Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari boje i arome vina od jabuke

Mihovilović, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:977188

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Mia Mihovilović

UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA ZADRŽAVANJE TVARI BOJE I AROME VINA OD JABUKE

diplomski rad

Osijek, srpanj, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija vina
Tema rada je prihvaćena na VIII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 30. svibnja 2016. godine
Mentor: doc.dr.sc. Anita Pichler

Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari boje i arome vina od jabuke

Mia Mihovilović, 274/DI

Sažetak: Voćna vina proizvode se fermentacijom mošta dobivenog prešanjem raznih vrsta voća kao što je jabuka, kruška, trešnja, višnja, ribiz itd. Postupak proizvodnje ovih vina sličan je proizvodnji vina od grožđa, ali se razlikuje ovisno o pojedinoj vrsti voća. Glavna karakteristika koja određuje kakvoću vina i ima vrlo važnu ulogu prilikom odabira vina od strane potrošača je aroma. Aroma vina potječe jednim dijelom iz sirovine dok jedan dio produciraju kvasci tijekom alkoholne fermentacije, a dio nastaje odležavanjem i njegovanjem mladog vina. Pojedine komponente arome nastaju tijekom odležavanja vina, a pojedine postepeno nestaju te na taj način vino mijenja svoja organoleptička svojstva. Miris vina predstavlja ekstremno velik kvalitativni i kvantitativni kemijski kompleks, jer sadrži preko tisuću hlapljivih spojeva identificiranih u vinu.
Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi sadržaj aromatičnih spojeva, polifenola, flavonoida te antioksidacijsku aktivnost u vinima od jabuke dobivenim različitim tehnološkim postupkom proizvodnje. Utvrđeno je da tehnološki postupak proizvodnje utječe na sadržaj aromatičnih spojeva, polifenola, flavonoida te na antioksidacijsku aktivnost u vinima od jabuke.
Rezultati analize vina pokazali su da je vino od jabuke dobiveno fermentacijom maceriranih jabuka imalo najveći udio spojeva arome, dok je vino od jabuke dobiveno fermentacijom koncentriranog soka jabuke imalo najmanji udio aromatskih spojeva. Također, vino od jabuke proizvedeno fermentacijom maceriranih jabuka imalo je najveći sadržaj polifenola, flavonoida te najveću antioksidacijsku aktivnost.

Ključne riječi: vino od jabuke, aromatični spojevi, polifenoli, flavonoidi, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 68 stranica
29 slika
6 tablica
51 literaturnu referencu

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar	predsjednik
2. doc. dr. sc. Anita Pichler	član-mentor
3. doc. dr. sc. Natalija Velić	član
4. izv. prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban	zamjena člana

Datum obrane: 11. srpnja 2016.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Technology of Wine
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. VIII held on May 30, 2016
Mentor: Anita Pichler, PhD assistant prof.

Influence of processing parameters on retention of colour and aroma components in apple wine

Mia Mihovilović, 274/DI

Summary: Fruit wines are produced by fermentation of must obtained by pressing various kinds of fruit such as apple, pear, cherry, sour cherry, currant, etc. Production process of these wines is similar to the production of wine from grapes, but varies depending on the particular type of fruit. The main characteristic that determines the quality of the wine and has a very important role in consumers' choice is flavor. The aroma of the wine originates in part from raw materials while some is produced by yeasts during fermentation, and part is created by aging and nurturing young wine. Individual flavor components are formed during the aging of wine, and some gradually disappear and thus wine changes its organoleptic characteristics. The smell of wine represents an extremely large qualitative and quantitative chemical complex, because it contains more than a thousand volatile compounds identified in wine.
The aim of this study was to determine the content of aromatic compounds, polyphenols, flavonoids and antioxidant activity in wines from apples obtained by various technological process of production. It was found that technological process affects the content of aromatic compounds, polyphenols, flavonoids and the antioxidant activity in the wines of apples.
Results of the analysis showed that wine is obtained by fermentation of macerated apples had the highest share of flavor compounds, while the wine obtained by fermentation of concentrated apple juice had the lowest proportion of aromatic compounds. Also, wine is produced by fermentation of macerated apples had the highest content of polyphenols, flavonoids and the highest antioxidant activity.

Key words: apple wine, aromatic compounds, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity

Thesis contains: 68 pages
29 figures
6 tables
51 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Mirela Kopjar PhD, associate prof. — chair person
2. Anita Pichler PhD, assistant prof. — supervisor
3. Natalija Velić PhD assistant prof. — member
4. Nela Nedić Tiban PhD, associate prof. — stand-in

Defense date: July 11, 2016

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Aniti Pichler na prihvaćanju ideje diplomskog rada, strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi istog.

Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama uz koje su godine studiranja prošle u zanimljivom tonu.

Najveće hvala mojim roditeljima na razumijevanju i neizmjernoj podršci koju su mi pružili tijekom studiranja.

Sadržaj

1. UVOD ... 1

2. TEORIJSKI DIO ... 3

2.1. JABUKE ... 4

2.2. VINA OD VOĆA ... 5

2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA ... 5

2.3.1. ALKOHOLI ... 6

2.3.2. UGLJIKOHIDRATI ... 7

2.3.3. KISELINE ... 9

2.3.4. ALDEHIDI I KETONI ... 11

2.3.5. ESTERI ... 11

2.3.6. TVARI AROME ... 12

2.3.7. ENZIMI ... 13

2.3.8. FENOLNI SPOJEVI ... 13

2.3.9. MINERALNE TVARI (PEPEO) ... 15

2.3.10. EKSTRAKT VINA ... 15

2.3.11. DUŠIČNE TVARI ... 16

2.3.12. KOLOIDI VINA ... 17

2.3.13. PROTEINI ... 17

2.3.14. PARAMETRI KAKVOĆE VINA ... 17

2.4. PROIZVODNJA VOĆNIH VINA ... 20

2.5. ODREĐIVANJE SASTOJAKA AROME PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM ... 28

2.5.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA ... 28

2.5.2. SPEKTROFOTOMETRIJA MASA ... 30

2.5.3. SPME analiza ... 31

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 32

3.1. ZADATAK ... 33

3.2. MATERIJALI I METODE ... 33

3.2.1. Vino od jabuke ... 33

3.2.2. Proces proizvodnje vina od jabuka ... 33

3.2.3. Kemijska analiza vina ... 34

3.2.4. Analiza arome vina plinskom kromatografijom primjenom SPME analize ... 40

4. REZULTATI ... 42

5. RASPRAVA ... 48

6. ZAKLJUČCI ... 53

7. LITERATURA ... 55

Popis oznaka, kratica i simbola

SPME	Solid Phase Microextraction (mikroekstrakcija na čvrstoj fazi)
GC	Plinska kromatografija
GC/MS	Plinska kromatografija sa maseno-selektivnim detektorom

1. UVOD

Voćno vino od jabuke ili cider osvježavajuće je piće koje zbog svojeg kemijskog sastava konzumentima pruža energizirajuće i tonizirajuće djelovanje. Pozitivan učinak ovog energetskog pića isključivo ovisi o sastavu jabuka od kojih je proizveden. Sadržaj vitamina B3 i B6, minerala, visoke koncentracije antioksidanasa te esencijalnih elemenata poput kalija, kalcija i magnezija potrošaču omogućuje zaštitu od raznih kroničnih bolesti, oporavak od napora uzrokovanih treningom te homeostazu organizma. Bioraspoloživost ovih spojeva može veoma varirati. Mnogi faktori poput genetike, okoliša i tehnologije utječu na koncentraciju tih spojeva u hrani. Neki od ovih faktora mogu se kontrolirati i time optimizirati koncentraciju istih u hrani.

Jabuka (*Malus domestica*) jedna je od najrasprostranjenijih i najčešće uzgajanih voćaka, a time i jedna od dostupnijih za ljudsku prehranu. Kao osnovna sirovina u proizvodnji ovakovih pića svojom kompleksnošću doprinosi kvaliteti proizvoda i benefitima na zdravlje potrošača.

Kemijski sastav ove kraljice voćaka glavni je subjekt prilikom izbora sorte jabuke za proizvodnju cidera. Jabuka obiluje šećerima, dijetalnim vlaknima, vitaminima i fenolnim spojevima. Upravo fenolni spojevi imaju jednu od važnijih uloga u redukciji pojavnosti raznih kroničnih bolesti, između ostalih pretilosti, karcinoma i kardiovaskularnih bolesti. Flavonoidima i fenolnim kiselinama, kao fenolnim spojevima, pripisuje se antioksidacijski kapacitet (Eberhardt i sur., 2000.; Lee i sur., 2003.). Što je češće ova namirnica uključena u svakodnevnu uravnoteženu prehranu smatra se da pridonosi pozitivnom djelovanju na ljudsko zdravlje (Boyer i Liu, 2004.).

U ovom radu ispitivana su tri uzorka vina od jabuke dobivena različitim procesom proizvodnje. Cilj rada bio je istražiti utjecaj procesnih parametara na očuvanje boje i arome vina od jabuke. Rezultati istraživanja pokazali su da procesni parametri utječu na zadržavanje tvari boje i arome u vinu od jabuke.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JABUKE

Skupno ime za sve sorte jabuka je *Malus domestica*. Ista pripada porodici *Rosaceae*, potporodici *Maloideae* i rodu *Malus*. Iz roda *Malus* poznato je između 25 i 30 vrsta i nekoliko podvrsta jabuka. S obzirom da predstavlja jednu od najčešće uzgajanih voćaka, jabuka se od davnina koristi kao namirnica ili sirovina za preradu. Zbog svojih privlačnih svojstava, prvenstveno izgleda, a potom i mirisa te slatkog okusa učestala je njena konzumacija. Prema proizvodnji, prometu i potrošnji, na svjetskoj razini nalazi se na trećem mjestu, odmah iza agruma i banana (Mišić, 2004.). U Hrvatskoj se ova najraširenija voćka, s obzirom na količinu najviše proizvodi u kontinentalnom djelu. Za proizvodnju cidera sorte jabuka klasificiraju se prema kiselosti, fenolnom sastavu i šećerima.

Fizikalna, biokemijska i organoleptička svojstva određuju kakvoću i kvalitetu ploda jabuke, dok su najvažniji faktori kod potrošača tekstura i okus sirovine (Abbott i sur., 2004.).

Složen kemijski profil jabuke čine brojni organski i anorganski spojevi te mikro i makro elementi.

Slika 1 Jabuka (*Malus domestica*) (Web 1)

2.2. VINA OD VOĆA

Povijest riječi *cider* veoma je duga, a tijekom vremena označava „fermentirano piće od jabuka“.

Fermentacijom mošta dobivenog prešanjem raznih vrsta voća kao što su jabuka, kruška, trešnja, višnja, ribiz, proizvode se vina od voća. Za fermentaciju mošta najčešće se koriste selekcionirani kvasci.

Ovisno o sorti jabuke koje se koriste u proizvodnji voćnih vina, ovise i organoleptička svojstva konačnog proizvoda. Odabir sirovine najčešće je vezan za područje u kojem je zastupljena pojedina sorta jabuke. Međutim, jabučna vina obično se proizvode kupažiranjem vina različitih sorata jabuka.

Slika 2 Cider (Web 2)

2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA

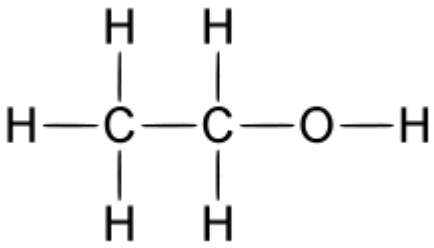
Kemijski sastav vina raznovrstan je s obzirom na velik broj kemijskih komponenti koje prema kemijskoj građi pripadaju različitim grupama spojeva.

Jabučna vina se s obzirom na kemijski sastav klasificiraju prema kiselosti, udjelu tanina, fenolnim tvarima te šećerima.

Zakon o vinu određuje granične vrijednosti pojedinih sastojaka i njihove odnose, a rezultati dobiveni kemijskim analizama moraju biti u skladu s istima. (Zoričić, 1996.).

2.3.1. ALKOHOLI

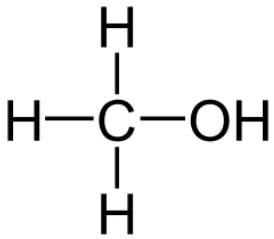
Vino sadrži velik broj različitih alkohola. Etilni alkohol (etanol) nastaje alkoholnom fermentacijom prirodnih šećera, a koliko će nastati etilnog alkohola ovisi o udjelu šećera u grožđu i moštu. U iznimnim slučajevima, prilikom popravljanja mošta, može se dodavati i saharoza. Dopušteni udio alkohola u vinu, kod stolnih vina, kreće se od 8,5% vol. do 15% vol. kod kvalitetnih i vrhunskih vina (Vrdoljak, 2009.).



Slika 3 Strukturna formula alkohola etanola (Web 3)

Ostali alkoholi koji se nalaze u vinu su metilni alkohol (metanol) i viši alkoholi.

Metanol nije produkt fermentacije. U vinu se javlja kao nusprodukt, a nastaje hidrolizom pektinskih tvari. Od sorata grožđa bogatih pektinom u konačnici i njihova vina imaju više udjele metanola. Iako se metanol u vinu nalazi u malim količinama, crna vina sadrže 2 – 3 puta više metanola od bijelih vina. Alkohol metanol je toksičan i oksidacijom može preći u formaldehid i mravlju kiselinu koji su toksični za centralni živčani sustav. Vino proizvedeno od plemenitih sorti grožđa nikad nema metanola preko kritičnog sadržaja od 350 mg/kg. Međutim, u vinima proizvedenim od hibridnih sorata grožđa, udio metanola je visok pa su toksična. Stoga nije dopušteno proizvoditi vino od hibridnih sorata grožđa (Pozderović, 2010.).



