

Usporedba fizikalno-kemijskih i senzorskih karakteristika vinskih destilata

Pezer, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:623872>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Martina Pezer

653/PI

**USPOREDBA FIZIKALNO-
KEMIJSKIH I SENZORSKIH
KARAKTERISTIKA VINSKIH
DESTILATA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Jasne Mrvčić, izv. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice Stele Križanović, dipl. ing. i u proizvodnom pogodnu Badel 1862 d.d. uz stručno vodstvo Vesne Jurak, dipl. ing. i Mirele Krajnović, mag. ing.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasni Mrvčić, asistentici dipl. ing. Steli Križanović te voditeljicama moga diplomskog rada dipl. ing. Vesni Jurak i mag. ing. Mireli Krajnović, koje su mi svojim znanstvenim i stručnim savjetima pomogle u izradi ovog diplomskog rada.

Najveće hvala mojim roditeljima, **Miri i Kruni**, koji su mi kroz sve godine školovanja pružali neizmjernu ljubav, podršku i razumijevanje.

Mom bratu **Marku**, na svim pohvalama i kritikama utkanim u moju današnju osobnost.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

USPOREDBA FIZIKALNO-KEMIJSKIH I SENZORSKIH KARAKTERISTIKA VINSKIH DESTILATA

Martina Pezer 653/PI

Sažetak: Vinski destilat je jako alkoholno piće koje se proizvodi destilacijom crnog ili bijelog vina. Cilj ovog rada bio je odrediti fizikalno-kemijske i senzorske karakteristike 13 uzoraka vinskih destilata različitog vremena odležavanja u hrastovim bačvama. Za određivanje hlapivih spojeva u uzorcima vinskih destilata korišten je plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID). Koncentracija ukupnih fenola određena je spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, a polifenolni profil vinskih destilata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Rezultati su pokazali da se starenjem vinskih destilata značajno povećava udio fenolnih spojeva, koji pozitivno utječu na njihovu kvalitetu i senzorska svojstva. U uzorcima vinskih destilata koji ne stare ili su kratko odležavali, fenolni spojevi nisu detektirani ili su detektirani u niskim koncentracijama. Najviša koncentracija fenolnih spojeva ($1861,4 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1} \text{ GAL}$) zabilježena je u uzorku vinskog destilata označenog brojem 5. Galna, vanilinska, siringinska i elaginska kiselina, te vanilin i siringaldehid najzastupljeniji su fenolni spojevi u uzorcima vinskih destilata.

Ključne riječi: vinski destilat, hlapivi spojevi, fenolni spojevi, proces odležavanja

Rad sadrži: 65 stranica, 24 slike, 10 tablica, 45 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Pomoć pri izradi: dr. sc. Stela Križanović, asistent, dipl. ing. Vesna Jurak i mag. ing. Mirela Krajnović

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić
2. Izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić
3. Izv. prof. dr. sc. Damir Stanzer
4. Doc. dr. sc. Leo Gracin

Datum obrane: 21. srpnja 2016.

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

COMPARISON OF PHYSICOCHEMICAL AND SENSORY CHARACTERISTICS OF WINE DISTILLES

Martina Pezer 653/PI

Abstract: Wine distillate is a strong beverage which has been produced by distillation of red or white wine. The purpose of this thesis was to determine the physicochemical and sensory characteristics among 13 wine distillate samples with different time duration of aging in oak barrels. For the determination of volatile compounds in samples of wine distillate is used gas chromatograph with flame-ionization detector (GC-FID). Concentration of total phenols was determined with Folin-Ciocalteu reagent, and polyphenolic profile of wine distillate was defined by high-performance liquid chromatography. The results showed that aging wine distillate significantly increases the proportion of phenolic compounds, which positively affect the quality and sensory properties. In those wine distillate samples where isn't present aging period or that were being aged in barrels for a short aging time, phenolic compounds have not been detected or have been detected in low concentrations, while the highest phenolic compound concentration ($1861,4 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1} \text{ GAL}$) was observed in sample of wine distillate marked with number 5. Galic, vanilic, syringic and elagic acid, syringaldehyde and vanillin are the most present phenolic compounds in samples of wine distillate.

Keywords: wine distillate, volatile compounds, phenolic compounds, process of maturation.

Thesis contains: 65 pages, 24 figures, 10 tables, 45 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: Ph.D. Jasna Mrvčić, Associate Professor

Technical support and assistance: Ph.D. Stela Križanović, Assistant, B.Sc. Vesna Jurak, and M.Sc. Mirela Krajnović

Reviewers:

1. Ph.D. Karin Kovačević-Ganić, Full Professor
2. Ph.D. Jasna Mrvčić, Associate Professor
3. Ph.D. Damir Stanzer, Associate Professor
4. Ph.D. Leo Gracin, Assistant Professor

