

Alkoholna fermentacija rogača i aroma profil rakije od rogača

Devčić, Borna

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:880156>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2019

Borna Devčić

1101/PI

**ALKOHOLNA FERMENTACIJA
ROGAČA I PROFIL AROME
RAKIJE OD ROGAČA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasaca na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Mrvčić i uz pomoć asistentice mag. ing. Karle Hanousek Čiča.



Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta Taksonomija, Ekologija i uporaba rogača (*Ceratonia siliqua* L.) i lovora (*Laurus nobilis* L.) u Hrvatskoj (IP-11-2013_3304-TEUCLIC) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Jasni Mrvčić na ukazanoj pomoći, strpljenju i mentorstvu te asistentici mag. ing. Karli Hanousek Čiči na pomoći u izradi rada. Također, zahvaljujem se svojoj obitelji, djevojci i prijateljima na svesrdnoj podršci tijekom čitavog studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasaca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Alkoholna fermentacija rogača i aroma profil rakije od rogača

Borna Devčić, 1101/PI

Sažetak: Rogač je tradicionalna mediteranska kultura zastupljena u prehrani ljudi i životinja. U znanstvenoj literaturi postupak proizvodnje i karakterizacija rakije od rogača nisu istraženi pa je cilj istraživanja bio ispitati mogućnost proizvodnje rakije od rogača s naglaskom na fermentaciju rogača i karakterizaciju aroma spojeva u dobivenom destilatu. U radu je ispitana fermentacijska aktivnost tri komercijalno dostupna soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u komini rogača sa ili bez dodatka hranjiva, na tri različite temperature. Rezultati su pokazali da se upotrijebljeni sojevi kvasca *S. cerevisiae* koji se koriste za fermentaciju vina i voćnih komina mogu primijeniti i za fermentaciju komine rogača. Sam rogač ne sadrži inhibitore koji mogu utjecati na rast i fermentativnu aktivnost kvasca, a sadrži sve hranjive tvari potrebne za uspješno provođenje fermentacije. Nadalje, dodatak soli za vrenje nije utjecao na brzinu fermentacije kao niti na konačnu aromu proizvedenog destilata. Etil-oktanoat, etil-heksanoat, etil-dekanoat i etil-nonanoat (pelargonat) te etil-benzoat, etil-cinamat i etil-izobutirat najzastupljeniji su esteri u destilatu dobivenom fermentacijom brašna rogača.

Ključne riječi: rogač, fermentacija, *S. cerevisiae*, destilat, rakija

Rad sadrži: 68 stranica, 23 slike, 20 tablica, 69 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *prof.dr.sc Jasna Mrvčić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. *Izv.prof.dr.sc. Damir Stanzer*
2. *Prof.dr.sc Jasna Mrvčić*
3. *Doc.dr.sc. Antonija Trontel*
4. *Prof.dr.sc. Vlatka Petravić Tominac (zamjena)*

Datum obrane: 11. prosinac 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Alcoholic fermentation of carob and aroma profile of carob brandy

Borna Devčić, 1101/PI

Abstract: Carob is a traditional Mediterranean culture used in human and animal nutrition. In the scientific literature, the production process and characterization of carob brandy have not been investigated, so the aim of the study was to investigate the possibility of producing carob brandy with an emphasis on fermentation of carob and the characterization of aroma compounds in the distillate obtained. This paper examines the fermentable activity of three commercially available yeast strains of *S. cerevisiae* in the carob extract with or without nutrient supplementation at three different temperatures. The results showed how strains of *S. cerevisiae* that are used for fermentation of wine and fruit can also be applied for fermentation of carob. The carob itself does not contain any yeast inhibitors and it contains all the nutrients needed for fermentation, so the addition of fermenting salt did not affect the fermentation rate or the final aroma of the distillate produced. Ethyl octanoate, ethyl hexanoate, ethyl decanoate and ethyl nonanoate (pellargonate) and ethyl benzoate, ethyl cinnamate and ethyl isobutyrate are the most represented esters in distillate obtained by fermentation of carob flour.

Keywords: *carob, fermentation, S. cerevisiae, distillate, brandy*

Thesis contains: 68 pages, 23 figures, 20 tables, 69 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *Jasna Mrvčić, Full professor*

Reviewers:

1. PhD. *Damir Stanzer, Associate professor*
2. PhD. *Jasna Mrvčić, Full professor*
3. PhD. *Antonija Trontel, Assistant professor*
4. PhD. *Vlatka Petravić Tominac, Full professor (substitute)*

Thesis defended: 11 December 2019

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Jaka alkoholna pića.....	2
2.2. Rogač	5
2.3. Alkoholna fermentacija.....	8
2.3.1. Kvasci za alkoholnu fermentaciju.....	8
2.4. Destilacija prevrele komine	10
2.5. Spojevi arome u rakiji od rogača	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. Materijali.....	17
3.1.1. Rogač	17
3.1.2. Mikroorganizmi	17
3.1.3. Soli za vrenje.....	17
3.1.4. Laboratorijsko posuđe, kemikalije i otopine	17
3.2. Metode rada	19
3.2.1. Priprema sirovine za fermentaciju	19
3.2.2. Alkoholna fermentacija komine rogača	19
3.2.3. Destilacija prevrele komine rogača.....	20
3.2.4. Određivanje udjela alkohola po Martin – Dietrechu.....	22
3.2.5. Određivanje koncentracije šećera i alkohola visokotlačnom tekućinskom kromatografijom u komini i prefermentiranim kominama rogača.....	24
3.2.6. Određivanje hlapivih aroma spojeva komina plinskom kromatografijom.....	26
3.2.7. Određivanje profila aroma spojeva destilata rogača plinskom kromatografijom s masenim detektorom	29
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	30
4.1. Fermentacijska aktivnost različitih sojeva kvasca <i>S. cerevisiae</i> u komini rogača	31
4.2. Volumni udjeli etanola u prefermentiranim kominama rogača	37
4.3. Određivanje šećera i fermentacijskih produkata u prefermentiranim kominama rogača.....	39
4.4. Određivanje hlapivih spojeva u prefermentiranim kominama i brašnu od rogača.....	44
4.5. Određivanje hlapivih komponenti u destilatima rogača.....	49
5. ZAKLJUČCI.....	61
6. LITERATURA.....	62
7. PRILOZI.....	69

1. UVOD

Rogač je tradicionalna mediteranska kultura odavno zastupljena u prehrani ljudi i životinja. Sastav ploda je dobre kvalitete, a tome u prilog ide i iznimna otpornost samog drveta rogača koje odoljeva sušama i ima sposobnost rasta na nenavodnjavanim površinama. Pripadajuće osobine čine rogač zahvalnim za uzgoj i preradu na području Dalmacije i ostalih otoka, no taj potencijal nije u potpunosti iskorišten (Golub, 2016). Na tržištu je dostupan u svježem i suhom obliku, a u prehrambenoj industriji može se koristiti kao zgušnjivač, stabilizator i zamjena za kakao (Benković i sur., 2019). Njegov ekstrakt se koristi kao aroma dodatak u proizvodnji: alkoholnih i bezalkoholnih pića, zamrznutih mliječnih proizvoda, mesnih proizvoda, začinskih mješavina i pekarskih proizvoda. Sama rakija od rogača pripada skupini jakih alkoholnih pića (JAP), koja su po svojoj definiciji iz Pravilnika namijenjena za ljudsku potrošnju, imaju posebna senzorska svojstva i sadrže minimalno 15 % vol. alkohola (Pravilnik, 2009).

Fermentacija rogača i mogućnost proizvodnje bioetanol iz rogača ispitana je u nekoliko istraživanja (Turhan i sur., 2010; Saharkhiz i sur., 2013; Rodrigues i sur., 2015). No, u znanstvenoj literaturi nedostaje podataka o jakim alkoholnim pićima proizvedenim od rogača. Za proizvodnju jakih alkoholnih pića koristi se osušeni rogač. Osušeni sadrži visoki udio slobodnih šećera, koji ovisi o sorti i stupnju zrelosti. U Hrvatskoj, kao dijelom mediteranskoj zemlji u kojoj se rogač uzgaja, od jakih alkoholnih pića na bazi rogača najčešće se radi liker od rogača i to pretežno u domaćoj radinosti. Mahune rogača maceriraju se određeno vrijeme u lozi ili komovici uz dodatak šećera prema tradicijskim receptima. Suprotno tome, čista rakija od rogača vrlo je rijetka. Proizvođači je miješaju osobito s lozom i komovicom (može i s drugim rakijama) ili se sirovom destilatu pojedinih vrsta rakija dodaje odgovarajuća količina rogača i ponovno destilira. Budući da u znanstvenoj literaturi postupak proizvodnje i karakterizacija rakije od rogača nisu istraženi, cilj istraživanja je po prvi puta ispitati mogućnost proizvodnje rakije od rogača s naglaskom na fermentaciju rogača i karakterizaciju aroma spojeva u dobivenom destilatu. Mogućnost fermentacije rogača temelji se na činjenici da osušeni rogač sadrži veliki udio fermentabilnih šećera (prosječno 50 %) – saharoze, fruktoze i glukoze. U radu je ispitana fermentabilna aktivnost tri komercijalno dostupna soja kvasca *S. cerevisiae* u komini rogača sa ili bez dodatka hranjiva, na dvije različite temperature.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Jaka alkoholna pića

Jaka alkoholna pića mogu se proizvesti izravno:

- *Destilacijom*, sa ili bez dodavanja arome, prirodno prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla.
- *Maceracijom* ili sličnom preradom bilja u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i/ili u destilatima poljoprivrednog podrijetla, i/ili u jakim alkoholnim pićima opisanih u Pravilniku o jakim alkoholnim pićima.
- *Dodavanjem arome, šećera ili drugih sladila* sadržanih u Pravilniku o jakim alkoholnim pićima i/ili drugih poljoprivrednih proizvoda i/ili prehrambenih proizvoda etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i/ili destilatima poljoprivrednog podrijetla i/ili jakim alkoholnim pićima u smislu Pravilnika o jakim alkoholnim pićima.

Drugi način proizvodnje jakih alkoholnih pića je neizravno, mješanjem alkoholnog pića s jednim ili više: drugim jakim alkoholnim pićem, etilnim alkoholom poljoprivrednog podrijetla ili destilatima poljoprivrednog podrijetla, drugim alkoholnim pićima, pićima (Pravilnik, 2009).

2.1.1. Podjela jakih alkoholnih pića

Jaka alkoholna pića mogu se podjeliti prema načinu proizvodnje, količini alkohola ili šećera u pićima, ili obzirom na njihovu kvalitetu (Stehlik-Tomas, 2010):

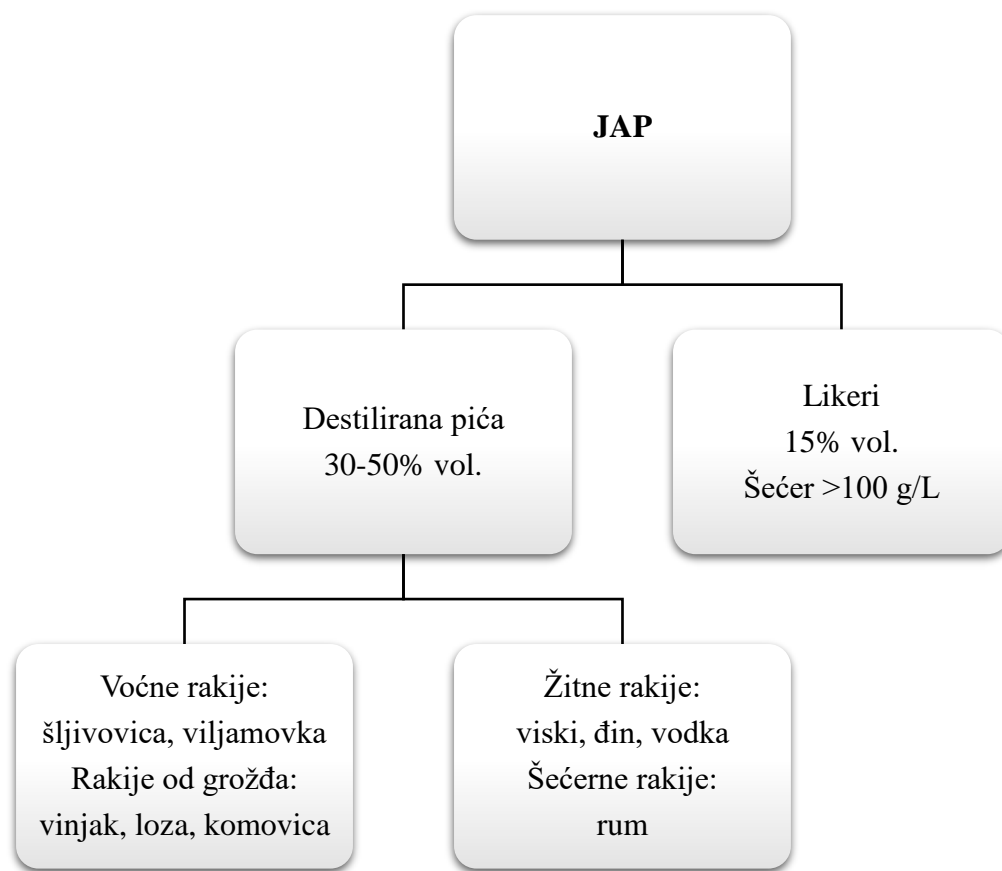
- a. Prirodna jaka alkoholna pića
 - b. Umjetna aromatska alkoholna pića
 - c. Aromatska vina
- *Prirodna jaka alkoholna pića* su pića koja se proizvode destilacijom iz prefermentiranih šećernih komina, čime dobiju prepoznatljivu aromu sirovine iz koje su dobiveni. U proizvodnji ove vrste jakih alkoholnih pića nije dozvoljeno dodavati šećer, škrobni sirup te nikakvu otopinu na bazi škroba. Također, zabranjeno je dodavati sirovi i rafinirani etilni alkohol te arome i boje. Karakteristični primjeri tih pića su šljivovica, konjak, tekila, viski itd.

- *Umjetna jaka alkoholna pića* su pića koja se proizvode maceracijom sirovina u alkoholu, destilacijom aromatskih supstanci i prefermentiranih voćnih sokova. Ovdje je velika mogućnost u proizvodnji pića jer je dozvoljena uporaba boja, aroma, šećera i šećernih sirupa. Ova pića također imaju aromu od sirovina iz kojih su proizvedeni s time da ne sadrže patočna ulja i aldehide, jer se kao osnova za proizvodnju koristi rafinirani etilni alkohol. Kao primjer ovakvog pića navodim maraskino koji se dobiva destilacijom macerata višnje Maraske.
- *Aromatska vina* su pića koja se proizvode maceracijom prevrelih voćnih sokova, odnosno vina, s aromama kao što su limun, gorušćica, naranča, pelin. Omjer vina i dodane arome treba najmanje biti 3:1. Udio šećera u vinu može varirati te stoga postoji i podjela prema njegovoj količini:
 1. suha < 50 g L⁻¹ invertnog šećera
 2. polusuha 50-90 g L⁻¹ invertnog šećera
 3. poluslatka 90-130 g L⁻¹ invertnog šećera
 4. slatka > 130 g L⁻¹ invertnog šećera

Primjeri aromatskih vina su vermut i bernet.

Prirodna jaka alkoholna pića su cjenjenija od umjetnih jakih alkoholnih pića i aromatskih vina, jer imaju sve aromatske komponente iz sirovine od kojih su proizvedeni te komponente koje nastaju procesima fermentacije, destilacije i odležavanja (Stehlik-Tomas, 2010).

Zbog kompleksnosti, odnosno velike palete proizvoda koji se svrstavaju u kategoriju jakih alkoholnih pića u literaturi se mogu naći i drugačije podjele jakih alkoholnih pića. Tako se jaka alkoholna pića mogu prema karakteristikama, sirovinama te tehnološkim postupcima za proizvodnju podjeliti u dvije velike skupine: destilirana pića koja obuhvaćaju voćne, žitne i šećerne rakije te likere (slika 1; Mrvčić, 2015).



Slika 1. Podjela jakih alkoholnih pića (Mrvčić, 2015)

Voćne rakije se proizvode destilacijom iz prefermentiranih komina voća ubranog u fazi tehnološke zrelosti, odnosno kada plod ima najbolji omjer šećera, kiselina i aroma. Kao sirovine za voćne rakije koristi se: grožđe, vino, vinski ostateci, jezgričavo voće, koštunjčavo voće, južno voće (rogač), jagodasto i bobičasto voće (Mrvčić, 2015). Za odlične rakije, potrebno je uzimati samo zrelo, neoštećeno i dobro očuvano voće. Kod takvog voća, najvažniji je njegov sastav, odnosno suha tvar voća netopiva u vodi i suha tvar voća topiva u vodi. Suhu tvar voća netopivu u vodi čine sjemenke, koštice i djelomice pokožice, a suhu tvar topivu u vodi čini sok tkiva voća odnosno stanična citoplazma. Za rakiju je bitniji dio topiv u vodi, jer je u svakom voću golem broj različitih organskih i mineralnih sastojaka koje daju plodu, a kasnije i rakiji njezina karakteristična svojstva (okus, miris). Od tvari topivih u vodi najbitniji su šećeri, bjelančevine, vitamini, razne kiseline (limunska, jabučna, vinska) te fosfor i dušik kao hranjive tvari kvascu prilikom fermentacije. Ako ih u voću nedostaje, fermentacija će biti otežana pa ih je u kominu potrebno dodati.

Zahtjevi za kvalitetu voća za proizvodnju rakija su:

- a. Visok sadržaj šećera
- b. Određeni stupanj zrelosti voća
- c. Očuvana aroma tipična za sirovinu
- d. Očišćeno voće, bez zemlje, trave ili primjesa (Banić, 2006).

2.2. Rogač

Drvo rogača (*Ceratonia siliqua* L.), koje je danas široko rasprostranjeno na Mediteranskom području, spada u porodicu mahunarki (*Leguminosae*). Vjeruje se da su ga na ova područja pradavno donjeli Arapi (Martins-Loução, 1990). Na svjetskoj razini, godišnja proizvodnja od 2010. do 2013. je iznosila oko 160 tisuća tona rogača na 80 000 ha. Prinos po hektaru ovisi o podneblju u kojem drvo rogača raste. Glavni proizvođači rogača su: Španjolska (26,31 %), Italija (16,62 %), Portugal (13,77 %), Maroko (12,27 %), Grčka (12,05 %) i Turska (8,53 %) (Yatmaz i Turhan, 2018). Plod je dugačak, zatvoren, sabijen, ravan ili zakrivljen, zadebljan na krajevima, 10-30 cm dugačak, 1,5-3,5 širok i debljine 1 cm. Mahuna je zelene boje, a kada dozrije prelazi u smeđu boju (slika 2). Pulpa se sastoji od tvrdog perikarpa i mekanog mezokarpa koji razdvaja transverzalno položene sjemenke. Pulpa čini 90 %, a sjemenke 10 % ploda (Goulas i sur., 2016). Sjemenke se mogu koristiti u proizvodnji gume od rogača (karauba guma). Karauba guma sadrži galaktomanan te se može dodati u različite proizvode kao prirodni zgušnjivač ili stabilizator (Petkova i sur., 2017).



Slika 2. Nezreli plodovi rogača i unutrašnjost zrelog rogača (Tišljarić, 2018)

Teško se može odrediti točan kemijski sastav rogača jer on ovisi o kultivaru, podneblju, vremenu berbe i metodi određivanja kemijskog sastava. Nastavno tome, može se odrediti raspon udjela pojedinih komponenti u rogaču (tablica 1). Od osnovnih kemijskih komponenti dominiraju jednostavni šećeri: glukoza, fruktoza (15-25 % ukupnih šećera) i saharoza (65-75 % ukupnih šećera) u udjelu od 48-56 %, a od složenijih: celuloza i hemiceluloza u udjelu od 18 % (Goulas i sur., 2016). Rogač ima nizak udio masnih kiselina, stoga se smatra zdravom namirnicom. Najviše su zastupljene: oleinska (40,45 %), linolenska (23,19 %), palmitinska (11,01 %) i stearinska (3,08 %) (Youssef i sur., 2013). Udio proteina je nizak i kreće se od 1-7 %, ovisno o sorti (Golub, 2016). Pulpa također sadrži veliki udio fenolnih spojeva od kojih su najvažniji tanini (16-20 % udjela fenolnih spojeva; Miličević i sur, 2018).

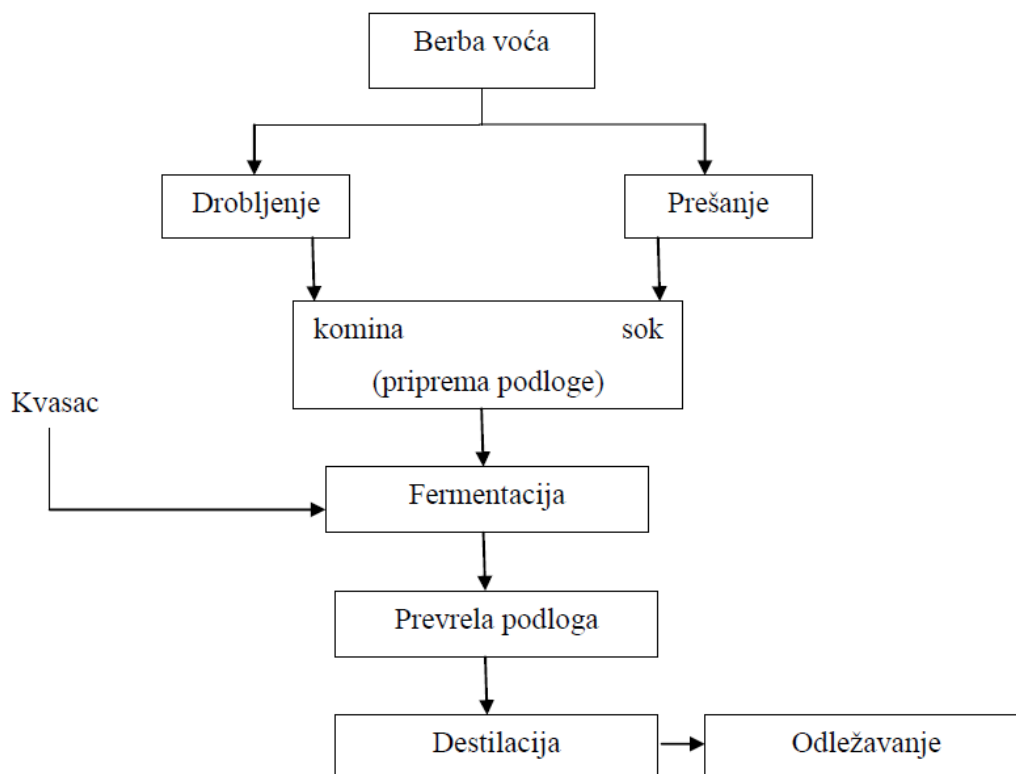
Tablica 1. *Kemijski sastav rogača (Yousif, 2000; Petkova i sur., 2017)*

Kemijski sastav	Maseni udio na 100 g (%)
Voda	7,56-11,07
Proteini	5,54-5,90
Masti	0,30-0,50
Ukupni ugljikohidrati	55,99-85,50
Šećeri	45,0 -57,44

2.2.1. Tehnološki postupak proizvodnje rakije od rogača

Općeniti postupak proizvodnje voćnih rakija shematski je prikazan na slici 3. Jednako tako koraci u proizvodnji rakije od rogača uključuju:

- a. priprema plodova i sušenje
- b. usitnjavanje plodova i prerada u brašno
- c. ekstrakcija šećera iz rogačevog brašna
- d. fermentacija komine
- e. destilacija prevrele komine
- f. odležavanje, dozrijevanje i završna obrada



Slika 3. Shema proizvodnje voćnih rakija (Stehlik-Tomas, 2010)

a. Priprema plodova i sušenje

Ubrani rogač se suši na zraku ili u sušarama uz pomoć toplog zraka. Sušenje se mora provoditi stupnjevito i ne prebrzo. Ovakav osušeni rogač ima veću koncentraciju šećera nego svježi plod.

b. Usitnjavanje plodova i prerada u brašno

Kako bi mogli provesti fermentaciju, plodovi se moraju prvo usitniti, a zatim i samljeti kako bi se dobilo brašno rogača. Usitnjavanje se provodi mehaničkim operacijama, odnosno mljevenjem do granulacije krupice kako ne bi došlo do sabijanja brašna prilikom fermentacije, a samim time i do njene otežane provedbe.

c. Ekstrakcija šećera iz rogačevog brašna

Ekstrakcija šećera iz rogačevog brašna se provodi u prikladnim posudama s četiri puta većom količinom tople vode (Turhan i sur., 2010). Ekstrakcija se provodi uz mješanjem kako ne bi došlo do stvaranja grudica, odnosno aglomerata. Nakon ekstrakcije, komina se hladi na temperaturu fermentacije.

d. Fermentacija komine brašna

Prethodno ohlađenoj i ekstrahiranoj komini, dodaje se radni mikroorganizam, odnosno kvasac. Vrenje se provodi postupno, pri optimalnoj temperaturi rasta odabranog kvasca (Banović, 2006).

