

Cijanovodična kiselina u jakim alkoholnim pićima

Dutković, Tatjana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:198931>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij
Prehrambena tehnologija

Tatjana Dutković
0058212946/PT

**CIJANOVODIČNA KISELINA U JAKIM ALKOHOLNIM
PIĆIMA**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Proizvodnja jakih alkoholnih pića

Mentor: Prof. dr. sc. *Jasna Mrvčić*

Zagreb, 2021.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno - biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Cijanovodična kiselina u jakim alkoholnim pićima

Tatjana Dutković, 0058212946

Sažetak: Cijanovodična kiselina prekursor je kancerogenog spoja etil karbamata. U jakim alkoholnim pićima nastaje prilikom razgradnje cijanogenih glikozida koji se nalaze u košticama voća koje služi kao polazna sirovina za proizvodnju jakih alkoholnih pića. S obzirom da je prekursor navednog kancerogenog spoja njena koncentracija je zakonski regulirana u velikom broju zemalja. Provedena su brojna istraživanja kako bi se odredila koncentracija cijanovodične kiseline u jakim alkoholnim pićima. Pokazalo se kako kod vrlo male količine ispitanih jakih alkoholnih pića koncentracija cijanovodične kiseline prelazi dozvoljenu granicu. To je najčešće kod rakija proizvedenih od koštunjičavog voća. Cilj ovog rada bio je prezentirati dosadašnja saznanja o cijanovodičnoj kiselini, njenoj zakonskoj regulativi te napraviti pregled dosad provedenih istraživanja.

Ključne riječi: cijanovodična kiselina, alkohol, etil-karbat

Rad sadrži: 24 stranice, 9 slika, 4 tablice, 1 graf, 16 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. *Jasna Mrvčić*

Pomoć pri izradi: Prof. dr. sc. *Jasna Mrvčić*

Datum obrane: srpanj, 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Hydrocyanic acid in strong alcoholic beverages

Tatjana Dutković, 0058212946

Abstract: Hydrocyanic acid is a precursor of the carcinogenic compound ethyl carbamate. In strong alcoholic beverages it is formed by the decomposition of cyanogenic glucosides, which are found in stone fruits and serve as a starting material for the production of strong alcoholic beverages. Since it is a precursor of this carcinogenic compound, its concentration is regulated by law in many countries. Numerous studies have been carried out which showed that in a very small quantity of the alcoholic beverages tested, the concentration of hydrocyanic acid exceeded the permissible concentration limit, but there were also beverages in which the concentration was too high. This is often the case with spirits made from stone fruit. The aim of this work was to present the current state of knowledge about hydrocyanic acid and its legislation and to give an overview of the investigations carried out so far.

Keywords: hydrocyanic acid, alcohol, ethyl-carbamate

Thesis contains: 24 pages, 9 figures, 4 tables, 1 chart, 16 references

Original in: croatian

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

Mentor: PhD Jasna Mrvčić, Full Professor

Technical support and assistance : PhD Jasna Mrvčić, Full Professor

Defence date: July, 2021.

Sadržaj

1. Uvod	5
2. Teorijski dio	6
2. 1. Povijest jakih alkoholnih pića	6
2. 2. Definicija i podjela jakih alkoholnih pića	7
2. Cijanovodična kiselina	10
2. 1. Sirovine i nastanak cijanovodične kiseline	10
3. Zakonska regulativa	14
3. 1. Zakonska regulativa alkoholnih pića	14
3. 2. Zakonska regulativa cijanovodične kiseline i etil karbamata	15
4. Cijanovodična kiselina u jakim alkoholnim pićima	18
4. 1. Utjecaj rezidbe na količinu HCN-a u šljivovicama	18
4. 2. Kemijske karakteristike "Sliwowica Lacka" i drugih šljivovica	20
4. 3. Utjecaj kvasca na prinos fermentacije i hlapljivi profil destilata šljive "Węgierka Zwykła"	21
4. 4. Biosinteza etanola i oslobađanje cijanovodične kiseline tijekom fermentacije voćnih komina	22
5. Zaključak	28
6. Literatura	29

1. Uvod

Alkoholna pića od davnina su dio ljudske prehrane. Povijest jakih alkoholnih pića ne seže daleko u povijest kao što je to slučaj kod fermentiranih alkoholnih pića, piva i vina, ali bez obzira na to proizvodnja jakih alkoholnih pića ima dugu tradiciju u mnogim zemljama. Pod jaka alkoholna pića ubrajaju se alkoholna pića posebnih senzorskih svojstava namijenjena za ljudsku potrošnju koja sadrže minimalno 15 % vol. alkohola. Jaka alkoholna pića dobivaju se iz voćnih sirovina pomoću procesa fermentacije i destilacije, odnosno maceracije. Postoje mnogi spojevi koji jakim alkoholnim pićima daju prepoznatljivu aromu, međutim, postoje i nepoželjne komponente, koje ne samo da umanjuju organoleptička svojstva jakih alkoholnih pića, već su i potencijalno opasni za ljudsko zdravlje. Jedan od tih spojeva je i etil karbamat. Etil karbamat je spoj koji se najčešće nalazi u rakijama od koštunjičavog voća s obzirom da je njegov najčešći prekursor cijanovodična kiselina. Cijanovodična kiselina je produkt enzimske hidrolize cijanogenih glikozida. Cijanogeni glikozidi su spojevi koji se nalaze u košticama voća od kojih se dobivaju jaka alkoholna pića, npr. šljiva, breskva, trešnja i dr. S obzirom da je etil karbamat potencijalno kancerogen, količina cijanovodične kiseline regulirana je "Pravilnikom o jakim alkoholnim pićima". Provedena su brojna istraživanja u kojima se mjerila koncentracija cijanovodične kiseline prisutne u destilatima te je većina destilata sadržavala vrlo male koncentracije cijanovodične kiseline.

Cilj ovog rada bio je prezentirati dosadašnja saznanja o cijanovodičnoj kiselini, zakonskoj regulativi kojom je ona regulirana te o rasponu cijanovodične kiseline u dosad provedenim istraživanjima u području jakih alkoholnih pića.

2. Teorijski dio

2. 1. Povijest jakih alkoholnih pića

Alkoholna pića od davnina su se koristila kao opojna sredstva za uživanje, u religijsko-magijske svrhe, ali i u narodnoj medicini. Pivo i vino bilo je poznato ljudima već nekoliko tisuća godina prije Krista. Vino su drevni narodi nazivali "vodom života" ili "svetim pićem". Jedan od razloga zbog kojeg je već u to vrijeme konzumacija alkohola bila raširena je taj što je konzumiranje obične vode često bilo smrtonosno zbog epidemija zaraznih bolesti koje su se prenosile putem kontaminirane vode. Još iz doba prije Krista postoje arheološki nalazi da je već tada postojalo vinogradarstvo i selektivan uzgoj grožđa u svrhu proizvodnje vina i to na planinama između Kaspijskog i Crnog mora (Mujić, 2010) . Kada je u Starom Egiptu utvrđeno da se groždani sok brzo kvari, a fermentirani sok od grožđa, odnosno vino, ima dulju trajnost počinje masovna proizvodnja vina. Egipćani su za umijeće stvaranja vina zahvaljivali bogu ratarstva Ozirisu. Destilacija se kao proces proizvodnje spominje još u zapisima Aristotela i Hipokrita. Bila je poznata i u Kini (7. st.) te u Indiji (9. st.), a u Europi se prvi put pojavila u 11. stoljeću kada se u Irskoj spominje prva destilacija, a proizvodnja alkohola destilacijom se potom širi u Škotsku i dalje. U 16. stoljeću u Nizozemskoj počinje proizvodnja rakija iz vina, pošto se vino nije moglo spriječiti od kvarenja na dugim putevima koje su imali pomorci. To su piće Nizozemci nazvali Bradwijn te je to ujedno preteča današnjeg Brandyja. U Njemačkoj u to doba počinje proizvodnja žitnih rakija koja se širi čitavom Europom, a posljedica tih tehnologija je proizvodnja pića poput Vodke i Whiskyja. U 17. stoljeću također u Nizozemskoj započinje proizvodnja gina destiliranjem bobica borovice te se trend širi u Englesku. U istom stoljeću je dvostrukom destilacijom proizvedeno danas vrlo prepoznatljivo piće Cognac, a zatim i Calvados. Do naglog razvitka i poboljšanja procesa destilacije došlo je poslije Prvog, a naročito poslije Drugog svjetskog rata.