Thesis defended: 21 July 2016

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DEFINICIJA I PODJELA JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA.....	2
2.2. RAKIJA OD VINA	3
2.2.1. Proizvodi destilacije	3
2.3. VINSKI DESTILAT.....	4
2.4. TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE VINSKIH DESTILATA	5
2.4.1. Odabir sorti grožđa.....	6
2.4.2. Muljanje, runjenje, maceracija i prešanje grožđa	7
2.4.3. Alkoholna fermentacija	7
2.4.4. Destilacija.....	9
2.4.4.1. Prvi tok (<i>prvijenac</i>).....	10
2.4.4.2. Drugi, srednji tok (<i>srce</i>).....	11
2.4.4.3. Treći tok (<i>patoka</i>).....	11
2.4.4.4. Dinamika prelaska pojedinih sastojaka u destilat	11
2.4.5. Odležavanje vinskog destilata	12
2.5. VAŽNE KEMIJSKE KOMPONENTE VINSKIH DESTILATA	15
2.5.1. Etanol	15
2.5.2. Metanol.....	16
2.5.3. Kiseline.....	16
2.5.4. Esteri.....	16
2.5.5. Viši alkoholi	17
2.5.6. Fenolni spojevi	17
2.6. SENZORSKA PROCJENA.....	19
2.6.1. Senzorsko ocjenjivanje jakih alkoholnih pića	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	22
3.1. MATERIJALI.....	22
3.1.1. Vinski destilati.....	22
3.2. METODE RADA	23
3.2.1. Određivanje stvarne alkoholne jakosti.....	23
3.2.2. Određivanje ukupnih kiselina	24
3.2.3. Određivanje viših alkohola (plinska kromatografija GC/FIS).....	24
3.2.4. Određivanja ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa.....	27
3.2.5. Određivanje fenolnih spojeva HPLC metodom.....	28
3.2.6. Senzorsko ocjenjivanje	32
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	33
4.1. ALKOHOLNA JAKOST	33
4.2. UKUPNE KISELINE	34

4.3. ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA PRISUTNIH U UZORCIMA VINSKIH DESTILATA	35
4.3.1. UKUPNI ESTERI	35
4.4.2. Metanol.....	36
4.4.3. Viši alkoholi	37
4.4.3.1. <i>i-amilni alkohol</i>	38
4.4.3.2. <i>i-butanol</i>	40
4.4.3.3. <i>n-propanol</i>	40
4.4.3.4. <i>2-butanol</i>	41
4.4.2.5. <i>n-butanol</i>	42
4.4. ODREĐIVANJE UKUPNE KOLIČINE POLIFENOLNIH SPOJEVA SPEKTOFOTOMETRIJSKOM METODOM.....	44
4.5. ODREĐIVANJE POLIFENOLNOG PROFILA UZORAKA VINSKIH DESTILATA TEKUĆINSKOM KROMATGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI.....	45
4.6. SENZORSKO OCIJENJIVANJE UZORAKA VINSKIH DESTILATA	58
5. ZAKLJUČCI	61
6. LITERATURA	62

1. UVOD

Prvi pouzdani zapisi o dobivanju destilata poznati su tek u 11. stoljeću, kada je pronađena mogućnost kondenzacije lakše hlapivih spojeva hlađenjem. U početku su destilate proizvodili kemičari i farmaceuti pa su se ti proizvodi većinom koristili kao lijek. U 16. stoljeću u Nizozemskoj počinje proizvodnja rakija iz vina, jer pomorci na svojim dugotrajnim putovanjima nisu mogli sačuvati vino od kvarenja te su ga destilirali. To piće su Nizozemci nazvali Brandwein, što je podrijetlo današnjeg Brandyja. Nakon tog perioda započinje masovna proizvodnja vinskih destilata te voćnih rakija. Srednji vijek, naročito u Francuskoj, obilježava procvat proizvodnje rakije od grožđa i drugog voća. S vremenom su se usavršili uređaji za preradu voća i žitarica, pogotovo uređaji za destilaciju, koji u novije vrijeme predstavljaju složena industrijska postrojenja koja prerađuju velike količine prevrele komine, proizvodeći destilate, odnosno rakije. Početkom 17. stoljeća u Francuskoj dvostrukom destilacijom proizvedeno je i danas na daleko poznato piće Cognac (Stehlik-Tomas i Grba, 2010).

Vinski destilat je jako alkoholno piće proizvedeno destilacijom bijelog ili crnog vina. Dozrijevanjem u hrastovim bačvama vinski destilat postaje vinjak. Kako bi se vinski destilat uspješno proizveo, potrebno je pravilno provesti tehnološki postupak proizvodnje koji uključuje: pravilan odabir sorte grožđa i kontroliranu preradu, alkoholnu fermentaciju, destilaciju i odležavanje. Tijekom alkoholne fermentacije glavnu ulogu u formiranju arome imaju kvasci, među kojima su za proizvodnju vinskih destilata najznačajniji oni iz roda *Saccharomyces*. Destilacija vina u vinski destilat odvija se kontinuirano pri čemu nastaje sirovi destilat. Nakon što se nakupi veća količina sirovog destilata provodi se redestilacija uz odvajanje frakcija kako bi se uklonile nepoželjne primjese, što je u stvari ključni dio proizvodnje kvalitetnog vinskog destilata. Dobiveni svježi destilat se ne koristi direktno u proizvodnji zbog njegove oštine, već se podvrgava odležavanju gdje nastaju spojevi koji značajno doprinose mirisu i okusu vinskih destilata.