Slika 4 Strukturna formula alkohola metanola (Web 4)

Pod nazivom viši alkoholi podrazumjevamo alkohole s dva i više C atoma. Većina viših alkohola nastaje kao sekundarni produkt fermentacije, koje sintetiziraju kvasci iz šećera ili aminokiselina koje se nalaze u grožđu i moštu. Viši alkoholi javljaju se u vinima u minimalnim količinama (150 – 550 mg/L), te s kiselinama daju estere koji poboljšavaju kakvoću vina. Koncentracija viših alkohola ovisi o sorti grožđa, vrsti kvasca te uvjetima prerade. Najznačajniji viši alkoholi su izobutanol, amilalkohol, izoamilalkohol (Vrdoljak, 2009.).

Od viševalentnih alkohola u vinu, posebno se može izvojiti glicerol. Glicerol je poliol i u svojoj kemijskoj strukturi sadrži 3 C atoma i 3 hidroksilne skupine. Proizvode ga kvasci alkoholnom fermentacijom. Glicerol u vinu utječe na okus vina te mu daje osjećaj punoće i blagosti, te pojačava slatkoću vina (Pozderović, 2010.).

Najzastupljeniji i najznačajniji od aromatskih alkohola prisutnih u vinu je fenil-etanol, koji ujedno utječe na bouquet vina (Vrdoljak, 2009.).

2.3.2. UGLJIKOHIDRATI

Najraširenija skupina organskih spojeva u živom svijetu su ugljikohidrati. Sinteza ugljikohidrata započinje u zelenim djelovima biljaka, najviše listu i zelenim bobicama, složenim procesom koje se naziva fotosinteza. Ugljikohidrati u hrani mogu biti prirodno prisutni ili se u hranu dodaju.

Ugljikohidrati su sačinjeni od ugljika, kisika i vodika, a njihova opća formula je

$$C_n(H_2O)_m$$

Udio šećera u grožđu i moštu ovisi o sorti, okolinskim i vremenskim uvjetima. Visokokvalitetne sorte mogu imati od 22 do 28% šećera, dok se kod kvalitetnih sorti količina šećera kreće od 18 do 22%. Kvasci brže i lakše previru glukozu nego fruktozu do etanola, CO_2 i drugih spojeva (Vrdoljak, 2009.). Razni su oblici u kojima prirodni ugljikohidrati postoje, a većina njih u obliku je oligosaharida ili polisaharida (polimera).

Kemijski sastav svih ugljikohidrata je isti, međutim možemo napraviti podjelu istih prema složenosti u građi molekule. Dijelimo ih na (Stričević i Sever, 2001.):

- monosaharide (glukoza, fruktoza)

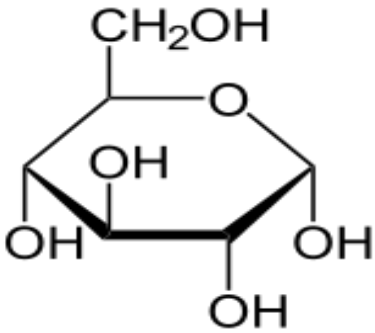
- disaharide (saharoza, maltoza, laktoza)
- polisaharide (škrob, amiloza, amilopektin, celuloza).

U grožđu, moštu i vinu, od monosaharida najzastupljenije su heksoze, D-glukoza i D-fruktoza, te manjim dijelom pentoze, L-arabinoza i D-ksiloza. Zrenjem voća dolazi do rasta udjela fruktoze u odnosu na glukozu. U zelenoj bobici ima svega ½ fruktoze i ¾ glukoze. Zrenjem se ova razlika smanjuje tako da je pri tehnološkoj zrelosti odnos fruktoze i glukoze 1 : 1. S obzirom na koncentraciju u plodu jabuke, šećeri predstavljaju glavnu komponentu u formiranju organoleptičkih svojstava sirovine.

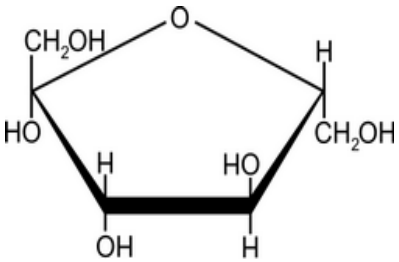
Od oligosaharida u grožđu prisutni su saharoza, maltoza, laktoza, rafinoza i trehaloza, ali je samo saharoza bitan sastojak, dok ostali nemaju utjecaj na kakvoću vina.

Od visokomolekularnih polisaharida u grožđu su prisutni pektini, škrob, glikogen, smole i sluzave tvari. Većina ovih tvari otežava taloženje i bistrenje vina.

Određivanje šećera u grožđu i moštu provodi se moštnim vagama (Oechslova i Baboova ili Klosterneuburška), te refraktometrom (Pozderović, 2010.).



Slika 5 Strukturna formula šećera glukoze (Web 5)



Slika 6 Strukturna formula šećera fruktoze (Web 6)

2.3.3. KISELINE

Kiseline u vinu su prisutne kao normalni sastojci vina, te se upravo zbog njihove prisutnosti vino odlikuje kiselim okusom, što utječe na konačnu kakvoću vina.

Kiseline u vinu mogu biti:

- ukupne kiseline tj. sadržaj svih kiselina u vinu, a iskazuju se kao vinska kiselina,
- hlapljive i nehlapljive kiseline.

Udio kiselina u grožđu i moštu kreće se od 5 do 15 g/L, od toga najveći udio čine vinska i jabučna kiseline. Procesom zrenja udio jabučne kiseline se smanjuje. Premalo kiseline u vinu daje tupi okus vinu (Pozderović, 2010.).

Kiseline u vinu su organske (hlapljive i nehlapljive), anorganske kiseline i soli različitih kiselina.

Organske kiseline u vinu mogu biti podrijetlom iz (Pozderović, 2010.):

- grožđa odnosno mošta (vinska, jabučna, limunska, askorbinska, oksalna, glikolna, glukonska),
- kao produkti alkoholne fermentacije (piruvična, mliječna, octena, sukcinska, oksalna i fumarna kiselina),
- mliječna kiselina nastala malolaktičkom fermentacijom iz jabučne kiseline,
- kiseline nastale razvojem sive plijesni na grožđu.

Organske kiseline koje se nalaze u vinu su vrlo važne za organoleptička svojstva vina, posebno kod bijelih vina i za fizikalno-kemijsku i mikrobiološku ispravnost vina (Pozderović, 2010.).

Metabolizam kvasaca i octeno kiselim vrenjem nastaju hlapljive kiseline. Ovisno o soju kvasca ovisi i količina kiselina koja će nastati. Selekcionirani kvasci produciraju manje hlapljivih kiselina. Temperatura fermentacije isto tako ima značajan utjecaj na tvorbu hlapljivih kiselina, pa tako pri nižim temperaturama fermentacije nastaje manje hlapljivih kiselina (Pozderović, 2013.).

Octena kiselina je najzastupljenija od hlapljivih kiselina u vinu. Octena kiselina nastaje oksidacijom alkohola, djelovanjem octenih bakterija u aerobnim uvjetima, te djelovanjem

kvasaca u anaerobnim uvjetima tijekom alkoholne fermentacije. Pojava octene kiseline karakteristična je za bolesna vina. Međutim, ukoliko se octena kiselina nalazi u manjim koncentracijama, do 0,3 g/L, nema štetno djelovanje već pozitivno utječe na okus vina. Vino može sadržavati i sljedeće kiseline: mravlju, propionsku, butirnu, kapronsku, kaprilnu, kaprinsku i laurinsku kiselinu.

Od nehlapljivih kiselina u vinu, treba izdvojiti: vinsku, jabučnu, mliječnu, jantarnu i limunsku kiselinu.

U zelenim dijelovima vinove loze nalazi se vinska kiselina. Vinska kiselina je najjača i ključna kiselina, pa stoga najviše utječe na pH-vrijednost i kiselost vina. Vezivanjem vinske kiseline s mineralima kalija i kalcija dolazi do stvaranja soli – tartarata koji nisu dobro topljivi. Pri nižim temperaturama tartarati se mogu istaložiti u obliku sitnih kristala (Pozderović, 2013.).

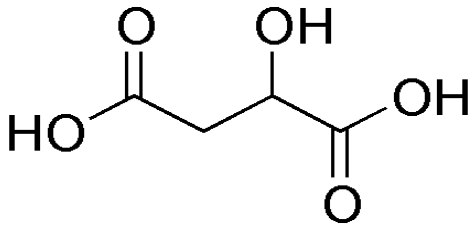
Dozrijevanjem grožđa koncentracija jabučne kiseline opada. Pad koncentracije jabučne kiseline povezan je sa temperaturom zraka. Iz tog razloga, jabučna kiselina zastupljenija je u vinima sjevernih krajeva i u godinama s nižim temepraturama. Više koncentracije ove kiseline pridonose zeljastom, neharmoničnom okusu vina. Mliječno-kiselim vrenjem (malolaktičkim vrenjem) jabučna kiselina pretvara se u slabiju (manje kiselu) mliječnu kiselinu (Pozderović, 2013.).

Mliječna kiselina se u vinu javlja kao sekundarni produkt alkoholne fermentacije. Mliječna kiselina, u većim količinama, javlja se uslijed metabolizma mliječno-kiselih bakterija, u pokvarenim vinima (Pozderović, 2013.).

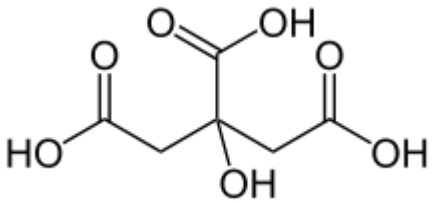
Jantarna kiselina sekundarni je produkt alkoholne fermentacije iz acetaldehida. Prisutna je u neznatnim količinama, a vinu daje gorčinu (Pozderović, 2013.).

Ukoliko dođe do previranja šećera djelovanjem plijesni u vinu nastaje limunska kiselina.

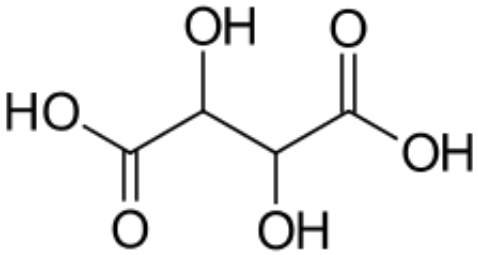
Anorganske kiseline prisutne u vinu najčešće se javljaju u obliku kalijevih i kalcijevih soli.



Slika 7 Strukturna formula jabučne kiseline (Web 7)



Slika 8 Strukturna formula limunske kiseline (Web 8)



Slika 9 Strukturna formula vinske kiseline (Web 9)

2.3.4. ALDEHIDI I KETONI

Aldehidi i ketoni reaktivni su spojevi. Vežu se sa sumporastom kiselinom i njenim solim tvoreći lako topljive kiseline. Ovi spojevi veoma su značajni jer tvore karakterističnu aromu i bouquet vina, a time i organoleptička svojstva vina.

Aldehidi u čistom obliku daju oštar miris, koji podsjeća na voće. Najintenzivniji miris daje heptanal. Alkoholnim vrenjem nastaju novi aldehidi, uglavnom acetaldehid na koji otpada 90%. Alifatskih aldehida u vinu ima vrlo malo, te daju ugodan voćni miris (Vrdoljak, 2009.).

Ketoni su u moštu i vinu slabo zastupljeni. Najzastupljeniji je aceton, potom acetoin i diacetil. Većina ima miris svježeg maslaca, što u većim količinama može dati nijansu užeglosti (Vrdoljak, 2009.).

2.3.5. ESTERI

Esterifikacijom alkohola i kiselina koji nastaju esteri. Tijekom fermentacije (hlapivi esteri) i odležavanja i starenja vina (nehlapivi esteri) dolazi do povećanja njihovog udjela, što znači da

ih u vinu ima više nego u polaznoj sirovini, grožđu. Esteri octene kiseline daju ugodan miris i svježinu vinu. To su: etil acetat, propil acetat, izopropil acetat, izobutil acetat i izoamil acetat.

Od estera masnih kiselina u vinu su zastupljeni: etil propionat, etil valerijat, etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanoat (Vrdoljak, 2009.).

2.3.6. TVARI AROME

Aromu vina čine različiti hlapivi sastojci koji se u istima nalaze u malim koncentracijama reda veličine od nekoliko mg/L do nekoliko ng/L. Aroma vina je kompleksna i formira se tijekom zrenja, složenim kemijskim, biokemijskim i mikrobiološkim procesima (Vrdoljak, 2009.). Sadržaj tvari aroma isključivo ovisi o sorti vinove loze, zrelosti grožđa, načinu uzgoja, klimatskim uvjetima prilikom sazrijevanja ploda, sastavu tla, primjeni agrotehničkih mjera uzgoja sirovine, te o tehnologiji prerade grožđa u vino.

Aroma vina naziva se bouquet. Tvari arome uglavnom se nalaze u pokožici, a znatno manje u mesu i sjemenkama grožđa. To su različite tvari arome koje pripadaju velikom broju različitih kemijskih spojeva: hlapljive karboksilne kiseline, alkoholi, esteri, aldehidi, ketoni, eterična ulja, više masne kiseline, terpeni, te tvari slične smolama i voskovima.

Aroma vina potječe (Vrdoljak, 2009.):

- Iz grožđa ovisno o sorti grožđa, klimatskim uvjetima i agrotehničkim mjerama uzgoja,
- Biokemijskim reakcijama (oksidacija, hidroliza) tijekom separacije mošta i maceracijom,
- Alkoholnom fermentacijom, produkcijom kvasaca nastaje karakteristična aroma; malolaktičkom fermentacijom,
- Kemijskim i enzimatskim reakcijama poslije fermentacije tijekom dozrijevanja i starenja vina u bačvama, cisternama i bocama nakon punjenja.

Najvažniji hlapivi spojevi primarne arome grožđa su monoterpeni: geraniol, linalol, nerol, α-terpineol, citronelol i hotrineol. Ovi spojevi su odgovorni za voćne i cvjetne mirise pojedinih sorti grožđa. Terpeni mogu biti slobodni u hlapivom obliku ili vezani za šećere – glikozidi.