Povijest jakih alkoholnih pića u Hrvatskoj vezana je uz proizvodnju maraschino likera u 17. stoljeću kada je Francesco Drioli došao iz Istre u Zadar i osnovao tvornicu likera. Iako je Zadar u to vrijeme već imao nekoliko destilerija za proizvodnju maraschino likera, Drioli se posvetio podizanju proizvodnje na industrijsku razinu. Nešto kasnije, 1862. osnovana je prva Zagrebačka tvornica pića koju zatim kupuje Franjo Pokorny i osniva tvornicu "Franjo Pokorny". Ovaj izuzetan poduzetnik i autor slavnog Pelinkovca vrlo brzo proširuje posao na brojna europska tržišta, a zahvaljujući iznimnoj kvaliteti proizvoda oni se piju i na francuskom carskom dvoru Napoleona III. Također započinje i proizvodnju Lavova, šljivovice i drugih

alkoholnih pića. Zagrebački poduzetnik i trgovac vinima Mijo Arko 1867. osniva tvornicu „Arko“ opremljenu najmodernijom tehnologijom koja se bavila proizvodnjom alkoholnih pića poput šampanjca, brandyja i likera. Zagreb 1886. dobiva novu tvornicu „Patria“, tvornicu finih likera, koja svojim kvalitetnim proizvodima osvaja tržište, među kojima je najpoznatiji Patria brandy medicinal, koji se prodavao u ljekarnama, a i danas se nalazi na tržištu pod imenom Prima Brand. Nakon kraja II. Svjetskog rata tvornice za proizvodnju alkoholnih pića Patria, Pokorny i Baker ujedinjuju se u „Zagrebačku tvornicu likera i vina“. Dvije godine kasnije Zagrebačka tvornica likera i Plemenika (bivši „Arko“) spajaju se u novo poduzeće – Tvornica likera i vinarstvo, odnosno današnji Badel.

2. 2. Definicija i podjela jakih alkoholnih pića

Jaka alkoholna pića prema pravilniku su alkoholna pića koja su najmjenjena za ljudsku potrošnju, imaju posebna senzorska svojstva, sadrže minimalno 15 % vol. alkohola te su proizvedena destilacijom, maceracijom ili miješanjem alkoholnog pića s jednim ili više drugih jakih alkoholnih pića (NN 61/2009).

Postoji više različitih podjela jakih alkoholnih pića, ovisno o sirovini iz koje se dobiva, postupku dobivanja ili udjelu alkohola. Jedna od podjela jakih alkoholnih pića ovisno o sirovini, tehnologiji i uvjetima proizvodnje jaka alkoholna pića dijeli na: rakije, rakije po posebnim postupcima, jaka alkoholna pića po posebnim postupcima, likere i koktele (Mujić, 2010). Ovisno o vrsti i načinu proizvodnje, Mrvčić i sur. (2012) navode podjelu jakih alkoholnih pića na čiste destilate te likere i miješana pića. U destilirana jaka alkoholna pića ubrajaju se jaka alkoholna pića čiji se volumni udio alkohola kreće između 30-50 %. Destilirana alkoholna pića još možemo podijeliti na voćne rakije, rakije od grožđa, šećerne rakije i žitne rakije. Tako se u destilirana alkoholna pića ubrajaju: šljivovicu, viljamovku, rum, whiskey, gin i druga pića. Likeri i mješana alkoholna pića su jaka alkoholna pića koja sadrže više od 15 % alkohola i sadrže više od 100 grama šećera po litri alkoholnog pića (uz iznimku kod trešanja/višanja i encijana). Destilirana alkoholna pića te likeri i miješane rakije razlikuju se i s obzirom na način proizvodnje. U oba slučaja proces proizvodnje kreće s pripremom sirovine te se nastavlja s alkoholnom fermentacijom. Ovisno o jakom alkoholnom piću slijedi destilacija i završna obrada u slučaju destiliranih alkoholnih pića dok poslije destilacije kod likera slijedi maceracija pa onda završna obrada likera i miješanje alkoholnih pića kod

miješanih jakih alkoholnih pića. Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima, jaka alkoholna pića klasificirana su u čak 44 kategorije.

Proizvodnja jakih alkoholnih pića temelji se na alkoholnoj fermentaciji šećera iz grožđa ili voća. Fermentaciji podliježu i drugi sastojci biljnih sirovina poput pektina i aminokiselina (Mujić, 2010).

Alkoholna fermentacija je biokemijski proces u kojem se fermentabilni šećeri razgrađuju do etilnog alkohola i ugljikovog dioksida pomoću kvasaca. Početak fermentacije je spontan, a odvija se pod djelovanjem različitih sojeva kvasaca, najčešći među njima su *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Torulospora* i *Zygosaccharomyces*. *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* najčešće je korišteni kvasac u procesu alkoholne fermentacije zbog svoje tolerancije na visoke koncentracije alkohola te zbog relativno brzog previranja šećera. Nedostatak kvasca *Saccharomyces cerevisiae* je taj što ne fermentira polisaharide pa je njih prije procesa fermentacije potrebno hidrolizirati do jednostavnih šećera poput glukoze. U fermentabilne šećere ubrajaju se svi šećeri koje kvasac *Saccharomyces cerevisiae* može razgraditi, a to su monosaharidi, disaharidi te neki trisaharidi poput maltotrioze. Tijekom procesa fermentacije oko 95 % šećera pretvara se u etanol i ugljikov dioksid, a ostatak se troši na rast kvašćevih stanica i sporedne proizvode alkoholnog vrenja. Oni uključuju male količine međuproizvoda glikolize, viših alkohola i estera. Kod fermentacije je bitno da se ona pokrene brzo kako bi se izbjeglo razvijanje drugih, nepoželjnih mikroorganizama. Ovo je anaeroban proces i time su inaktivirani eventualni aerobni mikroorganizmi koji bi se mogli razviti na komini. Ostale mikroorganizme inaktivirat će visoka koncentracija etanola. Alkoholna fermentacija može biti kontrolirana ili spontana. Spontna fermentacija je ona koju provode autohtoni mikroorganizmi iz ploda čija se komina fermentira. To su najčešće mješovite kulture prisutne u sirovini. Ovakva fermentacija traje dulje od kontrolirane te može dati proizvode neujednačene kvalitete. Kontrolirana fermentacija se provodi sa čistim kulturama mikroorganizama te su produkti ove fermentacije ujednačene kvalitete. Selekcionirane stanice kvasca koje se koriste u kontroliranoj fermentaciji omogućuju brži tijek fermentacije, veću toleranciju na osmotski tlak i etanol te omogućuju sintezu poželjnih nusproizvoda .

Destilacija je fizikalno-kemijski proces separacije u kojemu se hlapivi sastojci tekućine koja sadrži etanol zagrijavanjem prevode u plinovito stanje, a zatim se hlađenjem te pare kondenziraju u destilat koji sadrži najvećim dijelom etanol i vodu, a manjim dijelom druge primjese. Vrelište etanola (78,3 °C) je niže u odnosu na vrelište vode (100 °C) te zbog toga

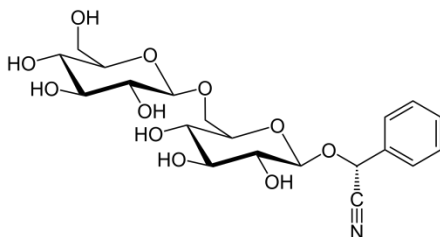
etanol počinje isparavati prije vode i hlađenjem ukapljuje se u drugoj posudi čime se dobiva destilat. Kada prevrela komina dostigne temperaturu vrenja vode ona također počinje isparavati i postaje dio destilata. S obzirom na navedeno destilat u početku sadrži veću koncentracija etanola koja se smanjuje zbog sve intenzivnijeg isparavanja vode. Destilacija slijedi nakon završene fermentacije. Proces destilacije mora se provesti odmah nakon završene fermentacije ili najkasnije 2-3 tjedna nakon fermentacije kako nebi došlo do rasta plijesni i bakterija što bi uzrokovalo kvarenje komine. Destilaciju možemo provoditi jednokratno ili dvokratno. Kako bi proizveli kvalitetan destilat potrebno je provoditi dvokratnu destilaciju. Ova vrsta destilacije obuhvaća dvije destilacije, prvu i drugu. U prvoj destilaciji destilirana komina s ili bez odvijanja prvijenca u kojoj nam je cilj koncentrirati etanol te odvojiti krute sastojke. Dobiveni destilat naziva se sirovi destilat ili "meka rakija". Druga destilacija je redestilacija sirovog destilata uz izdvajanje tri frakcije: prvijenac, srce i patoka. Prva frakcija, prvijenac, sadrži nepoželjne spojeve poput acetaldehida i metanola te se izdvaja iz destilata. Druga frakcija, srce, je kvalitetna frakcija odnosno u ovoj frakciji se nalazi glavina etanola. Treća frakcija, patoka, sadrži vrlo mali udio etanola te se odvaja u posebnu posudu. Cilj druge destilacije je dodatno pročišćavanje meke rakije kroz odvajanje frakcija te povećanje volumnog udjela alkohola. Uređaji za destilaciju nazivaju se kotlovi te se razlikuju razne vrste kotlova od koji su neki: Alambik kotlovi, uređaj za neprekidnu destilaciju komine, konjak uređaj tipa Najkom i drugi (Mujić, 2010). Kotlovi za destilaciju najčešće se izrađuju od bakra, a nešto je rjeđa upotreba nehrđajućeg čelika i inoxa. Bakar je dobar kod izrade kotlova zbog visoke toplinske vodljivosti, odnosno ima visoki koeficijent toplinske vodljivosti, pa brzo preuzima toplinu pare i predaje ju okolini. Otporan je na kiseline što je izrazito bitno jer se pH prevrelih komina kreće između 2,5 i 4,5. Bakar također veže sumporovodik koji je jedan od nepoželjnih sastojaka prevrele komine. Uz navedene prednosti bakar također sudjeluje i u konverziji sastojaka komine kao katalizator reakcija. Kako ne bi narušili aromu rakije i njenu kvalitetu, destilaciju prevrele komine potrebno je provoditi polagano.