Cilj rada će biti odrediti fizikalno-kemijske i senzorske karakteristike 13 uzoraka vinskih destilata različitog vremena odležavanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEFINICIJA I PODJELA JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (2009) jaka alkoholna pića su alkoholna pića namijenjena za ljudsku potrošnju, koja imaju posebna senzorska svojstva, a sadrže minimalno 15 % vol. alkohola.

Mogu biti proizvedena izravno destilacijom, s ili bez dodavanja aroma, prirodno prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla, i/ili maceracijom ili sličnom preradom bilja u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla ili u destilatima poljoprivrednog podrijetla te dodavanjem šećera, aroma ili drugih sladila. Također, mogu biti proizvedena miješanjem jakog alkoholnog pića s jednim ili više drugih alkoholnih pića, ili etilnim alkoholom, ili destilatima poljoprivrednog podrijetla (Pravilnik, 2009).

Ovisno o vrsti sirovine i tehnološkom postupku te količini alkohola i šećera u pićima, jaka alkoholna pića se mogu svrstati u 3 skupine: prirodna jaka alkoholna pića, umjetna jaka alkoholna pića i aromatizirana vina (Stehlik-Tomas i Grba, 2010).

Prirodna jaka alkoholna pića su pića koja se proizvode destilacijom prevrelih "prirodnih supstrata", a karakterizirana su specifičnom aromom koja potječe od sirovina iz kojih su pića proizvedena. U proizvodnji tih pića (npr. šljivovica, konjak, kalvados, viski, tekila, vodka) nije dozvoljena upotreba šećera, škrobnog sirupa ili sirovina na bazi škroba kao niti dodavanje sirovog ili rafiniranog etilnog alkohola te biljnih proizvoda koji su ekstrahirani rafiniranim etilnim alkoholom, umjetnih boja i aroma. Prirodna pića dijele se prema sirovinama iz kojih se dobivaju na voćne rakije (šljivovica, komovica, vinjak), žitne rakije (viski, vodka) i šećerne rakije (rum) (Stehlik-Tomas i Grba, 2010).

Umjetna jaka alkoholna pića su pića koja se proizvode maceracijom sirovina u alkoholu, destilacijom voćnih sokova i/ili dodatkom rafiniranog alkohola i aromatskih supstanci. Sadrže sve karakteristike sirovina iz kojih su proizvedena, i to u oplemenjenom obliku. U tu skupinu pića spada poznati maraskino destilat (Stehlik-Tomas i Grba, 2010). Maraskino destilat se dobiva iz destilata fermentiranih zrelih plodova dalmatinske višnje maraske i destilata macerata lišća i mladih grančica (Mrvčić, 2016).

Aromatizirana vina proizvode se maceracijom mirodija i aroma u prevrelim voćnim sokovima (vinima) sa ili bez dodatka šećera i rafiniranog alkohola. U tu skupinu spadaju vermut i bermet. U posebnu skupinu tih pića spadaju gorki likeri Amaro i Pelinkovac (Stehlik-Tomas i Grba, 2010).

2.2. RAKIJA OD VINA

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (2009) rakija od vina je jako alkoholno piće proizvedeno isključivo iz vinskog destilata koji je dobiven destilacijom vina ili vina pojačanog za destilaciju na manje od 86 % vol. alkohola ili redestilacijom vinskog destilata na manje od 86 % vol. alkohola; koje sadrži količinu hlapivih tvari od najmanje 125 grama po hektolitr preračunato na 100 % vol. alkohola; koje sadrži količinu metanola od 200 grama po hektolitr preračunato na 100 % vol. alkohola.

Alkoholna jakost rakije od vina koja se stavlja na tržište kao gotov proizvod je najmanje 37,5 % vol. te nije dopušteno dodavanje razrijeđenog ili nerazrijeđenog alkohola. Rakija od vina se ne smije aromatizirati, izuzimajući tradicionalne metode proizvodnje. Smije sadržavati jedino karamel kao sredstvo za prilagodbu boje (Pravilnik, 2009).

2.2.1. Proizvodi destilacije

Proizvodi destilacije alkoholno prevrelih proizvoda od grožđa jesu:

- Rakije, komovica (dropica), loza, vinovnica i droždenka
- Vinski destilat
- Vinski alkohol (rafinirani i nerafinirani)
- Vinjak (Pravilnik, 1996).

Komovica je jako alkoholno piće proizvedeno destilacijom prevrele groždane komine. Koristi se kao temeljna rakija za proizvodnju travarice, orahovca i domaćih likera. Loza je tradicionalno bezbojno jako alkoholno piće proizvedeno isključivo destilacijom groždane komine tako da se po osebnim senzorskim svojstvima razlikuje od vinskih destilata i rakije od groždanog tropa (Pravilnik, 2009). Vinovica je jako alkoholno piće proizvedeno

destilacijom vina, ili vina sa ili bez vinskog taloga, dok je droždenka jako alkoholno piće proizvedeno destilacijom prevrelog vinskog taloga.

Vinski destilat je jako alkoholno piće proizvedeno destilacijom bijelog ili crnog vina, dok je vinski alkohol proizvod dobiven destilacijom vina ili drugih alkoholno prevrelih proizvoda od grožđa čiji stvarni sadržaj alkohola iznosi najmanje 90 % vol. (Pravilnik, 1996).