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

2.3.7. ENZIMI

Enzimi u moštu i vinu, kao organski biokatalizatori, imaju ulogu pokretača kemijskih reakcija koje se odvijaju tijekom vinifikacije, taloženja i bistrenja vina, odležavanja, starenja i njege vina. Iz tog razloga značajni su za razvoj sekundarnog bouquet-a vina.

U vinu se nalazi veći broj enzima, a među njima najvažniju ulogu imaju sljedeći: saharaza (invertaza), tanaza, pektaza i katalaza. Saharaza hidrolizira saharozu na glukozu i fruktozu. Tanaza, koja u vino dospijeva iz plijesni trulog grožđa, katalizira tvorbu taninskih tvari. Pektaza hidrolizira pektinske tvari na metanol i poligalakturonsku kiselinu, a značajna je za bistrenje vina. Katalaza ubrzava oslobađanje kisika iz vodikovog peroksida i ostalih peroksidnih spojeva, te na taj način toksično djelovanje ovih spojeva ne dolazi do izražaja (Vrdoljak, 2009.).

2.3.8. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u svim biljnim tkivima voća i povrća, te u fermentiranim proizvodima kao što su vina. Fenoli su grupa organskih spojeva koji u svom kemijskom sastavu sadrže jednu ili više hidroksilnih grupa na aromatskom prstenu i/ili prstenima. Međusobno variraju u strukturi, od jednostavnim molekula, monomera i oligomera, do polimera. Prema osnovnoj kemijskoj strukturi može ih se podijeliti na fenolne kiseline i flavonoide. Najznačajniji fenolni spojevi u moštu i vinu su fenolne kiseline i njihovi derivati, flavonoidi, tanini i antocijani koje potječu iz čvrstih dijelova grožđa. Fenolni spojevi ekstrahiraju se alkoholnom fermentacijom iz masulja, te prelaze iz mošta u vino (Vrdoljak, 2009.).

Od fenolnih kiselina u grožđu i vinu se nalaze benzojeva i cimetna kiselina te njihovi derivati. Fenolne kiseline su obojene u razrijeđenoj alkoholnoj otopini, a oksidacijom prelaze u žute pigmente. One ne utječu na okus i miris, ali su prekursori za hlapive fenolne spojeve.

Flavonoidi su žuti pigmenti koji se nalaze u kožici bijelog i crvenog grožđa. U grožđu se nalaze u obliku glikozida koji hidroliziraju tijekom fermentacije.

U dodiru sa kisikom fenolne tvari lako oksidiraju. Djelovanjem enzima polifenoloksidaze oksidacija je intenzivnija i dolazi do pojave posmeđivanja vina. Namirnice sa visokim udjelom fenolnih spojeva od velikog su značaja u industriji zbog svog utjecaja na oksidaciju lipida što rezultira konačnim proizvodom visoke nutritivne vrijednosti, a time i kvalitete (Kähkönen i sur., 1999.).

Fenolni spojevi pridonose senzorskim svojstvima odnosno okusu, aromi i boji te nutritivnoj vrijednosti namirnicama biljnog podrijetla te mnogobrojnim proizvodima dobivenim preradom istih (Cheynier, 2005.).

Neke fenolne tvari koje se nalaze u hrani mogu pridonijeti suhom osjećaju u ustima tijekom konzumacije. Tanini su polifenolni spojevi složene strukture i važan su sastojak vina za vrijeme vinifikacije i odležavanja vina. U grožđu se nalaze kondenzirani tanini kao polimeri flavonoidnih fenola, odnosno proantocijanidini. Osim toga, sadržaj fenola koji daju trpkost namirnici ili proizvodu može imati i utjecaj na prihvaćanje ili neprihvaćanje istog. Uz to, značajno utječu na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva vina. Ovi spojevi se uglavnom nalaze u kožici, peteljci i sjemenkama. Tanini imaju afinitet za proteine te uzrokuju njihovo zgrušavanje, a time i ubrzavaju bistrenje i taloženje mošta i vina. Što je veća molekula polimera to je veći i afinitet za proteine. Taninske tvari mogu reagirati sa kisikom iz zraka, čime započinje proces oksidacije i nastajanje tamno obojenih tvari. Crna vina sadrže više tanina od bijelih. U većim količinama tanini daju opor okus vinu (Pozderović, 2010.; Vrdoljak, 2009.).

Velika i raznolika grupa fenolnih tvari poznatiji kao flavonoidi odgovorni su za boju crnih sorata grožđa. Tako su antocijanini odgovorni za ružičastu, crvenu, plavu i ljubičastu boju povrća, voća, voćnih sokova i vina. Antocijani su flavonoidni polifenoli koji u prirodi dolaze u obliku antocijanina, odnosno glikozida pojedinih antocijanidina (aglikona). U vinu se nalazi pet osnovnih antocijanidina: malvidin, delfinidin, pentunidin, peonidin i cijanidin. Na stabilnost ovih pigmenata utjecaj imaju pH, temperatura, svjetlost, enzimi, kisik, koncentracija i struktura molekule. Antocijanini najviše pridonose antioksidativnoj aktivnosti u voću od ostalih flavonola, flavan-3-ola i fenolnih kiselina (Jakobek i sur., 2009.).

Neke grupe žutih i svijetlih flavonoidnih pigmenata koji se mogu naći u biljkama uključuju flavonole, flavone, halkone, flavonide i izoflavonoide. Bez obzira što su mnoge od ovih tvari bezbojne, prilikom rukovanja i prerade mogu se promjeniti u obojene produkte. Iz tog razloga prilikom prerade se dodaju konzervansi kao antioksidansi ili kao antimikrobni agensi.

Ukoliko se jabuka konzumira sa kožicom, otpuštanje antioksidativne aktivnosti je više od 80% (Zardo i sur., 2013.). Mnoge studije pokazale su da fenolni spojevi u namirnicama posjeduju pozitivne karakteristike poput antikarcinogenosti, antioksidativnosti, antimikrobnu i antiviralnu aktivnost.

2.3.9. MINERALNE TVARI (PEPEO)

Postupkom isparavanja vode i potpunog spaljivanja suhe tvari vrši se određivanje pepela u namirnici. Pepeo čine anorganske tvari vina koje ulaze u sastav vina. Pepeo u vinu sastoji se od kalcijevih, kalijevih i magnezijevih soli sumporne, fosfatne i karbonatne kiseline, te od tragova fluora, bakra, željeza, mangana i drugih elemenata. Bolju aromu vina i bouquet, te jače izražene sortne karakteristike grožđa imaju vina sa većom količinom mikroelemenata (Fe, Mn, Zn, Co, Ni) (Vrdoljak, 2009.).

Mineralne tvari u sirovinu dospijevaju iz zemljišta te čine sastavni dio iste, dok manji dio mineralnih tvari dolazi u vino prilikom prerade grožđa i njege vina (Zoričić, 2008). Količina pepela u vinu ovisi o sorti vinove loze, kakvoći i zrelosti grožđa, sastavu tla, mikro i makroklimatskim uvjetima te tehnologiji prerade grožđa u vino. Crna vina sadrže veće količine pepela jer se tijekom fermentacije masulja ekstrahiraju veće količine mineralnih tvari iz čvrstih dijelova grožđa (Vrdoljak, 2009.).

Sadržaj mineralnih tvari u svježem voću je od 0,3 – 0,8%.

2.3.10. EKSTRAKT VINA

Ukupni suhi ekstrakt ili ukupna suha tvar vina je skup svih organskih i mineralnih tvari sadržanih u vinu koje nisu hlapljive pod specifičnim fizikalnim uvjetima. U ekstrakt spadaju ugljikohidrati, nehlapljive kiseline (vinska, mliječna, jabučna), mineralne tvari, glicerol, butilen, glikol, tanini i tvari boje (Vrdoljak, 2009.).

Ekstrakt u vinu može biti:

- Ukupni suhi ekstrakt kojeg čine svi sastojci vina koji nisu hlapivi pod specifičnim fizikalnim uvjetima,
- Nereducirani ekstrakt bez šećera, dobije se kada se od ukupnog suhog ekstrakta oduzme sadržaj ukupnih šećera u vinu,
- Reducirajući ekstrakt, dobije se kada se od ukupnog suhog ekstrakta oduzme sadržaj ukupnih šećera umanjen za 1 g ako je sadržaj šećera preko 1 g/L.

Vrsta, sorta, klimatski uvjeti te tehnologija prerade utječe na sadržaj ekstrakta u vinu. U pravilu južniji krajevi sa više sunčanih sati godišnje daju grožđe i vina sa više ekstrakta. Tako za neka vina možemo reći da su tankog i praznog ili punog i harmoničnog okusa. Crna vina bogatija su ekstraktom zbog većeg sadržaja tanina. Sukladno tome, više ekstrakta sadržavaju kvalitetna i vrhunska vina (Vrdoljak, 2009.).

2.3.11. DUŠIČNE TVARI

Dušični spojevi u vino dolaze iz grožđa. Količina u prvom redu ovisi o bogatstvu tla dušičnim spojevima, zatim o zdravstvenom stanju grožđa (zdravije grožđe sadrži više dušičnih spojeva), o načinu prešanja (samotok sadrži manje dušičnih tvari od prešavine) (Zoričić, 1996.).

Spojevi sa dušikom se u moštu i vinu nalaze kao organski i anorganski spojevi. Mikroorganizmi u moštu koriste dušične tvari, te ih ugrađuju u svoje stanice tijekom rasta. Sukladno tome vino sadrži manje manje dušika što je posljedica ugradnje aminokiselinskog dušika u stanice kvasaca za fermentaciju. Mošt dobiven kontinuiranim prešanjem sadrži manje ukupnog dušika jer se proteini vežu i talože s taninskim tvarima.

Dušične tvari mogu utjecati na boju, aromu, bistroću i postojanost vina, iako se u vinu nalaze u malim količinama. Ukoliko se nalaze u većim količinama, mogu uzrokovati zamućenje vina, a k tome su i dobar izvor dušika bakterijama uzročnicima kvarenja vina (Vrdoljak, 2009.).

2.3.12. KOLOIDI VINA

Koloidi su sluzave tvari vina, a čine ih proteini i pektinske tvari. Veličina čestica koloida je između 1 – 100 µm. Prisutnost koloida u vinu uzrokuje povećanje viskoznosti, opalesciranje, zamućenje vina i pojavu kataforeze (čestice posjeduju istovrstan naboj), te na taj način nepovoljno utječu na organoleptička svojstva vina.

Koloidne tvari dijele se na liofilne i liofobne. Liofilni koloidi imaju sposobnost vezivanja vode i povećanja kiselosti vina. Liofobni koloidi su jako osjetljivi na elektrolite, pri malim promjenama pH dolazi do njihove koagulacije. Uglavnom sadrže kompleksne spojeve željeza, fosfora i bakra (Vrdoljak, 2009.).

2.3.13. PROTEINI

Proteini su makromolekule građene od aminokiselina, a imaju važnu strukturalnu i funkcionalnu ulogu u svim živim organizmima. Molekularna masa proteina je oko 10 000. Proteini su vrlo nestabilni spojevi, u vinu se ponašaju kao koloidi sa pozitivnim električnim nabojem, a talože se sa taninima. Proteini u vinu potječu iz grožđa i iz kvasaca. Odumiranjem kvasaca proteini prelaze u vino.

Koagulirani proteini su (-) nabijene čestice. Proteini u vinu, posebno u bijelom vinu su nestabilni, te se spontano sporo talože. Nestabilnost mladih bijelih vina potječe od sadržaja veće količine koaguliranih proteina. Količina koaguliranih proteina u crnim vinima manji je problem iz razloga što se isti talože sa taninima. Razlog tomu je veći udio tanina u crnim vinima za razliku od udjela u bijelim vinima. (Vrdoljak, 2009.).

2.3.14. PARAMETRI KAKVOĆE VINA

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

- Fizikalno-kemijske analize: alkoholna jakost, ukupni suhi ekstrakt, gustoća, reducirajući šećeri, saharoza, ukupne kiseline, hlapljive kiseline, pepeo, pH, slobodni sumporni dioksid, ukupni sumporni dioksid;
- Dodatne analize:

- ugljični dioksid (prirodna pjenušava, biser i gazirana vina),
- u analizu po potrebi mogu biti uključeni i drugi parametri sastojaka bitnih za ispitivano vino, a sukladno odredbama Pravilnika o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina i drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina;

- Mikrobiološko ispitivanje vina i taloga;
- Provjere ponašanja vina pri izlaganju zraku i niskim i povišenim temperaturama;
- Organoleptičko ocjenjivanje boje, bistroće, mirisa i okusa;
- Odnos pojedinih sastojaka u vinu bitnih za pojedino vino.

Prema Pravilniku o vinu (2004.), vino mora sadržavati:

- **Najmanji udio stvarnog alkohola**

Tablica 1 Najmanji udio stvarnog alkohola (u volumnim %):

Zona	Stolno vino i stolno vino s oznakom kontroliranog zemljopisnog podrijetla (vol %)	Kvalitetno vino s oznakom kontroliranog podrijetla (vol %)	Vrhunsko vino s oznakom kontroliranog podrijetla (vol %)
B	8,5	8,5	10,0
C1	8,5	9,0	10,5
C2	8,0	9,5	11,0
C3	8,5	10,0	11,5

B – Moslavina, Prigorje-Bilogora, Plešivica, Pokuplje, Zagorje

C1 – Podunavlje, Slavonija

C2 – Istra, Hrvatsko Primorje, Dalmatinska Zagora

C3 – Sjeverna, Srednja i Južna Dalmacija

Dopušteno odstupanje najviše 0,5 vol% stvarnog alkohola.

Najveći udio ukupnog alkohola 15 vol% ako nije drugačije određeno.