2. Cijanovodična kiselina

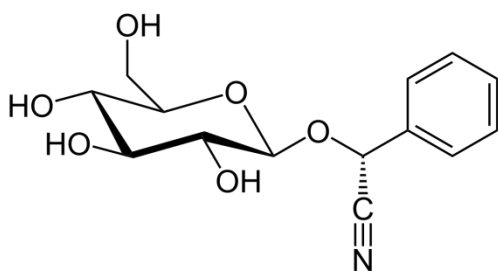
Cijanovodična kiselina je slaba kiselina koja je prisutna kao cijanovodična kiselina ili kao odgovarajući anion odnosno cijanid, ovisno o pH vrijednosti. Iako su cijanidi toksični za ljude, razlog zbog kojeg je cijanovodična kiselina regulirana kod proizvodnje jakih alkoholnih pića je taj što je ona prekursor kancerogenog spoja etil karbamata.

2. 1. Sirovine i nastanak cijanovodične kiseline

Cijanovodična kiselina je produkt enzimske hidrolize cijanogenih glikozida koji su prisutni u mnogim biljkama (Balcerek, 2018). Kada govorimo o izvoru cijanogenih glikozida kod jakih alkoholnih pića najčešće mislimo na koštice plodova od kojih se dobiva alkoholno piće. Koštunjičavo voće, čije su koštice glavni izvor cijanogenih glikozida, dolaze iz porodice Rosaceae. U taj rod ubrajaju se šljive, trešnje, višnje, breskve i marelice. Najčešći cijanogeni glikozidi iz kojih hidrolizom nastaje cijanovodična kiselina jesu amigdalini i prunazini (Balcerek i Szopa, 2012). Amigdalini, čiju strukturu vidimo na slici 1. , se nalaze u jezgrama i sjemenkama voća dok se prunazini, čiju strukturu možemo vidjeti na slici 2., nalaze u mesu i pokožici voća (Rajković i Perić, 2005).

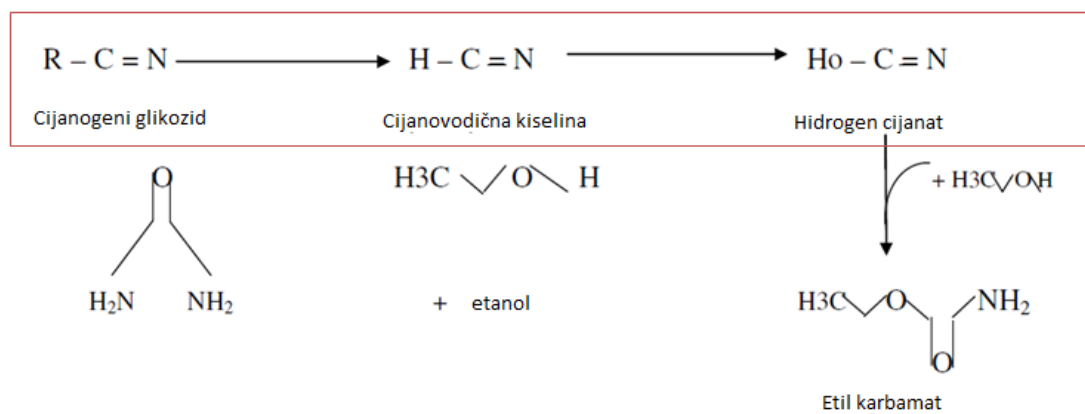


Slika 1. Struktura amigdalina (Anonymous 1)



Slika 2. Struktura prunazina (Anonymous 1)

Do razgradnje cijanogenih glikozida kod proizvodnje jakih alkoholnih pića dolazi samo ako se voće mehanički obrađuje. Sami cijanogeni glikozidi i enzimi koji ih razgrađuju ne nalaze se na istom mjestu tako da sve dok nema razbijanja stanične stijenke neće doći do njihove razgradnje. Prilikom tehnoloških procesa koji uključuju gnječenje ploda s košticom dolazi do razbijanja koštica te se omogućava djelovanje β -glukozidaze na cijanogene glikozide odnosno dolazi do enzimske hidrolize, čiji su produkti šećeri i cijanhidrini. Nastali cijanhidrini mogu se raspadati spontano ili raspadi mogu biti katalizirani pomoću enzima hidrosinitril liaze pri čemu nastaju aldehid ili keton te cijanovodična kiselina. Oksidacijom cijanovodične kiseline nastaju cijanidi koji s etanolom tvore etil karbamat (Gowd, 2018). Opisano nastajanje etil karbamata možemo vidjeti na Slici 3. Kada jednom krene reakcija nastajanja etil karbamata ona se ne može zaustaviti. Razni okolišni uvjeti također imaju utjecaj na stvaranje etil karbamata od kojih neki mogu biti svjetlo i visoka temperatura. Cijanovodična kiselina također može biti oslobođena iz neusitnjenih koštica tijekom duljeg skladištenja fermentirane komine. Tijekom destilacije u svim frakcijama možemo naći cijanovodičnu kiselinu (Commission Recommendation 2016). Iako je prilikom proizvodnje voćnih rakija od koštunjica voća poželjan okus "gorkog badema" koji daje benzaldehid koji nastaje razgradnjom cijanogenih glikozida iz koštica voća, njihova prisutnost predstavlja opasnost za zdravlje pošto je cijanovodična kiselina koja se dobiva razgradnjom glikozida prekursor kancerogenog etil karbamata.



Slika 3. Nastajanje etil karbamata iz etanola i hidrogen cijanata (Victory, 2013)

Etil karbamat, još poznat pod imenom uretan, ester je karbaminske kiseline. Proučavanje i korištenje etil karbamata počelo je s početkom dvadesetog stoljeća. Iako je korišten u medicinske svrhe 1943. godine otkriveno je kako je zapravo sami spoj kancerogen. Iako postoje i drugi prekursori iz kojih ovaj spoj nastaje primjećujemo kako je cijanovodična

kiselina glavni prekursor ovog spoja (Weber, 2009). Istraživanja su pokazala kako je na 260 uzoraka različitih jakih alkoholnih pića s koncentracijama cijanovodične kiseline u rasponu od 1 - 40 mg/l samo 17,5 % uzoraka pokazalo da se koncentracija etil karbamata mijenja s promjenom koncentracije cijanovodične kiseline (EFSA, 2007). Bez obzira na prethodno navedeno, utvrđeno je da što je viša koncentracija cijanovodične kiseline to je viša koncentracija i etil karbamata (Weber, 2009). Do nastajanja etil karbamata iz cijanovodične kiseline u jakim alkoholnim pićima može doći na više načina. Kao što je navedeno do njegovog nastajanja dolazi zbog prisutnosti cijanogenih glikozida u plodovima, međutim u većini slučajeva etil karbamata nastaje iz cijanovodične kiseline tijekom zagrijavanja, odnosno tijekom destilacije. Do nastajanja etil karbamata tijekom destilacije dolazi zbog različitih reakcija koje se odvijaju u plinovitom stanju. Pretpostavlja se da se vrlo mali udio etil karbamata koji se nalazi u destilatu dobiva isparavanjem zbog svojeg visokog vrelišta (184 °C) (Weber, 2009). Kao glavni prekursori etil karbamata tijekom destilacije smatraju se HCN i HCNO. Obje kiseline imaju vrlo nisku temperaturu vrelišta te zbog toga u plinovitoj fazi mogu reakcijama davati etil karbamata, pogotovo ako se prilikom destilacije koristi kotao od bakra, pošto onda bakar služi kao katalizator (Weber, 2009).