Alkoholna fermentacija i destilacije su ključne faze u proizvodnji rakije pa će biti detaljno opisane u slijedećim poglavljima.

2.3. Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija je anaerobni biokemijski proces u kojem se glukoza, uz pomoć kvasca, prevodi u etanol i CO₂.

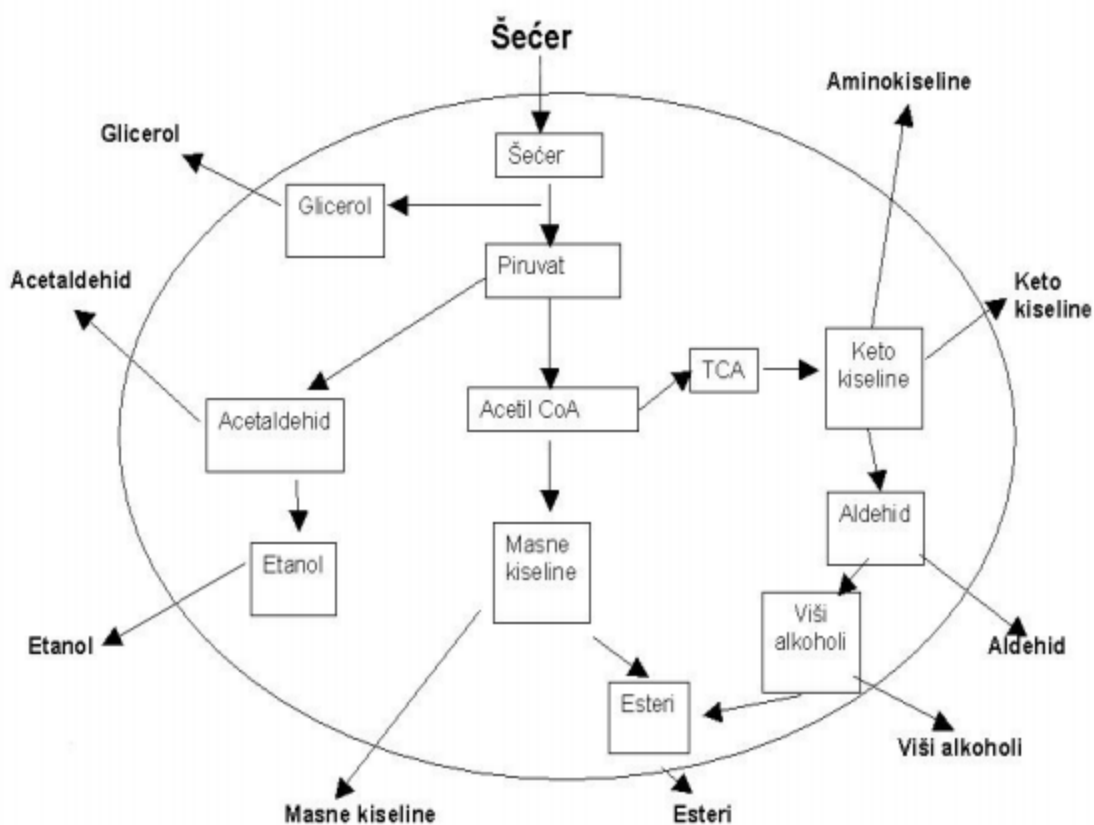


Proces fermentacije se može voditi kontrolirano s prethodno pripremljenom mikrobnom kulturom ili spontano s prisutnim mikroorganizmima na sirovini. Spontane fermentacije mogu dati proizvode neujednačene kvalitete te je sama fermentacija duža, naspram korištenja čiste mikrobne kulture, gdje se dobiva proizvod ujednačene kvalitete (Mrvčić, 2015).

2.3.1. Kvasci za alkoholnu fermentaciju

Kvasac je eukariotski mikroorganizam odgovoran za proizvodnju alkoholnih pića, a selekcija kvašćevog soja je bitna radi što većeg iskorištenja i očuvanja senzorskih svojstva prilikom fermentacije (Walker i Stuart, 2016). Kvasci su kemoorganotrofi, organizmi koji ugljik i energiju pridobivaju iz organskih spojeva. Imaju široki enzimski potencijal pa mogu rasti na brojnim konvencionalnim i nekonvencionalnim supstratima kao što su ugljikohidrati, alkoholi, organske kiseline, amino kiseline, n-alkani i lipidi. Ugljikohidrati su najčešći i najvažniji izvor ugljika s

obzirom na biotehnošku primjenu kvasaca. Od ugljikohidrata mogu metabolizirati monosaharide, oligosaharide i polisaharide. Među monosaharidima svi metaboliziraju heksoze (glukoza, fruktoza, manozna) glikolitičkim putem dok je za korištenje galaktoze potreban aktivan Leloir-ov put. Korištenju oligosaharida i polisaharida predhodi hidroliza do monosaharida, a ekspresija odgovarajuće hidrolaze je taksonomski ograničena. *S. cerevisiae* var. *diastaticus* te *Schwanniomyces* vrste primjeri su amilolitičkih kvasaca. Oni sintetiziraju i izlučuju glukoamilazu, enzim potreban za razgradnju škroba, dok kvasac *S. cerevisiae* nema tu sposobnost i zahtjeva predhodnu enzimsku hidrolizu škroba do maltoze i glukoze. Također, nisu identificirani kvasci koji sintetiziraju celulaze, enzime potrebne za razgradnju celuloze. Stoga se za proizvodnju alkohola iz lignoceluloznih sirovina provodi predhodna obrada lignocelulozne sirovine do lignoceluloznih hidrolizata koji sadrže jednostavne šećere (glukoza, ksiloza, manozna, galaktoza i arabinoza) koje dalje metaboliziraju različite vrste kvasaca (genetički modificirani kvasac *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* te vrste rodova *Candida* i *Pichia*) (Petravić -Tominac i sur. 2017). Kvasac koji dominira u procesima fermentacije je *S. cerevisiae*. Primjena njegovih sojeva ima velik utjecaj na aromu i karakterističan okus u različitim fermentiranim pićima. Za velike industrijske fermentacije koriste se čiste stanične kulture koje se kupuju od specijaliziranih tvrtki za uzgoj mikrobnih kultura ili se izoliraju u vlastitom laboratoriju. Kao mikroorganizam, *S. cerevisiae* zahtjeva aktivitet vode od minimalno 0,65. Što se tiče temperature i pH vrijednosti, većini kvasaca pogoduje temperatura između 20-30 °C i pH između 4,5-6,5. Od hranjivih sastojaka, kvascima su potrebni: glukoza, amonijeve soli, anorganske soli i nekoliko faktora rasta (Walker i Stuart, 2016). Kvasac *S. cerevisiae* tijekom svog metabolizma proizvodi primarne i sekundarne metabolite (primarni i sekundarni metabolizam, slika 4). Primarni metabolizam je neophodan za rast, diobu stanica i preživljavanje te proizvodnju metabolita kao što su etanol, glicerol, acetaldehid i octena kiselina. Sekundarni metaboliti su male molekule koje kvascu nisu neophodne za preživljavanje: viši alkoholi, esteri, karbonilni i sumporni spojevi, tioli i terpenoidi. Sekundarni metaboliti pridonose organoleptičkim karakteristikama namirnica fermentiranih s pomoću kvasaca (vino, pivo, kruh, itd.), a njihova sinteza regulirana je vrstom i količinom fermentabilnih šećera i izvora dušika te uvjetima fermentacije (Querol, 2005).



Slika 4. Metabolizam kvasaca (Mrvčić, 2015)

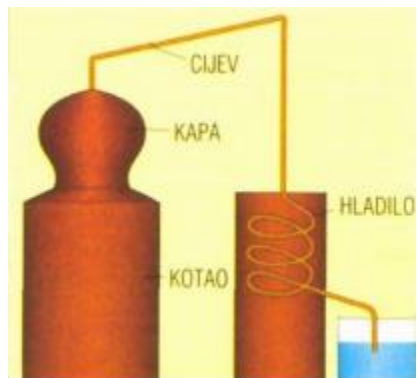
2.4. Destilacija prevrele komine

Nakon alkoholne fermentacije, slijedi proces destilacije koji se smatra najbitnijim dijelom u proizvodnji rakije. Destilacijom se odvaja nastali etilni alkohol u određenom omjeru s vodom i svi produkti koji pridonose aromi iz prefermentirane komine. Sam proces destilacije je zapravo zagrijavanje tekuće faze, njeno isparavanje i ponovno kondenziranje. Kod prevrele komine, glavni sastojci su voda i etilni alkohol, a oni imaju različite točke vrelišta. Etilni alkohol vrije pri 78,3 °C dok je vrelište vode pri 100 °C. Stoga, zagrijavanjem komine isparavat će više alkohola nego vode. Ako bi pak podigli temperaturu pri temperaturi vrelišta vode, isparavalo bi više vode, a to je u ovom slučaju nepoželjno, jer želimo izvući što više alkohola (Banić, 2006). Prilikom destilacije, uz vodu i alkohol kao glavne sastojke prefermentirane komine, isparavaju i hlapive

komponente. Kako se u komini nalazi velik broj hlapivih komponenti, tako je i velik njihov raspon vrelišta (npr. acetaldehid 20,8 °C i benzaldehid 179 °C). Hlapive komponente čine aromu rakije koja se proizvodi. Neke komponente arome su poželjne u malim količinama, dok je druge potrebno što više ukloniti iz destilata. Destilacija se općenito može provoditi kontinuirano ili diskontinuirano. Za proizvodnju voćnih rakija, koristi se diskontinuirana, odnosno šaržna destilacija. Neovisno o tipu provedbe destilacije, destilacija mora biti polagana jer s ubrzanim procesom dolazi do zagorijevanja komine i njene termalne degradacije. Od uređaja za destilaciju koji se koriste postoje dva tipa: jednostavni kotao za destilaciju (slika 5) ili destilacijska kolona. Za Hrvatsku, najčešći tip uređaja za destilaciju je jednostavni kotao (Spaho, 2017).

Osnovni dijelovi jednostavnog kotla za destilaciju su:

- a. kotao s dijelom za destilaciju i dijelom za zagrijavanje
- b. klobuk (kapa) ili poklopac
- c. parovodna cijev
- d. hladilo



Slika 5. Jednostavni kotao za destilaciju (Banić, 2006)

Kod pečenja rakije u jednostavnim kotlovima, destilaciju je potrebno provesti više puta (većinom dva puta: prva i druga destilacija) kako bi osigurali visok udio alkohola u destilatu (Spaho, 2017).

- Prva destilacija

Prva destilacija započinje punjenjem kotla do 70 % njegovog volumena, pa čak i do 50 % kod sirovina koje se jako pjene. Njen osnovni cilj je odvajanje hlapivih komponenti od nehlapivih. Zagrijavanjem komine hlapive komponente polako prelaze u destilat. Kod ove destilacije, bitno je održavati temperaturu oko 70-80 °C kako bi osigurali da sve komponente arome ispare. Destilacija se smatra završenom kada je udio alkohola u sirovom destilatu na izlazu iz hladila odnosno kondenzatora oko 2-3 %. Sirovi destilat je obično mutan jer sadrži sve hlapive komponente (patočna ulja, metanol, itd.)

- Redestilacija/ Druga destilacija

Cilj druge destilacije, odnosno redestilacije je koncentriranje alkohola i poboljšanje njegove kvalitete. To se postiže odvajanjem pojedinih tokova prilikom procesa. Prvi tok se naziva prvijenac, a odvaja se u količini od 0,5 % volumena sirovog destilata. Odvaja se jer sadrži nepoželjne hlapive spojeve. Po potrebi se odvaja i više, ako se fermentirana komina nije odmah po završetku fermentacije destilirala pa sadrži octenu kiselinu u povišenoj koncentraciji. Srednji tok se naziva srce te se počinje odvajati nakon prvijenca a skuplja se do 40-50 % jačine destilata na izlazu destilata iz hladila. U njemu su najpoželjniji sastojci i arome hlapivih komponenti. Nakon što udio alkohola počne padati ispod 42 %, u destilatu se pojavljuju patočna ulja i tada se počinje odvajati treći tok, odnosno patoka. U patoci se također nalaze hlapive komponente neugodnog mirisa. Odvaja se sve dok udio alkohola u destilatu ne iznosi 3-5 %. Nakon završene druge destilacije, destilat se ostavlja da odleži i dozrije.

- Odležavanje destilata

Prije razrijeđivanja destilata na zakonom propisanu jačinu, potrebno ga je ostaviti da odleži od 6 do 8 tjedana na sobnoj temperaturi. Što ga se duže ostavi da dozrijeva, to će kvaliteta rakije biti bolja. Osim topline za dozrijevanje je važan i kisik, stoga se boce s destilatom pune do tri četvrtine obujma. Kod dozrijevanja dolazi do esterifikacije viših alkohola pri čemu nastaju esteri ugodnog mirisa. Proces dozrijevanja je zapravo dugačak proces koji se odvija čitavo vrijeme u posudi u kojoj se rakija nalazi (Banić, 2006).

2.5. Spojevi arome u rakiji od rogača

Pod aromom se podrazumijeva smjesa spojeva koji isparavaju s vodom, vodenom parom ili inertnim plinom, koja daje nezamjenljivu osjetilnu karakteristiku određene vrste ili sorte. U kemijskom smislu to su smjese različitih alkohola, estera, etera, aldehida, ketona, eteričnih ulja, terpena, karboksilnih kiselina, smola, voskova i njima sličnih tvari. Pojavljuju se u minimalnim količinama (ppb = mg/kg) a izazivaju jaki osjetni efekt. Koncentracija nekog spoja može utjecati na aromatski karakter npr. jonon u visokim koncentracijama daje aromu cedrovine, a u malim daje miris po ljubičici (Levaj, 2018). Tijekom destilacije, nehlapive komponente ostanu u prefermentiranoj komini, dok hlapive prijeđu u destilat (Gibson i Newsham, 2018). Spojevi koji su općenito zaslužni za aromu u rakiji mogu se podijeliti u četiri skupine (Malnar, 2016):

a) Primarna aroma

Primarna aroma potječe iz sirovine korištene za fermentaciju, a faktori koji utječu na njenu: geografsko podneblje, metoda uzgoja, klimatski uvjeti, vrijeme berbe i skladištenje. Voće sadrži nekoliko stotina spojeva koji zajedno doprinose aromi, odnosno u većini slučajeva aromu čini kombinacija više spojeva. (npr. heksil 2-metilbutanoat, heksil acetat i etil heksanoat daju jabučnu aromu). Različitost sorti čini određivanje općenitog aromatskog profila ploda zasad nemogućim, no danas se zna koje komponente su odgovorne za pojedine arome (npr. benzaldehid – aroma badema, oktil acetat – aroma kruške, heksil 2-metilbutanoat – aroma trave) (Śliwińska i sur., 2015). Za intenzitet arome nekog spoja važna je njegova molekularna masa. Intenzitet arome se povećava s povećanjem molekularne mase u homolognom pogledu sve do jednog maksimuma nakon čega dolazi do opadanja intenziteta (Levaj, 2018). Udjeli pojedinih hlapivih komponenti u sirovom rogaču prikazani su tablici 2.

Tablica 2. *Relativni udjeli hlapivih komponenti rogača (Farag i El-Kersh, 2017)*

Komponente	Udjeli (%)
Ukupne kiseline	77,03
Ukupni alkoholi	0,05
Ukupni aldehidi i ketoni	8,08
Ukupni ugljikovodici	0,10
Ukupni esteri	12,86
Ukupni furan i piran	1,21
Ukupni seskviterpeni	0,67

b) Sekundarna aroma

Sekundarna aroma nastaje tijekom fermentacije. Osim šećera, kvasci razgrađuju, aminokiseline, masne kiseline i ostale kemijske spojeve u svom metabolizmu (slika 4). Razgradnjom tih spojeva nastaju različiti nusprodukti fermentacije koji daju svoj miris i okus konačnom proizvodu.

Karbonilni spojevi

Acetaldehid je glavna karbonilni spoj koji nastaje za vrijeme fermentacije i to razgradnjom piruvata. 2-propenal ima aromu papra i hrena te može nastati tijekom destilacije dehidracijom glicerola. Također, mogu se naći i dietoksietan, trietoksietan i diacetil.

Alkoholi

Metanol, 1-butanol i 2-butanol spadaju u sekundarnu aromu, no oni nisu nusprodukti fermentacije, nego nastaju razgradnjom spojeva u sirovini (npr. metanol nastaje razgradnjom pektina). Viši alkoholi su kvantitativno najveća skupina hlapivih komponenti koja nastaje degradacijom ketokiselina koje su pak nastale degradacijom aminokiselina. Viši alkoholi su najzastupljeniji hlapljivi spojevi proizvedeni tijekom fermentacije i značajno doprinose aromi fermentiranih proizvoda. Viši alkoholi koji se sintetiziraju tijekom fermentacije su propanol, izoamil alkohol, izobutanol, 2-feniletanol i dr. Nastaju kroz Ehrlichov put koji započinje transaminacijskom reakcijom između aminokiseline i α -ketoglutarata. U ovom koraku aminokiselina se prevodi u α -

keto kiselinu. Nakon toga, piruvat dekarboksilaza katalizira konverziju α -keto kiseline u odgovarajući aldehid koji se reducira u odgovarajući viši alkohol. Viši alkoholi mogu imati pozitivne ili negativne učinke na aromu. Koncentracije više od 400 mg/L daju neugodnu aromu na otapalo, dok koncentracije niže od 300 mg/L daju poželjne voćne karakteristike pića, posebice 2-feniletanol, dok amil i izoamilni alkohol daju aromu marcipana i banane. Kao što je navedeno, viši alkoholi su prekursori arome acetatnih estera (Hirst i Richter, 2017).

Najvažniji viši alkoholi, odnosno patočna ulja, koji nastaju za vrijeme fermentacije su: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metilbutanol i aromatski alkohol 2-feniletanol.

Masne kiseline

Biosinteza masnih kiselina započinje u stanici kvasaca formiranjem acetil koenzima A koji reagira s malonil koenzimom A da bi nastao lanac s 4 do 18 °C atoma. Nastali udio zasićenih i nezasićenih masnih kiselina ovisi o procesu fermentacije. Od masnih kiselina sintetiziraju se: butanska, heksanska, oktanska i dekanska.

Esteri

Esteri su spojevi koji pridonose cvjetnoj i voćnoj aromi proizvoda, a nastaju esterifikacijom alkohola i kiselina. Dva najčešća tipa estera proizvedena tijekom fermentacije su acetatni ester koji potječu od acetyl-CoA i viših alkohola (etil-acetat koji je i najzastupljeniji, izoamil-acetat, 2-metilbutil-acetat, i feniletal-acetat) i etil ester (etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat) nastali esterifikacijom etanola i srednjelančanih masnih kiselina. Aroma ovih estera opisuje se aromom jabuke, voća, jagode, kruške i anisa. Najveća su grupa aroma spojeva te su uglavnom ugodnog mirisa. Njihov udio i omjer su važni za percepciju okusa nekog destilata (Hirst i Richter, 2016).

c) Tercijarna aroma

Do formiranja tercijarne arome dolazi prilikom destilacije. Na tercijarnu aromu uvelike utječe oprema, odnosno uređaj za destilaciju i vođenje procesa (Šliwińska i sur., 2015). Destilacijom u jednostavnim kotlovima, više aldehida i furfurala prevest će se u destilat. Ako se pak provodi spora destilacija, prevest će se više aldehida i estera (Mrvčić, 2015). Općenito gledajući, u prvijencu se odvajaju spojevi nižeg vrelišta kao što su: aldehidi, aceton, pojedini esteri i metanol. U srcu se odvaja etanol, dok se u patoci odvajaju viši alkoholi odnosno patočna ulja, koja imaju viša vrelišta (Gibson i Newsham, 2018).

d) Kvarterna aroma

Dozrijevanjem destilata dolazi do formiranja kvarterne arome. Dozrijevanje je važan korak u proizvodnji, jer sirovi destilat ima sirovu i opornu aromu. Tokom dozrijevanja različite komponente arome međusobno reagiraju te dolazi do njihovog sljublivanja. Sljublivanju aroma pomaže velika koncentracija alkohola jer su komponente arome uglavnom polarne te se u njemu dobro otapaju. Dolazi do povećanja koncentracije etilnih estera i masnih kiselina, a smanjuje se koncentracija aldehida (isparavanjem ili formiranjem acetala) i drugih alkoholnih estera procesom transesterifikacije. Čuvanjem destilata u drvenim bačvama, dolazi do otapanja vanilina, krezola, eugenola i ostalih fenolnih spojeva koji daju posebnu aromu. Dolazi i do prolaska etanola kroz dužice bačve te se njegova koncentracija smanjuje, a destilat dobiva intenzivniju, kompleksniju i zasićeniju aromu. Odležavanje destilata ovisi o veličini bačve, jačini destilata te o temperaturi i vlažnosti skladišta (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Rogač

Kao sirovina za fermentaciju korišten je mljeveni komercijalno dostupan rogač poduzeća Šafram d.o.o. pakiran u vrećice od 200 g.