- **Najmanji udio suhog ekstrakta bez šećera**

Tablica 2 Najmanji udio suhog ekstrakta bez šećera (u g/L)**:**

Boja vina	**Kakvoća vina**		
	Stolna sa i bez oznake kontroliranog zemljopisnog podrijetla	**Kvalitetna**	**Vrhunska**
Bijelo	15	17	17
Ružičasto	16	18	19
Crno	17	19	20

- **Najmanji udio pepela**

Tablica 3 Najmanji udio pepela (g/L)**:**

Vino	**Stolno**	**Stolno s oznakom kontroliranog podrijetla**	**Kvalitetno s oznakom kontroliranog podrijetla**	**Vrhunsko s oznakom kontroliranog podrijetla**
Bijelo	1,2	1,2	1,4	1,6
Ružičasto	1,3	1,3	1,5	1,6
Crno	1,6	1,6	1,7	1,8

- **Ukupna kiselost**

Ukupna kiselost vina mora biti najmanje 4 g/L, a najviše 14 g/L, izražena kao vinska kiselina.

- **Hlapiva kiselost**

Hlapiva kiselost izražena kao octena kiselina, u proizvodima u prometu ne smije biti veća od:

- 0,8 g/L u moštu u fermentaciji i mladom vinu,

- 1,0 g/L u bijelom vinu i
- 1,2 g/L u crnom vinu, u vinu kasne berbe i vinu izborne berbe.

Hlapiva kiselost može biti veća kod vina s ukupnom alkoholnom jakošću većom od 13 vol%.

- **Sadržaj sumpornog dioksida**

Ukupni sadržaj sumpornog dioksida u vinu, osim kod pjenušavih, gaziranih i specijalnih vina u prometu ne smije biti veći od:

- 160 mg/L kod crnih vina (najviše slobodnog SO_2 do 30 mg/L);
- 210 mg/L kod bijelih vina (najviše slobodnog SO_2 do 40 mg/L).

Ukupni sadržaj sumpornog dioksida kod vina sa ostatkom neprevrelog šećera većim od 5 g/L, izraženo kao invertni šećer, može biti:

- 210 mg/L kod crnih vina (najviše slobodnog SO_2 do 40 mg/L);
- 260 mg/L kod bijelih vina (najviše slobodnog SO_2 50 mg/L) (Pravilnik o vinu, 2004.).

2.4. PROIZVODNJA VOĆNIH VINA

Za proizvodnju jabučnih vina koriste se jabuke koje su dostigle potpunu zrelost, iz razloga što će se sav škrob pretvoriti u glukozu koja će potom fermentirati te će se postići i bolji razvitak arome. U zrelom plodu jabuke udio šećera kreće se od 8 – 14%. Međutim, ukoliko se želi proizvesti jače jabučno vino koriste se jabuke sa udjelom šećera između 10 – 14% (Jemrić, 2014.).

Berba jabuka

Proizvodnja započinje berbom jabuka koje se otresaju sa stabla te se sakupljaju ručno ili pomoću stroja (**Slika 10** i **Slika 11**). Potom se iste pomoću stroja transportiraju do mjesta prerade. Preradu je poželjno započeti u što kraćem vremenu od primitka jabuka. Zbog ubrzanog starenja dolazi do brzo propadanja ploda, a kasnije i lošije kvalitete jabučnog vina. Jabuke ne bi smijele stajati na hrpi duže od 10 dana, jer bi za to posljedica bila teže prešanje i teže bistrenje mladog vina (Jemrić, 2014.).

Slika 10 Ručno branje jabuka (Web 10)

Slika 11 Strojno sakupljanje jabuka (Web 11)

Priprema plodova za preradu

Izdvajanje oštećenih i trulih plodova

Prije postupka usitnjavanja jabuke je potrebno oprati hladnom vodom, dok se oštećene i trule plodove izdvaja od zdravih (**Slika 12**).

Slika 12 Plodovi jabuke nepogodni za preradu (Web 12)

Pranje plodova

Pranje plodova provodi se u svrhu uklanjanja mikroorganizama koji bi mogli utjecati na kakvoću jabučnog soka. Osim plodova, potrebno je održavati i čistoću opreme kako ne bi došlo do kontaminacije plodova štetnim mikroorganizmima.

Prerada plodova

Drobljenje (usitnjavanje) plodova

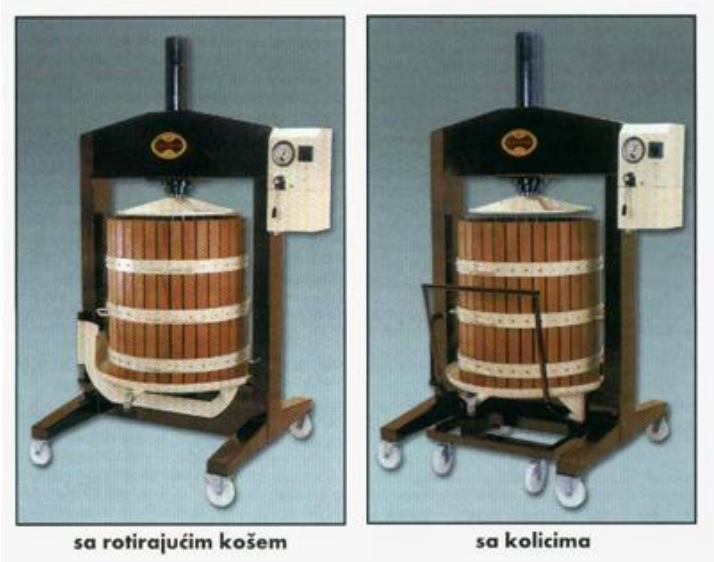
Plodovi se usitnjavaju cijeli, s korom i sjemenkama. Rezultat usitnjavanja je fina pulpa. Danas se za usitnjavanje koriste specijalni mlinovi za voće (**Slika 13**). S obzirom na narušavanje strukture ploda, započinju procesi oksidacije, prvenstveno enzimsko posmeđivanje, te se u svrhu sprječavanja istog tijekom usitnjavanja vrši sulfitiranje (**Slika 14**) (Jemrić, 2014.).

Slika 13 Mlin za usitnjavanje plodova (Web 13)

Slika 14 Sulfitiranje pulpe jabuke (Web 14)

Prešanje usitnjenih plodova – cijeđenje mošta

U proizvodnji voćnih vina postoje različite preše, od tradicionalnih do onih suvremenih hidrauličkih i električkih (**Slika 15** i **Slika 16**). Kako bi se postiglo bolje prešanje tj. veće iskorištenje, pulpa se stavlja u jutene vreće (**Slika 17**).



Slika 15 Hidraulična preša (Web 15)

Slika 16 Električna preša (Web 16)

Slika 17 Jutene vreće (Web 17)

Najbitniji dio prešanja je smanjiti kontakt pulpe sa kisikom. Reakcije posmeđivanja započinju mehaničkim oštećenjem tkiva, što podrazumijeva operacije guljenja, rezanja, mljevenja, drobljenja itd. (Piližota i sur., 2012.). Polifenoloksidaze najzastupljenije su u koštuničavom i jabučastom voću, pa je sukladno tome u tim sirovinama i njihovim prerađevinama pojavnost reakcija enzimskog posmeđivanja posebno izražena. Enzim polifenoloksidaza nalazi se uz staničnu stijenku ploda. Prisutnost kisika iz zraka potiče nastajanje nepoželjnih oksidativnih procesa što dovodi do smanjenja i/ili gubitka nutritivne vrijednosti voća i povrća. Osim spomenutog postupka sulfitiranja usitnjenih jabuka, može se provesti i dodatak askorbinske kiseline (vitamin C) kao zaštita od oksidacije (Jemrić, 2014.).

Mošt se potom prebacuje u posudu u kojoj će se odvijati alkoholna fermentacija. Najčešće se koriste tankovi izrađeni od nehrđajućeg čelika tzv. inoks. Dodatnu opremu čine odgovarajući poklopci (**Slika 18**) i vreljnjače (**Slika 19**).

Slika 18 Poklopac inoks tanka (Web 18)

Slika 19 Vreljnjača (Web 19)

U suvremenoj proizvodnji najčešće se koriste strojevi izrađeni upravo za ovu namjenu. Isti imaju prednost zbog kontinuirane proizvodnje, dostatnog kapaciteta te manjeg izlaganja proizvedene pulpe zraku.

Tretiranje mošta (soka) prije fermentacije

Ovisno o željenom konačnom proizvodu, mošt se prije fermentacije može tretirati na nekoliko načina. Može se vršiti korekcija kiselina, šećera te dodatak hranjiva kako bi se potaknuo proces fermentacije. Sve to, u konačnici, utječe na konačnu kvalitetu proizvoda. Dodatak određenih sastojaka zakonski je reguliran te se mora poštovati.

Alkoholna fermentacija

Glavnu ulogu u proizvodnji kako alkoholnih pića tako i jabučnih vina imaju sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. U fazi alkoholne fermentacije dolazi do razvitka okusa, mirisa i cijelokupnog doživljaja proizvoda. Fermentacija teče na temperaturi između 14 – 16°C. Fermentacija traje dok se ne potroši sav šećer. Nerijetko se dodaje šećer kako bi se osigurala dovoljna količina ugljičnog dioksida. Usput dolazi do stvaranja ugljičnog dioksida koji djeluje kao zaštitni sloj i smanjuje kontakt vina sa zrakom. Produkt alkoholne fermetacije je etanol. (Jemrić, 2014.).

Malolaktička fermentacija

Malolaktička fermentacija je proces pretvorbe jabučne kiseline u mliječnu kiselinu. Mliječna kiselina znatno je slabija od jabučne kiseline. Jabučna vina u kojima ima malolaktičke

fermentacije imaju manju kiselost, stabilnija su i imaju bolje organoleptičke značajke. Malolaktičku fermentaciju provode malolaktičke bakterije, a najznačajnija vrsta je *Lactobacillus brevis.* Ukoliko se koriste autohtone sorte starter kultura bakterija konačni proizvod biti će ujednačene i bolje kakvoće. Malolaktička fermentacija provodi se između 20 – 25°C (Pozderović, 2013.).

Dorada i stabilizacija fermentiranog proizvoda (jabučnog vina)

Otakanje vina s taloga, bistrenje i filtriranje

Mlado vino se nakon završetka alkoholne fermentacije pretače s taloga te kontakt sa zrakom mora biti minimalan. Provodi se ili izostavlja sulfitiranje vina, a ono ovisi o željama proizvođača.

Bistrenje se može provesti prirodnim putem, što je najjednostavnije, centrifugiranjem ili dodatkom sredstva za bistrenje poput bentonita ili želatine.

Filtracijom se postiže kristalna bistroća jabučnog vina, a najčešće se provodi netom prije punjenja jabučnog vina u boce pomoću pločastog filtera (**Slika 20**).

Slika 20 Pločasti filter (Web 20)

Korekcija okusa, dodavanje ugljičnog dioksida i konzerviranje

Prije punjenja u boce, jabučna vina prolaze proces korekcije okusa i kupažiranje.

Korekcija okusa uključuje dodavanje vode, šećera, jabučne ili druge organske kiseline, aditiva i obogaćivanje ugljičnim dioksidom.

Kupažiranje označava miješanje vina dobivenih od različitih sorata jabuka. Provodi se kako bi se proizvod svojom kakvoćom prilagodio potrošaču.

Ukoliko se jabučno vino buteljira, moguće je naknadno dodavanje šećera kako bi došlo do oslobađanja ugljičnog dioksida i postiglo tzv. „perlanje“ (Jemrić, 2014.).

Slika 21 Perlanje vina (Web 21)

Jabučno vino može se čuvati u taknovima izrađenim od nehrđajućeg čelika velikog kapaciteta (**Slika 22**).

Slika 22 Inoks tank za čuvanje vina (Web 22)

2.5. ODREĐIVANJE SASTOJAKA AROME PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

2.5.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografska analiza (grč. *chroma* – boja, *graphein* – pisati) upotrebljava se za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka u smjesama. Sastojci se raspodjeljuju između dviju faza, jedna faza je nepokretna (stacionarna), dok je druga pokretna (mobilna) i kreće se u određenom smjeru (Vrdoljak, 2009.).

Plinska kromatografija je najraširenija instrumentalna fizikalna metoda separacije. Kod plinske kromatografije mobilna faza nalazi se u plinovitom stanju, a stacionarna faza je kruti adsorbens ili tekućina nanesena na kruti nosač (Primorac, 2007.). Uzorak je otopljen u pokretnoj fazi, koja može biti tekućina, plin, fluid u superkritičnim uvijetima, i kreće se uzduž nepokretne faze, koja može biti u koloni ili na ravnoj plohi (Primorac, 2007.). Uzorak se injektira na početak kromatografske kolone gdje isparava. Mobilna faza je inertni plin pomoću kojeg se provodi eluiranje. Odvajanje sastojaka na GC koloni uvjetovano je razlikom u njihovoj hlapivosti. Razdvajanje smjese hlapivih sastojaka odvija se naizmjenično adsorpcijom i desorpcijom lakše hlapivih sastojaka, djelovanjem plina nositelja (Vrdoljak, 2009.). Plin nosioc nema interakcija s analiziranim komponentama već služi isključivo kao transportno sredstvo (Primorac, 2007.).

Razdvajanje smjese hlapivih sastojaka odvija se naizmjenično adsorpcijom i desorpcijom lakše hlapivih sastojaka, djelovanjem plina nositelja (Vrdoljak, 2009.). U kromatografsku kolonu prilikom eluiranja, uvodi se određena količina ispitivane smjese strujom inertnog plina (plin nositelj). Prolaskom kroz kolonu, smjesa se razdjeljuje između nepokretne faze i struje plina nositelja (pokretna faza). Plin nositelj ispire iz kolone pojedine frakcije, pa su sastojci na taj način pomiješani samo sa plinom nositeljem, stoga je olakšano kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenata (Vrdoljak, 2009.).

Plin nositelj

Plin nositelj mora biti kemijski inertan kako ne bi došlo do reakcije s uzorkom. Plin nositelj mora biti suh i pročišćen od nečistoća koje bi mogle dovesti do lošeg funkcioniranja uređaja ili raspadanja kolone, stoga se često je potrebno instalirati uređaje za pročišćavanje plina.

Također, plin mora biti dovoljne gustoće kako bi se smanjila difuzija u plinskoj fazi. Kao plinovi nositelji, najčešće se upotrebljavaju: helij (He_2), argon (Ar), dušik (N_2), ugljikov dioksid (CO_2) i vodik (H_2).