Vinjak je jako alkoholno piće koje se proizvodi destilacijom vina i dodatkom aditiva (bonifikatora) te dozrijevanjem vinskog destilata više godina u hrastovim bačvama utvrđenim postupkom (Stehlik-Tomas i Grba, 2010).

2.3. VINSKI DESTILAT

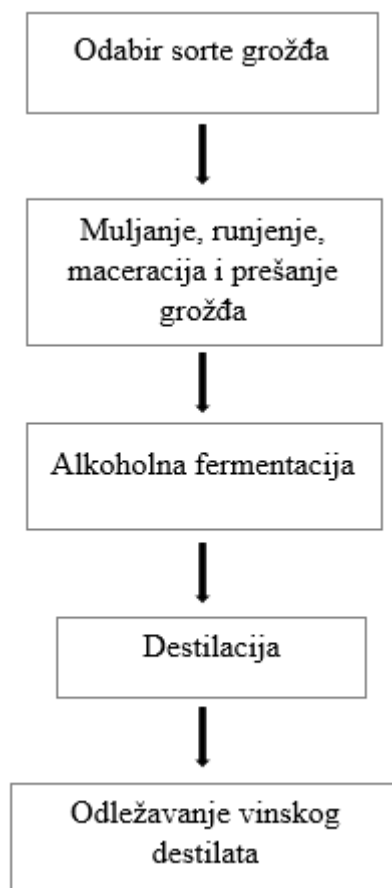
Prema Pravilniku o vinu (1996) vinski destilat je proizvod dobiven destilacijom vina ili vina za preradu koja nemaju više od 2 g L⁻¹ hlapljivih kiselina, izraženih kao octena kiselina, a sadrže:

- stvarnog alkohola od 54 do 72 % vol.
- ekstrakta od 0,2 do 0,5 g L⁻¹
- ukupne kiseline, izražene kao octena kiselina od 50 do 1000 mg L⁻¹
- estera, izraženih kao etil estera octene kiseline od 500 do 2500 mg L⁻¹
- metil alkohola do 0,25 % vol. a.a.
- viših alkohola od 1500 do 5000 mg L⁻¹ a.a.
- aldehida od 40 do 400 mg L⁻¹ a.a.
- furfurola do 20 mg L⁻¹ a.a.
- sumpornog dioksida do 50 mg L⁻¹
- permanganatni indeks: nula
- izdašnost najmanje 1:300.

2.4. TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE VINSKIH DESTILATA

Destilacijom bijelog ili crnog vina i ružice proizvodi se vinski destilat koji dozrijevanjem u hrastovim bačvama postaje vinjak.

Kako bi se vinski destilat uspješno proizvodio i sačuvao dobar glas koji je na početku proizvodnje stekao među jakim alkoholnim pićima, potrebno je pravilno provesti tehnološki postupak proizvodnje vinskih destilata. Tehnološka shema proizvodnje vinskih destilata prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Tehnološka shema proizvodnje vinskih destilata (vlastita shema).

2.4.1. Odabir sorti grožđa

Grožđe i vino kao osnovne sirovine bitno utječu na kakvoću vinskog destilata, a time i na proizvode koji u svom sastavu sadrže vinske destilate.

Visoko kvalitetne sorte grožđa ne moraju uvijek dati i visoko kvalitetni vinski destilat. Ipak, izbor sorti grožđa ima veliki utjecaj na kvalitetu proizvedenog vinskog destilata (Lučić, 1986).

Vinski destilati prihvatljive kakvoće mogu biti proizvedeni samo od sirovine koja posjeduje posebne osobine. Vina za destilaciju moraju imati boju normalnog bijelog vina, zelenkasto-žutu, ili svjetlo crvenu, ako vino potječe od crnih sorata. Osim toga, moraju imati izražene sortne karakteristike arome, bez stranih i nepoželjnih primjesa (Miličević, 2001).

Za proizvodnju vinskih destilata pogodne su sorte koje dospijevaju kasnije, koje daju grožđe sa smanjenim udjelom šećera (ne više od 0,22 %), a sa povećanim udjelom kiselina (6-10 g L⁻¹). S većim udjelom kiselina se lakše provodi proces alkoholne fermentacije bez prisustva sumporovog dioksida te na taj način dobiveno vino sadrži manje aldehida (Sahor, 1999).

Svaka sorta ima svoje specifičnosti u pogledu kemijskog sastava i udjela šećera, kiselina, tvari arome, boje te morfološke građe dijelova ploda. Primjerenim tehnološkim postupcima i promišljenom pripremom proizvoda, moguće je unaprijediti kakvoću, a neprimjerenim, značajno umanjiti, posebice ako se radi o višim stupnjevima tehnološke prerade, kao što je slučaj u proizvodnji destiliranih proizvoda (Gomez i sur., 1994).

Sorte koje se mogu koristiti za proizvodnju vinskih destilata su: graševina bijela, pinot bijeli, chardonnay bijeli, rajnski rizling, ružica crvena i mnoge druge.

Klimatski uvjeti su značajni za sazrijevanje grožđa. Topla klima je nepogodna za proizvodnju grožđa za vinski destilat, jer grožđe obično prezrije i daje vino s više alkohola i manje kiselina. U vlažnoj i hladnoj klimi grožđe ne može normalno sazrijeti, pa truli (Lučić, 1986).