3.1.2. Mikroorganizmi

Za fermentaciju korištena su tri soja suhog aktivnog kvasaca:

Saccharomyces cerevisiae var. *bayanus*, proizvođač Danstar Ferment AG

Saccharomyces cerevisiae var. *burgunder*, proizvođač Eaton Technologies

Saccharomyces cerevisiae, komercijalnog naziva Vrelko, proizvođač Danstar Ferment AG

3.1.3. Soli za vrenje

SIHA Sol za vrenje plus sadrži hranjive tvari za kvasce koje se sastoje od diamonij fosfata, vitamina B1 te celuloze kao nosača. Proizvođač je Eaton Technologies, Njemačka.

3.1.4. Laboratorijsko posuđe, kemikalije i otopine

Tablica 3. Prikaz korištenog laboratorijskog posuda

Sude i posuđe	Proizvođač
Čaša (50, 100, 200 mL)	Hirschmann
Tikvica (10, 25, 50 mL)	Simax
Erlenmeyerova tikvica	Hirschmann
Pipeta	Hirschmann
Čepovi	Simax
Kapaljka	Hirschmann
Lijevak	Hirschmann
Bireta	Hirschmann
Špatula	Simax

Tablica 4. *Prikaz korištenih uređaja*

Uređaj/aparatura	Proizvođač
Tehnička vaga	Kern & Sohn
Analitička vaga	Mikrotehna
Kotao za destilaciju	Fresl obrt
Aparatura za određivanje % udio EtOH po Martin - Dietrichu	Staklena aparatura
HPLC	Shimadzu
GC/FID	Perkin-Elmer i Agilent Technologies
GC/MS	Agilent Technologies
Vodena kupelj	Memert
Pipetor	Eppendorf
pH metar	Schott

Kemikalije

- Kalijev jodid
- Škrob
- Sulfatna kiselina
- Kalijev bikromat
- Natrij tiosulfat
- Natrijev hidroksid
- Natrijev klorid

Otopine

- Carez 1 (kalij (II) – heksaferocijanit; 0,085 mol L⁻¹)
Carez 2 (cink sulfat; 0,25 mol L⁻¹)

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema sirovine za fermentaciju

Komina za fermentaciju pripremljena je ukomljavanjem brašna rogača s vodom u omjeru 1:4. Za svaku pojedinu šaržu u Erlenmeyerove tikvice od 500 mL odvagano je 60 g rogača. Potom je dodano 240 mL destilirane vode te se s parafilmom začepilo grlo tikvica. Takve začepljene tikvice su stavljene u vodenu kupelj na 50 °C kroz 2 sata kako bi se ekstrahirali šećeri.

Nakon zagrijavanja, tikvice su ohlađene na temperaturu fermentacije. Ukoliko se istraživao utjecaj dodatka hranjiva na aktivnost kvasca u ohlađenu kominu dodana je i sol za vrenje (0,5 g L⁻¹ prema preporuci proizvođača). Komine za fermentaciju koje su se nakon završene alkoholne fermentacije destilirale pripremljene su na isti način, pri istom omjeru rogača i vode i pri istim uvjetima ekstrakcije šećera, samo u većim volumenima. Naime, volumen kotla za destilaciju je 5 L pa je za fermentaciju bilo potrebno pripremiti 4 L komine.

3.2.2. Alkoholna fermentacija komine rogača

Nakon hlađenja pripremljenih komina, komine su inokulirane s kvascima te zatvorene vrelnjačama. Korištena su tri soja suhog aktivnog kvasca i to 0,075 g po tikvici (0,2-0,25 g L⁻¹ prema preporuci proizvođača). Tikvice su zatim izvagane radi očitavanja početne mase te su premještene u termostate na određenu temperaturu kako bi se provela fermentacija. Temperature fermentacija iznosile su 20 °C i 30 °C, te 25 °C za fermentaciju komina za destilaciju. Uz tikvice za fermentaciju, u termostat su stavljene i dvije tikvice s vodom. Promjene njihovih masa tijekom vremena predstavljaju gubitak mase komine uslijed hlapljenja i služe za korekciju mase izgubljenog CO₂ u fermentacijskim tikvicama. Naime, tijekom alkoholne fermentacije praćen je gubitkom sintetiziranog CO₂. U određenim vremenskim intervalima bilježena je masa fermentacijskih i kontrolnih tikvica (za vrijeme trajanja burne fermentacije dva puta dnevno, a zatim po jedan puta dnevno). Masa komine u Erlenmeyerovim tikvicama se smanjivala uslijed gubitka CO₂, nusprodukta alkoholne fermentacije preko kojega je na ovaj način praćena dinamika nastajanja etanola, glavnog produkta alkoholne fermentacije, odnosno aktivnost različitih sojeva kvasca. Cijela priprema je naknadno ponovljena jedan puta kako bi imali paralelu.

Fermentacija je prekinuta kada je masa tikvica bila jednaka tri dana zaredom.

Numerički izračun proveden je prema Petravić – Tominac i sur., (2013).

Nastali CO₂ se računa prema sljedećem izrazu:

$$m = m_1 - m_2 \quad (1)$$

m – masa CO₂ (g)

m₁ – razlika mase između dva mjerenja fermentacijskih tikvica (g)

m₂ – razlika mase između dva mjerenja kontrolnih tikvica s vodom (g)

Nastali CO₂ u određenom vremenskom periodu računa se prema sljedećem izrazu:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{\Delta m}{V \times \Delta t} \quad (2)$$

dCO₂/dt – brzina nastajanja CO₂ (gL⁻¹dan⁻¹)

Δm – masa CO₂ nastala u vremenskom intervalu Δt (g)

Δt – vremenski interval između dva mjerenja (dani ili sati)

V- volumen medija (L)

3.2.3. Destilacija prevrele komine rogača

Za potrebe destilacije prevrele komine korišten je laboratorijski kotao za destilaciju volumena 5 L. Provedena je dvokratna destilacija. U prvoj destilaciji odvojen je sirovi destilat. Destilat je sakupljan dok koncentracija destilata na izlazu nije bila oko 3-5 % volvol⁻¹. Od 4 L prevrele komine u kojoj je koncentracija alkohola bila oko 5,5 % volvol⁻¹ dobiveno je oko 800 mL sirovog destilata jačine oko 23 % volvol⁻¹. Kako bi bilo moguće provesti drugu destilaciju, da bi se dobilo dovoljno sirovog destilata, provedene su dvije ovakve destilacije za svaki uzorak. Sirovi destilati su spojeni (ukupno oko 1600 mL) i ponovno redestilirani uz izdvajanje frakcija. Odvojen je prvijenac (8 mL), srce 1 i srce 2. Prvijenac je odvojen na početku u volumenu od 8 mL, što čini

0,5 % sirovog destilata. Destilati srca hvatani su uz pomoć denzimetrijskog alkoholmetra. Frakcija srca 1 hvatana je do 40 % volumnog udjela alkohola na izlazu, a frakcija srca 2 do 30 % jačine na izlazu (Tablice 5 i 6)

Tablica 5. Opis frakcija destilata dobivenih destilacijom prevrele komine rogača s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgnunder* – bez soli za vrenje, temperatura fermentacije 25 °C

Tok	Frakcija	Udio alkohola (%)	Volumen destilata (mL)
Prvijenac	1	-	8
Srce	1	62	470
	2	34	65

Tablica 6. Opis frakcija destilata dobivenih destilacijom prevrele komine rogača s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgnunder* - sa solima za vrenje, temperatura fermentacije 25 °C

Tok	Frakcija	Udio alkohola (%)	Volumen destilata (mL)
Prvijenac	1	-	8
Srce	1	62	540
	2	34	31

Dozrijevanje destilata

Nakon provedene destilacije, frakcije srca 1 i srca 2 premještene su u staklene boce kako bi odležale dva mjeseca na sobnoj temperaturi. Pritom dolazi do stabilizacije aroma koje su bitne radi analize plinskom kromatografijom.

3.2.4. Određivanje udjela alkohola po Martin – Dietrechu

Uzorci za određivanje alkohola uzeti su iz prevrelih komina nakon završenih fermentacija. Metoda se temelji na oksidaciji alkohola u octenu kiselinu. U prisutnosti sulfatne kiseline i kalijevog bikromata alkohol prelazi u octenu kiselinu koja je u tim uvjetima stabilna i ne oksidira dalje. Zaostali kalijev bikromat uz dodatak kalijevog jodida izlučuje elementarni jod. Koristeći natrijev tiosulfat kao titrant, elementarni jod se uz dodatak škrobra titrira do promjene boje.

U Erlenmeyerovu tikvicu s ventilom od 2 L dodana je destilirana voda u količini dovoljnoj da prekrije uronjenu epruvetu. Tikvica je zatim postavljena na tronožac te je plamenikom zagrijavana i održavana na temperaturi vrelišta vode. U epruvetu za uzorak dodano je 10 mL alkalne vode i 1 mL prethodno razrijeđenog uzorka (10:1,5). Na stalaku s hvataljkama postavljena je trbušasta epruveta u koju je dodano 20 mL otopine kalijeva bikromata. Epruveta s uzorkom je zatim uronjena u Erlenmeyerovu tikvicu s ventilom te je mostom spojena s otopinom kalijeva bikromata u trbušastoj pipeti. Etanol se zatim preko mosta ukapljuje i oksidira u otopini kalijeva bikromata što se promatra po promjeni boje otopine. Nakon promjene boje otopine, uzorak je ostavljen još par minuta kako bi se osiguralo da je sav etanol ispario i oksidirao u octenu kiselinu u otopini kalijeva bikromata. Sadržaj u trbušastoj epruveta zatim je prebačen u Erlenmeyerovu tikvicu od 200 mL. Zaostali sadržaj je također ispran s destiliranom vodom i vraćen u Erlenmeyerovu tikvicu od 200 mL. Vruće tikvice su zatim ohlađene na sobnu temperaturu kako bi se mogla provesti titracija. Kao indikator u tikvice je dodano 1 mL otopine škroba i kalijev jodid vrškom špatule. Otopina je zatim titrana natrijevim tiosulfatom do pojave bistre svjetlozelene boje.

Udio alkohola u otopini računa se prema sljedećoj formuli:

$$EtOH (\%) = \frac{V_1 - V_2 * f}{V (uzorka)} * r \quad (3)$$

V_1 - volumen potrošenog natrijeva tiosulfata za slijepu probu

V_2 - volumen potrošenog natrijeva tiosulfata za uzorak

f - faktor (0,146)

r – razrjeđenje

Uz poznate koncentracije etanola i šećera, udio fermentiranih šećera (4) i stupanj konverzije (5) prikazani u raspravi izračunati su prema sljedećim formulama:

$$w_{\text{š}} = \frac{S_0 - S}{S_0} * 100 \quad (4)$$

$$Y_{P/S} = \frac{Y_P}{S_0 - S} \quad (5)$$

$Y_{P/S}$ - koeficijent ili stupanj konverzije osnovnog supstrata (izvor C) u proizvod ($g g^{-1}$ ili $kg kg^{-1}$)

Y_P – prinos proizvoda ($g L^{-1}$ ili $kg m^{-3}$)

S - količina supstrata na kraju procesa ($g L^{-1}$ ili $kg m^{-3}$)

S_0 – količina supstrata na početku procesa ($g L^{-1}$ ili $kg m^{-3}$)

$w_{\text{š}}$ – udio fermentiranih šećera (%)

3.2.5. Određivanje koncentracije šećera i alkohola visokotlačnom tekućinskom kromatografijom u komini i prefermentiranim kominama rogača

- Priprema otopine standarda

Standardi određenih koncentracija saharoze, glukoze, fruktoze, etanola, glicerola, mliječne, octene i mravlje kiseline priređeni su razrjeđivanjem originalnog analitičkog standarda pojedinog spoja. Provedena je kromatografska analiza uz korištenje RI detektora. Iz ovisnosti površine ispod pikova o masenoj koncentraciji standarda nacrtani su baždarni pravci i izračunate pripadajuće jednadžbe pravaca za svaki pojedini spoj.

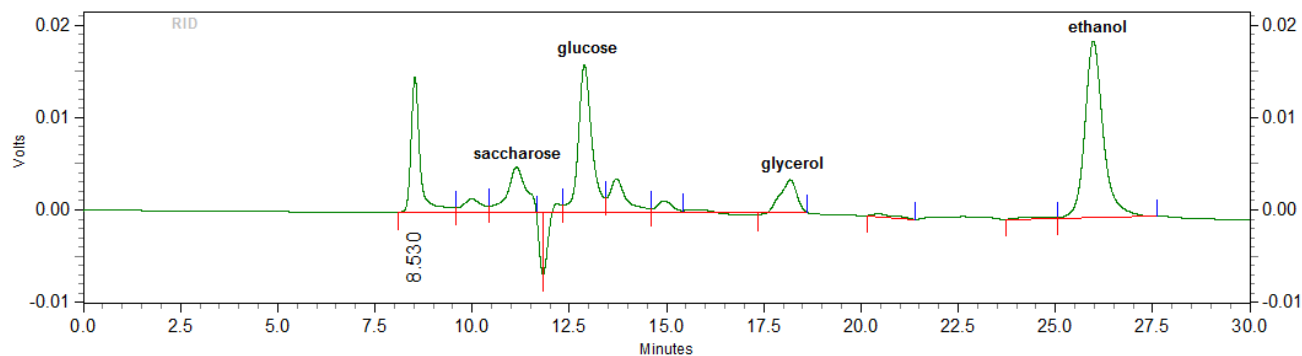
Prethodna obrada uzoraka prije analize je neophodna da bi se postigla ekstrakcija produkata alkoholne fermentacije te da bi se iz uzoraka uklonili proteini. Taloženje proteina provedeno je pomoću Carrez 1 i Carrez 2 otopine (Lefebvre i sur, 2002).

- Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija

High pressure liquid chromatography (visoko djelotvorna tekućinska kromatografija, HPLC) je jedna od najzastupljenijih instrumentalnih metoda u laboratorijima. Svrha HPLC-a je detektiranje i kvantifikacija različitih spojeva u hrani te u drugim sustavima. Princip rada HPLC uređaja temeljen je na obliku tekuće kromatografije gdje su komponente analize odvojene prema svojoj topljivosti u odnosu na mobilnu i stacionarnu. Osnovne komponente uređaja čine: mobilna faza, pumpa, injektor, stacionarna faza (kolona), detektor i sustav za obradu podataka (računalo) (Bélangier i sur., 1997). Preko računala podaci se ispisuju u obliku kromatograma (slika 6). Kromatogram je grafički prikaz ovisnosti koncentracija komponenti o vremenu njihovog izlaska iz kolone (Marković, 2017). Koncentracije šećera i alkohola određivane su na HPLC uređaju CLASS-VP LC-10A VP (Shimadzu, Kyoto, Japan). Identifikacija supstrata i produkata alkoholne fermentacije provedena je na temelju retencijskih vremena razdvojenih spojeva i standarda (tablica 7). Kvantitativne vrijednosti pojedinačnih spojeva izračunate su iz jednažbe baždarnih pravaca. Koncentracije su izražene u mgL^{-1} .

Kromatografski uvjeti za određivanje supstrata i produkata alkoholne fermentacije:

Kolona: Supelcogel™ C-610 H, 300 × 6,5 mm
Prekolona: Supelguard™ H
Pokretna faza: 0,1 % (vol/vol) H₃PO₄ (protok 0,5 ml min⁻¹)
Eluiranje: izokratno
Detektor: RI (detektor refraktivnog indeksa)
Temperatura kolone: 30 °C
Vrijeme trajanja: 30 min
Injektirani volumen: 20 μL



Slika 6. Principijelni HPLC kromatogram uzorka prefementirane komine rogača

Tablica 7. Retencijska vremena standarada i pripadajuće jednadžbe baždarnih pravaca na navedenoj koloni i pri navedenim uvjetima kromatografije

Standard	Retencijsko vrijeme (min)	Jednadžba baždarnog pravca
Saharoza	11,5	$y = 317507x - 5835,9$ $R^2 = 0,9997$
Glukoza	13,4	$y = 376026x - 16864$ $R^2 = 0,9995$
Fruktoza	14,6	$y = 387873x + 8691,4$ $R^2 = 0,9989$
Glicerol	18,1	$y = 321893x + 39156$ $R^2 = 0,9971$
Mravlja kiselina	18,7	$y = 98667x + 4671,5$ $R^2 = 0,9994$
Octena kiselina	20,3	$y = 163855x + 8176,2$ $R^2 = 0,9995$
Etanol	25,9	$y = 154691x - 2350,4$ $R^2 = 0,9994$

3.2.6. Određivanje hlapivih aroma spojeva kominama plinskom kromatografijom

Hlapive komponente u fermentiranim kominama rogača određivane su pomoću plinskog kromatografa Perkin Elmer Autosystems XL GC opremljenog s plameno-ionizacijskim detektorom (FID) Perkin-Elmer, SAD i sustavom za uzimanje uzoraka Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL, SAD.

- Priprema uzoraka

U HSS vialu otpipetirano je 10 mL uzorka za analizu i 1 μ L internog standarda (1-butanol). Viale su zatvorene čepovima sa silikonskom septom te stavljene u autosampler. Uzorak je zagrijavan na 80 °C tijekom 20 min kako bi došlo do isparavanja hlapivih spojeva, koji su potom prebačeni u injektor plinskog kromatografa. Vrijeme injektiranja iznosilo je 0,05 min, a temperatura igle i „transfer line-a“ bila je 100°C odnosno 110 °C. Kao mobilna faza korišten je helij pod tlakom od 25 psi (172369 Pa). Kromatografska analiza provedena je na kapilarnoj koloni ZB-5MS (Zebron, Phenomenex) duljine 60 m, promjera 0,25 mm s debljinom stacionarne faze 0,50 μ m prema temperaturnom programu: 5 min na 35°C, 2 min na 60°C te 7 min na 180°C. Brzina zagrijavanja između navedenih temperatura iznosila je 10°C/min. Za detekciju je korišten FID (Flame Ionization Detector) detektor čija je temperatura iznosila 250°C.

- Identifikacija i kvantifikacija spojeva

Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih ispitivanih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenom zadržavanja standarda (tablica 8). Kvantifikacija hlapivih spojeva provedena je računalnom analizom podataka dobivenih nakon kromatografske analize pomoću metode internog standarda. Kvantitativne vrijednosti pojedinačnih ispitivanih hlapivih spojeva izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca pripadajućih standarda.

Tablica 8. Retencijska vremena (*Rt*) određivanih hlapivih spojeva i internog standarda

	Spoj	Rt/min
1	acetaldehid	4,14
2	n-propanol	6,37
3	2-butanol	7,46
4	etil-acetat	7,71
5	2-metil-1-propanol	8,23
6	1-butanol (IS)	9,51
7	3-metil-1-butanol	12,26
8	2-metil-1-butanol	12,43
9	etil-butirat	14,49
10	izoamil-acetat	16,80
11	etil-heksanoat	19,95
12	etil-oktanoat	24,24
13	etil-oktanoat	24,25

3.2.7. Određivanje profila aroma spojeva destilata rogača plinskom kromatografijom s masenim detektorom

- Priprema uzoraka – mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)

Uzorci destilata prije mikroekstrakcije na čvrstoj fazi razrijeđeni su destiliranom vodom na 4 % vol etanola. Odvagnu je 2 g NaCl u HSS bočicu te je dodano 8 mL razrijeđenog uzorka. HSS bočica je zatim zatvorena čepom sa silikonskom septom te je ostavljena u termobloku na zagrijavanju kroz 10 min na 60 °C. Nakon toga se kroz septu uvodi DVB/CAR/PDMS vlakno i izlaže parama uzorka tijekom 40 min na 60 °C uz konstantno miješanje pomoću magnetića. Tijekom ovog postupka dolazi do adsorpcije hlapivih spojeva iz uzorka na SPME vlakno. Nakon toga SPME vlakno preneseno je u injektor plinskog kromatografa gdje na 250 °C kroz 5 min dolazi do desorpcije hlapivih spojeva koji nošeni plinom nosiocem ulaze u kromatografski sustav. SPME vlakno je prije upotrebe kondicionirano prema uputama proizvođača (270 °C, 30 min).

- Uvjeti rada plinskog kromatografa (GC/MS):

- temperatura injektora: 250 °C
- temperatura detektora: 280 °C
- temperaturni program:
40 °C, 5 min → 160 °C, 4 °C/min → 240 °C, 10 °C/min, 3min
- plin nosioc: He
- protok plina nosioca: 1,5 mL/min
- 'Splitless mode' injektiranja

- Identifikacija aroma spojeva destilata rogača

Retencijska vremena pojedinih sastojaka (vrijeme u minutama između injektiranja i detektiranja pri izlasku iz kolone), pomoću kojih se kasnije identificirao pojedini sastojak, utvrđena su prilikom razvoja metode, injektiranjem model otopina različitih koncentracija te pojedinačnim injektiranjem pojedinog spoja. Identifikacija nepoznatih spojeva je provedena na način da su uspoređeni maseni spektri dobivenih pikova s poznatim pikovima pohranjenim u bazi („library“) uređaja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

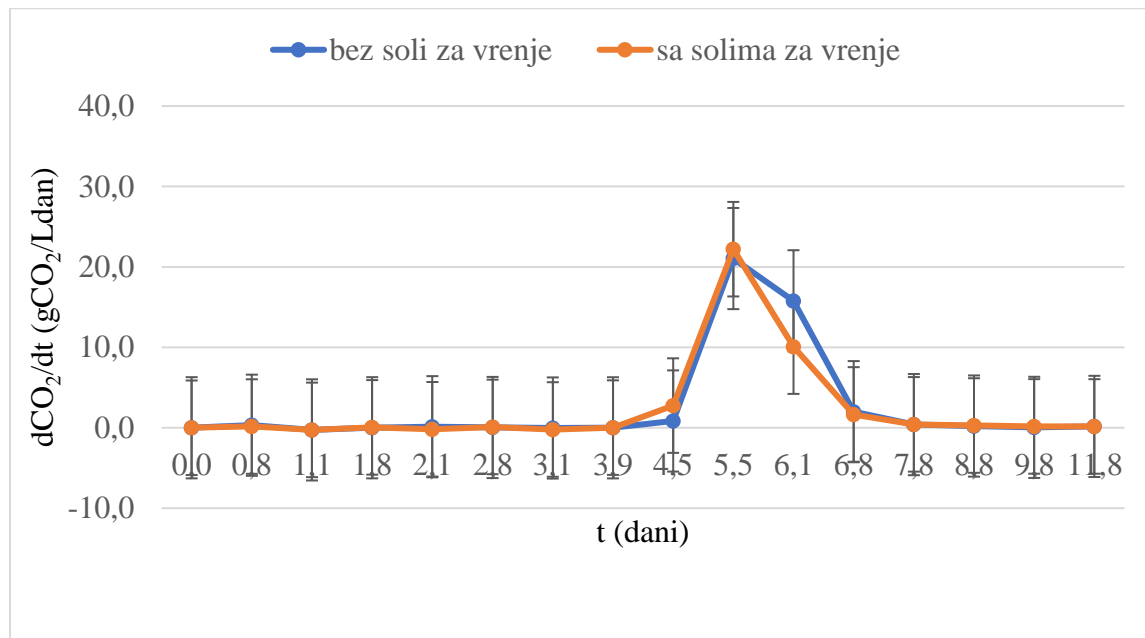
Prvi korak u proizvodnji voćnog destilata je priprema komine za fermentaciju. Za razliku od svježeg voća, kod brašna rogača kao sirovine prvo je potrebno provesti ukomljavanje i ekstrakciju šećera analogno proizvodnji alkohola iz suhih žitnih sirovina, ali bez enzimske hidrolize škroba budući da rogač sadrži fermentabilne šećere: saharozu, glukozu i fruktozu. Turhan i sur. (2010) izvijestili su da su optimalni uvjeti za ekstrakciju šećera iz rogača 80 °C, 2 h, pri omjeru rogač: voda 1:4, što daje oko 115,3 gL⁻¹ šećera. S druge strane Sánchez i suradnici (2010) ispitali su rogač kao sirovinu za proizvodnju bioetanol. Pokazali su da je gotovo kompletna vodena ekstrakcija šećera iz brašna rogača postignuta u kratkom vremenu (manje od 30 min) na sobnoj temperaturi. Uzimajući u obzir ove literaturne rezultate te da bi se izbjeglo visoko zagrijavanje komine prije fermentacije (zbog troškova energije) u ovom radu primijenjena je niža temperatura ekstrakcije 50 °C, 2 h i ukomljavanje u omjeru 1:4.