S obzirom da je cijanovodična kiselina prekursor za stvaranje etil karbamata postavilo se pitanje postoji li veza između odgovarajućih količina etil karbamata i cijanovodične kiseline u alkoholnim pićima. Kako bi se ispitala ova hipoteza napravljena je linearna regresija između log transformiranih vrijednosti cijanovodične kiseline i etil karbamata otkrivenih u 260 uzoraka alkoholnih pića s gornjim vrijednostima oba spoja. Koeficijent regresije iznosio je 0,284 s korelacijskim koeficijentom (R) 0,419 za logaritamski transformirane koncentracije (EFSA, 2007). Stoga između ova dva spoja postoji određena veza sudeći prema korelacijskom koeficijentu, ali sa značajnim raspršenjem podataka. Koeficijent determinacije (R²) pokazao je kako je samo 17,5 % uzoraka pokazalo da promjene u razini etil karbamata mogu biti objašnjene promjenama u koncentraciji cijanovodične kiseline (EFSA, 2007). Uzrok ovim rezultatima je taj što na stvaranje etil karbamata utječe više faktora koji u ovom slučaju nisu bili poznati.

Kako bi se izbjeglo stvaranje cijanovodične kiseline kao prekursora etil karbamata službeni list Europske Unije izdao je preporuke za prevenciju i smanjenje koncentracije etil karbamata u rakijama od koštunjičavog voća. Tako se prilikom pripreme komine treba postupati na način da se izbjegne otpuštanje cijanovodične kiseline. Koštunjičavo voće trebalo bi biti visoke kvalitete, bez mehaničkih oštećenja i mikrobiološkog kvarenja jer bi oštećeno i pokvareno

voće moglo sadržavati veću količinu slobodnih cijanida (Commission Recommendation 2016). Preporučuje se da voće bude otkošteno, a u slučaju kada voće nije otkošteno treba paziti da kod tehnološke obrade ne dođe do razbijanja koštica. Kod fermentacije se predlaže upotreba selekcioniranih kultura kvasaca. Prevrela komina od neotkoštenog voća treba se što brže destilirati kako ne bi došlo do oslobađanja cijanovodične kiseline uslijed dugog stajanja prevrele komine. Uređaji i oprema za destilaciju trebaju biti prikladni kako bi se osiguralo da cijanovodična kiselina ne bude prenesena u destilat. Oprema za destilaciju trebala bi sadržavati automatske uređaje za ispiranje i bakrene katalizatore. Automatski uređaji za ispiranje će održavati opremu čistom dok će bakreni katalizatori vezati cijanovodičnu kiselinu prije nego ona pređe u destilat. Automatski uređaji za ispiranje nisu potrebni kod diskontinuirane destilacije. U slučajevima kada se ne koriste bakreni katalizatori preporuka je da se u prevrelu kominu dodaju bakrena sredstva prije procesa destilacije. Iako je navedeno da bakar inhibira nastajanje etil karbamata on svejedno može poticati formiranje etil karbamata u destilatu. Stoga se preporučuje upotreba kondenzatora od nehrđajućeg čelika na kraju destilacije. Tijekom destilacije redovno se treba provjeravati koncentracija cijanovodične kiseline. Ako koncentracija cijanovodične kiseline u destilatu prijeđe granicu od 1 mg/l preporuča se redestilacija sa bakrenim katalizatorima ili bakrenim sredstvima (Commission Recommendation, 2016). Destilati sa razinom cijanovodične kiseline blizu 1 mg/l također bi trebali biti redestilirani ili, gdje redestilacija nije moguća, trebali bi se pohraniti na mjesto koje nije izloženo svjetlu te bi vrijeme skladištenja trebalo biti što manje. Također se u slučaju skladištenja preporuča izbjegavanje viših temperatura.

3. Zakonska regulativa

3. 1. Zakonska regulativa alkoholnih pića

Zahtjeve sigurnosti i kvalitete koji se odnose na različite vrste alkoholnih pića uspostavile su određene zemlje i međunarodne organizacije poput Europske Unije (EU), Codex Alimentarius Komisije (CAC), Kanade, Sjedinjenih Američkih Država, Kine, Australije i mnogih drugih. Ovi standardi koji se primjenjuju na alkoholna pića usmjereni su na poboljšanje kvalitete i zaštitu potrošača. Oni se međusobno razlikuju u svojim pojedinostima poput sirovina ili tehnika obrade. Prema trenutnim podacima pokazatelji kvalitete i sigurnosti alkoholnih pića u trenutnom zakonodavstvu uključuju metanol, više alkohole, etil karbamat, cijanovodičnu kiselinu, olovo, patulin, ftalate i aldehide (Pang, 2017).

Komisiju Codex Alimentarius (CAC) zajednički su osnovale *Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda* (FAO) i *Svjetska zdravstvena organizacija* (WHO). Komisija omogućava neutralni forum gdje se vlade, skupine potrošača, industrija i predstavnici sveučilišta sastaju radi razmjene ideja o sigurnosti hrane, trgovini te usvajanju Codex-ovih dokumenata (<https://www.hzn.hr/default.aspx?id=175>). Na listi Codexovih standarda nisu navedeni točni standardi koji se odnose na jaka alkoholna pića. Prema Codex STAN 193-1995 "Opći standard za onečišćenje i toksine u hrani i hrani za životinje" (engl. "General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed") samo za olovo i patulin navedene su maksimalne vrijednosti (Pang, 2017).

U Sjedinjenim Američkim Državama Američko ministarstvo za riznicu, alkohol i duhan, porez i trgovinu (engl. the U.S. Department of the Treasury, Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau) upravlja proizvodnjom, uvozom i distribucijom alkoholnih pića dok je Američka uprava za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration, FDA) odgovorna za prisutnost nepoželjnih spojeva u alkoholnim pićima.

U Kanadi na saveznoj razini odgovornost za sigurnost hrane podijeljena je na dvije organizacije, "Health Canada" i Kanadska agencija za inspekciju hrane (engl. Canadian Food Inspection Agency). Health Canada ustanovila je popis raznih kemijskih spojeva u određenoj maloprodajnoj hrani, a na tom popisu našao se i etil karbamat. To je bio prvi propis koji je označio maksimalnu količinu etilnog karbamata (Pang, 2017).

Australija i Novi Zeland rade zajedno kroz "Standardi hrane Australije i Novog Zelanda" (engl. "Food Standards Australia New Zealand") te druge organizacije. FSANZ je odgovorna za

razvijanje standarda kojima podliježu i jaka alkoholna pića. Standardi FSANZ koji se odnose na alkoholna pića jesu Standard 1.4.1 "Kontaminanti i prirodni toksini" i Standard 1.3.1 "Prehrambeni aditivi" te Standard 2.7.5 "Alkoholi" koji se bavi definicijama te zemljopisnim oznakama (Pang, 2017). U Kini Nacionalni centar za procjenu sigurnosti hrane (engl. National Food Safety Assessment Centre) vrši procjenu rizika te razvija standarde sigurnosti hrane. Najvažniji standard u vezi kvalitete i sigurnosti alkoholnih pića je GB 2757-2012 "Nacionalni standard sigurnosti hrane za destilirana pića i alkoholna pića" (engl. "National Food Safety Standard for Distilled Spirits and Formulated Spirits") (Pang, 2017). Ovi standardi obavezni su za domaća alkoholna pića kao i za uvozna alkoholna pića.

3. 2. Zakonska regulativa cijanovodične kiseline i etil karbamata

Europska agencija za sigurnost hrane procijenila je kako su glavni izvor cijanovodične kiseline u prehrani prehrambeni proizvodi, a ne alkoholna pića. Međutim s obzirom da je cijanovodična kiselina prekursor etil karbamata njena vrijednost treba biti regulirana. U Kini, koncentracija cijanida ne smije prelaziti 8 mg/l izraženih kao cijanovodična kiselina. Australija i Novi Zeland odnosno FSANZ odredila je najstrože granice za cijanovodičnu kiselinu u jakim alkoholnim pićima koja iznosi 1 mg/l (Pang, 2017). U Sjedinjenim državama nije regulirana maksimalna količina cijanovodične kiseline u rakijama. CAC nije ustanovila maksimalnu količinu za cijanovodičnu kiselinu ali je ukazala na potencijalno povećanje koncentracije etil karbamata ukoliko krajnji destilat sadrži više od 1 mg/l cijanovodične kiseline, u tom slučaju predlaže se redestilacija. Kanada zasada nije ustanovila maksimalnu količinu za cijanovodičnu kiselinu u rakijama.