Stoga, za proizvodnju vinskog destilata najbolje odgovara grožđe uzgojeno u umjerenim klimatskim uvjetima. Prilikom same prerade grožđa treba ograničiti oksidaciju i aeraciju mošta, smanjiti drobljenje sjemenki te nakupljanje taninskih tvari u moštu. Proces fermentacije treba biti izvršen do kraja jer neprevreli šećer nije poželjan (Sahor, 1999).

Karbonatna tla daju grožđe pogodno za vinski destilat (Stehlik-Tomas i Grba, 2010).

2.4.2. Muljanje, runjenje, maceracija i prešanje grožđa

Postupak obuhvaća mehaničko drobljenje grožđa pri čemu se peteljkovina odvaja od bobice grožđa (runjenje) te izdvajanje soka i mesa od kože bobice (muljanje). Runjenje se provodi prvenstveno kako bi se smanjila ekstrakcija nepoželjnih fenola iz peteljke koji imaju gorak i trpak okus. Muljanje je najvjerojatnije jedan od najstarijih predfermentacijskih postupaka pri čemu bobice prolaze kroz valjke koji mogu biti različite izvedbe. Po završetku runjenja i muljanja dobije se masulj koji može ići na maceraciju ili direktno na prešanje (Orlić i Jeromel, 2010).

Maceracija je proces ekstrakcije u kojem dolazi do oslobađanja enzima iz stanice grožđa, što omogućuje olakšano otapanje i oslobađanje tvari koje su vezane unutar stanice pokožice, mesa i sjemenki. Obično se maceracija odvija u početnim fazama alkoholne fermentacije (Orlić i Jeromel, 2010).

Postupak prešanja podrazumijeva postepeno stiskanje masulja pri čemu dolazi do odvajanja soka (mošta) od krutih dijelova bobice (kožice, sjemenke i mesa). Razvoj novih tehnika prešanja i samih preša ima pozitivan utjecaj na kakvoću dobivenog mošta (Orlić i Jeromel, 2010).

2.4.3. Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija, ili kako se često naziva alkoholno vrenje, je biokemijski proces transformacije monosaharida (glukoze, fruktoze) u alkohol i ugljični dioksid posredstvom kvasaca i uz sudjelovanje cijelog niza enzima. Prvu formulu kemijskog procesa alkoholne fermentacije postavio je Gay-Lussac, 1815. godine:



Alkoholnu fermentaciju mogu potaknuti predstavnici kvasaca raznih rodova i vrsta (Regadon i sur., 1997).

Mošt predstavlja odličan medij za kvasce općenito jer sadrži sve tvari koje su potrebne za razvoj mikroorganizama. U proizvodnji vina najznačajniji su kvasci iz rodova *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Candida*, *Kloeckera*, *Schizosaccharomyces*, *Metschnikowia* (Orlić i Jeromel, 2010).

Rod *Saccharomyces* obuhvaća najveći broj kvasaca značajnih za alkoholnu fermentaciju. Među njima se nalaze vrste za koje se slobodno može reći da su glavni nosioci procesa fermentacije. Druge su vrste manje zastupljene i predstavljaju pratitelje koji svojim metabolizmom ipak utječu na kvalitetu vina i destilata iz vina (Miličević, 2001).

Kvasci odgovorni za alkoholnu fermentaciju obično potječu iz tri izvora: s površine grožđa, s površine opreme u vinariji, ili iz različitih startera koji se dodaju ukoliko se radi o kontroliranoj alkoholnoj fermentaciji. Brojni čimbenici utječu na ukupnu populaciju kvasaca i odnos među vrstama na grožđu. Ti čimbenici uključuju: temperaturu, oborine i druge klimatske čimbenike, stupanj zrelosti grožđa i vrijeme berbe, upotrebu fungicida, fizikalna oštećenja uzrokovana pticama, mikroorganizmima i insektima te kultivar vinove loze (Orlić i Jeromel, 2010).

Alkoholna fermentacija je anaeroban proces, jer se kisik vrlo brzo potroši iz mošta, a ugljikov dioksid koji nastaje pri izlasku iz komine osigurava anaerobne uvjere i izaziva njezino pjenjenje što podsjeća na vrenje. Kako alkoholno vrenje napreduje tako sintetizirani alkohol djeluje inhibitorno na većinu bakterijskih vrsta te se njihov broj smanjuje. Ugljikov dioksid koji se tijekom fermentacije nakuplja na površini komine onemogućava rast plijesnima i aerobnim bakterijama. Tako stvoreni uvjeti pogoduju samo kvascima koji jedini zaostaju na kraju fermentacije. Najznačajniji kvasci prisutni tijekom spontane fermentacije su kvasci *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima* te *Candida stellata* koji se svrstavaju u skupinu ne-*Saccharomyces* vrsta (Combina i sur., 2005). Njihova aktivnost je izražena u ranijim fazama fermentacije jer im je rast u kasnijim fazama fermentacije inhibiran sintetiziranim etanolom. Kada koncentracija etanola poraste, fermentaciju preuzima i završava *Saccharomyces cerevisiae*. Osim kvasaca i drugi mikroorganizmi sintetiziraju etanol tijekom rasta na ugljikohidratnim sirovinama, ali u toliko malim količinama da je iskorištenje ugljikohidrata u odnosu na nastali etanol neznatno.