Kvasac ima glavnu ulogu u proizvodnji svih alkoholnih pića, a izbor odgovarajućeg soja kvasca ključan je ne samo za postizanje visokih koncentracija alkohola, već i za sintezu drugih metabolita kvasca koji osiguravaju prepoznatljivu aromu krajnjih proizvoda. Kvasac koji dominira u proizvodnji alkoholnih pića širom svijeta je *S. cerevisiae*. Na tržištu su dostupni brojni sojevi ovog kvasca i u prvom dijelu istraživanja u ovom radu ispitana je mogućnost korištenja komercijalno dostupnih sojeva u fermentaciji brašna rogača. Kako bi se istražilo sadrži li rogač dovoljno izvora dušika, vitamina i minerala, proučavan je i utjecaj dodatka hranjivih tvari na alkoholnu fermentaciju. Rezultati ovog dijela istraživanja su prikazani u poglavljima 4.1– 4.4.

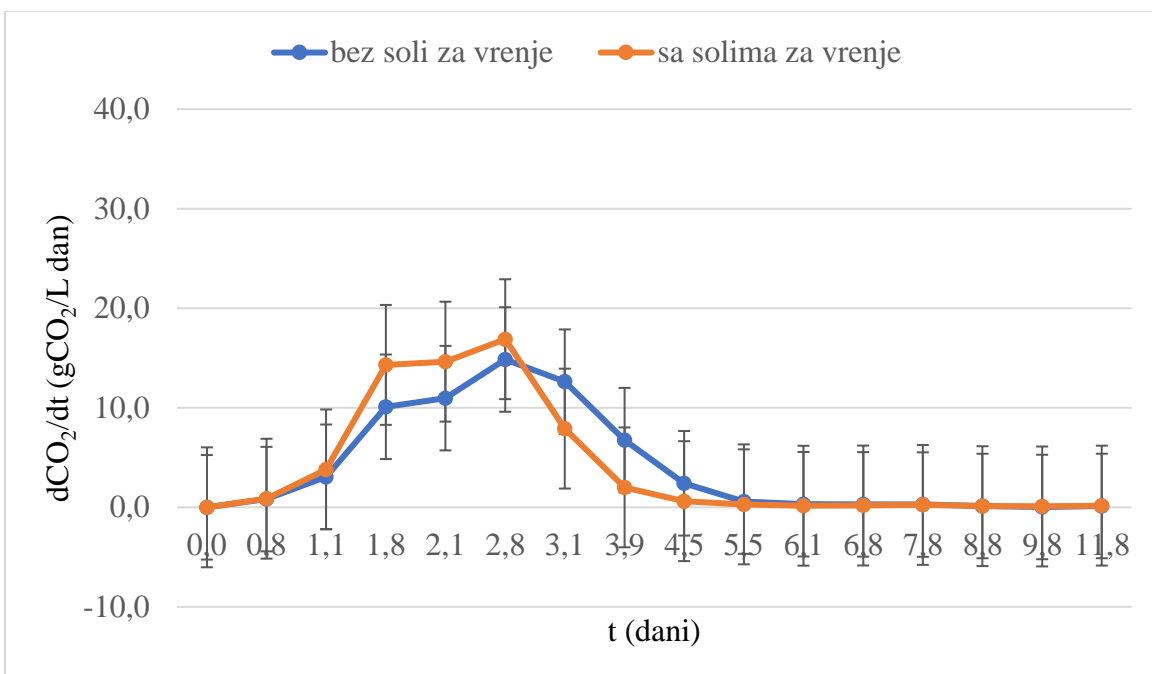
4.1. Fermentacijska aktivnost različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae* u komini rogača

Kao što je ranije opisano, fermentacija komine rogača provodila se u kontroliranim uvjetima pri temperaturi 20 °C i 30 °C, pomoću tri soja kvasca *S. cerevisiae* sa i bez dodatka soli za vrenje u kominu rogača. Cilj ovog dijela istraživanja je usporediti fermentacijsku aktivnost različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae* pri različitim temperaturama fermentacije.

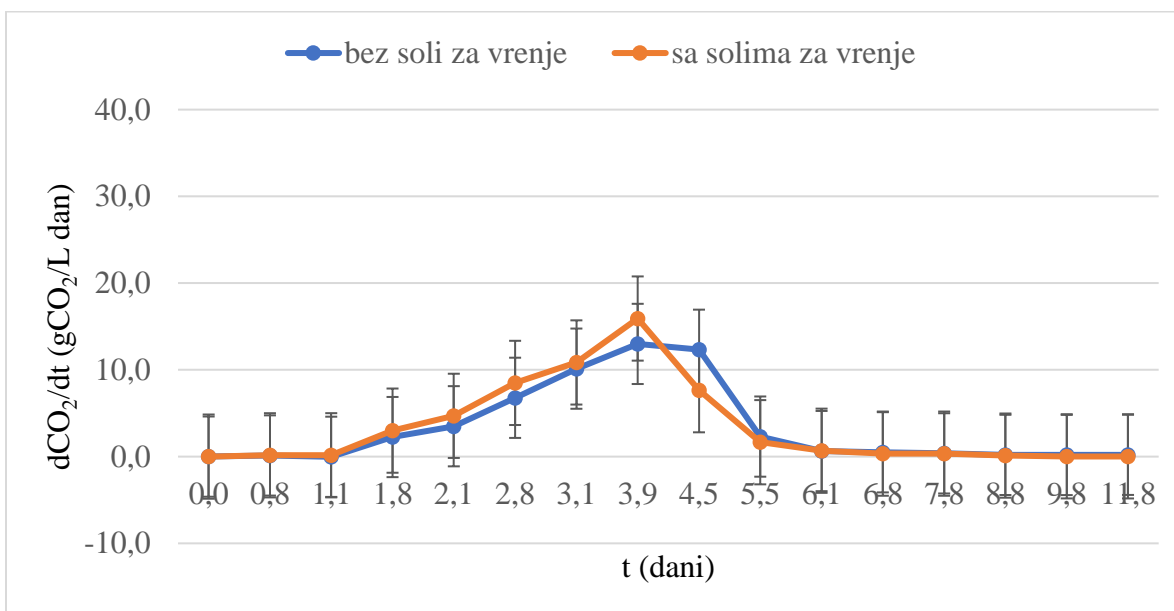
Dobiveni rezultati brzine nastajanja CO₂ za sve fermentacije prikazani su na slikama 7-13.



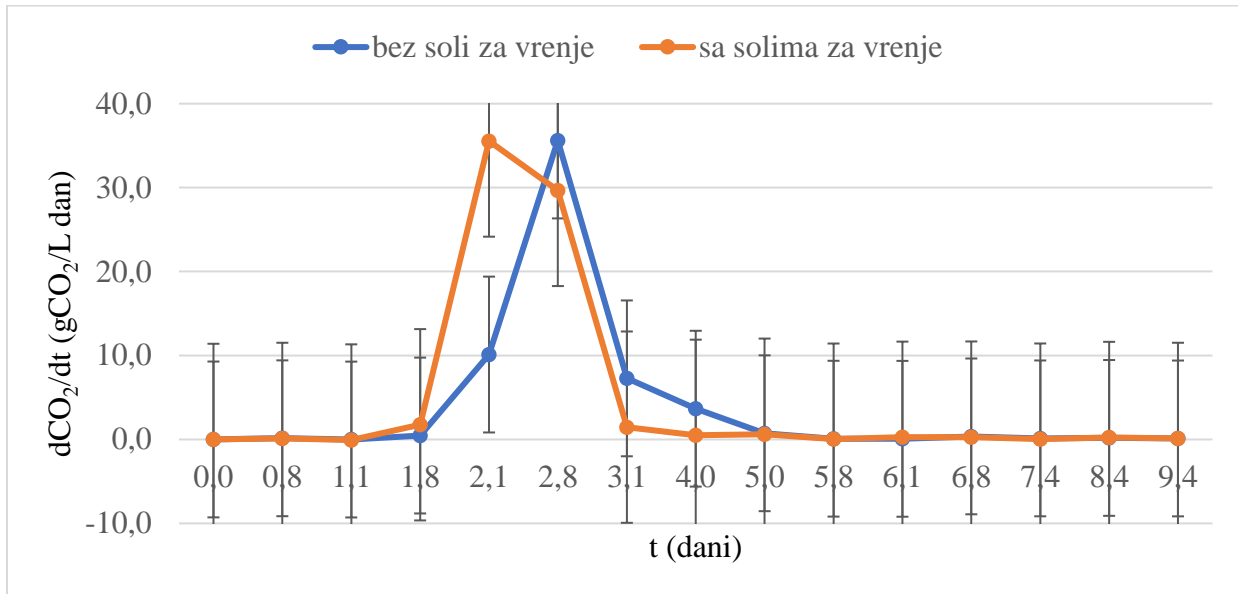
Slika 7. Brzina nastajanja CO₂ za kvasac *S. cerevisiae* var. *bayanus* sa i bez soli za vrenje pri temperaturi fermentacije 20 °C (n=2)



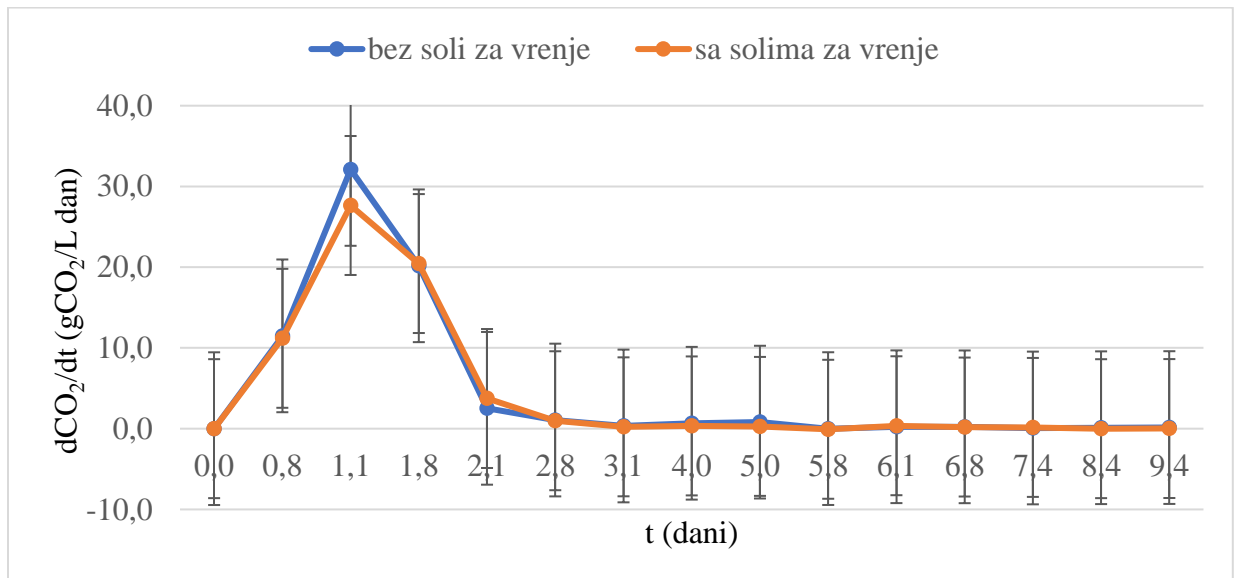
Slika 8. Brzina nastajanja CO₂ za kvasac *S. cerevisiae* var. *burgnunder* sa i bez soli za vrenje pri temperaturi fermentacije 20 °C (n=2)



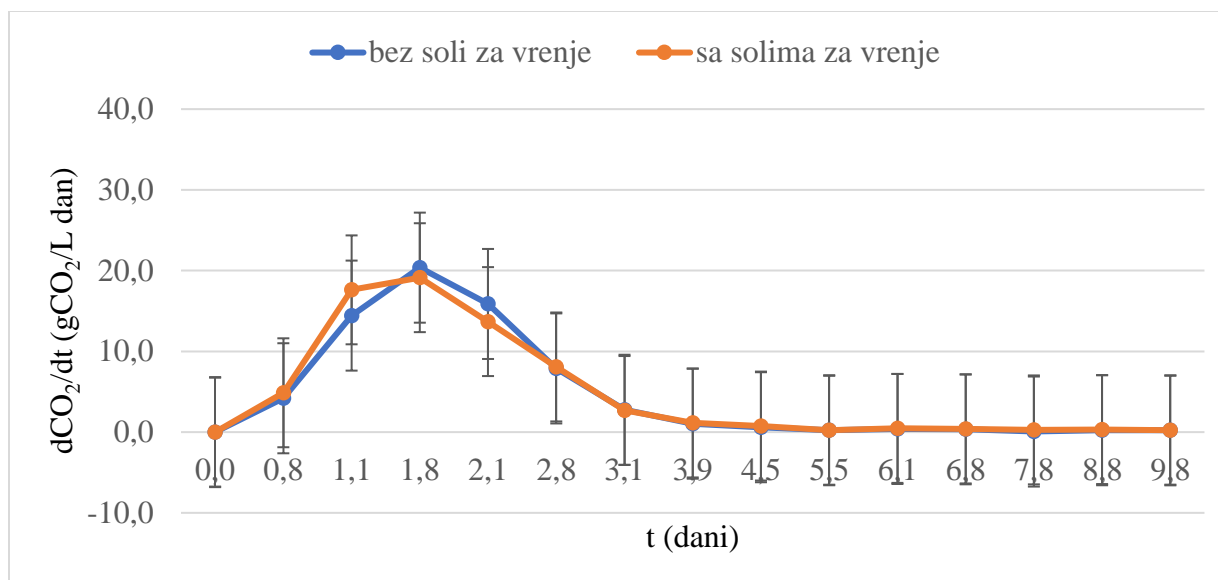
Slika 9. Brzina nastajanja CO₂ za kvasac *S. cerevisiae* sa i bez soli za vrenje pri temperaturi fermentacije 20 °C (n=2)



Slika 10. Brzina nastajanja CO₂ za kvasac *S. cerevisiae* var. bayanus sa i bez soli za vrenje pri temperaturi fermentacije 30 °C (n=2)



Slika 11. Brzina nastajanja CO₂ za kvasac *S. cerevisiae* var. burgnunder sa i bez soli za vrenje pri temperaturi fermentacije 30 °C (n=2)



Slika 12. Brzina nastajanja CO₂ za kvasac *S. cerevisiae* sa i bez soli za vrenje pri temperaturi fermentacije 30 °C (n=2)

Usporedbom rezultata prikazanih slikama 7-9, za fermentacije pri 20 °C, može se vidjeti da je kvasac *S. cerevisiae* var. *burgnunder* imao najkraću lag fazu te je shodno tome prvi započeo burnu fermentaciju na isti dan kada su komine inokulirane. *S. cerevisiae* je imao najdužu lag fazu te je svoju burnu fermentaciju dostigao tek peti dan nakon inokulacije. Usporedbom rezultata prikazanih slikama 10-12, za fermentacije pri 30 °C, pokazalo se da su kvasci *S. cerevisiae* var. *burgnunder* i *S. cerevisiae* započeli burnu fermentaciju isti dan kada su komine inokulirane dok je kvasac *S. cerevisiae* var. *bayanus* svoju burnu fermentaciju dostigao drugi dan nakon inokulacije. Zajednički gledano, viša temperatura je pogodovala kraćoj lag fazi. Sličan primjer utjecaja temperature na rast kvasca navode i Torija i sur. (2003) koji su proučavali niz sojeva kvasca *S. cerevisiae* za fermentaciju vina te su zabilježili kraću lag fazu i veće brzine oslobođenog CO₂ L⁻¹dan⁻¹, odnosno proizvedenog etanola pri temperaturi od 30 °C u odnosu na temperaturu od 20 °C. Također, kvasci koji su fermentirali pri 30 °C pokazali su veću aktivnost nego kvasci koji su fermentirali pri 20 °C. Razlog tome je utjecaj temperature na enzimsku aktivnost pri čemu se kod kvasca najveća aktivnost očituje na 30 °C. (Reddy i sur., 2011). Jasni prikaz takve aktivnosti vidljiv je pri temperaturi od 20 °C gdje kvasci pokazuju duži period burne fermentacije (otprilike 4 do 6 dana), dok kod kvasca pri 30 °C taj je period puno kraći (oko 2 dana).

Razlika u aktivnosti kod različitih temperatura očituje se i u maksimalnim brzinama nastalog CO₂. Kvasac *S. cerevisiae* var. *bayanus* pokazao je najveću brzinu od 35,86 g CO₂ L⁻¹dan⁻¹ pri temperaturi fermentacije od 30°C te znatno niže, 22,20 g CO₂ L⁻¹dan⁻¹ pri temperaturi fermentacije od 20°C. Isti trend manje maksimalne brzine nastajanja CO₂ zabilježen je i za druga dva korištena soja kvasca pri fermentaciji na različitim temperaturama. Petravić-Tominac i sur. (2013) također su promatrali brzinu nastajanja CO₂ tijekom fermentacije kupinovog vina pri 23°C uz korištenje dva različita kvasca. Maksimalne brzine nastalog CO₂ kretale su se do 25,77 g CO₂ L⁻¹dan⁻¹ za kvasac Fermol Mediterranéé te 20,37 g CO₂ L⁻¹dan⁻¹ za kvasac Fermol Rouge. Navedene brzine oslobađanja CO₂ postignute su treći dan za kvasac Fermol Mediterranéé te četvrti dan za kvasac Fermol Rouge što se može usporediti s rezultatima dobivenim u ovom radu.

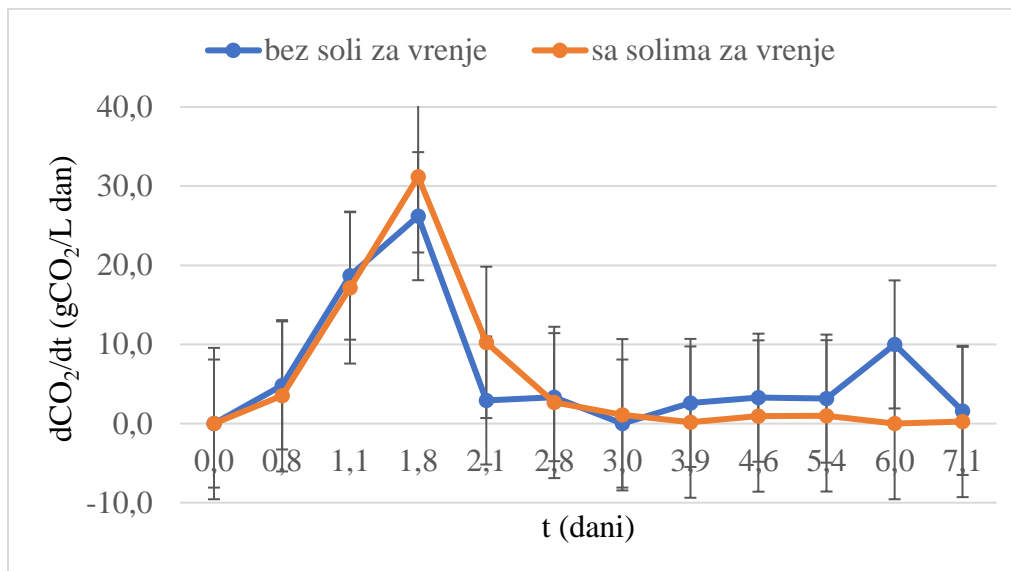
Rezultati prikazani slikama 7-12 pokazuju da nema statistički značajne razlike između brzina nastalog CO₂ kod fermentacija komine rogača koje su provedene sa solima za vrenje i bez soli za vrenje. Razlog tome je rogač, odnosno rogačevo brašno koje je prirodno pogodno za fermentaciju zbog toga što sadrži sve potrebne sastojke za rast kvasaca (osim vode). U rogačevu brašnu osim šećera, proteina i masti prisutni su Fe, Ca, Na, K, P i S kao potrebni elementi za rast kvasaca i vitamini E, D, C, niacin, B6 i folna kiselina kao faktori rasta (Youssef i sur., 2013). Roukas i sur. (1994) su također potvrdili da dodavanjem hranjiva u kominu rogača nije došlo do povećanja sinteze g EtOH L⁻¹dan⁻¹, odnosno g CO₂ L⁻¹dan⁻¹.

Sumarno gledano rezultate za aktivnost korištenih kvasaca (Slike 7-12), kvasac *S. cerevisiae* var. *bayanus* pokazao je najveću brzinu fermentacije pri obje temperature, ali i vrlo dugu fazu prilagodbe. Kvasac *S. cerevisiae* var. *burgunder* pokazao je pri obje temperature fermentacije, i neovisno o dodatku soli za vrenje, najkraću fazu prilagodbe te time i najkraće vrijeme fermentacije u odnosu na druge kvasce. Pored toga, ovaj kvasac pokazao je zadovoljavajuću aktivnost, odnosno brzinu proizvodnje CO₂. Uzimajući u obzir dobivene rezultate za proizvodnju rakije od rogača odabran je kvasac *S. cerevisiae* var. *burgunder*.

Nakon početnih fermentacija u kojima je cilj bio istražiti koji kvasac pokazuje najbolju aktivnost, pripremljena je komina za fermentaciju s kvascem *S. cerevisiae* var. *burgunder*, ali u većem volumenu komine kako bi se kasnije mogla dobiti dovoljna količina destilata za daljnju analizu. Komine su fermentirane na temperaturi od 25 °C, budući da po uputama proizvođača optimalna temperatura fermentacije *S. cerevisiae* var. *burgunder* iznosi od 23-26 °C, a to je i uobičajena

temperatura okoline u ranu jesen kada rogač dozrijeva. Iako, mora se napomenuti da osušene mahune rogača imaju dugi rok trajanja i mogu se koristiti za fermentaciju tijekom cijele godine, za razliku od sezonskog svježeg voća koje se koristi za proizvodnju rakije (šljive, kruške, jabuke, grožđe) pa je ovo jedna od dobrih karakteristika u odabiru rogača kao sirovine za proizvodnju rakije.

