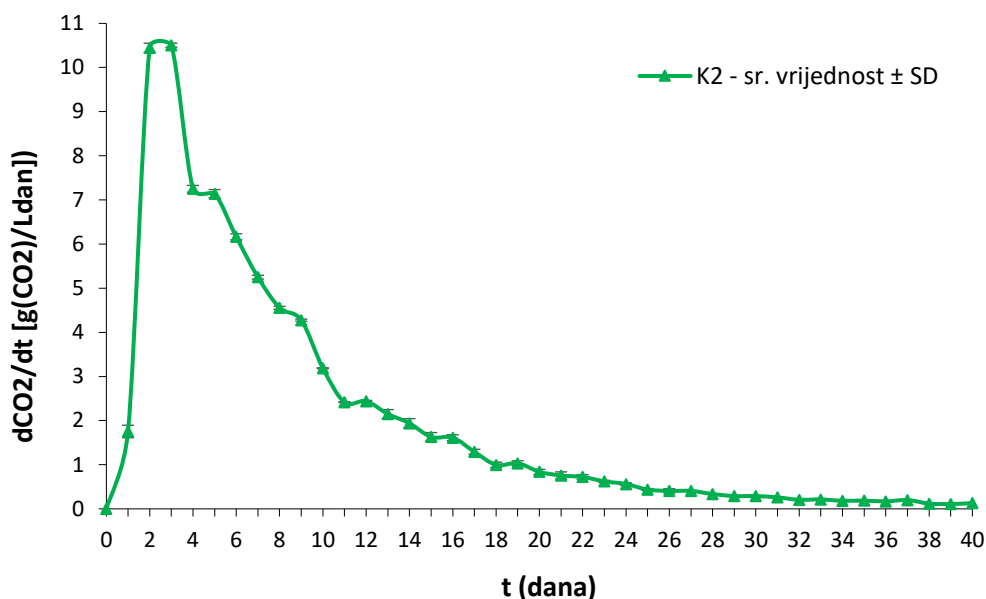
provode fermentaciju s obzirom na to da je njihova aktivnost bila sporija u odnosu na ostale ispitivane kvasce tijekom AF. Sličan trend fermentacijske kinetike imali su Petravić-Tominac i sur. (2013) tijekom proizvodnje voćnog vina od kupine kao i Radiković (2022) tijekom proizvodnje voćnog vina od jabuke.



Slika 11 Fermentacijska aktivnost vinskih kvasaca 011 BIO (K1), RX 60 (K2), FX 10 (K3) te ALPHA TD:FX10 (10:1) (K4) tijekom proizvodnje voćnog vina od sibirske borovnice



Slika 12 Promjene specifične brzine fermentacije soka od sibirske borovnice primjenom kvasaca 011 BIO (K1), RX 60 (K2), FX 10 (K3) te ALPHA TD:FX10 (10:1) (K4)



**Slika 13** Promjena specifičnih brzina fermentacije soka od sibirске borovnice primjenom kvasca K2 – RX 60 (točke označavaju srednje vrijednosti  $\pm$  SD za dvije tikvice s kvascem K2 – paralele)