2.4.4. Destilacija

Etilni-alkohol (etanol) koji se dobiva alkoholnom fermentacijom, nalazi se u sastavu vina od grožđa, vina od voća, fermentirane melase i drugih sirovina. Pored etanola, u njihovom sastavu se nalaze i brojne druge hlapive i ne hlapive komponente. Proizvodnja jakih alkoholnih pića se zasniva na njihovoj destilaciji na različitim destilacijskim uređajima (Lučić, 1986).

Destilacija je proces separacije u kojemu se hlapivi sastojci tekućine koja sadrži etanol i druge metabolite zagrijavanjem prevode u plinovito stanje, a zatim hlađenjem te pare kondenziraju u destilat koji sadrži najvećim dijelom etanol i vodu, a manjim dijelom druge spojeve arome (Mrvčić, 2016).

U proizvodnji destilata za jaka alkoholna pića, cilj destilacije je izdvojiti kondenzat s optimalnim odnosom alkohola, tvari arome i svih ostalih primjesa, koje definiraju objektivnu kakvoću proizvoda. U većini slučajeva to se postiže dodatnim postupcima redestilacije, deflegmacije ili rektifikacije (Rose, 1985).

Redestilacija je ponovna destilacija već dobivenog sirovog destilata („meke rakije“). Njenim postupkom se povećava udio alkohola na račun smanjenja udjela vode i primjesa. Redestilacija je najstariji oblik pojačavanja i pročišćavanja destilata (Lučić, 1986).

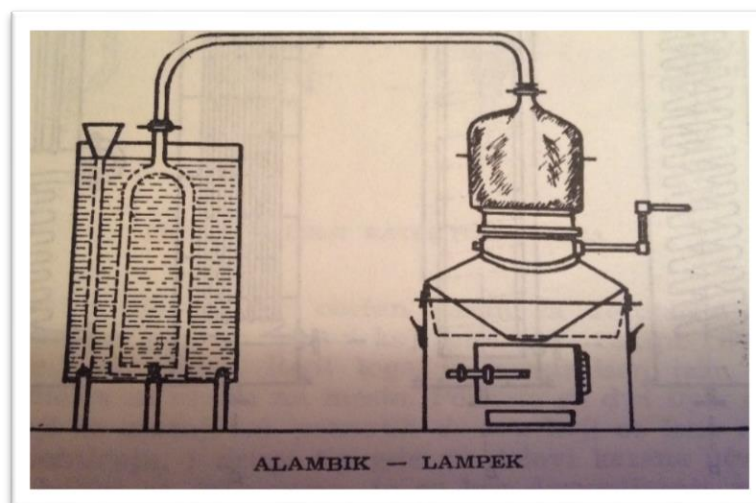
Deflegmacija je proces pojačavanja i pročišćavanja alkohola u destilatu na složenim kotlovima za destilaciju. To su kotlovi za destilaciju koji pored običnog hladnjaka imaju i hladnjak koji se naziva deflegmator (Lučić, 1986).

Rektifikacija je proces destilacije vina, komine ili sirovog destilata na složenim kolonskim uređajima za destilaciju koji pored rektifikacijske kolone, imaju i deflegmator koji pomaže boljem pročišćavanju destilata (Lučić, 1986).

Svaki pojedini postupak ima svoje prednosti i mane, jer sastav kondenzata tijekom destilacije ovisi o karakteristikama svake pojedine komponente, njenoj točki vrenja, topljivosti u alkoholu ili vodi te mijenjaju udjela alkohola tijekom destilacije. Zbog kompleksnosti sastava praktično je teško izračunati koeficijente isparavanja i rektifikacije za svaku pojedinu komponentu i iz njih optimizirati proces destilacije vinskih destilata (Miličević, 2001).

Kotlovi za destilaciju vina u vinski destilat, napravljene su od bakrenog lima sa specijalnim dodacima za otklanjanje sumpornih spojeva (Stehlik-Tomas i Grba, 2010). Najvažniji uređaj u proizvodnji vinskog destilata je Alambik-Lampek (Slika 2). Destilacija vina se odvija serijski ili kontinuirano (Tsakirisa i sur., 2014). Za destilaciju je važno da teče sporo, bez "udara". Kad se izdvoji 1/3 destilata, ili nešto više, smatra se da je destilacija gotova. Takav destilat ima jakost 22-35 % vol. alkohola, a u kotlu zaostaje patočna voda u kojoj ima još dosta vrijednih sastojaka vina, koji se mogu iskoristiti tako što se u patočnu vodu bez alkohola doda sirovi vinski destilat do 10 % i pusti se da smjesa odstoje 3-5 tjedana u hrastovim posudama, a zatim se destilira. Tako dobiveni destilat se naziva "aromatična voda" i dodaje se nakon starenja kod formiranja vinjaka (Lučić, 1986).

Nakon što se nakupi veća količina sirovog destilata, započinje se s redestilacijom uz odvajanje frakcija, kako bi se uklonile nepoželjne primjese kojih ima u suvišku u sirovom destilatu. Uobičajeno se odvijaju tri toka. To je u stvari ključni korak proizvodnje kvalitetnog vinskog destilata (Lučić, 1986).