Izbor plina ovisi o: vrsti primijenjenog detektora, sigurnosnim mjerama, brzini i efikasnosti, mogućnosti nabave te o cijeni (Vrdoljak, 2009.).

Uređaj za unošenje uzoraka (injektor)

Da bi se u konačnici dobio dobar rezultat analize, uzorak se u sustav za analizu unosi brzo, u maloj količini, pomoću mikrolitarske štrcaljke, kroz gumenu ili silikonsku membranu u zagrijani dio uređaja koji je smješten na vrhu kolone. Kako bi isparavanje uzorka bilo potpuno, temperatura prostora gdje dolazi do rasprskavanja i isparavanja uzorka mora biti za 50°C viša od temperature vrelišta najslabije hlapive komponente u uzorku (Primorac, 2007.).

Kromatografske kolone

Kolona koja se koristi za analizu od značajne je važnosti za uspješno provođenje analize. Kromatografska kolona je srce sustava, a čini ju cijev i nepokretna faza unutar nje, dok pokretna faza prolazi kroz nju. Kolona se nalazi u termostatiranoj pećnici s mogućnošću zagrijavanja i kontrole temperature.

Osnovni zahtjev kod njenog odabira dobra selektivnost. Selektivnost kolone ovisi o izboru krutog nosača, punjenju kolone, te vrsti i količini selektivne tekućine.

Kako bi razdvajanje uzorka plinskom kromatografijom bili dobro, selektivna tekućina mora biti:

- selektivna i dobro otapalo za sve sastojke uzorka,
- nehlapiva,
- termički stabilna i pri povišenim temperaturama,
- kemijski inertna prema sastojcima uzorka koji se analizira.

Kolone mogu biti građene od metala (čelik, bakar, aluminij), plastičnih masa, stakla i kvarca. Oblik kolone ovisi o prostoru i termostatu, a uglavnom su spiralno savijene.

Kolone se mogu prema načinu izvedbe podijeliti na preparativne i analitičke. Preparativne kolone imaju promjer od 10 mm i više, a duljinu do nekoliko metara, dok analitičke kolone mogu biti punjene (promjer 2 – 5 mm), mikropunjene (promjer 1 mm) i kapilarne (promjer 0.1 – 0.5 mm) (Vrdoljak, 2009.).

Detektori

Detektor je uređaj koji mjeri promjenu u sastavu eluata mjerenjem fizikalnih i kemijskih svojstava (toplinska vodljivost, radioaktivna i plamena ionizacija, kemijske reakcije, infracrvena i UV spektrometrija, spektrometrija masa, nuklearno – magnetska rezonancija i dr.). Detektor mora pokazati brz odziv na male promjene koncentracije sastojaka za vrijeme njihove eluacije iz kromatografske kolone.

Detektori, s obzirom na selektivnost, u plinskoj kromatografiji mogu biti:

- univerzalni – daju odziv za svaki sastojak u eluatu osim za čistu mobilnu fazu
- selektivni – daju odziv samo na određene grupe komponenata u eluatu (Primorac, 2007.).

Prednost se daje detektorima koji su osjetljivi prema što većem broju odjeljivanih sastojaka, brzo reagiraju i imaju široko područje linearnog odgovora, te se mogu upotrebljavati u širokom temperaturnom rasponu.

2.5.2. SPEKTROFOTOMETRIJA MASA

Spektometri su instrumenti koji daju podatke o molekularnoj strukturi. Razlikuju se: infracrveni spektar (IC), spektar nuklearno – magnetske rezonancije (NMR), ultraljubičasti spektar (UV), spektar elektron – spinske rezonancije (ESR) i spektar masa.

Spektrometar masa je uređaj u kojem se molekule bombardiraju snopom elektrona bogatih energijom. Dolazi do ionizacije i cijepanja molekula u mnogo fragmenata, od kojih su neki pozitivno nabijeni ioni. Svaka vrsta iona ima određenu masu i naboj, odnosno određeni odnos m/e što je karakteristična veličina za tu vrstu iona. Niz iona se analizira na način da se dobije signal za svaku vrijednost m/e koja je prisutna. Intenzitet svakog signala prikazuje relativnu količinu iona koja daje taj signal. Osnovni signal je najviši signal ili maksimum (engl. peak). Intenzitet osnovnog signala označava se sa 100, te se obzirom na njegov intenzitet

izražava intenzitet ostalih signala. Spektar masa je dijagram koji pokazuje relativne intenzitete signala za različite vrijednosti m/e. Za dokazivanje identičnosti dvaju spojeva i kao pomoć pri određivanju strukture novog spoja može poslužiti spektar masa. Dva spoja su identična ako su im jednake fizikalne konstante (talište, vrelište, gustoća).

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

2.5.3. SPME analiza

Dugotrajna priprema uzoraka i upotreba organskih otapala, analitičke tehnike poput ekstrakcije tekuće – tekuće ili ekstrakcije na čvrstoj fazi nisu bile zadovoljavajuće učinkovite, te su Zhang i Pawliszyn 1993. godine razvili novu tehniku pripreme uzoraka poznatu kao mikroekstrakcija na čvrstoj fazi ili tzv. SPME (engl. solid phase microextraction) tehnika. Ova tehnika se sve više primjenjuje za pripremu čvrstih i tekućih uzoraka poput vina, piva, voća, ulja i meda.

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

SPME analiza je tehnika koja se koristi za analizu širokog spektra hrane, prvenstveno iz razloga što zahtijeva manju manipulaciju ali i zato što je ekonomski prihvatljiva.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari boje i arome vina od jabuke te u vinima odrediti sadržaj tvari arome pomoću tehnike GC/MS, primjenom SPME analize. Potrebno je odrediti i kemijski sastav jabučnih vina: udio alkohola, prirodni i ukupni šećer, ukupni ekstrakt, slobodni i ukupni SO_2, hlapljive kiseline, ukupne kiseline, polifenole, flavonoide, antioksidacijsku aktivnost i pepeo nastao spaljivanjem uzorka vina.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Vino od jabuke

Analizirana su tri vina od jabuke dobivena različitim tehnološkim postupkom proizvodnje.

3.2.2. Proces proizvodnje vina od jabuka

Dva od tri analizirana vina proizvedena su fermentacijom maceriranih jabuka: mirno vino od jabuke (MVJ) i pjenušavo vino od jabuke (PVJ), a jedno je kupljeno na tržištu i proizvedeno je iz koncentrata soka jabuke (KVJ).

Mirno jabučno vino (MVJ) i pjenušavo jabučno vino (PVJ) proizvedeno je iz sorti jabuka Idared, Granny Smith i Fuji. Kako bi plodovi omekšali i postigli veću koncentraciju aromatskih tvari, jabuke su prije prerade bile u tamnoj komori tjedan dana na dodatnom dozrijevanju („znojenju“). Muljanje plodova obavilo se u centrifugalnoj muljači. Izmuljane jabuke su tretirane s K-metabisulfitom (10 g K-metabisulfita na 100 L mošta) kako bi se spriječili negativni oksidacijski procesi. Paralelno s muljenjem jabukama je dodan antioksidans AROMAX u koncentraciji 20 g/100 kg voća, a potom je provedeno prešanje. Dobivenom moštu (samotok, I. i II. samotok) dodan je enzimski preparat NOVOCLAIR SPEED za depektinizaciju u koncentraciji 1 g/hL mošta. Temperatura na ulazu bila je u rasponu od 18 do 20°C, a depektinizacija se provodila u trajanju od 24 sata. Potom se mošt hladio 2 sata na temperaturu 13°C, te su mu dodana sredstva za brže bistrenje BAYKISOL 30 u koncentraciji 50 g/hL i GELSOL u koncentraciji 5 g/hL. Proces bistrenja mošta proveden je tijekom 24 sata

na temperaturi 15°C. Bistrom moštu dobivenom dekantiranjem dodan je selekcionirani vinski kvasac Lalvin, EC 1118 te hrana za kvasce FERMAID E (40 g/hL). Nakon 48 sati započela je fermentacija, dodan je MICROCEL (40 g/hL); sredstvo za bistrenje, stabilitaciju i fizikalnu aktivaciju fermentacije. Glavno vrenje MVJ trajalo je 12 dana pri temperaturi 18°C. Nakon vrenja cider se pretočio s taloga, dodao se SO_2 (5 g K-metabisulfita na 100 L cidera) i slijedilo je bistrenje i odležavanje cidera. Nakon 2 mjeseca punio se u boce uz korekciju sumpora (koncentracija slobodnog SO_2 25 mg/L).

Pri proizvodnji pjenušavog jabučnog vina (PVJ) glavno vrenje trajalo je 8 dana pri temperaturi 15°C te je nakon toga provedeno punjenje u boce s ostatkom šećera od 15°Oe, pred sam kraj vrenja. Doviranje se nastavilo u boci s ciljem stvaranja prirodnog CO_2.

Jabučno vino proizvedeno iz koncentrata soka jabuke (KVJ) kupljeno je na tržištu.

3.2.3. Kemijska analiza vina

Određivanje slobodnog SO_2

Volumen uzorka od 50 mL stavi se u Erlenmeyer-ovu tikvicu s brušenim grlom, potom se redom dodaju 10 mL H_2SO_4 (1:4) i 3mL otopine škroba (w = 0,01) kao indikator. Titracija se vrši otopinom joda ($c(I_2)$ = 0,02) do pojave plave boje.

Određivanje ukupnog SO_2

U Erlenmeyer-ovu tikvicu stavi se 50 mL cidera, a zatim se doda 25 mL otopine NaOH (c = 1 mol/L) i ostavi stajati 15 minuta. Potom se doda 15 mL otopine H_2SO_4 (1:4) i 3 mL škroba (w = 0,01). Vino se prethodno tretira s NaOH čime je stvorena alkalna sredina u kojoj se oslobađa SO_2 (vezan na šećere, aldehide i polifenolne tvari).

U oba slučaja titracija se provodi jodom do pojave konstantne plave boje.

Račun je za oba slučaja jednak, tj. utrošak otopine joda u mL množi se faktorom 12,8 i dobije količina ukupnog SO_2 u mg/L cidera tj.

$$SO_2\left(\frac{mg}{L}\right) = V\ (0{,}02\ N\ I_2)(mL) * 12{,}8$$

Određivanje prirodnih šećera

U odmjernu tikvicu volumena 200 mL odvaže se 25 g uzorka te se redom dodaje 5 mL reagensa I (vodena otopina kalijferocijanida) i 5 ml reagensa II (vodena otopina cinkovog acetata) , pomiješa i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Cijeli sadržaj se profiltrira preko suhog, naboranog papira u suhu tikvicu. Dobiveni filtrat zove se F1.

U tikvicu od 300 mL redom se odmjeri 25 mL Luffove otopine i doda otopina šećera. Osim toga, potrebno je napraviti i slijepu probu. Slijepa proba radi se od 25 mL Luffove otopine i 25 mL destilirane vode. Prije zagrijavanja u tikvice se dodaju staklene kuglice, a potom se zagrijava sadržaj do vrenja 2 minute, a potom na srednjoj vatri narednih 10 minuta. Zagrijavanje se vrši uz povratno hladilo i preko azbestne mrežice. Po isteku 10 minuta naglo se hladi sadržaj tikvice pod mlazom hladne vode, a potom se dodaje 3 mL otopine KI. Brzo se promješa te se pažljivo doda 20 mL 25% H_2SO_4 i 10 mL otopine KCNS. Tikvica se mućka do prestanka šuma. Titracija se vrši otopinom Na-tiosulfata uz prethodni dodatak škroba kao indikatora. Gubitkom plave boje završava titracija.

Račun:

$$\%\, reducirajućih\ šećera = \frac{a * 100}{mg\ uzorka}$$

a – mg šećera izračunati iz tablice po Schoorl-Luff-u.

Određivanje ukupnih šećera

U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 50 mL filtrata F1 i doda se 5 mL HCl-a te se sve promiješa. Zagrijavanje se vrši u vodenoj kupelji na 70°C u trajanju od 10 minuta, brzo se hladi uz stalno miješanje. Doda s metiloranž kao indikator te se neutralizira sa 20%-tnom NaOH. Hlađenje se vrši do postizanja sobne temeprature i dopuni do oznake destiliranom vodom. Dobiveni filtrat zove se F2.

Postupak dalje slijedi isto kao kod određivanja reducirajućih šećera.

$$\%\, reducirajućih\ šećera = \frac{a * 100}{mg\ uzorka}$$

a – mg šećera izračunati iz tablice po Schoorl-Luff-u.

Određivanje ukupnih kiselina

Određivanje ukupnih kiselina temelji se na neutralizaciji svih kiselina s NaOH.

U čašu od 100 mL stavi se 25 mL cidera te se zagrijava do vrenja kako bi se uklonio CO_2, a potom se ohladi. Zatim se dodaje fenolftalein kao indikator. Titracija se provodi sa 0,25 N NaOH. Promjena boje ukazuje na završetak neutralizacije. Količina ukupnih kiselina se dobije umnoškom utroška 0,25 N NaOH i faktora 0,75 ili se očita u tablici. Dobivena vrijednost količine ukupnih kiselina u g/L u vinskoj kiselini.

Račun:

$$vinska\ kiselina\ \left(\frac{g}{L}\right) = V\ (0{,}25\ N\ NaOH)(mL) * 0{,}75$$

Određivanje hlapivih kiselina

Uzorak vina destilira se na u posebnoj aparaturi. Nakon destilacije dodaje se indikator fenolftalein i provodi se titracija sa NaOH. Titracija se provodi do pojave konstantne ružičaste boje. Utrošak NaOH pri titraciji ukazuje na količinu octene kiseline.

Račun:

$$\frac{g}{L} NaOH = \frac{g}{L} CH_3COOH$$

Određivanje ukupnog ekstrakta i alkohola

Suhi ostatak ili ekstrakt je cjelokupna količina onih tvari koje zagrijavanjem na 100 °C (destilacija) ne prijeđu u destilat.

Uzorak vina (50 mL) se destilira. Mjeri se pomoću piknometra. Prvo se izračunava relativna gustoća ekstrakta.