#### 4.2. Udio ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost vina od sibirске borovnice

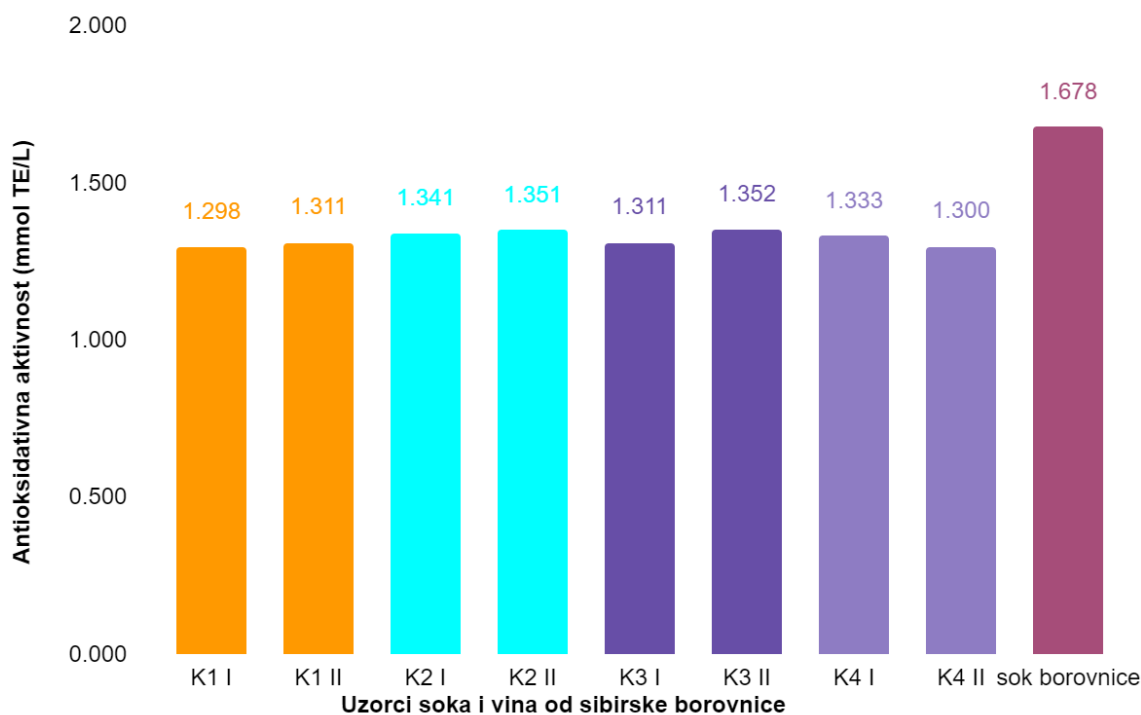
Nakon analize ukupnih polifenola prikazane **Tablicom 1**, vidljivo je da dolazi do smanjena udjela ukupnih polifenola u vinu od sibirске borovnice u odnosu na sok od sibirске borovnice. Tako vidimo da najveća koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva je u soku od sibirске borovnice te srednja vrijednost iznosi 1025,77 mg galne kiseline/L, a najmanja koncentracija je u K1 i iznosi 876,15 mg galne kiseline/L. Mješovita kultura K4 nije utjecala na koncentraciju ukupnih polifenola jer nema znatnog pada ili porasta same koncentracije. Radiković (2022) u svom radu navodi sličan trend smanjenja ukupnih polifenola u voćnom vinu od jabuke u odnosu na sok od jabuke, točnije došlo je do smanjenja koncentracije ukupnih polifenola s 204,94 mg galne kiseline/L u soku na 121,31 mg galne kiseline/L u vinu. Prema Amidžić Klarić i sur. (2020), analizirani uzorci kupinovog vina sadrže ukupne polifenole u rasponu od 868 – 2581 mg galne kiseline/L što nije znatno više od rezultata dobivenih u ovom radu. Nadalje, Velić i sur. (2018a) u svom istraživanju odredili su koncentracije ukupnih polifenola za slijedeća vina: vino od kupine (733 – 2698 mg galne kiseline/L), vino od trešnje (584 – 743 mg galne kiseline/L) i vino od jabuke (160 – 470 mg galne kiseline/L). Iz navedenih podataka možemo zaključiti kako voćna vina od bobičastog voća sadrže veću koncentraciju polifenolnih spojeva

u odnosu na voćna vina jabučastog voća. S tehnološkog aspekta proizvodnje voćnog vina od sibirске borovnice, polifenolni spojevi utječu na razvoj boje, trpkosti, gorčine, a neki od njih imaju i antioksidativno djelovanje.