Prisutnost etil karbamata u rakijama briga je zdravstva još od 1985. kada su kanadske vlasti zabilježile visoke količine etil karbamata u alkoholnim pićima, pogotovo u uvoznim njemačkim rakijama. Kanada je posljedično uvela slijedeće smjernice za etil karbamata: 30 µg/l za stolna vina, 100 µg/l za desertna vina, 150 µg/l za destilirana pića te 400 µg/l za voćne rakije (Health Canada. 2014. Canadian standards (maximum levels) for various chemicals in specified retail foods). Sjedinjene Američke Države utvrdile su maksimalne količine etil karbamata u vinima, 15 µg/l za vina te 60 µg/l za desertna vina, dok za jaka alkoholna pića granica nema. Ni CAC ni Europska Unija nisu zakonski odredili maksimalnu količinu etil karbamata u alkoholnim pićima.

Europska komisija je zatražila znanstveno mišljenje o zdravstvenom riziku koji predstavljaju etil karbamat i cijanovodična kiselina u hrani i alkoholnim pićima, posebno u rakijama od koštunjičavog voća. Kao odgovor, Europska organizacija za sigurnost hrane (EFSA) je 2006. godine zatražila podatke o koncentracijama etil karbamata i cijanovodične kiseline u hrani i alkoholnim pićima. Sedam članica Europske Unije, odbor za kontrolu alkoholnih pića u Ontariju te Vinski institut Kalifornije dostavili su rezultate analiza etil karbamata koji pokrivaju analize u razdoblju od 1998. do 2006. godine. Tri članice Europske Unije dostavile su i podatke o cijanovodičnoj kiselini u alkoholnim pićima. Među dostavljenim podacima bilo je 33 000 rezultata testiranja alkoholnih pića. Za 93 % uzorka piva, 42 % uzoraka vina, 15 % uzoraka rakija rezultati su bili ispod granice detekcije (EFSA, 2007). Kao što je bilo očekivano visoka koncentracija etil karbamata bila je u rakijama koštunjičavog voća, gdje je 68.9 % analiza uzoraka pokazalo je koncentraciju od 100 µg/kg, 20,2 % analiza pokazalo je koncentraciju od 1000 µg/kg, dok je sedam analiza pokazalo koncentraciju od 10 000 µg/kg etil karbamata. Što se tiče cijanovodične kiseline, od 716 rezultata analiza koji su pristigli njih 685 bili su rezultati analiza voćnih rakija. Među uzorcima, koncentracije cijanovodične kiseline varirale su od 13 µg/kg u jednom uzorku viskija, 149 µg/kg u jednom uzorku vina, 300 µg/kg u jednom uzorku ruma, između 130-880 µg/kg za osam uzoraka vinjaka, 120-5000 µg/kg za četiri uzoraka destilata, do 25-70,000 µg/kg za voćne rakije (EFSA, 2007). U dva uzorka koncentracija cijanovodične kiseline bila je veća od maksimalno dozvoljene.

U Republici Hrvatskoj Pravilnikom o jakim alkoholnim pićima uređuju se opći zahtjevi kakvoće, definicija, opisivanje, prezentiranje i označavanje jakih alkoholnih pića kao i zaštita zemljopisnih oznaka jakih alkoholnih pića. S obzirom da je Hrvatska članica Europske Unije njeni zakoni o jakim alkoholnim pićima usklađeni su sa Europskim zakonima. Tako je maksimalna dozvoljena koncentracija cijanovodične kiseline u rakijama od voća i rakijama od voćne komine 7 grama po hektolitr preračunato na 100 % vol. alkohola (NN 61/2009). Naša dva najpoznatija proizvoda od koštunjičavog voća, koja su podrijetlom iz Hrvatske, također podliježu regulativi cijanovodične kiseline, Stara šljivovica, prikazana na slici 4, i Slavonska šljivovica, prikazana na slici 5, smiju sadržavati maksimalno 10 g cijanovodične kiseline po hektolitr 100 % vol. alkohola. (NN 61/2009). Kao što je navedeno Europska Unija nema donesene maksimalne granice što se tiče etil karbamata u jakim alkoholnim pićima te tako oni ne postoje ni u hrvatskom pravilniku o jakim alkoholnim pićima.



Slika 4. Stara šljivovica (Anonymous 2)



Slika 5. Slavenska šljivovica (Anonymous 3)

4. Cijanovodična kiselina u jakim alkoholnim pićima

4. 1. Utjecaj rezidbe na količinu HCN-a u šljivovicama

Popović i suradnici ispitivali su utjecaj intenziteta rezidbe sorte šljive Čačanska rodna s dva lokaliteta, Drenova i Vrnčani, na tehnološka svojstva ploda i karakteristike šljivovica proizvedenih primjenom istog tehnološkog postupka. Različita rezidba rezultira različitim tehnološkim svojstvima ploda, razlikama u prinosu te razlikama u kemijskom sastavu i senzorskim karakteristikama dobivenih rakija šljivovica. Sorta Čačanska rodna odlikuje se samooplodnošću, visokim postotkom zametanja cvjetova te sklonosti prevelikoj rodnosti. Intenzitet rezidbe može biti, u ovisnosti od nasada, od slabe rezidbe do vrlo jake rezidbe, dok postoje nasadi gdje se odražavaju tradicionalni načini uzgoja, odnosno u njima se rezidba ne obavlja.

Prilikom ispitivanja provedena je rezidba u dvije varijante: K.-kontrola je bez rezidbe, odnosno uklonjene su samo suhe i polomljene grane i R.- rezidba umjerene jačine. Prerada plodova iz oba nasada obavljena je na isti način. Po 20 kg plodova šljiva s košticama, u tri ponavljanja za svaku varijantu, blago je izmuljano i stavljeno na alkoholno vrenje u plastične spremnike. U obje varijante provodila se spontana fermentacija sa mikroflorom prisutnom na pokožici plodova. Destilacija prevrelih komina obavljena je na pilot uređaju za šaržnu destilaciju šaranstskog tipa izrađenom od bakra. Prinosi meke rakije (u litrama, sa sadržajem etanola 28 vol %) za pojedine varijante uzorka, koji su dobiveni destilacijom prevrele komine od 20 kg šljiva preračunati su na 100 kg šljiva. Potencijalni prinosi rakije i stvarni koeficijent iskorištenja šećera u tijeku fermentacije određeni su na osnovu udjela koštica i sadržaja ukupnih šećera u plodu. Redestilacija mekih rakija napravljena je na istom uređaju za destilaciju uz odvajanje frakcija. Za analize je korištena samo srednja frakcija destilacije odnosno srce. Kemijska analiza obavljena je standardnim metodama (SI list SFRJ 70/1987).

Tablica 1. Vrijeme sazrijevanja, masa ploda i koštice te udio koštice u plodu (Popović i sur., 2008)

Lokalitet	Varijanta rezidbe	Vrijeme sazrijevanja	Masa ploda (g)	Masa koštice (g)	Udio koštice u plodu (%)
Drenova	K	8. IX	19,77	1,05	5,31
Vrnčani	K	8. IX	23,35	1,28	5,48
Prosjek	K	8. IX	21,56	1,17	5,40
Drenova	R	8. IX	35,64	1,52	4,26
Vrnčani	R	8. IX	31,85	1,52	4,77
Prosjek	R	8. IX	33,75	1,52	4,52

Tablica 2. Kemijski sastav i senzorska ocjena proizvedenih šljivovica (Popović i sur., 2008)

Lokalitet	Varijanta rezidbe	Etaol (vol%)	Ukupne kiseline (mg/l)	Esteri (mg/l)	Ukupni aldehidi (mg/l)	Metanol (g/l)	Furfural (mg/l)	Benzaldehid (mg/l)	HCN (mg/l)	Senzorska ocjena
Drenova	K	44,20	1284	1895	48,40	971	8,55	96,30	1,96	17,50
Vrnčani	K	44,65	1613	2680	83,60	1002	8,26	111,80	2,90	17,59
Prosjek	K	44,43	1449	2288	66,00	987	8,41	104,50	2,43	17,55
Drenova	R	44,70	2099	2595	44,00	1094	8,21	93,80	0,48	17,34
Vrnčani	R	44,55	1347	2323	127,60	902	7,92	91,60	4,37	17,03
Prosjek	R	44,63	1723	2459	85,80	998	8,07	92,70	2,43	17,19

Zbog različitog intenziteta rezidbe došlo je do razlike u udjelu koštica u plodovima. Udio koštica u plodu značajan je kod plodova šljive, jer se u košticama nalaze cijanogeni glikozidi, od kojih je najpoznatiji amigdalini, koji su prekursori benzaldehida, HCN-a i etil karbamata. Kod rezidbe umjerene jačine udio koštica bio je manji nego kod plodova sa neobrezanih stabala. Kod obrezanih plodova udio koštica iznosi oko 4,5 %, dok u plodovima neorezanih stabala iznosi oko 5,3 % (Popović i sur., 2008). Sadržaj koštice u plodu Čačanske rodne kreće se u ovisnosti o intenzitetu rezidbe između 4,04 % (jaka rezidba) do 7 % (bez rezidbe). Kod benzaldehida primjećena je ovisnost između udjela koštice i udjela

benzaldehida u dobivenoj šljivovici kod HCN-a nije uočena ista pravilnost. U svim šljivovicama sadržaj HCN-a kretao se ispod maksimalnog sadržaja HCN-a koji je propisan "Pravilnikom o kvalitetu alkoholnih pića".