Račun:

$$\gamma(ekstrakta) = \frac{Q_1 - Q}{Q_2 - Q} * K$$

gdje je:

γ – relativna gustoća ekstrakta

Q – masa praznog piknometra

Q_1 – masa piknometra sa ekstraktom

Q_2 – masa piknometra sa destiliranom vodom

K – faktor korekcije (K=0,99823).

Iz izračunate gustoće ekstrakta iz tablice za preračunavanje očita se količina ekstrakta izražena u g/L.

Ekstrakt bez šećera izračunat je matematički:

$$ekstrakt\ bez\ šećera\ \left(\frac{g}{L}\right) = ekstrakt\ \left(\frac{g}{L}\right) - količina\ šećera\ (\frac{g}{L})$$

Količina alkohola mjeri se preko destilata koji je dobiven destilacijom. Formula je jednaka, a udio alkohola (vol%) očitava se iz Tablice za preračunavanje grama alkohola u litri na volumne postotke.

Račun:

$$\gamma(ekstrakta) = \frac{Q_1 - Q}{Q_2 - Q} * K$$

Određivanje pepela

Ostatak zaostao nakon potpunog spaljivanja uzorka vina predstavlja pepeo u vinu. U porculanskoj zdjelici na vodenoj kupelji (120°C) uzorak vina se isparava (25 mL), zatim se suši u sušioniku na 120°C jedan sat, te potom spaljuje u mufolnoj peći na temperaturi od 200 do 500°C do potpunog spaljivanja.

Račun:

$$m\left(pepela; \frac{g}{25\ mL\ vina}\right) = m_2 - m_1$$

$$m\ \left(pepela; \frac{g}{L}\right) = m\ \left(pepela; \frac{g}{25\ mL\ vina}\right) * 40$$

gdje je:

m_1 – masa prazne porculanske zdjelice

m_2 – masa porculanske zdjelice s pepelom.

Određivanje sadržaja polifenolnih spojeva

Koncentracija ukupnih fenola se određuje Folin-Ciocalteu metodom. Folin-Ciocalteu metoda temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja (apsorbance) pri valnoj duljini od 765 nm (Ough, & Amerine, 1988). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline a pri oksidaciji fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Folin-Ciocalteu reagens (1:10) pripremljen je tako da je otpipetirano 3,3 ml Folin-Ciocalteu reagensa u odmjernu tikvicu od 100 ml i do oznake dopunjeno s destiliranom vodom. Otpipetirano je 0,2 ml uzorka soka određenog razrijeđenja, te dodano 1,8 ml destilirane vode, 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa te nakon stajanja 30 sekundi do 8 minuta dodano 8 ml 7,5% Na_2CO_3 (ukupni volumen mora biti 20 ml). Za slijepu probu otpipetira se 2 ml destilirane vode u epruvetu, te doda 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 8 ml 7,5% Na_2CO_3. Nakon stajanja u mračnom prostoru 2 – 20 sati, pri čemu dolazi do razvijanja boje, mjeri se apsorbanca na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm. Sadržaj polifenolnih spojeva je interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/L uzorka.

Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida učinjeno je prema metodi Kim, Jeong i Lee (2003.) s modifikacijom (Blasa i sur., 2005.). Za kalibraciju su uzete različite koncentracije kvercetina (5-114 µg/mL), a linearnost je 0,9953 (R2). Postupak određivanja vršio se tako što je 1 ml otopine vina (1 mg/mL) pomiješan s 0,3 ml NaNO2 (5%), a nakon 5 min je dodano 0,3 ml AlCl3 (10%). Uzorci su pomiješani te su nakon 6 minuta neutralizirani s 2 ml otopine NaOH (1M). Absorbanca je izmjerena za sve uzorke pri 510 nm, a kvantifikacija izvedena koristeći kalibracijsku krivulju. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata kvercetina (QE) / 100 g vina, kao srednja vrijednost triju ponavljanja.

Određivanje antioksidativne aktivnosti

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

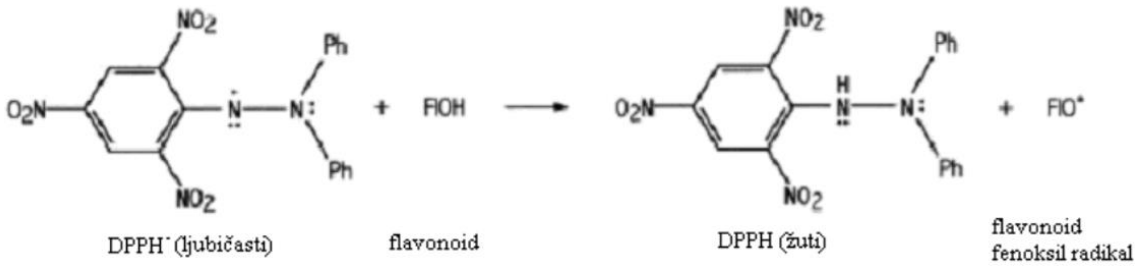
Nekoliko metoda je razvijeno za određivanje antioksidativne aktivnosti na osnovi uklanjanja sintetskih radikala u polarnom organskom otapalu (npr. metanolu) pri sobnoj temperaturi. One koje su najčešće, koriste 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i 2, 2'-azinobis (3-etilbenztiazolin-sulfonska kiselina)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

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

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

$DPPH^{\cdot} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\cdot}$

$DPPH^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow DPPH\text{-}R$



Slika 23 Prikaz reakcije DPPH radikala s flavonoidima

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

Antioksidativna aktivnost je izračunata prema slijedećem izrazu:

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

gdje je:

A_0 – absorbancija slijepe probe

A_1 – absorbancija uzorka.

3.2.4. Analiza arome vina plinskom kromatografijom primjenom SPME analize

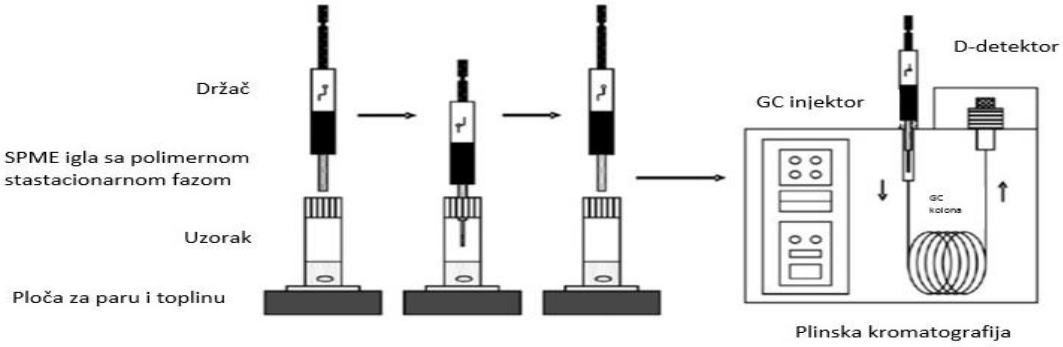
Priprema uzoraka za analizu:

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

Postupak pripreme uzorka:

U bočicu od 10 mL odvaže se 5 g uzorka vina. Kako bi adsorpcija aromatičnih sastojaka bila bolja dodaje se 1 g NaCl. U bočicu se ubaci magnet, te se hermetički zatvori teflonskim čepom. Bočica se postavi u vodenu kupelj, te se uz stalno miješanje uzorka magnetskom miješalicom, aromatični sastojci adsorbiraju na polimernu stacionarnu fazu unutar igle. Prije samog ispuštanja igle u nadprostor uzorka, uzorak se 5 minuta miješa na vodenoj kupelji (40°C) radi zasićenja nadprostora sa svrhom što bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka. Adsorpcija se provodi na temperaturi od 40°C (vodena kupelj) u trajanju od 45 minuta. Po završetku adsorpcije igla s adsorbiranim sastojcima odmah se stavlja u injektor plinskog kromatografa te slijedi njihova toplinska desorpcija (**Slika 24**).

Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka vina od jabuke provedeno je primjenom instrumentalne plinske kromatografije. U radu je korišten plinski kromatograf tvrtke Agilent 5890 B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5971A.



Slika 24 Korištenje SPME držača za uzorkovanje i analizu

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

Parametri ekstrakcije:

- Temperatura ekstrakcije: 40°C
- Vrijeme ekstrakcije: 45 minuta
- Tip mikroekstrakcijske igle: 65 μm PDMS/DVB (Supelco).

GC-MS analitički uvjeti:

Kolona: HP5; 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm (Agilent)

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

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

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

U izradi kromatografske analize korišten je splitless mod.

4. REZULTATI

Tablični prikazi rezultata

Tablica 4 Kemijski sastav vina

	Vino od jabuke		
	MVJ	**PVJ**	**KVJ**
Slobodni SO_2 (mg/dm^3)	10,24	7,68	5,12
Ukupni SO_2 (mg/dm^3)	108,8	122,88	46,72
Alkohol (vol%)	8,10	7,42	4,5
Ukupni ekstrakt (g/L)	24,0	15,9	109,3
Hlapljive kiseline (g/L)	0,82	0,91	0,51
Ukupne kiseline (g/L)	6,3	4,27	3,83
Prirodni šećeri (g/L)	3,13	1,40	36,89
Ukupni šećeri (g/L)	3,24	0,85	35,66
Pepeo (g/L)	1,89	1,61	0,68

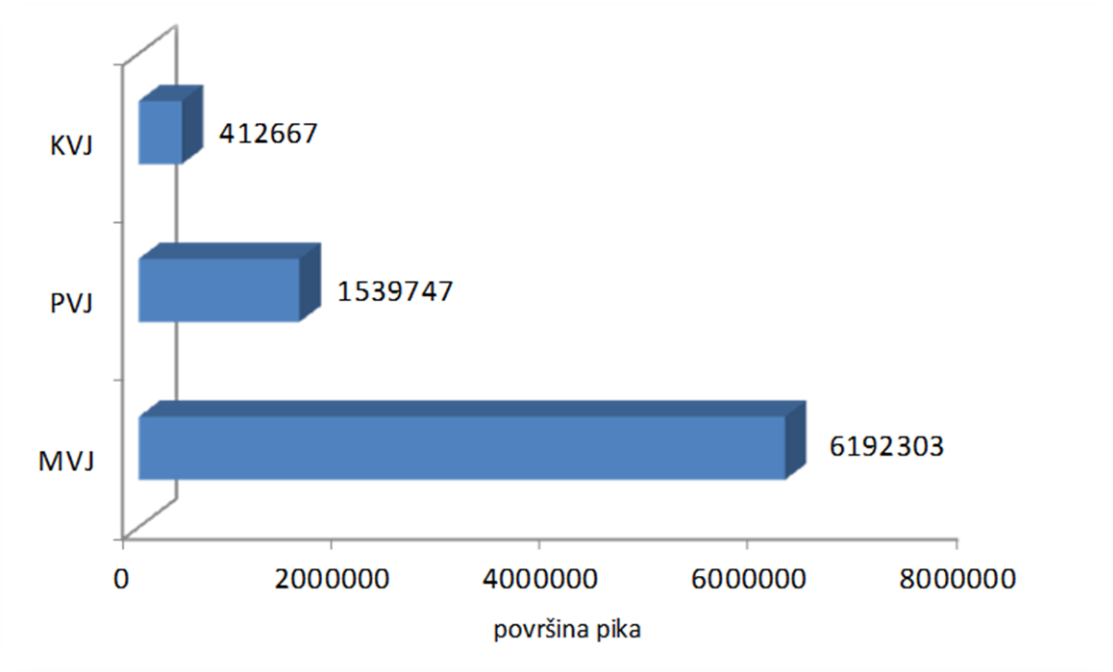
Tablica 5 Tvari boje u vinima od jabuke

	Vino od jabuke		
	MVJ	**PVJ**	**KVJ**
Polifenoli (mg/L)	516	194	146
Flavonoidi (mg/L)	143	117	50
Antioksidacijska aktivnost (mg/100g)	6,85	4,29	1,87

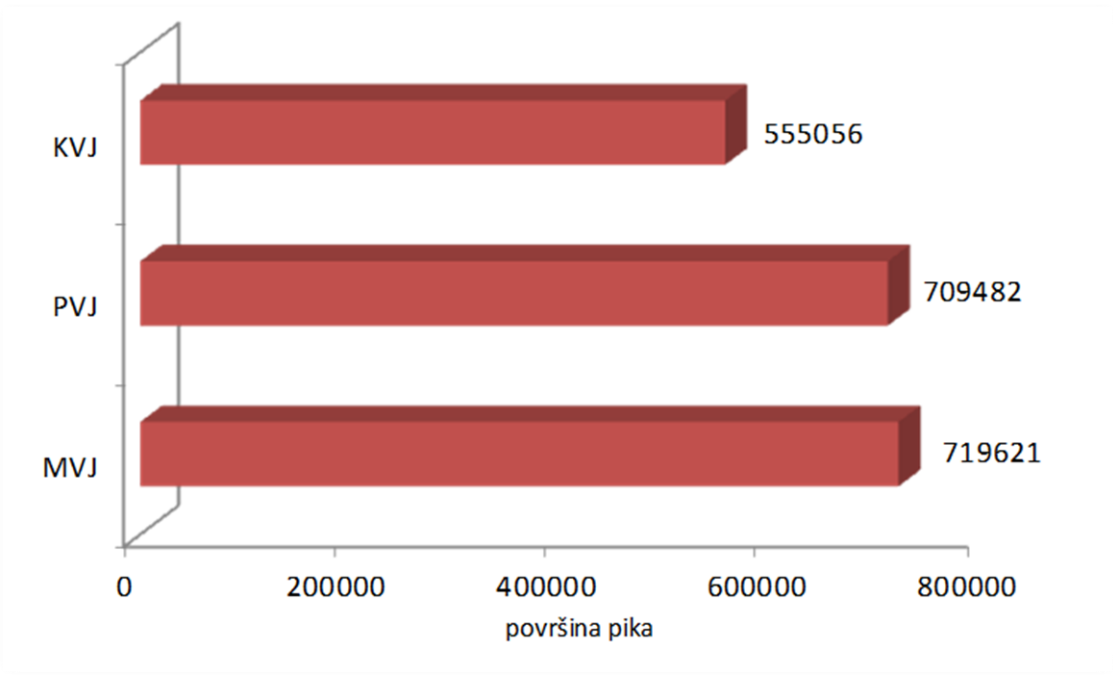
Tablica 6 Aromatični sastojci identificirani u vinima od jabuke