**Tablica 1** Koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima preračunata na mg/L galne kiseline

Oznaka uzorka	X <sub>1</sub> (apsorbancija)	X <sub>2</sub> (apsorbancija)	UP <sub>1</sub> (ukupni polifenoli)	UP <sub>2</sub> (ukupni polifenoli)	Srednja vrijednost ukupnih polifenola
K1 I	0.322	0.335	859.49	892.82	876.15
K1 II	0.334	0.340	890.26	905.64	897.95
K2 I	0.366	0.359	972.31	954.36	963.33
K2 II	0.363	0.356	964.62	946.67	955.64
K3 I	0.34	0.337	905.64	897.95	901.79
K3 II	0.353	0.359	938.97	954.36	946.67
K4 I	0.346	0.358	921.03	951.79	936.41
K4 II	0.329	0.334	877.44	890.26	883.85
Sok Haskap	0.255	0.252	1031.54	1020.00	1025.77

Na **Slici 14**, za antioksidativnu aktivnost voćnog vina i soka od sibirске borovnice, prisutan je isti trend kao i kod određivanja ukupnih polifenola. Sok od sibirске borovnice ima najvišu antioksidativnu aktivnost i njena vrijednost iznosi 1,678 mmol TE/L, slijede ga uzorci K3 II s 1,352 TE/L i K2 II s 1,351 TE/L, dok najmanju antioksidativnu aktivnost ima uzorak K1 I te ona iznosi 1,298 TE/L. Može se pretpostaviti da postoji korelacija između ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti, tj. Sok od sibirске borovnice ima najveću koncentraciju ukupnih polifenola te i najjača antioksidativna svojstva. Razlog najviših koncentracija u soku je taj što se dio polifenola gubi tijekom alkoholnog vrenja. Heinonen i sur. (1998) u svom su istraživanju određivali antioksidativnu aktivnost za preko 44 različita voćna vina, ali nije utvrđena korelacija između koncentracije ukupnih polifenola i antioksidativnih svojstava ispitanih voćnih vina. Unatoč tome, dobiveni rezultati govore da svi uzorci voćnih vina (vina od bobičastog voća te vina od jabuke) sadržavaju znatno antioksidativno djelovanje.



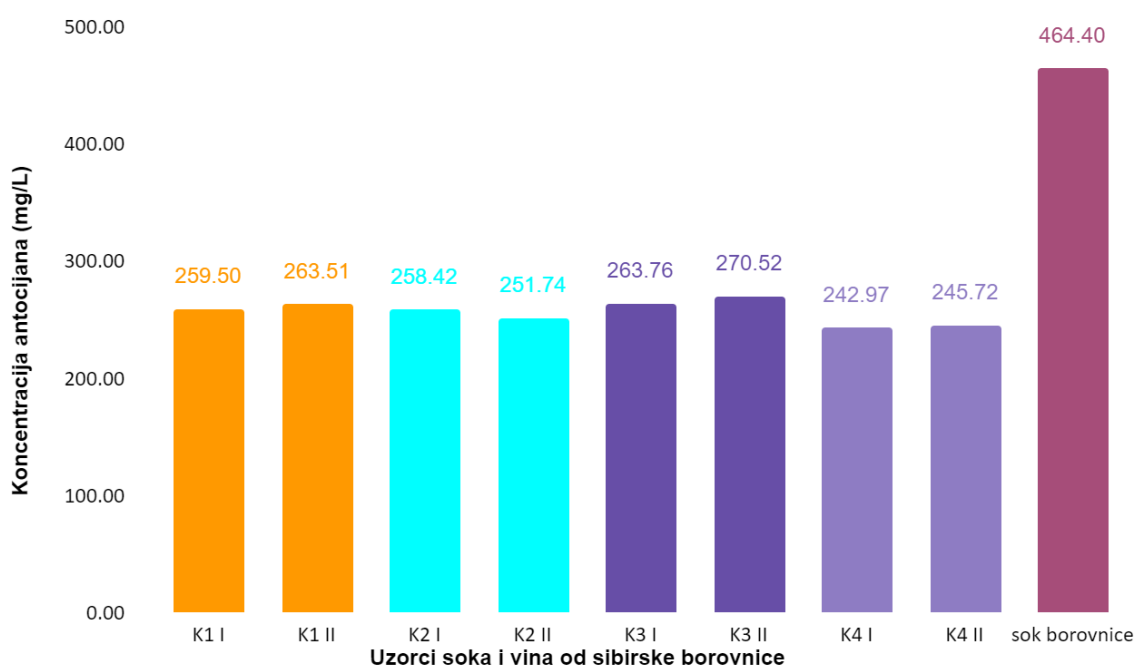
**Slika 14** Antioksidativna aktivnost soka od sibirske borovnice te vina od sibirske borovnice izražena kao mmol TE/L određena DPPH metodom