Slika 2. Alambik-Lampek (Lučić, 1986).

2.4.4.1. Prvi tok (prvijenac)

Prvi tok (prvijenac) je dio redestilata koji se uklanja. Prve kapi redestilata obično su mutne i odstranjuju se. Nakon kraćeg vremena destilat se izbistri i počinje teći uz povećanje

koncentracije alkohola od 75-80 % uz izraziti "bockajući" miris aldehida. Tijekom kratkog vremena koncentracija alkohola se smanjuje na 68-70 %, oštar miris aldehida nestaje i time završava prvi tok (Lučić, 1986).

2.4.4.2. Drugi, srednji tok (srce)

Drugi (srednji) tok traje dosta dugo. U ovom toku destiliraju se pozitivne komponente koje će finalnom proizvodu dati posebnost i ukazati na podrijetlo, odnosno sirovinu od koje je destilat proizveden (Krajnović, 2013). Koncentracija alkohola se dugo ne mijenja i ostaje 68-70 %. Nakon što koncentracija alkohola počne padati, znači da se približava kraj glavnog toka, destilat dobije reski miris i kod jakosti od 50 % na izlazu iz kondenzatora glavni tok je završen (Lučić, 1986). Različiti proizvođači variraju postotak alkohola na izlazu iz kondenzatora pri kojem prekidaju drugu frakciju.

2.4.4.3. Treći tok (patoka)

Treći tok se hvata sve dok koncentracija alkohola ne padne na 0 %, a u kotlu zaostaje patočna voda (Lučić, 1986). U posljednjem toku je najveći udio hlapljivih kiselina. Ovaj tok se može ponovno destilirati kako bi se iskoristio zaostali etanol. Vraćanjem tog toka na ponovnu destilaciju, smanjuje se količina kiselina i teže hlapljivih estera, što je povoljno za kvalitetu vinskog destilata, jer se koristi srednji tok (Stehlik-Tomas i Grba, 2010). Redestilacijom koja se provede na takav način dobije se 1-2 % prvog toka, 30-35 % drugog ili srednjeg toka i 15-25 % trećeg toka, računato na volumen sirovog vinskog destilata. Svježi vinski destilati su oštri i mutni te se stoga ne koriste direktno u proizvodnji, već se podvrgavaju dužem odležavanju, odnosno starenju (Lučić, 1986).

2.4.4.4. Dinamika prelaska pojedinih sastojaka u destilat

Pomoću koeficijenta isparavanja alkohola, primjesa i rektifikacije moguće je odrediti brzinu prelaska pojedinih sastojaka u destilat (Lučić, 1986).

- Etanol i metanol – prelaze u destilat ravnomjerno tijekom cijele destilacije, s postupnim smanjenjem sadržaja alkohola.
- Aldehidi i etil formijat – intenzivno prelaze u destilat u početku destilacije, tako da ih najviše ima u prvijencu te im se potom koncentracija oštro smanjuje.
- Etil-acetat - destilira se u prvoj frakciji uz nagli pad koncentracije, a manje količine mogu dospjeti i u treći tok.
- n-propanol – u potpunosti prelazi u prvu frakciju destilata.
- Butanol, i-butanol i amilni alkohol - prelaze većim dijelom u destilat u prvoj frakciji, a koncentracija im se smanjuje tijekom destilacije.
- Furfurol - pojavljuje se u početku srednjeg (glavnog) toka i do njegovog kraja se povećava, a potom se smanjuje tijekom krajnje frakcije.
- Hlapljive kiseline - najmanje se javljaju u prvom, a najviše u trećem toku.

2.4.5. Odležavanje vinskog destilata

Starenje je jedan od najvažnijih i najskupljih čimbenika koje određuje kvalitetu destiliranih pića (Van Jaarsveld i Hattingh, 2012). Osnovni cilj procesa starenja (odležavanja) destilata je poboljšanje okusa i bukea destilata. Tijekom starenja destilat postaje ugodniji, mekši i harmoničniji.