Sastojak	RT*
Esteri	
Etil acetat	1,3756
n-butilacetat	2,3749
2-metil butirat	2,7735
3-metilbutil acetat	3,1259
Etil kaproat	5,6502
n-heksil acetat	6,0314
Metil-oktanoat	9,7226
Etil benzoat	11,4844
Etil kaprilat	12,5819
Etil fenilacetat	14,4881
Etil dekanoat	20,8075
Izoamil kaproat	22,8466
Etil laurat	28,6982
Butil ftalat	41,4583
Izoamil acetat	3,0797
Kiseline	
3-metil-izovalerijanska kiselina	1,2890
Heksanska kiselina	5,0899
Kaprilna kiselina	12,1718
Dekanska kiselina	20,0624
Alkoholi	
1-butanol	1,4969
1-heksanol	2,9988
Etenil benzen stirol	3,4205
1-oktanol	7,8048
Fenetil alkohol	9,3124
2-metil-1-propanol	1,3525
1-pentanol	1,6876
Aldehidi i ketoni	
furfural	2,6406
Nonanal	8,9774
Dekanal	12,8765
5-fenil-2-pentanon	14,9734
heksanal	2,2599
4-oktanon	3,3401
Terpenoidi	
Eugenol	19,1439
Beta damascenon	20,2530
vitispiran	15,8514

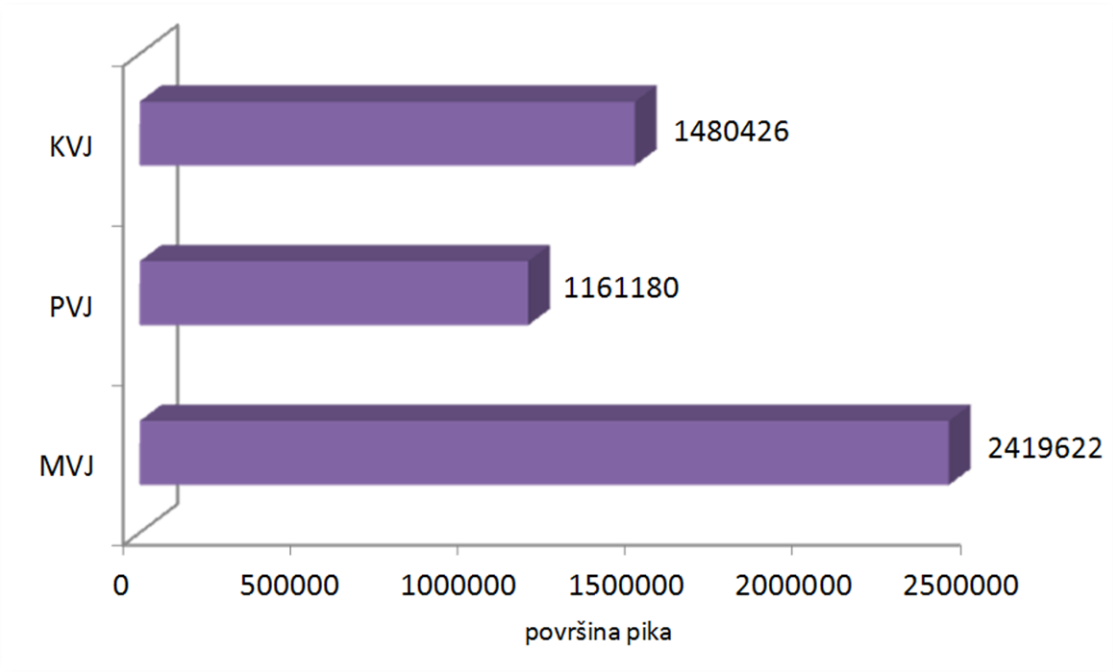
RT* (retencijsko vrijeme) – vrijeme zadržavanja aromatičnih sastojak (min)



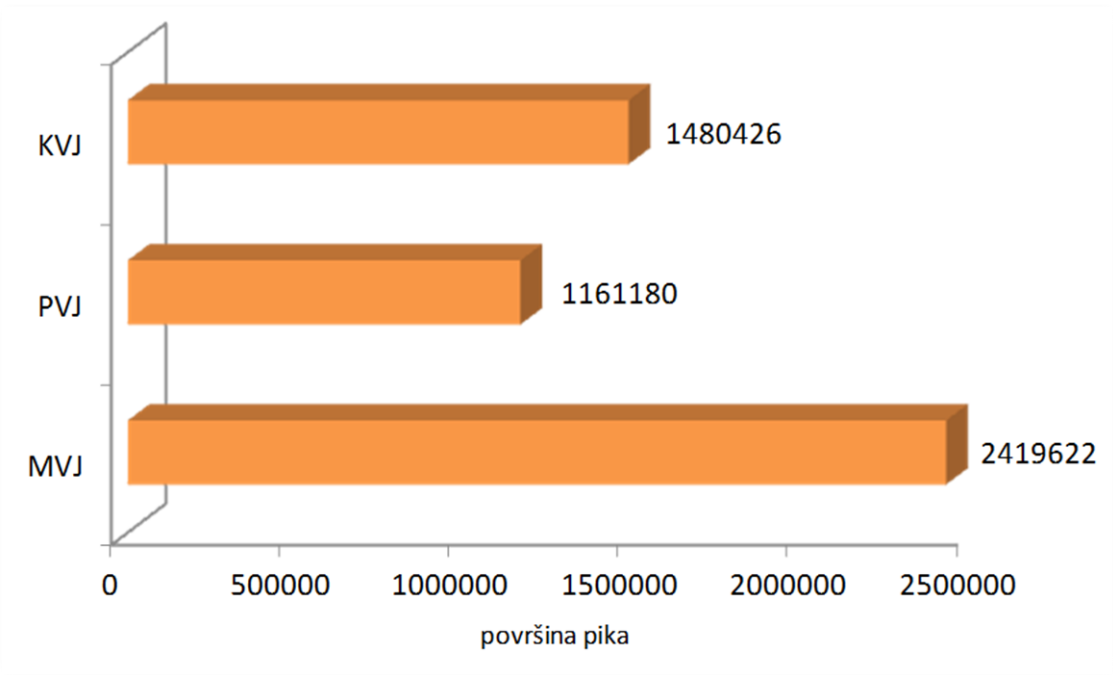
Slika 25 Zadržavanje kiselina u mirnom i pjenušavom vinu od jabuke te u vinu dobivenom iz koncentrata soka jabuke



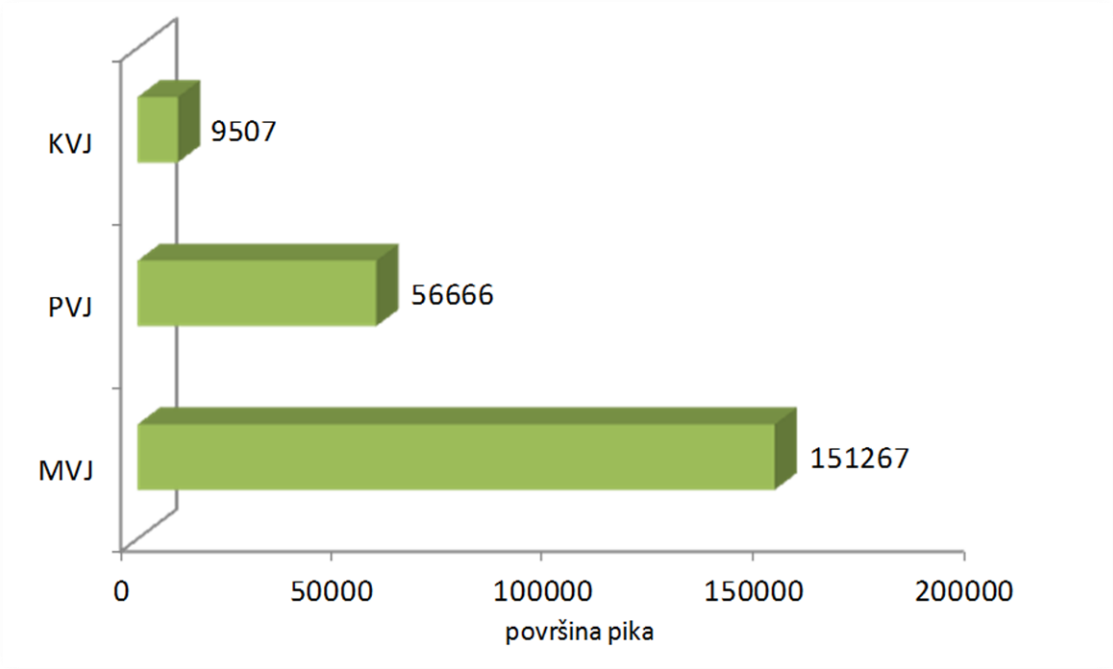
Slika 26 Zadržavanje alkohola u mirnom i pjenušavom vinu od jabuke te u vinu dobivenom iz koncentrata soka jabuke



Slika 27 Zadržavanje estera u mirnom i pjenušavom vinu od jabuke te u vinu dobivenom iz koncentrata soka jabuke



Slika 28 Zadržavanje aldehida i ketona u mirnom i pjenušavom vinu od jabuke te u vinu dobivenom iz koncentrata soka jabuke



Slika 29 Zadržavanje terpenoida u mirnom i pjenušavom vinu od jabuke te u vinu dobivenom iz koncentrata soka jabuke

5. RASPRAVA

Rezultati istraživanja utjecaja procesnih parametara na sadržaj tvari boje i arome u vinima od jabuke prikazani su u **Tablici 4, 5, 6** te na **Slikama 25, 26, 27, 28 i 29**.

Jabučna vina razlikuju se prema kiselosti, količini korisnih fenolnih tvari i šećera, te se prema tim kemijskim svojstvima i klasificiraju. Poznavanje kemijskog sastava sorte jabuke koja ulazi u proces proizvodnje cidera, hlapljivih komponenti i učinka miješanja različitih sorti od velikog je značaja za kakvoću jabučnoga vina. Spojevi koji značajno utječu na kakvoću jabučnog vina su šećeri, organske kiseline, polifenoli i mnogi drugi. U **Tablici 4** prikazani su rezultati ispitivanja kemijskog sastava vina od jabuke.

Organske kiseline uključuju vinsku, jabučnu, limunsku, jantarnu, piruvičnu, mliječnu i octenu kiselinu. Ovi su spojevi pokazatelji kakvoće tijekom proizvodnje jabučnoga vina. Premda su ovi spojevi kiselog okusa, oni također sudjeluju i u tvorbi gorčine. Kiselost je važan element za postizanje čistog i osvježavajućeg okusa jabučnog vina. Iz **Tablice 4** vidljivo je da najviše kiselina ima u mirnom vinu od jabuke (MVJ), a najmanje u vinu dobivenom iz koncentrata soka jabuke (KVJ). Osim toga, hlapivih kiselina najviše ima pjenušavo vino od jabuke (PVJ), a najmanje vino dobiveno iz koncentrata (KVJ).

Šećeri su jedan od pokazatelja zrelosti jabuke, ali i kakvoće jabučnog vina. Poznavanjem udjela različitih šećera u jabučnom soku može se utvrditi patvorenje jabučnog soka ili jabučnog vina (dodavanjem šećera dobivenog od šećerne repe ili trske u sok jabuke). Pravi sok od jabuke trebao bi imati omjer fruktoze i glukoze najmanje 1,6, a maksimalni udio saharoze trebao bi biti 3,5%. Iz **Tablice 4** vidi se da najviše šećera ima KVJ, a najmanje PVJ. Razlog leži u činjenici da je vino KVJ dobiveno iz koncentriranog soka jabuke te sadrži visok udio šećera. Vino PJV ima najmanji udio šećera, jer je dobiveno naknadnom fermentacijom u boci pri čemu je u anaerobnim uvjetima nastao prirodno stvoreni CO_2 te je zaostalo najmanje šećera. Osim toga, vidljivo je da iako je dodana saharoza ukupnog šećera nema, jer je saharoza uz pomoć saharaze hidrolizirala na glukozu i fruktozu (**Tablica 4**).

Što se tiče ukupnog ekstrakta, rezultati pokazuju da je najveća količina nađena u KVJ, što je očekivano s obzirom na proces proizvodnje jabučnog vina. Također je najveća količina slobodnog SO_2 očekivano prisutna u MVJ, jer je bila najveća mogućnost oksidacije s obzirom na uvjete fermentacije, odležavanja i čuvanja vina.

U **Tablici 5** prikazan je sadržaj polifenola, flavonoida te antioksidacijska aktivnost ispitivanih vina od jabuke.

Fenolne tvari imaju zaštitnu ulogu u organizmu jer uklanjaju slobodne radikale i tako umanjuju njihovo štetno djelovanje. Udio fenola u jabučnom vinu ovisi o svojstvima plodova jabuka koje se rabe za njegovu proizvodnju i o načinu proizvodnje vina. Glavni fenolni spojevi većine jabučnih vina su fenolne kiseline, dihidrokalkoni i flavanoli. Fenoli su važni za izgled i okus vina, a time i njegovu kakvoću. O njihovom sadržaju ovisi gorčina i trpkost jabučnoga vina. Na udio fenolnih spojeva u plodu utječu sorta, područje uzgoja i klimatski čimbenici tijekom vegetacije.

Najveća koncentracija polifenola zamijećena je kod uzorka vina MVJ, a najmanja kod vina KVJ. Utjecaj procesnih parametara ogleda se u količini prisutnih polifenola u jabučnim vinima. Vino MVJ ima najveći sadržaj polifenolnih tvari, jer se fermentacija odvijala pri višoj temperaturi i duže vrijeme u odnosu na vino PVJ. Vino KVJ ima najniži sadržaj polifenola što je rezultat procesa proizvodnje.