### 4.3. Spektrofotometrijsko određivanje antocijana

Izmjerene koncentracije antocijana u mg/L u soku od sibirske borovnice te u uzorcima voćnog vina od sibirske borovnice prikazane su na **Slici 15**. Ponovno je vidljivo kako sok od sibirske borovnice ima najviše antocijana u koncentraciji od 464,40 mg/L, dok je najmanja koncentracija u mješovitoj kulturi K4 koja iznosi 242,97 mg/L. Ruta i Farcasanu (2019) ističu kako antocijani imaju blagotvorna djelovanja na ljudsko zdravlje. Iako nisu esencijalni za život, brojna istraživanja na antocijanima ističu njihove pozitivne učinke u ublažavanju simptoma povezanih s aterosklerozom, kroničnom venskom insufijencijom, hiperlipidemijom, makularnom degeneracijom povezanom s dobi te drugih bolesti oka. Također, prehrambeni antocijani smatraju se potencijalnim regulatorima upala izazvanih pretilošću i njezinim povezanim kroničnim bolestima. Tijekom fermentacije i odležavanja vina, antocijani prolaze kroz različite kemijske transformacije, koje uključuju reakcije s produktima glikolize (piruvat i acetaldehid), ali i drugih spojeva prisutnih tijekom alkoholne fermentacije, što dovodi do stabilizacije ili povećanja koncentracije antocijana u finalnom proizvodu. Alpeza (2008) u svom radu navodi da u mladim vinima koncentracija antocijana može biti visoka (> 1 g/L) koja se

smanjuje dozrijevanjem vina zbog brojnih reakcija sa ostalim produktima (npr. Taninima). S obzirom da je ovo velika grupa spojeva, nisu poznati svi kemizmi nastajanja niti sve kemijske strukture.

U svom radu Ljevar i sur. (2016) zaključili su da je najveća koncentracija antocijana u vinu od crnog ribiza, slijede ga vino od višnje, maline, kupine i jagode, dok u vinu od jabuke antocijani nisu pronađeni. Također, Velić i sur. (2018a) nisu pronašli antocijane u voćnom vinu od jabuke, dok se u istraživanju na uzorcima voćnog vina od jabuke, kojeg je provela Radiković (2022), koncentracija antocijana kretala se u rasponu od 0,501 – 0,751 mg/L. Amidžić Klarić i sur. (2020) u svom radu navode kako se koncentracija antocijana u uzorcima kupinovog vina kretala od 5,07 mg/L do 217 mg/L. Iz navedenih podataka, vidljivo je da vina od bobičastog voća sadrže značajne koncentracija antocijana, u odnosu na vina od drugog voća.



**Slika 15** Koncentracija antocijana u mg/L u soku i vinu od sibirske borovnice



#### 4.4. Fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće voćnog vina od sibirske borovnice

**Tablica 2** prikazuje rezultate dobivene fizikalno-kemijskom analizom voćnog vina od sibirske borovnice. Uočeni je najveći sadržaj neprevrelog šećera kod uzoraka s mješovitom kulturom kvasaca (ALPHA TD i FX 10), a samim time i manji sadržaj alkohola, u odnosu na ostale ispitane uzorke u kojima je jedna starter kultura. Prema Pravilniku o vinarstvu (NN 81/22) svi uzorci voćnog vina od sibirske borovnice zadovoljavaju zahtjeve.