Na slici 13 prikazana je brzina nastajanja CO₂ za odabrani kvasac *S. cerevisiae* var. *burgunder*.



Slika 13. Brzina nastajanja CO₂ za kvasac *S. cerevisiae* var. *burgunder* sa i bez soli za vrenje pri temperaturi fermentacije 25 °C (n=4)

Uspoređujući rezultate brzine sinteze CO₂ za komine fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* na različitim temperaturama (slike 8, 11, 13) te sa i bez dodatka soli za vrenje primjećeno je da nema statistički značajne razlike između dobivenih vrijednosti g CO₂ L⁻¹ dan⁻¹ za kvasce sa i bez dodanih soli za vrenje. Nadalje, pri fermentaciji na 25 °C i 30 °C nema lag faze te burna fermentacija započinje inokulacijom, dok pri 20 °C lag faza traje manje od jednog dana. Jednako tako, brzina sinteze CO₂ najveća je pri temperaturi od 30 °C za kvasac bez dodanih soli za vrenje te iznosi 32,10 g CO₂ L⁻¹ dan.

4.2. Volumni udjeli etanola u preferemntiranim kominama rogača

Volumni udjeli etanola u preferemntiranim kominama rogača određeni su metodom po Martin - Dietrichu, a dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 9 i 10.

Tablica 9. Volumni udio etanola u prefermentiranim kominama rogača fermentiranih s pomoću različitih sojeva kvasca, sa (+) i bez dodatka soli za vrenje (-) u kominu rogača, na temperaturi fermentacije 20 °C i 30 °C

Kvasac	Soli za vrenje	Etanol (% volvol ⁻¹)	
		20 °C	30 °C
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	-	4,80	4,67
	+	4,80	4,52
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>burgunder</i>	-	4,80	4,75
	+	5,18	4,59
<i>S. cerevisiae</i>	-	4,75	4,23
	+	4,52	4,45
<i>t test</i> (temperatura 20°C/30°C) on-line test https://www.graphpad.com	P = 0,0380		
<i>t test</i> (dodatak soli) on-line test https://www.graphpad.com	P = 0,9458		

Tablica 10. Volumni udio etanola u prefermentiranim kominama rogača fermentiranih s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder*, sa (+) i bez dodatka soli za vrenje (-) u kominu rogača, na temperaturi 25 °C (n=4)

Kvasac	Soli za vrenje	Etanol (% volvol ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i> <i>burgunder</i> tip	-	4,94±0,42
	+	5,42±0,67

U prefermentiranim kominama rogača udio etanola (% volvol⁻¹) kretao se između 4,23-5,42 (tablice 9 i 10). Signifikantno veći postotak etanola uočen je kod fermentacija pri 20 °C, nego li kod fermentacija pri 30 °C, dok je najveći postotak etanola zabilježen pri 25 °C za *S. cerevisiae* var. *burgunder*. Utjecaj temperature na sintezu etanola pri fermentaciji rogačeve pulpe istraživan je u radu Rokuas i sur. (1993). Za potrebe istraživanja korišten je kvasac *S. cerevisiae* pri fermentacijskim temperaturama od 25 °C, 30 °C, 35 °C i 40 °C te nasuprot rezultatima u ovom radu, najveće vrijednosti volumena etanola postignute su pri 30 °C. Slično tome, u radu Fakruddin i sur. (2012), proučavan je utjecaj temperature na sintezu etanola pri fermentaciji melase uz uporabu *S. cerevisiae* IFST-072011 kao radnog mikroorganizama. Pri temperaturama fermentacije od 28 °C, 30 °C i 37 °C, najveće vrijednosti etanola zabilježene su pri 30 °C. Drugačiji rezultati zabilježeni su kod Yah i sur. (2012), gdje su najveće vrijednosti etanola postignute pri temperaturi od 25 °C. Na sintezu etanola, odnosno njegov udio u mediju, ovisit će korišteni tip kvasca i njegova optimalna temperatura. U ovom radu, moguće je da je pri višoj temperaturi od 30 °C došlo do hlapljenja jednog dijela etanola iz komina rogača. U proizvodnji rakija, fermentacija voća se provodi pri nižim temperaturama upravo da bi se izbjeglo gubljenje etanola, ali i aroma. Nadalje, veći udjeli alkohola kod temperature od 20 °C mogu ukazat na dodatnu hidrolizu i oslobađanje šećera tijekom duže fermentacije pri 20 °C.

4.3. Određivanje šećera i fermentacijskih produkata u preferemntiranim kominama rogača

Po završetku fermentacije te u početnoj komini, šećeri i fermentacijski produkti određeni su visoko učinkovitom tekućinskom kromatografijom kako je opisano u poglavlju 3.2.5. Dobivene koncentracije šećera, stupanj konverzije i udio fermentiranih šećera prikazani su u tablicama (11-16).

Tablica 11. *Masene koncentracije šećera u početnoj komini - ekstraktu rogačevog brašna (n=2)*

Šećer	Koncentracija (gL ⁻¹)
Saharoza	68,09±1,19
Glukoza	24,66±0,52
Fruktoza	13,09±0,48
Ukupno	105,84±2,20

Kao najzastupljeniji šećer rogača, saharoza je u ekstraktu rogačevog brašna prisutna u najvećoj koncentraciji (Petkova i sur., 2017). Koncentracija glukoze je veća od fruktoze, no njihov omjer može varirati ovisno o sorti, podneblju ili metodi ekstrakcije. U radu Sánchez-Segado i sur. (2010) pokazalo se da je udio glukoze manji od udjela fruktoze u njihovom odabranom rogaču.

Tablica 12. Masene koncentracije šećera u prefermentiranim kominama rogača nakon provedene fermentacije s pomoću različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae*, pri temperaturi od 20 °C te sa (+) i bez dodatka soli za vrenje (-) u kominu

Kvasac	Soli za vrenje	Temperatura 20 °C	
		γ (g L^{-1})	
		saharoza	glukoza
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	-	5,12	12,34
	+	4,68	11,16
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>burgunder</i>	-	4,03	10,8
	+	4,74	12,01
<i>S. cerevisiae</i>	-	4,74	12,57
	+	5,35	13,16

Tablica 13. Udio fermentiranih šećera i stupanj konverzije za fermentacije s pomoću različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae*, pri temperaturi od 20 °C te sa (+) i bez dodatka soli za vrenje (-) u kominu

Kvasac	Soli za vrenje	Temperatura 20 °C			
		udio fermentiranih šećera (%)	$Y_S = S_0 - S$ (g L^{-1})	Y_P (g L^{-1})	Stupanj konverzije $Y_{P/S}$ (g g^{-1})
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	-	83,51	88,39	37,87	0,43
	+	85,03	90,00	37,87	0,42
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>burgunder</i>	-	85,98	91,01	37,87	0,42
	+	84,17	89,09	40,87	0,46
<i>S. cerevisiae</i>	-	83,64	88,52	37,48	0,42
	+	82,51	87,33	35,66	0,41

Tablica 14. Masene koncentracije šećera i alkohola u prefermentiranim kominama rogača nakon provedene fermentacije s pomoću različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae*, pri temperaturi od 30 °C te sa (+) i bez dodatka soli za vrenje (-) u kominu

Kvasac	Soli za vrenje	Temperatura 30 °C	
		γ (g L^{-1})	
		saharoza	glukoza
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	-	1,10	11,91
	+	3,63	12,07
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>burgunder</i>	-	1,32	11,82
	+	3,34	11,78
<i>S. cerevisiae</i>	-	4,02	12,82
	+	4,26	12,87

Tablica 15. Udio fermentiranih šećera i stupanj konverzije za fermentacije s pomoću različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae*, pri temperaturi od 30 °C te sa (+) i bez dodatka soli za vrenje (-) u kominu

Kvasac	Soli za vrenje	Temperatura 30 °C			
		udio fermentiranih šećera (%)	$Y_S = S_0 - S$ (g L^{-1})	Y_P (g L^{-1})	Stupanj konverzije $Y_{P/S}$ (g g^{-1})
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	-	87,72	92,84	36,85	0,40
	+	85,16	90,13	35,66	0,40
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>burgunder</i>	-	87,58	92,69	37,48	0,40
	+	85,71	90,72	36,22	0,40
<i>S. cerevisiae</i>	-	84,09	89,00	33,37	0,37
	+	83,81	88,70	35,11	0,40

Povišenjem temperature dolazi do veće aktivnosti kvasaca, čime se fermentira veća količina šećera. Sukladno tome, usporedbom tablica 12-15 zaostalo je više šećera pri temperaturi od 20 °C u odnosu na temperaturu od 30 °C te je time veći udio fermentiranih šećera pri višoj temperaturi. Najveći udio fermentiranih šećera (87,72%) zabilježen je kod komine fermentirane s *S. cerevisiae* var. *bayanus* pri 30 °C bez dodanih soli za vrenje, dok je najmanji (82,51%) zabilježen kod komine fermentirane sa *S. cerevisiae* pri 20 °C. Gledajući koncentracije šećera pojedinačno, primjećena je veća količinu zaostale glukoze nakon fermentacije. Takav rezultat nije bio očekivan zbog činjenice da kvasci primarno koriste glukozu kao izvor ugljika. U ovom radu nije se istražio razlog zašto je zaostala određena količina glukoze i saharoze u prefermentiranim kominama. Najvjerojatnije korištena metoda vaganja tikvica, odnosno bilježenja promjena masa uslijed gubitka CO₂ nije dovoljno precizna metoda u završnoj fazi tihe fermentacije, stoga je za pretpostaviti da tiha fermentacija nije niti završila. Naime, u termostatu dolazi do hlapljenja tekućine i u kontrolnim tikvicama i u fermentacijskim tikvicama i prividno nema promjene masa tikvica što znači kraj fermentacije. No, očito je promjena mase spora i premala kako bi se detektirala vaganjem tikvica na tehničkoj vagi. Preciznija analitička vaga nije mogla biti korištena zbog prevelike mase tikvica. Uspoređujući stupanj konverzije supstrata u produkt pri temperaturama od 20 °C i 30 °C pokazalo se da je pogodnija niža temperatura fermentacije. Naime, iako je fermentiralo više šećera pri višoj temperaturi, prinos etanola je na toj temperaturi nešto niži, najvjerojatnije zbog sinteze nekih drugih metabolita ili eventualno gubitka etanola uslijed hlapljenja pri višoj temperaturi.

Tablica 16. Masene koncentracije šećera i stupanj konverzije za fermentacije s pomoću kvasac *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25 °C, sa (+) i bez dodatka soli za vrenje (-) u kominu (n=4)

Promatrani parametri	Temperatura 25 °C	
	bez soli za vrenje	sa solima za vrenje
Saharoza (gL ⁻¹)	4,50±0,48	5,34±0,41
Glukoza (gL ⁻¹)	10,97±0,40	10,38±1,04
Etanol (gL ⁻¹)	39,60±1,67	43,71±3,11
udio fermentiranih šećera (%)	85,38±0,38	85,14±0,90
stupanj konverzije (gg ⁻¹)	0,44	0,49

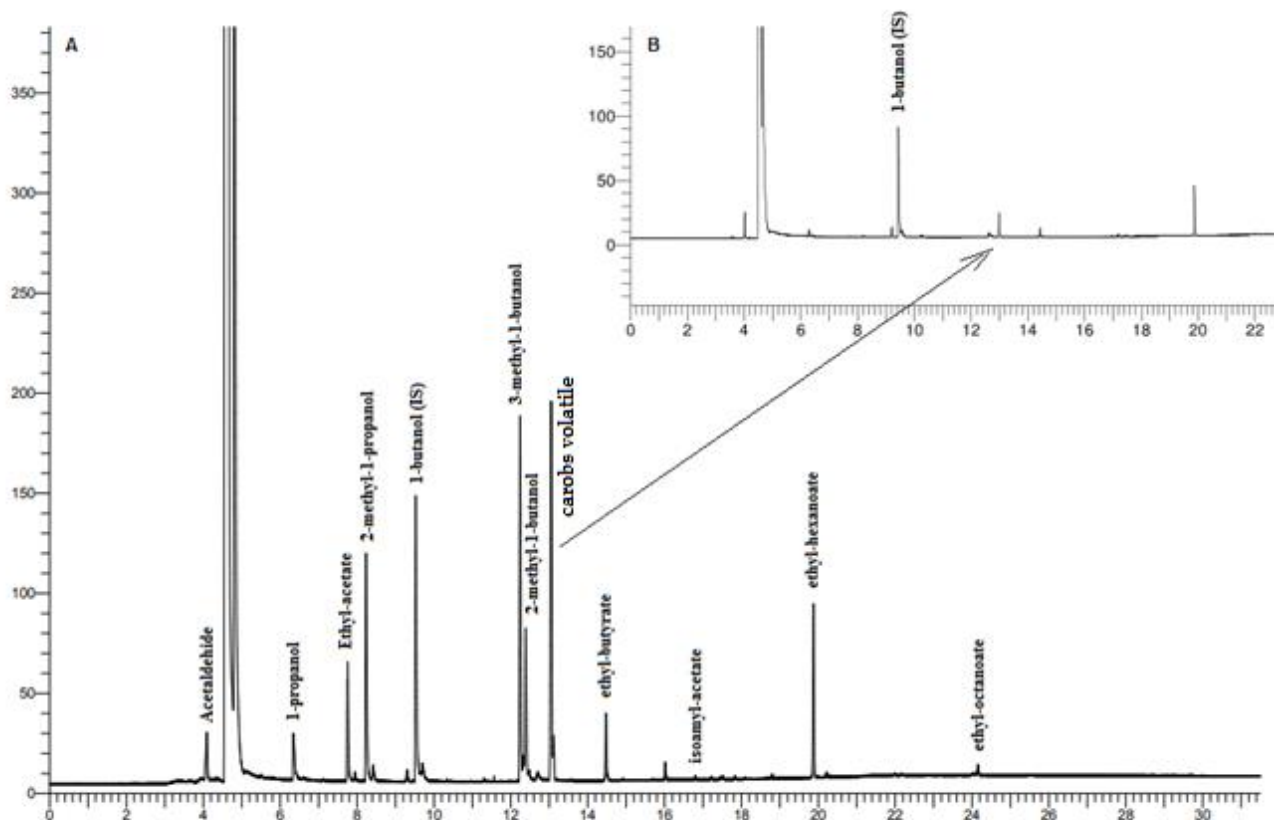
Kod komina fermentiranih uz pomoću odabranog kvasca *S. cerevisiae* var. *burgnunder* sa i bez dodatka soli za vrenje pri 25 °C ne postoji statistički značajna razlika u udjelu fermentiranih šećera te etanola, što dovodi do zaključka kako rogač sadrži dovoljnu količinu hranjiva za kvasce. Nadalje, vrijednosti stupnja konverzije za *S. cerevisiae* var. *burgnunder* pri 25 °C veća su u usporedbi s vrijednostima dobivenim pri fermentaciji na 20 °C i 30 °C. Razlog tome je primjenjena temperatura od 25 °C koju je proizvođač kvasca propisao kao optimalnu, čime se osigurava jedan od uvjeta kako bi kvasac ostvario najveću sintezu produkata tijekom fermentacije. Usporedbe radi, Turhan i sur. (2010) su također u svome radu proučavali fermentaciju rogačeva brašna, odnosno mogući stupnja konverzije i količinu dobivenog etanola. Koristili su bioreaktor za fermentaciju uz korekciju pH vrijednosti, a kao radni mikroorganizam upotrijebili su *S. cerevisiae* ATCC 36858. Fermentaciju su provodili pri temperaturi od 30 °C, pri čemu je utrošeno više od 94% fermentabilnih šećera te je postignut stupanj konverzije od 0,40-0,45 (g EtOH g⁻¹šećera). Slično tome, Germec i sur. (2015) su proučavali fermentaciju rogačeva brašna u reaktoru s biofilmom gdje su kao radni mikroorganizam koristili *S. cerevisiae* ATCC 36858. Fermentaciju su provodili pri temperaturi od 30 °C i različitim početnim koncentracijama šećera u ekstraktu rogačeva brašna. Jedna od tih koncentracija bila je 10° Brix (106,1 mgmL⁻¹), što je približno jednako početnoj koncentraciji šećera u ekstraktu rogačeva brašna u ovom radu. Stupanj konverzije dobiven pri toj početnoj koncentraciji šećera kretao se od 0,31-0,43 (g EtOH g⁻¹šećera). Takvi rezultati ne odudaraju od koeficijenata konverzije postignutih pomoću kvasaca koji su upotrebljeni za fermentacije u ovom radu (tablica 15). Također, Ercan i sur. (2013) zabilježili su preko 90 % utrošenih fermentabilnih šećera pri čemu je ostvaren stupanj konverzije od 0,46 (g EtOH g⁻¹šećera) u reaktoru s imobiliziranim biofilmom sa *S. cerevisiae* ATCC 36858 i pri temperaturi od 30 °C. Fermentacija rogača može se provesti i s bakterijom kao radnim organizmom (Vaheed i sur., 2010). U tom radu utrošeno je preko 90 % fermentabilnih šećera pri čemu je ostvaren stupanj konverzije od 0,37 (g EtOH g⁻¹ šećera) s pomoću bakterije *Zymomonas mobilis* pri temperaturi fermentacije od 30 °C.

4.4. Određivanje hlapivih spojeva u prefermentiranim kominama i brašnu od rogača

U ovom poglavlju opisani su hlapivi spojevi u prefermentiranim kominama rogača određeni plinskom kromatografijom. U radu su korištena trivijalna imena analiziranih hlapivih spojeva. U tablici 17 navedena je njihova nomenklatura po IUPAC-u (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Rezultati su prikazani tablicama 17-20 te slikom 14.

Tablica 17. Trivijalna imena spojeva dobivenih analizom prefermentiranih komina, njihova IUPAC nomenklatura i pripadajuća aroma

Trivijalno ime	Nomenklatura	Miris
Acetaldehid	Etanal	Jedak, sladak
Propanol	Propan-1-ol	Omamljujući miris
Etil acetat	Etil etanoat	Miris otapala
Izobutanol	2-metilpropan-1-ol	Alkoholni miris
Izoamil alkohol	3-metilbutan-1-ol	Sladni miris
2-butil alkohol	2-butanol	Alkoholni miris
Aktivni amilni alkohol	2-metilbutan-1-ol	Sladni miris
Etil butirat	Etil butanoat	Voćni, cvjetni miris
Izoamil acetat	3-metil-1-butil etanoat	Miris banane i kruške
Etil heksanoat	Etil heksanoat	Miris banane i jabuke



Slika 14. Glavni hlapivi produkti detektirani plinskom kromatografijom u prevreloj komini rogača fermentiranoj s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25 °C (A) i u početnoj komini rogača (B)

Glavni produkt fermentacije je etilni alkohol, no važnu ulogu u aromi čine mali, ali bitni udjeli ostalih hlapivih komponenti. Od prisutnih komponenti pri fermentaciji mogu nastati: aldehidi, ketoni, esteri, viši alkoholi itd. (Jung i sur., 2010).

Tablica 18. Masene koncentracije hlapivih spojeva određene u prefermentiranoj komini rogača fermentiranoj s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25°C sa (+) i bez dodatka soli za vrenje (-) u kominu (n=4)

Hlapivi spojevi γ (mgL ⁻¹)	soli za vrenje		T -test (p < 0,05)
	-	+	
1-propanol	36,05±6,50	33,51±5,83	0,22831
etil etanoat	12,13±3,46	19,67±2,45	0,03825
2-metil-1-propanol	97,91±23,65	81,17±25,81	0,49437
3-metil-1-butanol	74,77±9,14	68,87±9,89	0,28933
2-metil-1-butanol	38,18±5,16	31,46±5,77	0,17273
etil butanoat	3,267±0,37	2,92±0,94	0,54191
3-metil-1-butil etanoat	0,065±0,013	0,050±0,008	0,18169
etil heksanoat	3,06±0,31	4,33±1,06	0,04709

butan-2-ol i 2-fenil-etanol nisu detektirani; etil oktanoat ispod limita detekcije

Obradom rezultata dobivenih koncentracija hlapivih spojeva u prefermentiranim kominama, proučavan je utjecaj soli za vrenje na sintezu sekundarnih produkta fermentacije, odnosno u ovom slučaju viših alkohola i pojedinih estera. Primjećena je statistički značajna razlika kod kominama s dodanim i bez dodanih soli za vrenje za spojeve etil etanoat i etil heksanoat. Kod ostalih spojeva statistički značajna razlika nije zabilježena.

- Alkoholi

Od detektiranih viših alkohola prisutni su: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol i 3-metil-1-butanol. Viši alkoholi nastaju tijekom fermentacije deaminacijom i dekarboksilacijom aminokiselina. Kada se aminokiseline nalaze u suvišku, metabolizmom kvasca dolazi do njihove razgradnje tijekom fermentacije (Walker i Stewart, 2016).

Tablica 19. Masene koncentracije ukupnih viših alkohola u prefermentiranim kominama

Temperatura	Ukupni viši alkoholi (mgL ⁻¹)					
	20°C		25°C		30°C	
Soli za vrenje	-	+	-	+	-	+
<i>Saccharomyces c. var. bayanus</i>	195,1	146,5	/	/	207,0	189,1
<i>Saccharomyces c. burgunder</i> tip	219,7	170,4	246,90	215,02	224,1	182,3
<i>Saccharomyces c.</i>	170,4	147,6	/	/	176,6	130,1

Kada su koncentracije viših alkohola niže od 300 mgL⁻¹, kao što je slučaj kod svih prefementiranih komina čiji su rezultati prikazani u tablici 19, do izražaja dolaze poželjne voćne arome. Naspram toga, koncentracije od 400 mgL⁻¹ i više, dovode do negativnih utjecaja viših alkohola na aromu (Hirst i Richter, 2017). Usporedbe radi, Reddy i sur. (2011) su u svome radu također uspoređivali koncentracije viših alkohola u soku manga fermentiranom pri različitim temperaturama. Dobiveni rezultati prikazali su veće koncentracije viših alkohola pri većoj temperaturi, točnije rečeno, pri 15 °C izmjereno je 256 mgL⁻¹, dok je pri 30°C izmjereno 380 mgL⁻¹. Osim istraživanja Reddy i sur. 2011., više drugih autora je zabilježilo porast koncentracije ukupnih viših alkohola porastom temperature (Erten, 2002; Bardi i sur., 1997). Trend sinteze veće koncentracije viših alkohola pri višoj temperaturi primjećen je i kod prefermentiranih komina rogača ako uspoređujemo fermentaciju pri 20 °C i 30 °C. No, najveća koncentracija viših alkohola za kvasac *S. cerevisiae* var. *burgunder* primjećen je na njegovoj optimalnoj temperaturi fermentacije od 25 °C. Nastavno tome, niže koncentracije ukupnih alkohola zabilježene su kod prefermentiranih komina s dodanim soli za za vrenje u odnosu na komine bez dodanih soli za vrenje što se može povezati s promjenom metabolizma dušika uslijed dodatka diamonij fosfata.