4. 2. Kemijske karakteristike "Sliwowica Lacka" i drugih šljivovica

Šljivovica "Lacka" je jaka, destilirana, rakija od šljiva koja se proizvodi u prigorskom području Poljske. Satora i Tuszynski određivali kemijski sastav ovog alkoholnog pića, proizvedenog u godinama od 2001. do 2004. iz plodova iz dva različita voćnjaka s prigorskog prostora Poljske te su se rezultati usporedili sa drugim vrstama šljivovica. U Poljskoj se proizvodnja šljivovice "Lacka" smatra dugogodišnjom tradicijom. Njena originalnost posljedica je visokog udjela šećera i posebnoj aromi plave šljive kao i raznolika mikroflora koja je prisutna tijekom spontane fermentacije. Kvasci *Kloeckera apiculata* i *Candida pulcherrima* imaju vrlo važnu ulogu u stvaranju estera tijekom fermentacije te najčešće započinju proces fermentacije. S porastom koncentracije etanola glavnu ulogu u fermentaciji preuzima kvasac *Saccharomyces cerevisia*. Uzorci u istraživanju bile su šljivovice iz mjesta Jazowsko (2001.-2002.) te iz mjesta Lacko (2002.-2004.), koje su proizvedene spontanom fermentacijom. Također se analizirala komercijalna poljska šljivovica "Polmos", slovačka "Prava Bosacka" šljivovica te rumunjska "Tzuica" iz Cluj-Napoca. Koncentracija HCN-a određena je fotometrijskom metodom pomoću barbiturne kiseline i γ -picolina. Metoda uključuje pretvorbu HCN-a u klorcijan, uz pomoć kloramina T, koji sa barbiturnom kiselinom i γ -picolinom daje obojani kompleks. Intenzitet obojenja se zatim mjeri spektrofotometrijski na 605 nm valne duljine te se uspoređuje s obojenjem otopina standarda.

Tablica 3. Kemijske karakteristike analiziranih šljivovica (Satora i Tuszynski, 2007)

Uzorak šljivovice	Etanol (% vol)	HCN mg/l
Šljivovica Jazowsko (2001)	64,7	1,14
Šljivovica Jazowsko (2002)	64,3	1,14
Šljivovica Lacko (2002)	64,5	1,15
Šljivovica Lacko (2003)	69,3	1,05
Šljivovica Lacko (2004)	72,5	0,67
Šljivovica "Polmos"	70,0	0,93
Slovačka "Prava Bosacka"	48,1	3,20
Rumunjska "Tzuica"	51,5	5,91

Testirani uzorci imali su relativno male količine HCN-a u rasponu od 1 mg/l u poljskim šljivovicama te do 6 mg/l u slovačkoj šljivovici (Satora i Tuszynski, 2007). Ove razlike u koncentracijama HCN-a mogu biti posljedice različitog načina proizvodnje šljivovica. Također udio HCN-a u uzorku ovisi i o udjelu koštica tijekom fermentacije, temperature procesa, vrstama mikroorganizma koji provode fermentaciju, koncentraciji šećera te drugim faktorima (Satora i Tuszynski, 2007).

4. 3. Utjecaj kvasca na prinos fermentacije i hlapljivi profil destilata šljive "Węgierka Zwykła"

Pielech-Przybylska i sur., 2016 istraživali su utjecaj imaju različiti mikroorganizmi na prinos fermentacije i hlapljivi profil destilata šljiva Węgierka Zwykła. Fermentacija komine šljiva prilikom procesa izrade šljivovice može biti provedena sa autohtonim kvascima koji se nalaze na pokožici plodova ili sa selekcioniranim čistim kulturama. Na šljivama roda "Węgierka Zwykła" našle su se većinom kvascima slične gljivice roda *Aureobasidium sp.* i *Kloeckera apiculata* kvasac koje čine više od 80 % fungalne mikrobiote. Ovi mikroorganizmi pokreću proces fermentacije. U prvom dijelu fermentacije dominiraju vrste *K. apiculata* i *Candida pulcherrima*, međutim, kako fermentacija ide dalje ove vrste postepeno umiru, a daljnju fermentaciju provodi kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.

Materijal za proizvodnju destilata bila je komina pripremljena od šljiva roda "Węgierka Zwykła". U svaku kominu dodan je diamonijev fosfat kao izvor dušika za kvasce. Fermentacija komine započeta je s tri različita seta mikroorganizma. Prva komina fermentirana je sa autohtonim mikroorganizmima s pokožice šljiva, odnosno provodila se spontana fermentacija. Druga komina fermentirana je također s autohtonim mikroorganizmima s pokožice šljiva, ali u kombinaciji s mikroorganizmima na grožđicama kako bi se procijenio njihov utjecaj na hlapljive spojeve i organoleptička svojstva. Treća komina fermentirana je sa suhim vinskim kvascem BC S103 (*Saccharomyces bayanus*). Svaka komina bila je fermentirana pri 18 °C i 30 °C. Cijanovodična kiselina određivana je spektrofotometrijski pomoću piridin-pirazol reagensa.

Tablica 4. Koncentracije hlapivih komponenti u destilatima šljivovica (40 % vol) (Pielech-Przybylska i sur., 2016)

Kemijski spoj	Destilat šljivovice					
	S-18	S-30	R-18	R-30	Sb-18	Sb-30
HCN	0,45 g/l	0,55 g/l	0,25 g/l	0,50 g/l	0,20 g/l	0,35 g/l

Testirani destilati sadržavali su vrlo male količine HCN-a u rasponu od $0,20 \pm 0,05$ do $0,50 \pm 0,08$ mg/l u 40 % vol alkohola (Pielech-Przybylska i sur., 2016). Pokazalo se kako je u šljivovicama koje su fermentirane pri temperaturi od 18 °C manja koncentracija cijanovodične kiseline nego u šljivovicama koje su fermentirane pri 30 °C. S obzirom na vrstu mikroorganizma koji je provodio fermentaciju može se primjetiti da su najmanje količine cijanovodične kiseline uočene kod fermentacije s vinskim kvascem, što može biti posljedica toga da se s ovim kvascem fermentacija odvijala najbrže, odnosno bio je veći udio etanola u početnoj fazi nego kod autohtonih mikroorganizama što je dovelo do inhibicije enzima koji provode hidrolizu cijanogenih glikozida.

4. 4. Biosinteza etanola i oslobađanje cijanovodične kiseline tijekom fermentacije voćnih komina

Biosinteza etanola i oslobađanje cijanovodične kiseline važni su faktori koji karakteriziraju proces fermentacije voćnih komina. Balcerek i Szopa proučavali su utjecaj predtretmana voća i metode provedbe procesa fermentacije (sa ili bez dodatka vinskog kvasca) na dinamiku biosinteze etanola i oslobađanja cijanovodične kiseline i njihove koncentracije u dobivenim rakijama.