**Tablica 2** Rezultati analize fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće vina od sibirske borovnice 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 (g/l)	SADRŽAJ SLOBODNOG SUMPOROVOG DIOKSIDA (g/l)	pH	UKUPNI ŠEĆERI (g/L)	SADRŽAJ NEPREVRELOG ŠEĆERA (g/L)
HASKAP K1 - I	11,35	47,9	18	0,72	53,76	17,98	3,26	3,76	0,94
HASKAP K1 - II	11,49	48,30	18,3	0,72	51,20	20,48	3,27	1,9	1,9
HASKAP K2 - I	11,11	51,50	19,65	0,60	53,76	20,48	3,23	4,79	2,4
HASKAP K2 II	11,02	50,80	19,05	0,63	51,20	20,48	3,22	3,77	1,89
HASKAP K3 I	11,38	50,50	18,53	0,66	44,80	25,60	3,24	3,75	1,88
HASKAP K3 II	11,36	50,60	18,00	0,65	46,28	26,30	3,26	3,74	1,87
HASKAP K4 I	10,72	56,90	17,78	0,66	49,20	28,16	3,25	10,22	6,97
HASKAP K4 II	10,63	62,40	18,00	0,65	47,36	28,16	3,29	14,20	6,63

**V. ZAKLJUČCI**

S obzirom na rezultate istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Proizvedeno voćno vino od sibirske borovnice zadovoljava zahtjeve kakvoće vina propisane Pravilnikom o vinarstvu (NN 81/22).

Tijekom provedbe mikrofermentacija, najveću količinu CO<sub>2</sub> proizveo je komercijalni kvasac Zymaflore® RX60 (intenzivnija fermentacija), dok je mješovita kultura kvasaca Zymaflore® ALPHA TD i Zymaflore® FX10 proizvela najmanje ukupnog CO<sub>2</sub>.

Odabrani komercijalni kvasac Zymaflore® RX 60 imao je veću specifičnu brzinu fermentacije na samom početku vrenja (3. dan fermentacije), dok su nakon faze burnog vrenja (9. dan fermentacije) veću specifičnu brzinu fermentacije imali kvasci Zymaflore® 011 BIO i FX10.

Mješovita kultura odabranih komercijalnih kvasaca Zymaflore® ALPHA TD i Zymaflore® FX10 pogodna je za proizvodnju poluslatkih te slatkih voćnih vina od sibirske borovnice s nižim udjelom alkohola.

Nakon provedene alkoholne fermentacije došlo je do smanjenja udjela ukupnih polifenola u vinu od sibirske borovnice, u odnosu na početni sok, prilikom čega nije utvrđena jasna ovisnost između koncentracije ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti.

Uzorak voćnog vina od sibirske borovnice proizveden pomoću kvasca Zymaflore® RX60 ima najviši sadržaj ukupnih polifenola, dok najvišu antioksidativnu aktivnost ima uzorak proizveden pomoću kvasca Zymaflore® FX10.

Utvrđeno je smanjenje koncentracije antocijana u svim uzorcima proizvedenog voćnog vina od sibirske borovnice u odnosu na početni sok od sibirske borovnice. Najveća koncentracija antocijana izmjerena je u uzorcima voćnog vina od sibirske borovnice proizvedena pomoću kvasca Zymaflore® FX10.

## **VI. LITERATURA**

- AICV, European Cider and Fruit Wine Association: European cider trends 2021. AICV, Brussels, 2022.
- 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.
- Amidžić Klarić D, Klarić I, Velić D, Velić N, Marček T: Evaluation of Quercetin Content, Colour and Selected Physico – Chemical Quality Parameters of Croatian Blackberry Wines. *Polish Journal of Food and Nutrition Science* 67: 75-83, 2017.
- Bautista-Ortin A, Martinez-Cutillas A, Ros-Garcia M, Lopez-Roca J M, Gomez-Plaza E: Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology* 40: 867-878, 2005.
- 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.
- Celli GB, Ghanem A, Brooks MSL: Haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) - A critical review of antioxidant capacity and health-related studies for potential value-added products. *Food and Bioprocess Technology* 7:1541–1554, 2014.
- Coton E, Coton M, Guichard H: Cider (Cyder; Hard Cider): The Product and Its Manufacture. *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier Ltd, Amsterdam, 119–128. 2016.
- Čuš F, Jenko M: Influence of yeast on quality of Gewürztraminer wine, *Food Technology and Biotechnology* 51:547–553, 2013.
- Fotez A: Projektiranje sustava za kontroliranu fermentaciju vina. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.