- Esteri

Esteri nastaju kao nusprodukti fermentacije iz tri razloga (Belda i sur., 2017):

- a. manje toksični nego njihovi alkoholni i kiselinski prekursori (detoksikacijski mehanizam)
- b. privlače kukce jer služe kao mehanizam za rasprostranijvanje kvasaca
- c. služe pri mehanizmu regeneracije koenzima A

Esteri primarno nastaju reakcijom karboksilnih kiselina s alkoholom (Jia i sur., 2018). Od prisutnih estera detektiranih GC-FID instrumentalnom metodom, zabilježeni su: etil-acetat, etil-butirat, isoamil-acetat, etil-heksanoat. Povećanjem temperature fermentacije dolazi do sinteze većeg broja količina sekundarnih produkata, samim time i estera (Torija i sur. 2003).

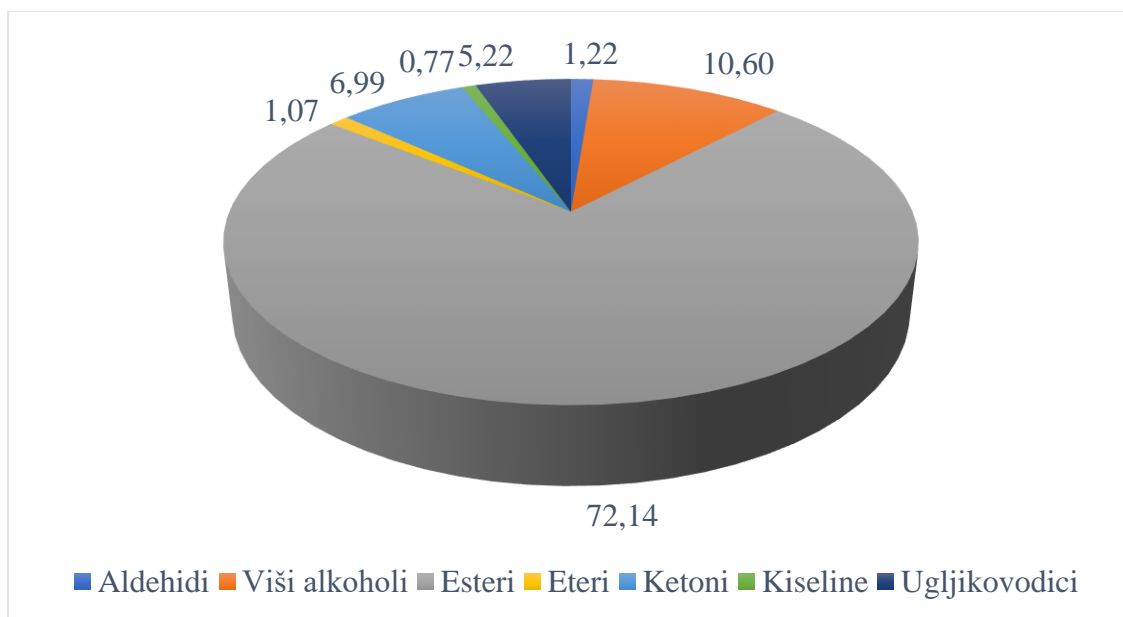
Tablica 20. *Masene koncentracije spojeva dobivenih plinskom kromatografijom ekstrakta rogačeva brašna, odnosno početne komine prije fermentacije*

Spojevi (mg L ⁻¹)	Rogač
acetaldehid	7,30
1-propanol	7,75
etil-acetat	-
2-metil-1-propanol	0,73
3-metil-1-butanol	0,63
2-metil-1-butanol	0,69
etil-butirat	0,56
isoamil-acetat	0,01
etil-heksanoat	2,28

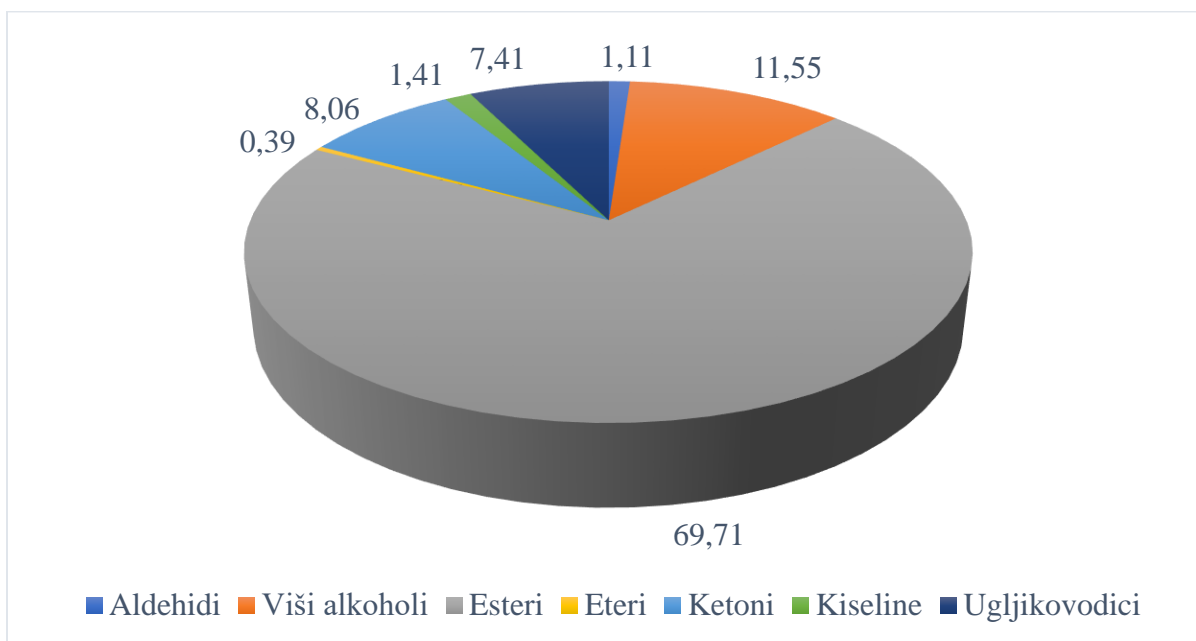
U rogačevom brašnu, prisutni svi spojevi koji su dobiveni u prefermentiranim kominama, osim etil acetata te u znatno nižim koncentracijama (tablica 20). Krokou i sur. (2019) su također pronašli spojeve acetaldehid, etil-acetat, etil-butirat i etil-heksanoat u rogačevu brašnu. Cantalejo (1997) je određivao hlapive spojevi GC-MS analizom u sirovom rogaču te je jednako kao i u tablici 20 detektirao 2-metil-1-propanol i etil butirat. Važno je napomenuti da je u svim prefermentiranim kominama detektiran spoj u 13. minuti koji u ovom radu nije identificiran, a pokazalo se da dolazi iz rogača kao sirovine (slika 14B)

4.5. Određivanje hlapivih komponenti u destilatima rogača

Destilat rogača je organoleptički karakteriziran spojevima arome, odnosno hlapivim komponentama, stoga je vrlo bitna provedba fermentacije u kontroliranim uvjetima kako ne bi došlo do pojave spojeva nepoželjnog mirisa i okusa kao što su: etil butirat, 2-butanol, aldehidi i pojedini karbonilni spojevi. Također, potrebno je provesti adekvatnu frakcijsku destilaciju kako bi se izdvojile hlapive komponente arome (López-Vázquez i sur, 2010). Sama detekcija aroma komponenata u destilatu je jedan od važnih koraka u ocjenjivanju, odnosno procjeni kvalitete rakije. Na aromu utječu različiti faktori kao što su: početna sirovina - sorta, vrijeme berbe, klimatske karakteristike godine te ostale varijable vezane uz proces proizvodnje (fermentacija, destilacija i odležavanje) (Hanousek Čiča i sur, 2017). Aroma komponente u rakiji od rogača određivane su SPME-GC/MS metodom u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25 °C sa i bez soli za vrenje, koje su prije analize odležale 2 mjeseca. U tablicama koje se nalaze u prilogu I i prilogu II prikazani su naziv spoja, faktor podudaranja, prisutnost u uzorku i maseni udio (%) za svaki detektirani spoj. Na slikama 15 i 16 prikazani su udjeli pojedinih spojeva u odnosu na organsku skupinu kojoj pripadaju za oba destilata, a na slikama 17-23 maseni udjeli najzastupljenijih spojeva u destilatu iz skupine estera, alkohola, aldehida i ketona te kiselina. Budući da su esteri i alkoholi najzastupljeniji spojevi u destilatima i da rezultati na slikama 15 i 16 ne pokazuju značajnu razliku u njihovim udjelima na slikama 17-23 prikazani su udjeli hlapivih komponenti u destilatu srce 1 bez dodanih soli za vrenje.

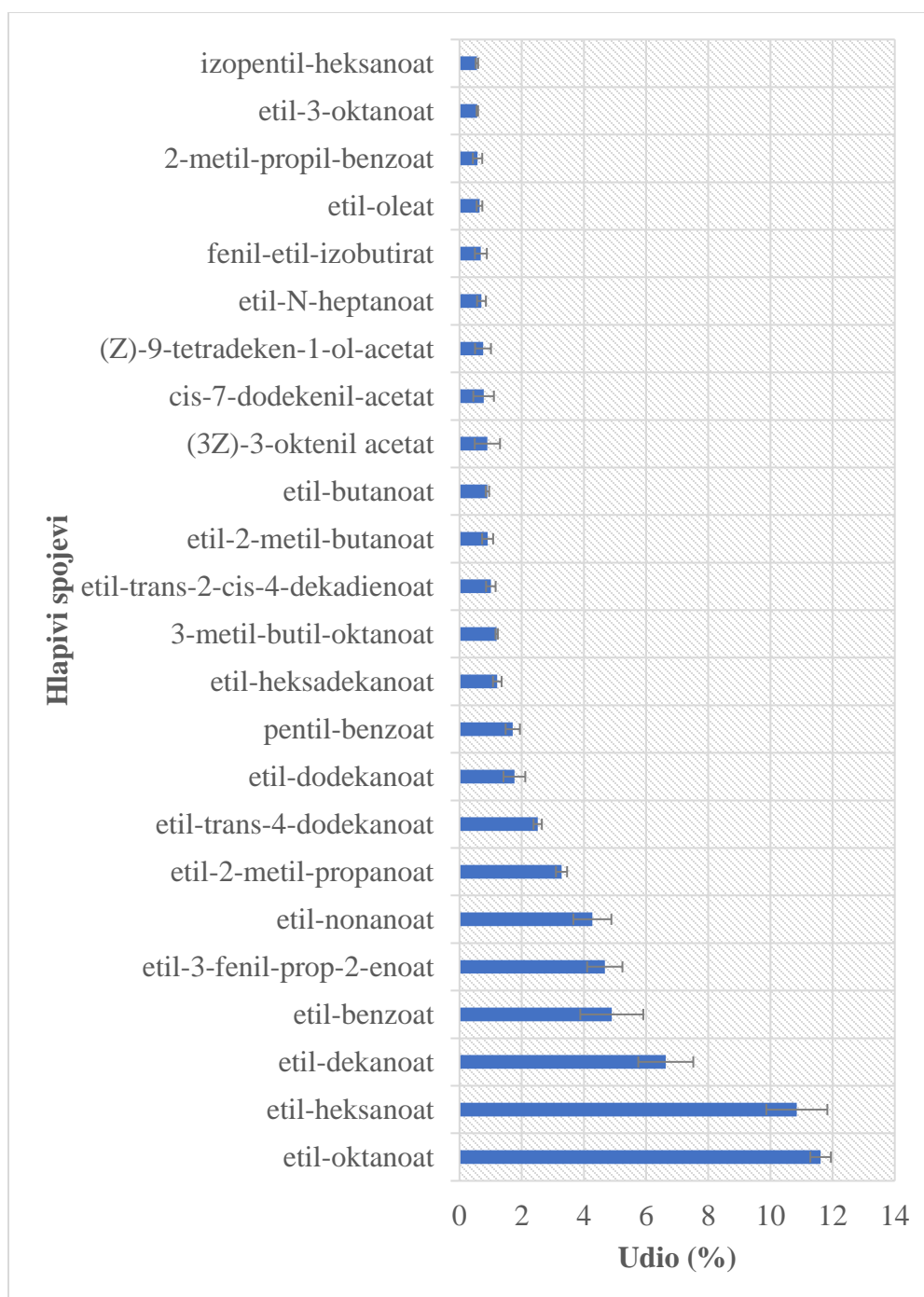


Slika 15. Udjeli hlapivih komponenti u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. burgunder pri temperaturi fermentacije od 25°C, bez dodatka soli za vrenje



Slika 16. Udjeli hlapivih komponenti u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. burgunder pri temperaturi fermentacije od 25°C, uz dodatak soli za vrenje

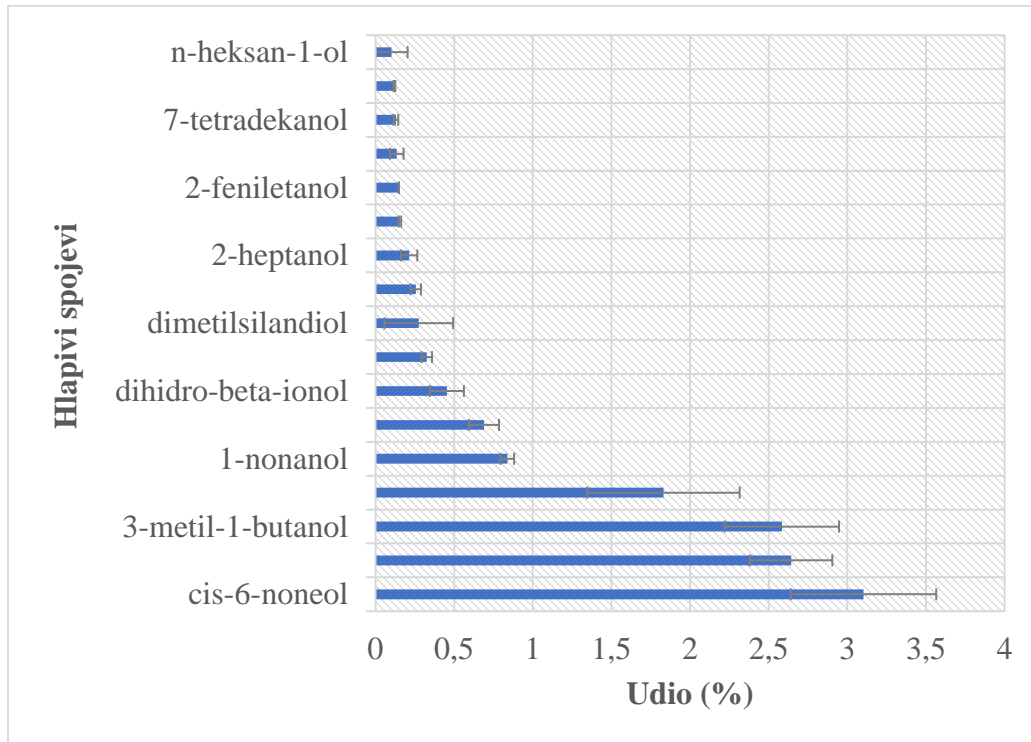
- Esteri



Slika 17. Maseni udjeli estera u destilatu rogača u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. burgunder pri temperaturi fermentacije od 25°C, bez dodatka soli za vrenje (n=3)

Kod oba uzorka esteri su bili najzastupljeniji hlapivi spojevi. Detektirano je 48 (-) odnosno 47 (+) estera u destilatu srce 1, ovisno o dodatku soli za vrenje u kominu, od čega su čak 42 estera detektirana u oba destilata (Prilozi I i II). Najveće udjele kod oba destilata (iznad 10%) imali su etil oktanoat, etil heksanoat i etil dekanat, odnosno esteri etanola i kapronske, kaprilne i kaprinske kiseline (slika 17). Etil-cinamat, etil-pelargonat (etil-nonanoat) te etil-2-metilpropanoat (etil-izobutirat) bili su manje zastupljeni (3-5%), no etil-cinamat i etil izobutirat znatno doprinose aromi rakije od rogača zbog njihovog niskog praga detekcije. Iako su galna kiselina i tanini najzastupljeniji fenoli rogača cimetna kiselina je također prisutna (Goulas i sur., 2016) i esterifikacijom daje etil cinamat u odležalom destilatu. Također, pojavljuju se i esteri etanola i ostalih masnih kiselina karakterističnih za rogač kao što su: etil-laureat, etil-palmitat, etil-oleat i etil-linoleat (slika 17). U radu Miličević i sur. (2018) istraživao se aroma profil destilata rogača pomoću plinske kromatografije te su najzastupljeniji esteri bili etil acetat, etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanat. Etil heksanoat ima voćnu i slatku aromu, etil oktanoat voćnu aromu marelice, dok etil dekanat ima voćnu aromu grožđa, no njihov velik udio u destilatu rogača ne znači nužno proporcionalnu karakteristiku arome. Ovi esteri mogu se naći i u drugim destilatima jakih alkoholnih pića kao što su rum, votka, džin, viski i voćne rakije (Zhao i sur., 2013). Nikićević i sur. (2011) su u svome radu istraživali aroma profil rakije od trešanja. Jednako kao i u ovom radu koristili su GC-FID i GC-MS kao analitičke metode. U svim uzorcima destilata trešnje esteri su najzastupljeniji aroma spojevi i to uglavnom esteri masnih kiselina koji nastaju esterifikacijom s alkoholima za vrijeme fermentacije i odležavanja. Slično kao u rakiji od rogača najzastupljeniji esteri u uzorcima destilata trešnje su: etil dekanat, etil oktanoat i etil oleat. Etil oktanoat i etil dekanat se smatraju najvećim doprinositeljima u aromi jakih alkoholnih pića. Uz etil oktanoat i etil dekanat, etil heksanoat čini aktivnu komponentu arome u destilatima marelice i jabuke (Genovese i sur., 2004). Esteri masnih kiselina od C₈-C₁₈ u destilatima jakih alkoholnih pića pridonose ugodnom cvjetnom i voćnom mirisu, dok esteri dugolančanih masnih kiselina dekanske, dodekanske, tetradekanske i heksadekanske imaju puno manji utjecaj na aromu destilata (Tešević i sur., 2005). Proučavanjem aroma profila rakije od šljive, Tešević i sur. (2005) su instrumentalnom metodom plinske kromatografije dobili najveće udjele sljedećih estera: etil-heksanoat, etil benzoat, etil dekanat, etil dodekanat i etil heksadekanat.

- Viši alkoholi



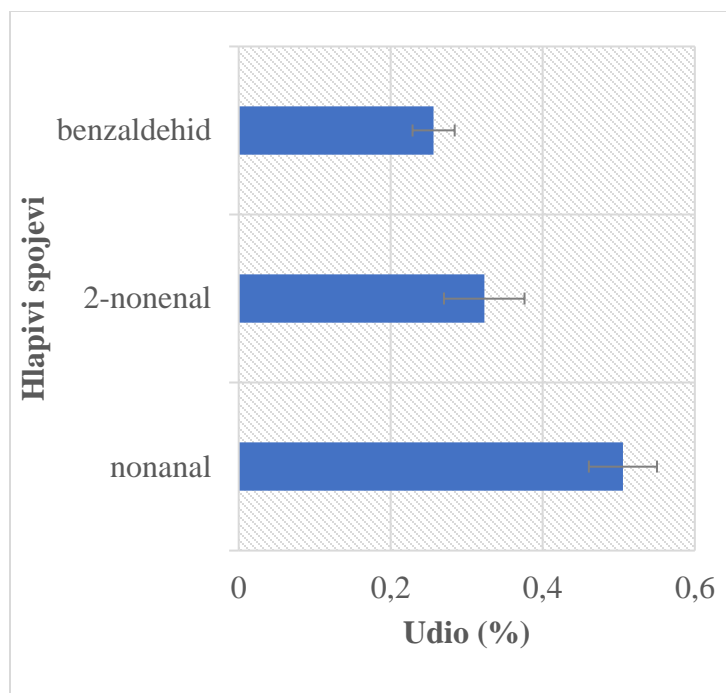
Slika 18. Maseni udjeli viših alkohola u destilatu rogača u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25°C, bez dodatka soli za vrenje (n=3)

Nakon estera, viši alkoholi imaju najveći udio u hlapivim spojevima u oba destilata (10-12%). Detektirano je ukupno 15 viših alkohola od čega je njih 12 bilo prisutno u oba destilata. Najveće udjele imali su: izoamil alkohol i cis-6-nonenol. Izoamil alkohol je također bio alkohol s najvećim masenim udjelom kod destilata rogača u istraživanju Miličević i sur. (2018). Detektirali su još 2-feniletanol i izobutil alkohol koji se pojavljuju i u destilatima ovog rada. U radu Cantaleja (1997), koji je istraživao aroma profil rogača GC/MS metodom, najzastupljeniji su bili izoamil alkohol, izobutil alkohol i 6-nonenol. Izoamil alkohol ima opornu aromu i aromu po bilju, etanol i izobutil imaju alkoholnu aromu, dok 2-feniletanol podsjeća na aromu ruže (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Tanamool i sur. (2019) proveli su istraživanje glavnih komponenti arome u destilatima fermentiranih sokova banane, tamarinda i manga prije odležavanja. Najveće udjele alkohola kod sva tri destilata imali su izoamil alkohol i etanol. Kod vinjaka, uglavnom dominiraju viši alkoholi

te oni utječu na aromu i kvalitetu destilata. Jedan od njih je izoamil alkohol koji se pojavljuje u najvećem udjelu u svom vinjacima u radu Satore i Tuszynski (2007). Heksan-1-ol, uglavnom ima negativan utjecaj na aromu i kvalitetu vinjaka. Njegove visoke koncentracije dovode do travnatog i ljutog okusa kod alkoholnih pića. Rakije od šljivovice sadrže velike količine heksan-1-ol-a, jer on čini 40% svih hlapivih komponenti u plodu šljive. 2-fenil-etanol se dobiva iz L-fenilalanina kao nusprodukt metabolizma *S. cerevisiae* za vrijeme fermentacije. Zbog svoje visoke točke vrelišta od 220 °C, pri destiliranju izlazi u patoci. Ako je prisutan u većoj koncentraciji, znak je da je destilacija provedena nepravilno. 2-fenil-etanol se može pojaviti u niskim koncentracijama kod vinjaka proizvedenog od različitih vrsta grožđa, dok se visoke koncentracije mogu pronaći u Grčkom brandiju *tsipouro* i destilatima borovnica kao rezultat povećane koncentracije fenilalanina u sirovini. Kod istraživanja aroma profila vinjaka Zhao i sur. (2017) dobili su kao najzastupljeni od svih alkohola 3-metil-1-butanol (izoamil alkohol). Njegov udio imao je raspon od 33,5% do 92,5%. Osim 3-metil-1-butanola, 2-metil-1-propanol je kod svih uzoraka bio prisutan u visokoj koncentraciji.