Za pripremu komina koristili su se plodovi šljive (*Węgierka Zwykła*) i crne aronije (*Aronia melanocarpa*). Oba ploda homogenizirani su u kominu prije fermentacije. U kominu od šljiva dodane su neusitnjene koštice u količini od 10 % od ukupne mase komine šljiva. U obje kaše dodan je diamonijev fosfat kao izvor dušika za kvasce. Varijante predobrade ploda i metoda fermentacija bile su sljedeće:

A - sirova voćna komina, *S. bayanus* vinski kvasac

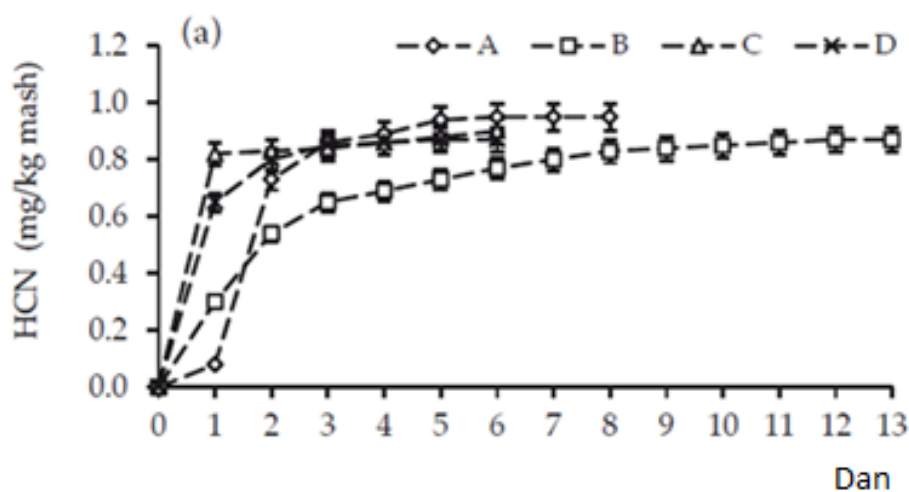
B - sirova voćna komina, spontana fermentacija

C - voćna komina koja je podvrgnuta pektolitičkom djelovanju, *S. bayanus* vinski kvasac

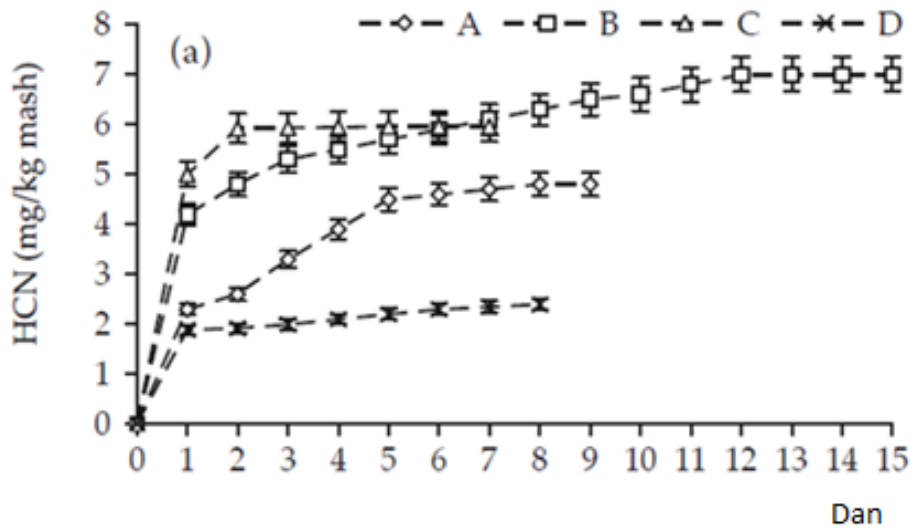
D - voćna komina nakon obrade s visokim tlakom i temperaturom, *S. bayanus* vinski kvasac.

Fermentacija komina odvijala se pri temperaturi između 28 °C i 30 °C. Uzorci fermentirane komine uzimani su svaki dan kako bi se odredio sadržaj etanola i cijanovodične kiseline. Postupak uzimanja uzoraka nastavio se svki dan dok koncentracija etanola nije postala stabilna. Destilacijom dobivenih prevrelih komina dobivene rakije sadržavale su 18,5-24,5 % vol etanola. Etanol je zatim rafiniran na otprilike 42 % vol alkohola.

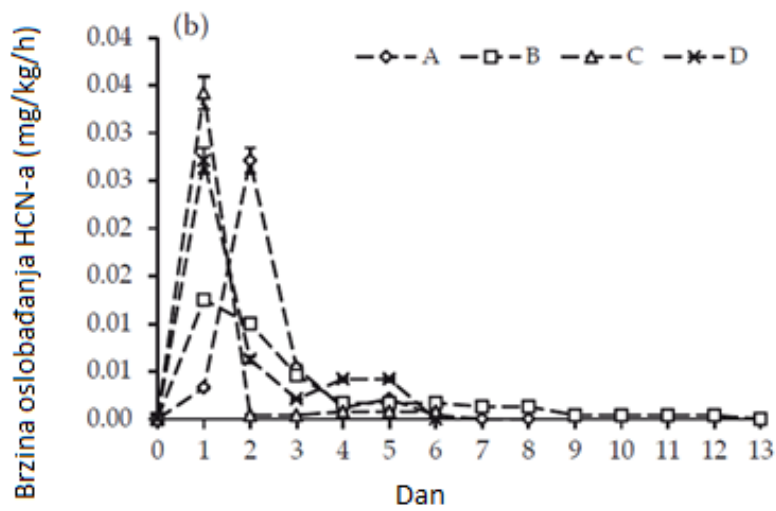
Balcerek i Szopa određivali su udio slobodne cijanovodične kiseline te ukupnu količinu cijanovodične kiseline. Udio slobodne cijanovodične kiseline određivan je pomoću piridin-pirazol reagensa. Ukupna cijanovodična kiseline, zbroj slobodne i vezane cijanovodične kiseline, određivana je nakon kiseline hidrolize sa 50 % -nom o-fosforom kiselinom.



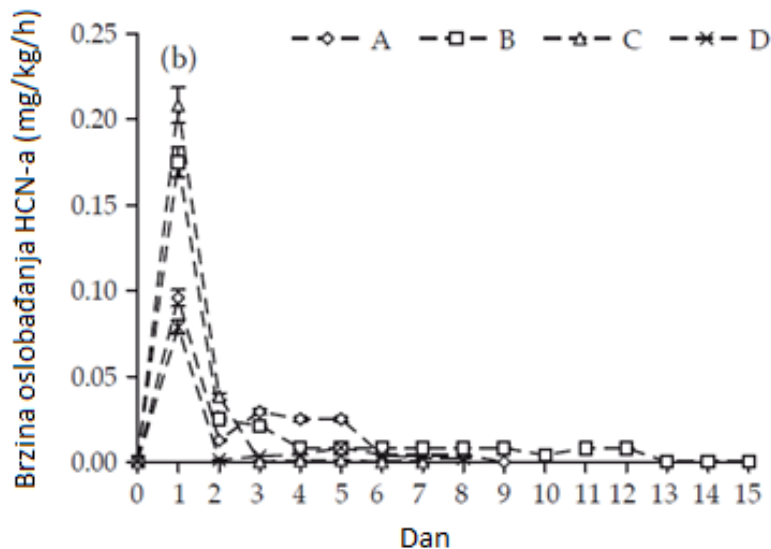
Slika 6. Promjena koncentracije HCN-a prilikom fermentacije komine od šljiva (Balcerek i Szopa, 2012)



Slika 7. Promjena koncentracije HCN-a prilikom fermentacije komine od aronije (Balcerek i Sazpa, 2012)



Slika 8. Brzina fermentacije komine od šljiva (Balcerek i Sazpa, 2012)



Slika 9. Brzina fermentacije komine od aronije (Balcerek i Sazpa, 2012)

A - sirova voćna komina, *S. bayanus* vinski kvasac, B - sirova voćna komina, spontana fermentacija, C - voćna komina koja je podvrgnuta pektolitičkom djelovanju, *S. bayanus* vinski kvasac, D - voćna komina nakon obrade s visokim tlakom i temperaturom, *S. bayanus* vinski kvasac

Kvantitativna analiza oslobađanja cijanovodične kiseline pokazala je kako je količina formiranog HCN-a veća u komini aronije nego u komini šljiva. Razlike u količini oslobođene HCN može biti uzrokovane time što su u komine šljive dodane neusitnjene koštice te nije došlo do hidrolize cijanogenih glikozida iz koštica. Uzrok tome također može biti i razlika u koncentracijama cijanogenih prekursora, aktivnosti β -glukozidaza u biljnom materijalu i brzini oslobađanja cijanida.