Iz rezultata u **Tablici 5** vidljivo je da najveći sadržaj flavonoida također posjeduje vino MVJ u odnosu na dva preostala vina. Veće vrijednosti flavonoida u vinu MVJ vjerojatno su posljedica različitih interakcija između sastavnih komponenata koje ovise o sorti, načinu manipulacije sirovine te procesu proizvodnje vina. Jedan od značajnih procesa zasigurno je maceracija, odnosno ekstrakcija tvari boje prilikom fermentacije.

Iz **Tablice 5** također je vidljivo da antioksidacijska aktivnost uzoraka slijedi trend porasta koncentracije flavonoida i polifenola. Uzorak vina MVJ imao je najveću antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostala ispitivana vina.

Aromu jabučnog vina čini niz spojeva različitih vrsta i koncentracija koji nastaju u plodovima jabuka tijekom zrenja, a još više tijekom fermentacije i starenja. To su različiti esteri, viši alkoholi, masne kiseline, aldehidi, ketoni, terpeni i drugi spojevi. Kombinacija različitih aromatskih tvari važna je za oblikovanje okusa jabučnoga vina po njemu se ona razlikuju. Većina se aromatskih tvari iz plodova jabuke izgubi tijekom prerade, tako da se glavnina arome oblikuje tijekom fermentacije i prerade. Viša temperatura fermentacije će proizvesti više estere tijekom proizvodnje jabučnog vina. Aroma ima značajnu ulogu u kakvoći jabučnog vina, a hlapive komponente su odgovorne za miris vina. Iz tog razloga jako je važno razumjeti

doprinos svake komponente arome na kakvoću vina od jabuke. Dobro poznavanje ključnih aromatičnih sastojaka može poboljšati tehnologiju prerade i konačnu kakvoću jabučnoga vina.

Kao što se može vidjeti u **Tablici 6** u jabučnim vinima identificirano je trideset i pet aromatičnih sastojaka. Radi boljeg prikaza pojedinih identificiranih aromatičnih sastojaka, sastojci su podijeljeni u pet skupina. To su esteri, kiseline, alkoholi, aldehidi i ketoni, kao i terpenoidi.

Kiseline potječu iz sirovine tj. jabuka te nastaju alkoholnom fermentacijom. Na **Slici 25** prikazan je udio kiselina u vinima MVJ, PVJ i KVJ. U ispitivanim uzorcima vina identificirane su četiri kiseline. Izovalerijanska kiselina nastaje kao produkt alkoholne i malolaktičke fermentacije te ima velik utjecaj na ukupnu kvalitetu vina. Dekanska kiselina nema tako velik utjecaj na ukupnu kvalitetu vina, ali ima važnu ulogu u složenosti sastava arome. MVJ imalo je najveći sadržaj kiselina, dok je KVJ imalo najmanji (značajno manji sadržaj kiselina u odnosu na ostala ispitivana vina).

Alkoholi su aromatični spojevi koji nastaju kao sekundarni produkti metabolizma kvasca. U ispitivanim vinima identificirano je 7 alkohola. Iz **Slike 26** vidljivo je da je KVJ imalo najmanji sadržaj alkohola, dok je MVJ imalo najveći sadržaj alkohola.

Esteri su produkti reakcije acetil-CoA sa višim alkoholima koji nastaju degradacijom aminokiselina ili ugljikohidrata. Na **Slici 27** prikazan je udio estera u vinima MVJ, PVJ i KVJ. MVJ imalo je najveći sadržaj estera (2419622), a PVJ najmanji (1161180). Može se primijetiti kako su etil-esteri masnih kiselina više prisutni od estera viših alkohola. To su etil acetat, izoamil acetat, heksil acetat. Veća prisutnost gore navedenih estera ukazuje na voćni miris analiziranog vina (Gomez-Miguez i sur., 2007.). Etil acetat i izoamil acetat najviše utječu na ukupnu mirisnu notu ispitivanih vina te daju voćni miris i miris banane.

Sadržaj aldehida i ketona u vinima MVJ, PVJ i KVJ prikazan je na **Slici 28**. MVJ imalo je najveći sadržaj aldehida i ketona, dok je vino PVJ imalo najmanji. U vinima su nađeni nonanal, furfural, dekanal i heksanal i dr.

Terpeni su kemijski spojevi karakteristični za aromatske sorte i glavni su nositelji primarnih ili sortnih aroma. Koncentracija tih sastojaka u vinu pored toga ovisna je još i o tehnološkom

postupku prerade i njege vina, te većeg broja drugih čimbenika kao što su maceracija, ekstrakcija, hidroliza, oksidacija, uporaba bentonita i pektolitičkih enzima.

Sadržaj terpenoida u vinima MVJ, PVJ i KVJ prikazan je na **Slici 29**. MVJ imalo je najveći sadržaj terpenoida, dok je vino KVJ imalo najmanji. U vinima su nađeni eugenol, beta damascenon i vitispiran. Eugenol daje mirisnu notu klinčića, beta damascenon daje određenu mirisnu notu ruže, a vitispiran sudjeluje u stvaranju mirisne note vanilije.

6. ZAKLJUČCI

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

- Procesni parametri (temperatura i vrijeme), kao i tijek alkoholne fermentacije utječu na kemijski sastav ispitivanih vina od jabuke.

- Mirno vino od jabuke imalo je najveći udio većine ispitivanih komponenti kemijskog sastava, jer je proizvedeno pri najvišoj temperaturi fermentacije i kroz najduže vrijeme.

- Rezultati ispitivanja pokazali su razlike u sadržaju ispitivanih tvari boje među vinima, jer su ona proizvedena različitim tehnološkim postupkom. Najbogatije polifenolima i flavonoidima pokazalo se mirno jabučno vino (MVJ).

- Sadržaj tvari arome slijedi trend porasta sadržaja tvari boje. Mirno jabučno vino (MVJ) imalo je najveći udio aromatičnih spojeva, ali je vidljivo da sva ispitivana vina imaju visok sadržaj navedenih tvari.

- Vina od jabuke dobivena fermentacijom iz svježih jabuka, a ne iz koncentrata, pokazala su visoku antioksidacijsku aktivnost. To im daje ulogu zdravog pripravka u primarnoj prevenciji zdravlja ljudi jer pomaže u sprječavanju bolesti krvožilnog sustava i upalnih procesa u organizmu.

7. LITERATURA

Abbot JA, Saftner RA, Gross KC, Vinyard BT, Janick J: Consumernevaluation and quality measurements of fresh-cut slices of 'Fuji', 'Golden Delicious', 'Gold Rush' and 'Granny Smith' apples. *Postharvest Biology And Tehnology* 33:124-140, 2004.

Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini PM, Albertini MC, Piatti E: Raw Mille fiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry* 97: 217-222, 2005.

Boyer J, Liu RH: Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* 3(5), 1475-2891, 2004.

Cheynier V: Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81(Suppl): 223S-229S, 2005.

Danianni Marinho Zardo, Karolline Marques Silva, Sylvain Guyot & Alessandro Nogueira: Phenolic profile and antioxidant capacity of the principal apples produced in Brazil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 64:5, 611-620, 2013.

Eberhardt MV, Lee CY, Lui RH: Nutrition-antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405:903-904, 2000.

Gomez-Miguez MJ, Cacho JF, Ferreira V, Vicario IM, Heredia FJ: Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry* 100(4): 1464-1473, 2007.

Jakobek L, Seruga M, Seruga B, Novak I, Medvidovic-Kosanovic M: Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of Rubus and Prunus species from Croatia. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 860-868, 2009.

Jemrić T, Šindrak Z, Skendrović Babojelić M, Fruk G, Mihaljević Žulj M, Jagatić Korenika AM: *Proizvodnja vina od jabuka*, Zagreb, 2014.

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ i sur.: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 47: 3954-3962. 1999.

Kim DO, Jeong SW, Lee CY: Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem*istry 81: 321-326, 2003.

Lee K, Kim Y, Kim D, Lee H, Lee C: Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 6516-6520, 2003.

Mišić P: Jabuka. Nolit, 2004.

MPŠ, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva RH: *Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina*. Narodne novine 96/03, 2004.

Ough CS, Amerine MA: *Phenolic Compounds. Methods for Analysis of Musts and Wines.* (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons Inc., str.196-221, 1988.

Pozderović A, Pichler A, Moslavac T: Utjecaj odležavanja, hladne stabilizacije i filtracije na kemijski sastav i kakvoću bijelih vina. *Glasnik zaštite bilja* 4: 100-109, 2010.

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

Primorac Lj, Banjari I: *Kontrola kakvoće hrane – Propisi za vježbe*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

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

Stričević D, Sever B: *Organska kemija.* Profil International, Zagreb, 2001.

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

Zhang Zhouyao i Pawliszyn Janusz: Headspace Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry* 65: 1843-1852, 1993.

Zoričić M: Kultura vina. V.B.Z., 2009.

Zoričić M: Od grožđa do vina. Gospodarski list, Zagreb, 1996.

http//studenti.ptfos.hr/Preddiplomski_studij/Tehnologija_prerade_sirovina_biljnog_podrijetla_II/_2012 (20.06.2016.)

http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski_studij/Kontrola_kakvoce_hrane/predavanja/Kromatografske%20metode.pdf (20.06.2016.)

http//studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Tehnologija_vina/ (15.06.2016.)

http://www.tehnologijahrane.com/literatura/literatura-iz-poljoprivrede/jabuka (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=jabuka&hl=en&biw=758&bih=690&site=webhp&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiHluqm88LNAhWCmBoKHV9NC_8Q_AUIBigB#imgrc=36zgf_Ar21gVoM%3A – Web 1 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=cider&hl=en&biw=758&bih=690&site=webhp&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjfpqe-88LNAhWEtxoKHazABowQ_AUIBigB#imgdii=finhiuimgZL3lM%3A%3BfinhiuimgZL3lM%3A%3BKaFbz-tAK8az6M%3A&imgrc=finhiuimgZL3lM%3A – Web 2 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=etanol&hl=en&biw=758&bih=690&site=webhp&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjr37XU9MLNAhUCLhoKHU9DBqoQ_AUIBigB#hl=en&tbm=isch&q=ethanol&imgrc=zm8hJhYnyikyRM%3A – Web 3 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=glukoza&espv=2&biw=758&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjgg6v-78LNAhWIVRoKHczFDr0Q_AUIBigB#tbm=isch&q=metanol+formula&imgrc=8GLfzX7KwDSQUM%3A – Web 4 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=glukoza&espv=2&biw=758&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjgg6v-78LNAhWIVRoKHczFDr0Q_AUIBigB#tbm=isch&q=jabuka&imgrc=36zgf_Ar21gVoM%3A – Web 5 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=fruktoza&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwixyr7-4dbNAhWFaxQKHV-SDEgQ_AUICCgB&biw=798&bih=651#imgrc=BKp8ln0p2_ff4M%3A – Web 6 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=glukoza&espv=2&biw=758&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjgg6v-78LNAhWIVRoKHczFDr0Q_AUIBigB#tbm=isch&q=fruktoza+formula&imgrc=bm-XX9gBOkoaeM%3A – Web 7 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=limunska+kiselina&hl=en&biw=758&bih=690&site=webhp&source=lnms&tbm=isch&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwjh0IX688LNAhWFWhoKHSjJDiwQ_AUIBigB#imgrc=anoeVDVHLQFtaM%3A – Web 8 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=vinska+kiselina&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi4nqqF99TNAhVIiRoKHUS6A8UQ_AUICCgB&biw=916&bih=734#imgrc=3Vb2eB9auzSOQM%3A – Web 9 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#imgrc=lIcScjZ-lpInGM%3A – Web 10 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=strojno+skupljanje+jabuka&imgrc=BcyT0wvDsCAs_M%3A – Web 11 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=izdvajanje+o%C5%A1te%C4%8Denih+plodova&imgrc=ycUO_FlHjVgSJM%3A – Web 12 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=mlinovi+za+ustnjavanje+jabuka&imgrc=aLNk7QMBz8HBnM%3A – Web 13 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=sulfitiranje+pulpe+jabuka&imgrc=eG112ZP_x0xYBM%3A – Web 14 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=hidrauli%C4%8Dka+pre%C5%A1a+za+jabuke&imgdii=4g65Bb5EodhFlM%3A%3B4g65Bb5EodhFlM%3A%3BR7OmmlRd8OBElM%3A&imgrc=4g65Bb5EodhFlM%3A – Web 15 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB

#tbm=isch&q=elektri%C4%8Dna+pre%C5%A1a+za+jabuke&imgrc=ag9k3D2H3SHvdM%3A – Web 16 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=jutene+vre%C4%87e&imgdii=EgOCu25JRAO78M%3A%3BEgOCu25JRAO78M%3A%3BlU-0-WCvYZ4hhM%3A&imgrc=EgOCu25JRAO78M%3A – Web 17 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=poklopci+inox+tankova&imgrc=N-zoyBfyFLfdYM%3A – Web 18 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=vrenja%C4%8Da&imgdii=byy5UMdTMzUjGM%3A%3Bbyy5UMdTMzUjGM%3A%3Bl4aYwl9Br3j-fM%3A&imgrc=byy5UMdTMzUjGM%3A – Web 19 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=plo%C4%8Dasti+filter+za+vino&imgdii=euwxvM7fVMnQRM%3A%3BeuwxvM7fVMnQRM%3A%3B6svdzcm36ZwWLM%3A&imgrc=euwxvM7fVMnQRM%3A – Web 20 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=perlanje+vina&imgrc=dicO2Z40h_tgMM%3A – Web 21 (25.06.2016.)

https://www.google.hr/search?q=ru%C4%8Dno+skupljanje+jabuka&biw=931&bih=734&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwinx6uJ6sLNAhVEVhoKHa0gA_MQ_AUIBigB#tbm=isch&q=inox+tank+za+vino&imgrc=4Ai7QPHCFlu90M%3A – Web 22 (25.06.2016.)