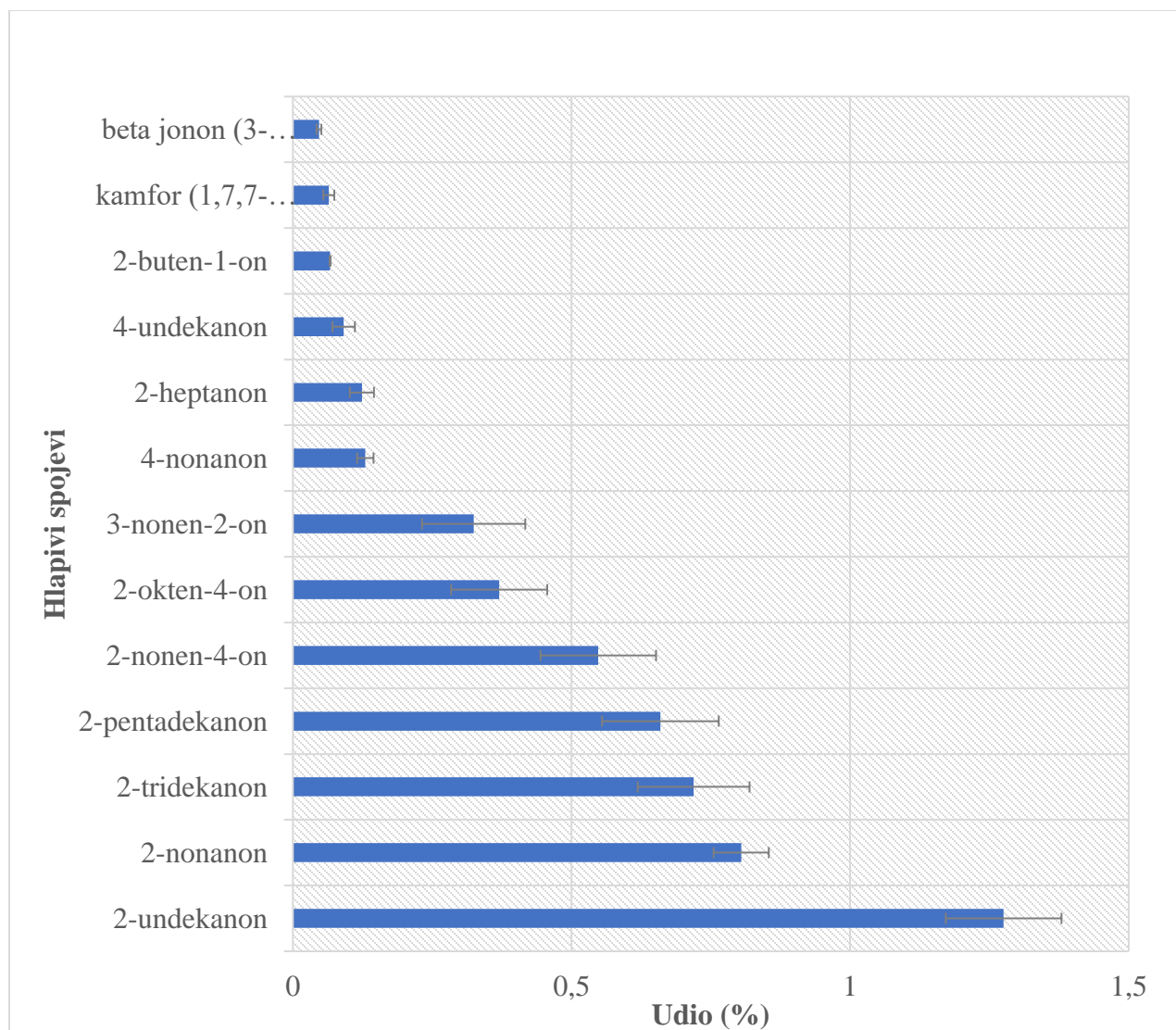
- Aldehidi i ketoni

Aldehidi do C₈ kao što su acetaldehid, formaldehid, akrolein, benzaldehid i furfural imaju prodornu, uglavnom nepoželjnu aromu za destilate jakih alkoholnih pića. Dugo lančane molekule aldehida pak karakterizira ugodan miris, no uglavnom su u destilatima prisutni u malim, nedovoljno izraženim koncentracijama kako bi se istaknuli (Spaho, 2017). Na slici 15 i 16 vidljivo je da su postotci aldehida u destilatu rogača bez dodanih soli i sa dodanim solima za vrenje podjednaki (oko 1,2 %). Nonanal, 2-noneal i benzaldehid su prisutni u oba destilata pri čemu je nonanal najzastupljeniji (oko 0,50 %). Zhao i sur. (2013) također su zabilježili dosta veliku koncentraciju nonanala kao rezultat biosinteze masnih kiselina iz acetalaldehida. Nonanal je aldehid koji je odgovoran za voćnu, a ponekad i cvjetnu te zelenu aromu destilata (Śliwińska i sur., 2014).



Slika 19. Maseni udjeli aldehyda u destilatu rogača u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25°C, bez dodatka soli za vrenje (n=3)

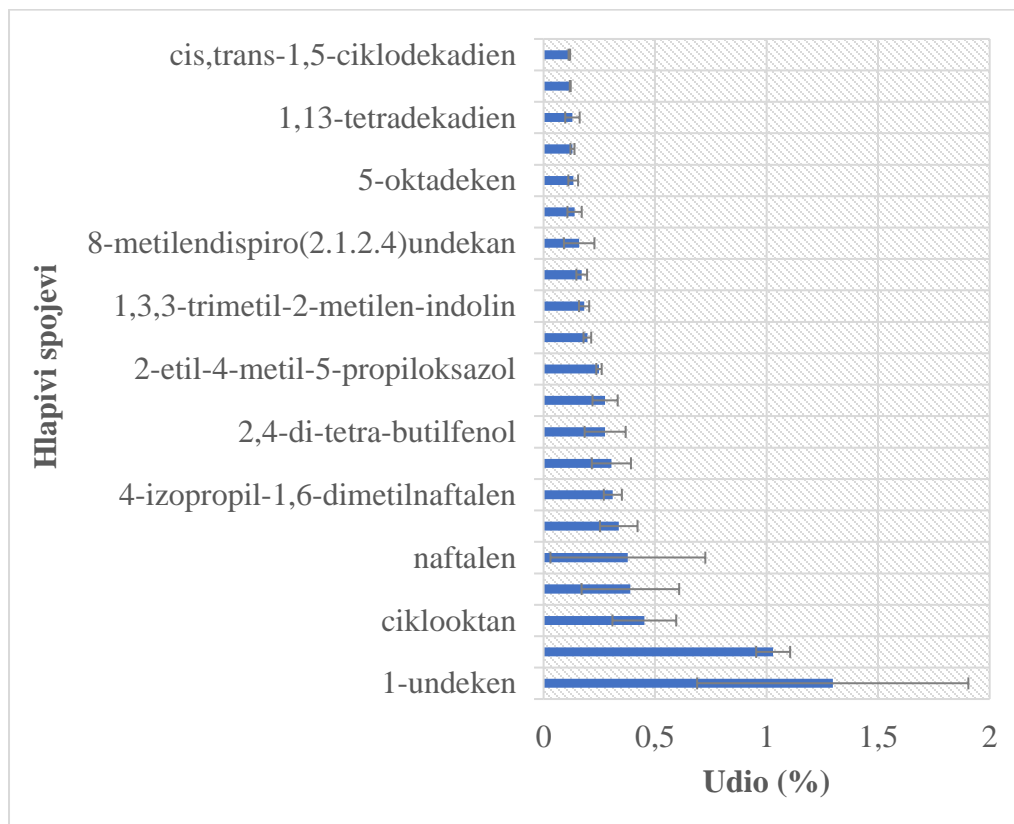
Ako uspoređujemo aldehide i ketone, uočljivi su znatno veći postotci ketona (slike 19 i 20). Zhao i sur. (2013) detektirali su 14 spojeva aldehida i ketona (od toga samo 5 ketona) u šest različitih vrsta jakih alkoholnih pića što zapravo potvrđuje da aldehidi i ketoni nastaju tijekom fermentacijskih procesa te njihova sinteza uvelike ovisi o korištenoj sirovini. Benzaldehid je aldehyd specifičan za voćne rakije od koštunjičavog voća. Njegova visoka koncentracija je rezultat fermentacije bez prethodnog uklanjanja sjemenki i koštica, odnosno kao posljedica hidrolize amigdalina koji se nalazi u njima. U rakijama doprinosi aromi gorkog badema i trešnje. Osim benzaldehida, za kvalitetu jakih alkoholnih pića, bitne su koncentracije 2-metil propanala, 2-propenala (akrolein), 3-hidroksi-2-butanona (acetoin) i 2,3-butandiona (diacetil). Negativne senzorske karakteristike su u korelaciji s prisutnim akroleinom i diacetilom (Spaho, 2017).



Slika 20. Maseni udjeli ketona u destilatu rogača u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25°C, bez dodatka soli za vrenje (n=3)

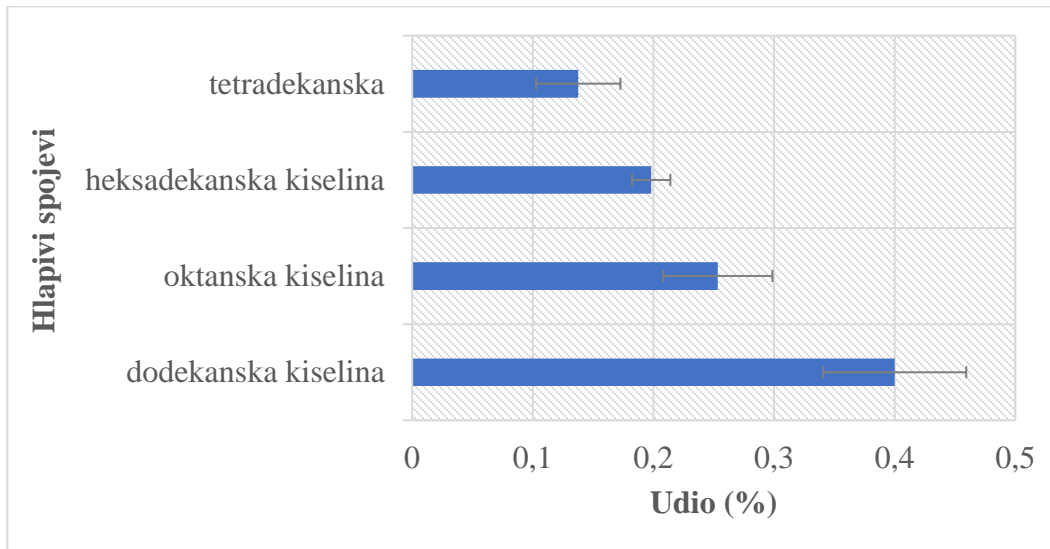
- Ugljikovodici

Osim etanola, viših alkohola, kiselina, estera, aldehida i ostalih komponenti arome, različiti ugljikovodici doprinose percepciji određenog mirisa. Njihova prisutnost je uglavnom u niskim koncentracijama, ali dovoljno visokim kako bi ih senzorski mogli osjetiti u pojedinim vinima i destilatima jakih alkoholnih pića. Terpene i C₁₃ norisoprenoide karakterizira aroma voća i cvjetni miris (Diéguez i sur., 2003). Od detektiranih ugljikovodika u destilatima rogača posebno se izdvajaju dva s najvećim postotcima, a to su: 1-undeken i ciklooktan. Farag i sur. (2017) proučavali su aroma profil rogača te su uočili vrlo male koncentracije ugljikovodika i to su uglavnom seskviterpenski ugljikovodici koji su odgovorni za cvjetnu aromu, te alifatski ugljikovodici koji daju više voćnu aromu (oktadekan). U radu kojeg su proveli Zhao i sur. (2013), istraživao se aroma profil šest različitih vrsta jakih alkoholnih pića te su detektirani različiti derivati naftalena, slično kao i u ovom radu. Naftalenova aroma podsjeća na dim i pepeo.



Slika 21. Maseni udjeli ugljikovodika u destilatu rogača u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom kome rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25°C, bez dodatka soli za vrenje (n=3)

- Kiseline



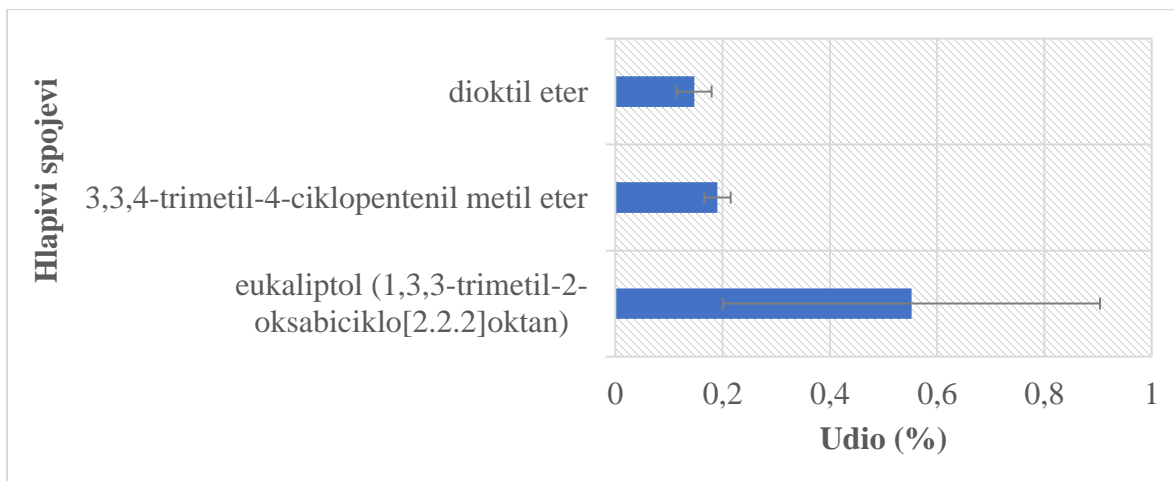
Slika 22. Maseni udjeli kiselina u destilatu rogača u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25°C, bez dodatka soli za vrenje (n=3)

Kao što je prikazano na slici 15 i 16, kiseline su u oba destilata prisutne u niskim koncentracijama (0,7-1,4%). Prisutne su oktanska kiselina (kaprilna), tetradekanska kiselina (miristinska), heksadekanska kiselina (palmitinska) i dodekanska kiselina (laurinska). Visoka koncentracija kratkolančanih masnih kiselina u destilatu je posljedica loše kvalitete početne sirovine te je nepoželjna, jer doprinosi sapunastoj aromi (Spaho, 2017). Miristinska, kaprilna i laurinska kiselina su uz kaprionsku kiselinu jedne od najčešćih prisutnih masnih kiselina u destilatima (Wiśniewska i sur., 2016). Cantalejo (1997) je proučavao aroma profil rogača GC-MS metodom te se osim ostalih detektiranih kiselina pojavljuju masne kiseline prisutne i u destilatima ovog rada. Youssef i sur. (2013) su u svome radu analizirali sastav masnih kiselina u rogačevu brašnu te su kao rezultat dobili najveće udjele oleinske i linolne masne kiseline, dok su od ostalih masnih kiselina bile prisutne i one detektirane u destilatima u ovom radu. Istraživanjem aroma profila različitih rakija od trešnje, Nikićević i sur. (2011) su dobili najveće udjele sljedećih masnih kiselina: oktanska, dekanska, tetradekanska, undekanska i dodekanska. U svim rakijama od trešnje, najzastupljenija

je bila dekanska kiselina, odnosno kaprilna kiselina. U radu Tešević i sur., (2005) proučavao se aroma profil rakija od šljive. Za potrebe istraživanja uzeto je više različitih rakija koje su analizirane GC-MS instrumentalnom metodom. Detektirane masne kiseline koje su prisutne u pojedinim uzorcima su: dekanska, undekanska, dodekanska, tetradekanska i heksadekanska. Od nabrojanih masnih kiselina, dodekanska (laurinska kiselina) se pojavljuje u najvećoj koncentraciji u svim uzorcima, jednako kao i u ovom radu. U aroma profilu vinjaka koji su proučavali Zhao i sur. (2017) najveće udjele od prisutnih kiselina imale su heksanska, oktanska i dekanska kiselina. Oktanska kiselina nalazila se u udjelima od 28.2% do 59% te je doprinjela slatkoj i voćnoj aromi. Masne kiseline uglavnom dovode do negativnih senzorskih karakteristika tek iznad koncentracije od 20 mgL⁻¹.

- Eteri

Eteri kod oba destilata čine jako mali udio hlapivih spojeva, svega oko 0,5-1 % (slike 15. i 16.). Od prisutnih etera eukaliptol (1,3,3-trimetil-2-oksabicikl[2.2.2]oktan) pojavljuje se u oba destilata. Eukaliptol (1,3,3-trimetil-2-oksabicikl[2.2.2]oktan) svojom prisutnošću u nekim vinima može doprinjeti isticanju arome kamfora i mente, te izražava njegovu svježinu (Sultanbawa, 2016).



Slika 23. Maseni udjeli etera u destilatu rogača u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25°C, bez dodatka soli za vrenje (n=3)

U znanstvenoj literaturi postupak proizvodnje i profil arome rakije od rogača nisu bili opisani. Stoga je cilj istraživanja bio ispitati mogućnost proizvodnje rakije od rogača s naglaskom na fermentaciju rogača i karakterizaciju aroma spojeva u dobivenom destilatu. Rezultati su pokazali da se rogač može koristiti kao sirovina za proizvodnju rakije. Brašno rogača potrebno je ukomiti s vodom u omjeru 1:4 pri čemu se dobije komina s oko 10 % fermentabilnih šećera. Rogać sadrži sve potrebne hranjive tvari potrebne kvascima za fermentaciju. Kvasci za fermentaciju vina i voćnih kaša komercijalno dostupni na tržištu mogu se koristiti i za fermentaciju komine rogača. Temperaturu fermentacije potrebno je podesiti prema preporuci proizvođača kvasca. Iz 1 kg rogača, moguće je dobiti oko 0.7 L rakije od rogača s udjelom alkohola oko 40 % volvol⁻¹. U destilatu dobivenom dvostrukom destilacijom s odvajanjem frakcija u drugoj destilaciji detektirana su 53 estera, 17 alkohola, 16 ketona, 4 aldehida, 5 kiselina, 3 etera i 21 ugljikovodik. Etil-oktanoat, etil-heksanoat, etil-dekanoat i etil-nonanoat (pelargonat) te etil-benzoat, etil-cinamat i etil-izobutirat najzastupljeniji su esteri u destilatu dobivenom fermentacijom brašna rogača.

5. ZAKLJUČCI

1. Pri korištenju rogača kao sirovine za proizvodnju rakije od rogača, brašno rogača potrebno je ukomiti s vodom u omjeru 1:4 pri čemu se ekstrakcijom dobije oko 100 gL^{-1} fermentabilnih šećera.
2. Saharoza je najzastupljeniji šećer u komini za fermentaciju, a prisutni su i glukoza i fruktoza.
3. Sojevi kvasca *S. cerevisiae* koji su komercijalno dostupni za fermentaciju vina i voćnih komina mogu se primijeniti i za fermentaciju komine rogača.
4. Testirani komercijalno dostupni kvasci tijekom fermentacije komine rogača razlikuju se po svojoj aktivnosti odnosno brzini fermentacije kao i dužini faze prilagodbe
5. Najbolja fermentacijska svojstva od tri testirana kvasca imao je kvasac *S. cerevisiae* var. *burgnunder*.
6. Svi testirani sojevi imali su veću brzinu fermentacije i kraću fazu prilagodbe pri višoj temperaturi fermentacije.
7. Komina rogača je kompletna hranjiva podloga, odnosno sadrži sve hranjive tvari potrebne za fermentaciju i dodatak soli za vrenje nije utjecao na brzinu fermentacije kao niti na konačnu aromu proizvedenog destilata.
8. Predloženim postupkom ukomljavanja, fermentacije i destilacije iz 1 kg rogača moguće je proizvesti 0,7 L rakije od rogača s udjelom alkohola $40 \% \text{ volvol}^{-1}$.
9. U destilatima su detektirana 53 estera, 17 alkohola, 16 ketona, 4 aldehida, 5 kiselina, 3 etera i 21 ugljikovodik.
10. Etil-oktanoat, etil-heksanoat, etil-dekanoat i etil-nonanoat (pelargonat) te etil-benzoat, etil-cinamat i etil-izobutirat najzastupljeniji su esteri u destilatu dobivenom fermentacijom brašna rogača.

6. LITERATURA

Banić, M. (2006) Rakije, whisky i likeri, Gospodarski list d.d., Zagreb. <https://dev.foodsta.eu/sites/default/files/digital_library_attachments/rakijewhisky_i_likeri_693.pdf> Pristupljeno 15.rujna 2019.

Banović, N. (2016) Kvaliteta rakije *loze* proizvedene pri različitim uvjetima fermentacije od sorte grožđa Izabela. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Bélangier, J. M. R., Jocelyn Paré, J. R., Sigouin, M. (1997) High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. Instrumental Methods in Food Analysis. U: Instrumental Methods in Food Analysis (Paré, J.R.J. i Bélangier, J.M.R., ured.), Elsevier Science B.V, Ottawa, str. 37–59.

Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Moreno-Arribas, M. (2017) Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* **22**(2), 189.

Benković, M., Bosiljkov, T., Semić, A., Ježek, D., Srećec, S. (2019). Influence of Carob Flour and Carob Bean Gum on Rheological Properties of Cocoa and Carob Pastry Fillings. *Foods* **8**(2), 66.

Bardi, E., Koutinas, A.A., Psarianos, C., Kanellaki, M. (1997) Volatile by-products formed in low-temperature wine-making using immobilized yeast cells. *Proc. Biochem.* **32**, 579-584.

Cantalejo, M., J. (1997) Effects of Roasting Temperature on the Aroma Components of Carob (*Ceratonia siliqua L.*). *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1345-1350.

Christoph, N., Bauer-Christoph, C. (2007) Flavour of Spirit Drinks: Raw Materials, Fermentation, Distillation, and Ageing. U: Flavours and Fragrances, (Beger, R. G., ured.), Springer, Germany, str. 221-239.

Ćapin, M. (2014) Destilacija u proizvodnji jakih alkoholnih pića. Završni rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Diéguez, S. C., de la Peña, M. L. G., Gómez, E. F. (2003) Approaches to Spirit Aroma: Contribution of Some Aromatic Compounds to the Primary Aroma in Samples of Orujo Spirits. *J. Agr. Food Chem.* **51**(25), 7385–7390.

Fakruddin, Md., Quayum, Md. A., Ahmed, M. M., Choudhury, N. (2012) Analysis of Key Factors Affecting Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* IFST-072011. *Biotechnology* **11**, 248-252.

Farag, M.A i El-Kersh, D.M. (2017) Volatiles profiling in *Ceratonia siliqua* (Carob bean) from Egypt and inresponse to roasting as analyzed via solid-phase microextraction coupled to chemometrics. *J.Adv.Res.* **8**, 379-385.

Ercan, Y., Irfan, T., Mustafa, K. (2013) Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *S. cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresource Technol.* **135**, 365–371.

Erten, H. (2002) Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 373-378.

Genovese, A., Ugliano, M., Pessina, R., Gambuti, A., Piombino, P., Moio, L. (2004) Comparison of the aroma compounds in apricot (*Prunus armeniaca*, L. cv. Pellecchiella) and apple (*Malus pumila*, L. cv. Annurca) raw distillates. *Ital. J. Food Sci.* **16**(2), 185-196.