Što se tiče fermentacije sirove voćne kaše šljiva sa *S. bayanus* najveća koncentracija HCN bila je u početnoj fazi fermentacije, pogotovo drugi dan fermentacije (0,027 mg/kg/h), isto se može uočiti i kod sirove kaše aronije kod fermentacije sa *S. bayanus* s time da je u ovom slučaju najveća koncentracija bila prvi dan (0,096 mg/kg/h) (Balcerek i Sazpa, 2012). S daljnjim tokom fermentacije u ovom slučaju došlo je do naglog smanjenja brzine hidrolize cijanogenih glikozida, a s time i do manjeg oslobađanja HCN-a. Kod spontane fermentacije sirovih voćnih kaša najveća brzina oslobađanja HCN-a zabilježena je prvi dan odnosno prije predfermentacije plodova. Kod voćne kaše šljiva ona je iznosila 0,013 mg/kg/h dok je kod aronije iznosila puno više, čak 0,175 mg/kg/h (Balcerek i Sazpa, 2012). Ove razlike opet se

moгу pripisati razlici u koncentraciji cijanogenih glikozida u voćnim kašama. U slučaju fermentacije s vinskim kvascem nije došlo do značajne razlike u koncentraciji cijanovodične kiseline između voćne kaše šljiva koja je spontano fermentirana i one koja je fermentirana s vinskim kvascem. Za razliku od toga kod voćne kaše aronije došlo je do značajne razlike u koncentraciji HCN-a između spontano fermentirane komine i komine fermentirane vinskim kvascem. Komina koja je spontano fermentirana imala je čak 46 % višu koncentraciju HCN-a od one koja je fermentirana vinskim kvascem. Maksimalno oslobađanje HCN-a kod obje komine koje su pektolitički tretirane i spontano fermentirane zabilježeno je prvi dan fermentacije. Međutim dodatak pektolitičkih enzima nije samo ubrzao hidrolizu pektina već je uzrokovao i oslobađanje značajne količine HCN-a u prvom danu procesa. Količina HCN-a prvi dan varirala je oko 84 % za aroniju i 91 % za šljivu od ukupno određene količine nakon završene fermentacije. Zanimljivo je kako ukupna količina oslobođenog HCN-a tijekom fermentacije komine koja je tretirana pektolitičkim enzimima nije značajno različita od količine oslobođenog HCN-a u komini koja nije pektolitički tretirana, dok je u slučaju aronije količina oslobođenog HCN-a u pektolitički tretiranoj komini 24 % viša nego u komini koja nije prethodno pektolitički tretirana (Balcerek i Sazpa, 2012). Najveća brzina oslobađanja HCN-a tijekom fermentacije predtretiranih komina uočena je u fazi prefermentacije i za kominu šljive iznosila je 0,027 kg/mg/h, a za kominu aronije 0,079 kg/mg/h (Balcerek i Sazpa, 2012). Pokazalo se kako je predtretman tlakom i temperaturom značajno smanjio oslobađanje HCN-a u komini aronije i to čak za 50 % od sirove komine aronije. Povišena temperatura dovodi do inaktivacije enzima koji provode hidrolizu cijanogenih glikozida prisutnih u komini. Istu stvar uvidjeli su i Voldřich i Kyzlink (1992) kada su koristili HTST metodu kao predtretman voća s visokim udjelom cijanogenih glikozida. Kod komine šljiva nije došlo do razlike u koncentraciji HCN-a u predtretiranoj komini u odnosu na ne tretiranoj komini što je posljedica neusitnjenih koštica koje su dodane komini.

U dobivenim destilatima šljive i aronije došlo je do značajne razlike u količinama slobodne cijanovodične kiseline. Kod aronije je ona iznosila od 3,65 mg/l do 28,90 mg/l u 40 % vol destilatu, dok je kod šljive ona iznosila od 2,54 mg/l do 10,50 mg/l u 40 % vol destilatu. (Balcerek i Sazpa, 2012). Nijedan destilat nije sadržavao HCN u vezanom obliku. Koncentracije HCN-a u destilatima šljivovice od komine koja je tretirana pektolitičkim enzimima i komine sirove šljive bile su slične te su bile u rasponu od 2,80 mg/l do 2,90 mg/l u 40 % vol, slični rezultati zabilježeni su i kod destilata aronije (Balcerek i Sazpa, 2012). Destilat šljivovice koji je dobiven spontanom fermentacijom imao je značajno veću koncentraciju HCN-a, 10,52 mg/l u 40 % vol (Balcerek i Sazpa, 2012). Spontana fermentacije

komine od aronije rezultirala je značajnim povećanjem koncentracije slobodne HCN te je iznosila 28,90 mg/l u 40 % vol destilatu. Predobrada tlakom i temperaturom kod destilata aronije dovela je do smanjenja koncentracije HCN-a za 71 % u odnosu na destilat dobiven iz sirove komine aronije. Koncentracija HCN-a kod destilata šljive čija je komina predtretirana tlakom i temperaturom nije postigla značajnu razliku u koncentraciju u odnosu na destilat sirove komine šljive, što opet možemo pripisati dodavanju neusitnjenih koštica u kominu.

5. Zaključak

1. Cijanovodična kiselina prisutna je u jakim alkoholnim pićima kao produkt hidrolize cijanogenih glikozida koji se nalaze u košticama voća koje se koristi za pripremu komina.
2. S obzirom da je cijanovodična kiselina prekursor kancerogenog spoja etil karbamata njena vrijednost regulirana je pravilnikom kod rakija od koštunjičavog voća.
3. Iako cijanovodična kiselina nije jedini prekursor etil karbamata, jedan je od najčešćih, te je povećana koncentracija cijanovodične kiseline povezana s povećanom koncentracijom etil karbamata.
4. Prema zakonskoj regulativi maksimalna dozvoljena koncentracija cijanovodične kiseline u rakijama od voća i rakijama od voćne komine iznosi 7 grama po hektolitr preračunato na 100 % vol. alkohola
5. Gotovi svi destilati o obrađenoj literaturi sadržavali su manju koncentraciju cijanovodične kiseline od maksimalno dozvoljene.
6. Iako su rezultati istraživanja zadovoljavajući i dalje je naglasak na opreznosti prilikom proizvodnje rakija od koštunjičavog voća.

6. Literatura

Badel 1862. - <https://www.badel1862.hr/>

Pristupljeno 12.travnja.2021

Balcerek M., Szopa J. (2018) Ethanol Biosynthesis and Hydrocyanic Acid Liberation During Fruit Mash Fermentation. *Czech Journal of Food Sciences* **30**: 144 - 152.

Commission recommendation (EU) (2016)

Official Journal of the European Union, 2016/22

EFSA (2007) Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants. *The EFSA Journal* (2007) **551**: 1-44

Gowd V., Su H., Karlovsky P., Chen W. (2018) Ethyl carbamate: An emerging food and environmental toxicant. *Food Chemistry* **248**: 312–321

Hrvatski zavod za norme - <https://www.hzn.hr/default.aspx?id=175>

Pristupljeno 15.ožujka.2021

Maraska - <https://maraska.hr/>

Pristupljeno 12.travnja.2021

Mrvčić J., Posavec S., Kazazić S., Stanzer D., Peša A., Stehlik-Tomas, V (2012) Spirit drinks: a source of dietary polyphenols. *Croatian journal of food science and technology* **4**: 102-111

Mujić I. (2010) Tehnologija proizvodnje jakih alkoholnih pića, 1. izd., Veleučilište u Rijeci, str. 15.

Satora P., Tuszynski T., (2007) Chemical characteristics of Sliwowica Łacka and other plum brandies. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**: 167–174

Pang XN Li ZJ, Chen JY, Gao LJ, Han BZ. (2017) A Comprehensive Review of Spirit Drink Safety Standards and Regulations from an International Perspective. *Journal of Food Protection* **80**: 431 - 442

Pielech-Przybylska K., Balcerek M., Nowak A., Patelski P., Dziekonska-Kubczak U. (2016) Influence of yeast on the yield of fermentation and volatile profile of 'Węgierka Zwykła' plum distillates. *Journal of the Institute of Brewing*, **122**: 612-623

Popović B., Nikićević N., Tešević V., Srećković M., Gavrilović-Damnjanović J., Mitrović, O. (2008) Utjecaj intenziteta rezidbe na karakteristike šljivovica sorte Čačanska rodna, *Zbornik naučnih radova*, **14**: 63 – 73

Pravilnik o jakim alkoholnim pićima (2009)

Narodne novine **61** (NN 61/2009)

Rajković M., Perić L. (2005) Određivanje aldehida: furfurala i benzaldehida u rakiji šljivovici. *Hemijska industrija* **59**: 78 - 83

Weber J.V., Sharypov V.I. (2009) Ethyl carbamate in foods and beverages: a review. *Environment Chemistry Letters* **7**, 233–247

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

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

Tajana Rtković

ime i prezime studenta