- Fugelsang KC, Edwards CG: Wine microbiology: Practical applications and procedures, 2. izd., Springer Science and Business Media, LLC, New York, 2007.
- Gołba M, Sokół-Łętowska A, Kucharska AZ: Health properties and composition of honeysuckle berry *Lonicera caerulea* L. an update on recent studies, *Molecules* 25:749, 2020.
- 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.
- 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.
- Jurković K: Vino od borovnice. Završni rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2018.
- Kantoci D: Uzgoj borovnice. *Glasnik zaštite bilja* 6: 30-37, 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.
- Krušelj M: Alkoholna fermentacija vina. Završni rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Kurtanjek K: Kupina kao sirovina za proizvodnju voćnog vina. Završni rad. Sveučilište Sjever, Koprivnica, 2022.
- Leisso R, Jarrett B, Miller Z: Haskap preharvest fruit drop and stop-drop treatment testing, *Horttechnology*, 2021.
- 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.

- Lovrenčić Š, Šimunović V: Haskap ili modra kozokrvina - sibirski borovnica, Savjetodavna služba, 2014.
- 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.
- Mesihović A: Proizvodnja kupinovog vina mikrofiltracijom s komercijalnim kvascem Fermol Rouge, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Zagreb, 2011.
- Molina AK, Vega EN, Pereira C, Dias MI, Heleno SA, Rodrigues P, Fernandes IP, Barreiro MF, Kostić M, Soković M, Barreira JCM, Barros L, Ferreira ICFR: Promising antioxidant and antimicrobial food colourants from *Lonicera caerulea* L. var. kamtschatica, *Antioxidants*, 2019.
- MP, Ministarstvo poljoprivrede: Pravilnik o vinarstvu. Narodne novine 81/22, 2022.
- MPŠ, Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva: Pravilnik o vinu. Narodne novine 73/06, 96/03, 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 Méditerranée. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 78:49-55, 2013.
- Petrovický B: Primjena starter kultura u prehrambenoj industriji. Završni rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.
- Radiković E: Optimizacija procesa proizvodnje i karakterizacija voćnog vina od jabuke. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2022.
- Ramírez M, Velázquez R: The yeast *Torulaspora delbrueckii*: An interesting but difficult-to-use tool for winemaking. *Fermentation* 4:94, 2018.

- Rupasinghe HPV, Arumuggam N, Amararathna M, De Silva ABKH: The potential health benefits of haskap (*Lonicera caerulea* L.): Role of cyanidin-3-O-glucoside. *Journal of Functional Foods* 44:24-39, 2018.
- Ruta LL, Farcasanu IC: Anthocyanins and anthocyanin-derived products in yeast-fermented beverages. *Antioxidants* 8:182, 2019.
- Sović V: Utjecaj membranske filtracije na kemijski sastav i kvalitetu vina sorte graševina. Diplomski rad, Prehrambeno–tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2013.
- 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.
- Vustin MM: The biological role of glycerol in yeast cells. Yeast as glycerol producers. *Applied biochemistry and microbiology* 57:907, 2021.
- Wang Z, Svyantek A, Miller Z, Jarrett B, Kapus A: Haskap juicing method effects on haskap juice quality, *Applied Sciences* 13: 10784, 2023.
- Zoričić M: Podrumarstvo. 2. izdanje. Nakladni zavod Globus, Zagreb, Hrvatska, 1996.