Germec, M., Turhan, I., Karhan, M., Demirci, A. (2015) Ethanol production via repeated-batch fermentation from carob pod extract by using *S. cerevisiae* in biofilm reactor. *Fuel* **161**, 304–311.

Gibson, M. i Newsham, P. (2018) *Spirits U: Food Science and the Culinary Arts*, (Gibson, M., ured.), Elsevier Applied Science, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 399–415.

Golub, N. (2016) Utjecaj sastava sirovine i veličine čestica na bioaktivna svojstva ekstrakta rogača (*Ceratonia Siliqua L.*). Završni rad. Prehrambeno.biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

- Goulas, V., Stylos, E., Chatziathanasiadou, M., Mavromoustakos, T., Tzakos, A. (2016) Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1875.
- Grba, S. (2009) Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji, Plejada d.o.o., Zagreb.
- Hanousek Čiča, K., Rupert, M., Koczoń, P., Derewiaka, D., Gajdoš-Kljusurić, J., Petravić-Tominac, V., Stanzer, D. (2018) Characterisation of flavour compounds in Biska - a herbal spirit produced with mistletoe. *J.I. Brewing.* **125**, 143-154.
- Hirst, M. B., Richter, C. L. (2016) Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **67**(4), 361–370.
- Jia, M., Jiang, L., Niu, F., Zhang, Y., Sun, X. (2018) A novel and highly efficient esterification process using triphenylphosphine oxide with oxalyl chloride. *Roy. Soc. Open Sci.* **5**, 1-12.
- Jung, A., Jung, H., Auwarter, V., Pollak, S., Farr, A.M., Hecser, L., Schiopu, A. (2010) Volatile congeners in alcoholic beverages: analysis and forensic significance. *Rom. J. Leg. Med.* **18**, 265-270.
- Krokou, A., Stylianou, M., Agapiou, A. (2019) Assessing the volatile profile of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 1-10. doi: 10.1007/s11356-019-04664-7
- Lefebvre F., Basset J. M. (2002) Surface organometallic chemistry of tin, germanium and arsenic. *Main Group Met. Chem.* **25** (1-2), 15-32.
- Levaj, B. (2018) Zrenje i dozrijevanje. <<http://www.pbf.unizg.hr/>>. Pristupljeno 2. rujna 2019.
- López-Vázquez, C., Herminia Bollaín, M., Berstsch, K., Orriols, I. (2010) Fast determination of principal volatile compounds in distilled spirits. *Food Control.* **21**(11), 1436–1441.
- Malnar, M. (2016) Kvaliteta rakije šljivovice proizvedene od nove sorte šljive Top King. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Marković K. (2017) Kromatografske analitičke tehnike. <<http://www.pbf.unizg.hr/>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2019.
- Martins-Loução, M. A. (1990) Carob (*Ceratonia Siliqua* L.), U: Biotechnology in Agriculture and Forestry, (Bajaj Y.P.S., ured.), Springer, Berlin/Heidelberg, str. 658–675.

Mrvčić, J. (2015) Voćne, žitne i šećerne rakije. < <http://www.pbf.unizg.hr/> >. Pristupljeno 28. kolovoza 2019.

Miličević, B., Ačkar, Đ., Babić, J., Jozinović, A., Miličević, R., Petošić, E., Kujundžić, T., Šubarić, D. (2018) Impact of the fermentation process with immobilized yeast cells on the aroma profile and sensory quality of distillates produced from carob pods (*Ceratonia Siliqua L.*), *Technologica Acta*. **11**, 5–9.

Nikićević, N., Veličković, M., Jadranin, M., Vučković, I., Novaković, M., Vujisić, L., Stanković, M., Urošević I., Tešević, V. (2011) The effects of the cherry variety on the chemical and sensorial characteristics of cherry brandy. *J. Serb. Chem. Soc.* **76**(9), 1219–1228.

Petkova, N., Petrova, I., Ivanov, I., Mihov, R., Hadjikinova, R., Ognyanov, M., Nikolova, V. (2017) Nutritional and antioxidant potential of carob (*Ceratonia siliqua*) flour and evaluation of functional properties of its polysaccharide fraction. *J. Pharm. Sci. & Res.* **9**, 2189-2195.

Petravić-Tominac, V., Mesihpvić, A., Mujadžić, S., Lisičar, J., Oros, D., Velić, D., Velić, N., Srčec, S., Zechner-Krpan, V., Petrović, Z. (2013). Production of Blackberry Wine by Microfermentation using Commercial Yeasts Fermol Rouge and Fermol Mediterranée. *Agric. conspec. sci.* **78**, 49-55.

Petravić-Tominac, V., Tolvajčić, M., Stanzer, D., Mrvčić, J., Šantek B. (2017) Kvasci za proizvodnju bioetanola iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina. *Glasnik zaštite bilja* **40**(5), 24-33.

Pravilnik o jakim alkoholnim i alkoholnim pićima (2009) *Narodne novine* **61**, Zagreb.

Querol, A., Fleet, G. (2005) *The Yeast Handbook: Yeasts in Food and Beverages*, 2.izd., Springer.

Reddy, L. V. A., Reddy, O. V. S. (2011) Effect of fermentation conditions on yeast growth and volatile composition of wine produced from mango (*Mangifera indica L.*) fruit juice. *Food Bioprod. Process.* **89**(4), 487–491.

- Rodrigues, B., Peinado J. M., Raposo S., Constantino A., Quintas C., Lima-Costa M. E. (2015) Kinetic and Energetic Parameters of Carob Wastes Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Crabtree Effect, Ethanol Toxicity, and Invertase Repression. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**(6), 837-44.
- Roukas, T. (1994). Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production. *Appl. Microbiol. Biot.* **41**(3), 296–301.
- Saharkhiz, S., Mazaheri, D., Shojaosadati, S. A. (2013) Evaluation of bioethanol production from carob pods by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid submerged carob pods. *Prep. Biochem. Biotech.* **43**(5), 415–430.
- Sánchez-Segado, S., Lozano, L.J., Juan Garcia, D., Godinez, C., Perez de los Rios, A., Hernandez-Fernandez, F.J. (2010) Life cycle assessment analysis of ethanol production from carob pod. *Chem. Eng. Trans.* **21**, 613-618.
- Satora, P., Tuszyński, T. (2010) Influence of indigenous yeasts on the fermentation and volatile profile of plum brandies. *Food Microbio.* **27**(3), 418–424.
- Śliwińska, M., Wiśniewska, P., Dymerski, T., Wardencki, W., Namieśnik, J. (2015) The flavour of fruit spirits and fruit liqueurs: a review. *Flavour Frag. J.* **30**(3), 197–207.
- Spaho, N. (2017) Distillation techniques in the Fruit Spirits Production. U: Distillation: Inovative Applications and Modeling (Fernandes M. M, ured.), In Tech, Rijeka, str.129-149.
- Stehlik-Tomas, V., Grba, S. (2010) Proizvodnja jakih alkoholnih pića U: Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji (Ranić I. ured), Plejada d.o.o., Zagreb, str. 229-264.
- Sultanbawa, Y. (2016) Essential Oils in Food Applications: Australian Aspects. U: Essential Oils in Food Applications. Essential Oils in Food Preservation (Preedy, R.V., ured.), Elsevier Science Publishing Co Inc, San Diego, str. 155–160.
- Tanamool, V., Leelavatcharamas, V., Moon-amart, S., Vichitphan, K. (2019) Major Volatile Compounds of Fruit Distillates Prior to Aging for Fruit Brandy. <https://www.researchgate.net/publication/266229856_Major_Volatile_Compounds_of_Fruit_Distillates_Prior_to_Aging_for_Fruit_Brandy/citation/download>. Pristupljeno 30. rujna 2019.

- Tešević, V., Nikićević, N., Jovanović, A., Djoković, D., Vujisić, Lj., Vučković, I., Bonić, M. (2005) Volatile Components of Plum Brandies. *Food Technol. Biotechnol.* **43**(4), 367–372
- Tišljar, P. (2018) Proizvodnja bioetanola iz rogača. Završni rad. Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Torija, M. (2003) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **80**(1), 47–53.
- Turhan, I., Bialka, K. L., Demirci, A., Karhan, M. (2010) Ethanol production from carob extract by using *S. cerevisiae*. *Bioresource Technol.* **101**(14), 5290–5296.
- Yah, C. S., Iyuke, S. E., Unuabonah, E. I., Pillay, O., Vishanta, C., Tessa, S. M., (2010) Temperature Optimization for Bioethanol Production from Corn Cobs Using Mixed Yeast Strains. *J. Biol. Sci.* **10**(2), 103–108.
- Yatmaz, E., Turhan, I. (2018) Carob as a carbon source for fermentation technology. *Biocatal. Agricul. Biotechn.* **16**, 200–208.
- Youssef, M. K. E., El-Manfaloty, M.M., Ali, H.M. (2013) Assessment of Proximate Chemical Composition, Nutritional Status, Fatty Acid Composition and Phenolic Compounds of Carob (*Ceratonia Siliqua L.* *Food and Public Health.* **3**, 304-308.
- Yousif, A. (2000) Processing and characterization of carob powder. *Food Chem.* **69**(3), 283–287.
- Vaheed, H., Shojaosadati, S. A., Galip, H. (2010) Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**(1), 101–111.
- Walker, G., Stewart, G. (2016) *S. cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, **2**, 30-36.
- Wiśniewska, P., Śliwińska, M., Dymerski, T., Wardencki, W., Namieśnik, J. (2016) The analysis of raw spirits - a review of methodology. *J. Inst. Brew.* **122**, 5–10.

Zhao, Y. P., Zheng, X. P., Song, P., Sun, Z. L., Tian, T. T. (2013) Characterization of Volatiles in the Six Most Well-Known Distilled Spirits.. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **71**, 161–169.

7. PRILOZI

Prilog I. *Maseni udjeli aroma komponenti u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25°C, bez dodatka soli za vrenje*

Hlapive komponente	Faktor podudaranja (MS spektar)	Paralele			Maseni udjeli (%)
		1	2	3	
Esteri					
etil-oktanoat	97	x	x	x	11,86
etil-heksanoat	93	x	x	x	9,69
etil-dekanoat	91	x	x	x	7,72
etil-benzoat	91	x	x	x	6,10
etil-cinamat	96	x	x	x	5,31
etil-pelargonat	86	x	x	x	3,67
etil-2-metil propanoat	83	x	x	x	3,41
etil-trans-4-dekanoat	98	x	x	x	2,26
amil benzoat	78	x	x	x	1,99
etil laureat	99	x	x	x	1,58
etil palmitat	98	x	x	x	1,24
3-metil butil oktanoat	91	x	x	x	1,22
etil-2-metil butanoat	94	x	x	x	1,09
6-dodekanol acetat	44	x	x	x	1,08
etil-butanoat	95	x	x	x	0,94
fenil-etil izobutirat	78	x	x	x	0,91
etil trans-2-cis-4-dekadienoat	92	x	x	x	0,88
2-metil-propil benzoat	83	x	x	x	0,75
etil-N-heptanoat	98	x	x	x	0,73
izopentil heksanoat	83	x	x	x	0,60

2-metilbenzil cijanid	52	x	x	x	0,58
etil oleat	99	x	x	x	0,57
etil tetradekanoat	97	x	x	x	0,55
etil-3-oktanoat	95	x	x	x	0,54
dibutil ftalat	94	x	x	x	0,52
(Z)-9-tetradeken-1-ol acetat	78	x	x	x	0,50
2-metilpropil heksanoat	83	x	x	x	0,43
2-hidroksi-etil benzoat	76	x	x	x	0,43
cis-7-dodekenil acetat	93	x	x	x	0,43
etil-trans-4-decenoat	95	x	x	x	0,39
2-hidroksi-metil benzoat	96	x	x	x	0,37
izobutil ftalat	83	x	x	x	0,36
izobutil izobutirat	72	x	x	x	0,34
3-metil-butil oktanoat	96	x	x	x	0,34
izopentil 3-fenilakrilat	89	x	x	x	0,33
etil-E-2-oktanoat	97	x	x	x	0,31
etil linoleat	99	x	x	x	0,26
etil-3-hidroksidodekanoat	64	x	x	x	0,22
2-metil butil oktanoat	83	x	x	x	0,22
metil 3,6-dodekadienoat	90	x	x	x	0,22
izobutil oktanoat	96	x	x	x	0,19
izoamil-2-metil butirat	86	x	x	x	0,17
2-feniletal cikloheksakarboksilat	41	x	x	x	0,17
7-tetradekanol	46	x	x	x	0,14
etil(2Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienoat	41			x	0,13
etil-2-heksanoat	97	x	x	x	0,11
etil 2-nonenoat	76		x		0,11
etil pentanoat	78		x		0,10
2-metilbutil 2-metil butanoat	83		x		0,10
Eteri					
eukaliptol	98	x	x	x	0,87

3,3,4-trimetil-4-ciklopentenil metil eter	80		x	x	0,20	
Ketoni						
1-metoksi-6-metilbiciklo(3.2.2)non-6-en-2-on	72		x	x	x	1,68
2-undekanon	93		x	x	x	1,15
2-nonanon	98		x	x	x	0,85
2-tridekanon	98		x	x	x	0,62
2-pentadekanon	93		x	x	x	0,57
2-nonen-4-on	64		x	x	x	0,44
2-okten-4-on	72		x	x	x	0,28
3-nonen-2-on	81		x	x	x	0,23
2-heptanon	87		x	x	x	0,18
3-izopentil-2,4-pentadion kamfor	23		x	x	x	0,18
4-undekanon	97		x	x	x	0,17
beta jonon	96		x	x	x	0,13
4-nonanon	83		x	x	x	0,12
ciklotridekanon	72		x	x		0,12
2-buten-1-on	91		x	x	x	0,11
Kiseline						
kaprilna kiselina	91		x	x	x	0,21
miristinska kiselina	99		x		x	0,21
palmitinska kiselina	86		x	x	x	0,19
laurinska kiselina	92		x	x	x	0,16
Ugljikovodici						
1-(4-penten-1-il)ciklopenten	51		x	x	x	0,96
1-undeken	96		x	x	x	0,75
nonanal	96		x	x	x	0,54
ciklooktan	93		x	x	x	0,52
2-nonenal	89		x	x	x	0,37

1-tetradeken	97	x	x	x	0,34
4-izopropil-1,6-dimetilnaftalen	98	x	x	x	0,34
2,4-di-tetra-butylfenol	96		x	x	0,34
benzaldehyd	95	x	x	x	0,31
8-metilendispiro(2.1.2.4)undekan	49	x	x	x	0,28
6-tetradekin	89	x	x	x	0,23
ciklododekan	93	x	x	x	0,22
ciklododeken	95	x	x	x	0,19
1-ciklopentilciklopenten	66	x	x	x	0,17
(1S,4S)-4-izopropil-1,6-dimetil- 1,2,3,4-tetrahidronaftalen	39	x	x	x	0,17
5-oktadeken	98	x	x	x	0,15
1,3,3-trimetil-2-metilen-indolin	90	x	x	x	0,14
naftalen	97	x	x	x	0,13
7-tetradekin	78	x	x	x	0,13
1,7,7-trimetil-4-metilendekahidro-1H- ciklopropazulen	94	x	x	x	0,13
Aldehidi					
nonanal	96	x	x	x	0,54
2-nonenal	89	x	x	x	0,37
benzaldehyd	95	x	x	x	0,31
Viši alkoholi					
izoamil alkohol	83	x	x	x	2,90
etanol	86	x	x	x	2,84
cis-6-nonenol	60	x	x	x	2,69
2-nonanol	83	x	x	x	1,40
1-nonanol	90	x	x	x	0,84
izobutil alkohol	80	x	x	x	0,77
dihidro-beta-ionol	80	x	x	x	0,52
1-oktanol	91	x	x	x	0,31
dimetilsilandioli	31	x		x	0,29

3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrien-1-ol	49	x	x	x	0,23
2-heptanol	78	x	x	x	0,17
2-fenil-etanol	84		x	x	0,15
(1S*,6S*,7S*)-triciklo[5.3.2.0(1,6)]- dodekan-7-ol	78	x		x	0,12
dimetilsilandioli	24	x		x	0,11
dimetilsilandioli	13	x			0,11

Prilog II. Maseni udjeli aroma komponenti u frakciji srce 1 dobivenoj destilacijom komine rogača fermentirane s pomoću kvasca *S. cerevisiae* var. *burgunder* pri temperaturi fermentacije od 25°C, uz dodatka soli za vrenje

Hlapive komponente	Faktor podudaranja (MS spektar)	Paralele			Maseni udjeli (%)
		1	2	3	
Aldehidi					
nonanal	96	x	x	x	0,47
2-nonenal	89	x	x	x	0,30
benzaldehyd	95	x	x	x	0,24
3-metil butanal	87	x			0,11
Viši alkoholi					
cis-6-nonenol	60	x	x	x	3,52
etanol	86	x	x	x	2,44
izamil alkohol	83	x	x	x	2,27
2-nonanol	83	x	x	x	2,26
1-nonanol	90	x	x	x	0,84
izobutil alkohol	80	x	x	x	0,61
dihidro-beta-ionol	80	x	x	x	0,38
1-oktanol	91	x	x	x	0,35
3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrien-1-ol	51	x	x	x	0,28
2-heptanol	78	x	x	x	0,26

cis-2-izopropil-trans-5-metil-1-cikloheksanol	46	x	x	x	0,16
dimetilsilandioli	38	x	x	x	0,15
2,5-dimetilcikloheksanol	43	x			0,14
7-tetradekanol	32	x	x		0,12
(1S*,6S*,7S*)-triciklo[5.3.2.0(1,6)]-dodekan-7-ol	78		x	x	0,12
n-heksan-1-ol	78	x			0,10
Esteri					
etil-heksanoat	93	x	x	x	11,55
etil-oktanoat	97	x	x	x	11,38
etil-dekanoat	91	x	x	x	5,99
etil-pelargonat	86	x	x	x	4,69
etil-cinamat	96	x	x	x	4,30
etil-benzoat	91	x	x	x	4,16
etil-2-metil propanoat	83	x	x	x	3,17
etil-trans-4-dekanoat	98	x	x	x	2,48
amil benzoat	78	x	x	x	1,55
etil laureat	99	x	x	x	1,51
etil palmitat	98	x	x	x	1,19
3-metil butil oktanoat	91	x	x	x	1,18
etil trans-2-cis-4-dekadienoat	92	x	x	x	1,11
cis-7-dodekenil acetat	93	x	x	x	1,01
(Z)-9-tetradeken-1-ol acetat	78	x	x	x	0,93
etil-butanoat	95	x	x	x	0,87
6-dodekanol acetat	40	x	x	x	0,85
etil-2-metil butanoat	94	x	x	x	0,78
etil 3-hidroksitridekanoat	70	x	x		0,69
etil-N-heptanoat	98	x	x	x	0,67
etil oleat	99	x	x	x	0,67
etil-3-oktanoat	95	x	x	x	0,59

fenil-etil izobutirat	78	x	x	x	0,55
izopentil heksanoat	83	x	x	x	0,53
2-metil-propil benzoat	83	x	x	x	0,47
etil-trans-4-decenoat	95	x	x	x	0,46
bis(2-etilheksil)heksadioat	98	x			0,46
dibutil ftalat	94	x	x	x	0,42
2-metilpropil heksanoat	83	x	x	x	0,41
etil 3-fenilprop-2-enoat	96	x	x	x	0,41
etil tetradekanoat	97	x	x	x	0,41
etil-E-2-oktanoat	97	x	x	x	0,34
2-hidroksi-etil benzoat	76	x	x	x	0,34
3-metil-butil oktanoat	96	x	x	x	0,34
metil 3,6-dodekadienoat	90	x	x	x	0,34
izobutil ftalat	83	x	x	x	0,29
etil-3-hidroksidodekanoat	64	x	x	x	0,28
2-metilbenzil cijanid	48	x	x	x	0,27
izopentil 3-fenilakrilat	89	x	x	x	0,27
2-metil butil oktanoat	83	x	x	x	0,26
2-hidroksi-metil benzoat	96	x	x	x	0,25
etil linoleat	99	x	x	x	0,25
2-feniletil cikloheksakarboksilat	41	x	x	x	0,24
izobutil izobutirat	72	x	x		0,18
etil-ftalat	84	x	x	x	0,18
2-etilheksil 2-hidroksibenzoat	68		x	x	0,17
izobutil oktanoat	96	x	x	x	0,16
izoamil-2-metil butirat	86	x			0,10
Eteri					
eukaliptol	98	x	x	x	0,24
dioktil eter	89		x	x	0,15
Ketoni					

1-metoksi-6-metilbiciklo(3.2.2)non-6-en- 2-on	70	x	x	x	1,56
2-undekanon	93	x	x	x	1,35
2-tridekanon	98	x	x	x	0,84
2-nonanon	98	x	x	x	0,77
2-pentadekanon	93	x	x	x	0,74
2-nonen-4-on	64	x	x	x	0,62
4-undekanon	97	x	x	x	0,56
2-okten-4-on	72	x	x	x	0,43
3-izopentil-2,4-pentadion	36	x	x	x	0,41
3-nonen-2-on	81	x	x	x	0,39
2-heptanon	87	x		x	0,14
4-nonanon	83	x	x	x	0,14
2-buten-1-on	91			x	0,11
Kiseline					
kaprilna kiselina	91	x	x	x	0,29
laurinska kiselina	92	x	x	x	0,25
palmitinska kiselina	86	x	x	x	0,21
laurinska kiselina	82	x	x	x	0,16
miristinska kiselina	99	x		x	0,16
miristinska kiselina	99			x	0,12
4-etil-2-metil-1,3-tiazol-5-karboksilna kiselina	32		x	x	0,12
miristinska kiselina	99		x		0,11
Ugljikovodici					
1-undeken	96	x	x	x	1,84
1-(4-penten-1-il)ciklopenten	51	x	x	x	1,09
naftalen	96	x		x	0,69
ciklododeken	95	x	x	x	0,59
8-metilendispiro(2.1.2.4)undekan	47	x	x	x	0,40
6-tetradekin	89	x	x	x	0,32

4-izopropil-1,6-dimetilnaftalen	98	x	x	x	0,28
1-tetradeken	97	x	x	x	0,26
3,3,4-trimetil-4-cikloptenil metil eter	46	x	x	x	0,25
1-ciklopentilciklopenten	67	x	x	x	0,19
7-tetradekin	78	x	x	x	0,19
(1S,4S)-4-izopropil-1,6-dimetil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen	47	x	x	x	0,17
2,4-di-tetra-butylfenol	96	x	x	x	0,17
naftalen	97			x	0,13
1,3,3-trimetil-2-metilen-indolin	90	x			0,13
ciklododekan	93		x		0,13
1,13-tetradekadien	91	x	x	x	0,13
kopaen	87		x	x	0,12
1,7,7-trimetil-4-metilendekahidro-1H-ciklopropazulen	94		x		0,12
cis,trans-1,5-ciklodekadien	22		x	x	0,12
5-oktadeken	98	x	x	x	0,12

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Borja Đević

Ime i prezime studenta