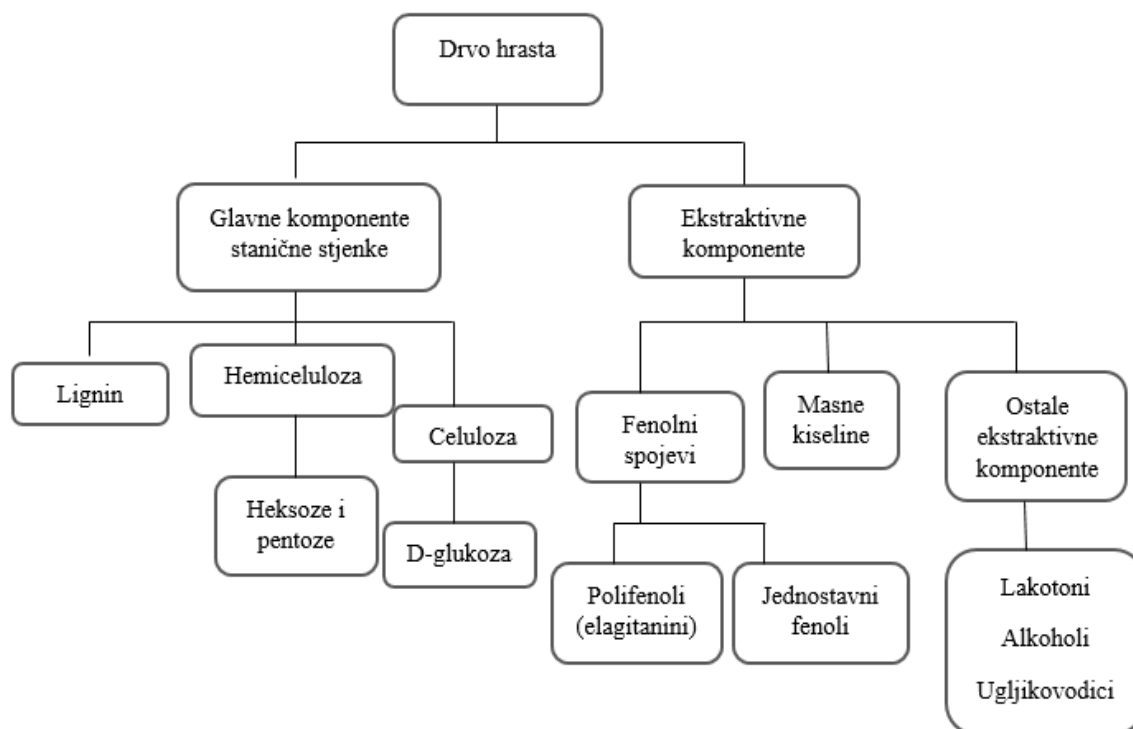
Sazrijevanje i starenje vinskih destilata odvija se u drvenim, uglavnom hrastovim bačvama (Slika 3). Ovaj proces može trajati od nekoliko mjeseci do nekoliko godina (Tsakirisa i sur., 2014). Iako hrastove bačve u prvom redu služe za transport i skladištenje, vrijeme provedeno u njima bitno pridonosi kvaliteti gotovog okusa i mirisa alkoholnih pića (Mosedale i Puech, 1998).



Slika 3. Hrastove bačve za odležavanje vinskih destilata (Anonymous 1).

Dobiveni vinski destilat se ocjenjuje organoleptički i analitički, a zatim se kupažira i puni najprije u nove hrastove bačve, a kasnije se pretače u stare (Lučić, 1986). Novi destilati odležavaju u bačvama maksimalnog kapaciteta 225-1000 L, dok stariji destilati mogu biti pohranjeni u bačvama do 5000 L. Za vrijeme tog razdoblja dolazi do gubitka 2-3 % destilata zbog isparavanja (Tsakirisa i sur., 2014). Nove hrastove bačve prethodno se isperu pregrijanom vodenom parom i hladnom vodom. Bačve se smještaju u prozračne, suhe i zamračene prostorije.

Destilat ostaje u novim bačvama sve dok ne poprimi zlatno žutu boju i ne dobije potrebnu količinu taninskih i ligninskih tvari. Poslije toga vinski destilat se prebacuje u stare bačve u kojima ostaje do kraja procesa starenja (Sahor, 1999). Vrijeme koje je potrebno za zadovoljavajuće sazrijevanje, varira ovisno o kvaliteti sirovog destilata, veličini, porijeklu, i tretmanu paljenja hrastove bačve i okoline u kojoj se proces sazrijevanja odvija. Do promijene okusa destilata dolazi zbog promijene u sastavu i koncentraciji spojeva koji utječu na okus i miris. Ove promjene mogu biti uzrokovane zbog: direktne ekstrakcije drvnih komponenti; reakcije između komponenata drva (Slika 4) i sirovog destilata; reakcijama koje uključuju samo ekstrakciju drva; reakcijama koje uključuju samo komponente destilata; isparavanje hlapljivih spojeva. Ekstrakcija i pretvorba spojeva u hrastovim bačvama ima veliku važnost na kvalitetu konačnog proizvoda (Mosedale i Puech, 1998).



Slika 4. Kemijski sastav drva hrasta (Mosedale i Puech, 1998).

Na početku procesa starenja dolazi do oksidacije etanola u acetaldehid, koji s alkoholima stvara acetale, koji destilatu daju ugodnu aromu i mekan okus. Tijekom procesa starenja ne mijenja se sadržaj estera, već se mijenja njihov odnos. Recimo, povećava se udio etil-acetata, a smanjuje udio estera viših alkohola. Za vrijeme starenja povećava se kiselost destilata čime se olakšava hidroliza hemiceluloze pri čemu se izdvajaju dekstran, ksiloza, arabinoza, galaktoza, glukoza i fruktoza, koje odležanim destilatima daju izrazitu slatkoću, mekoću i punoću (Sahor, 1999). Koncentracija ukupnih fenola raste s vremenom odležavanja. Prvo povećanje koncentracije ukupnih fenola pojavljuje se u prvoj godini odležavanja zbog gradijenta koncentracije između drva i destilata u bačvi (Posavec, 2012).

Na karakteristiku pića koja su odležavala u hrastovim bačvama utječe eugenol, koji utječe na okus i višak laktona za koje je utvrđeno da su izravno povezano sa ocjenom kvalitete vinskih destilata i smatraju se poželjnim za većinu destiliranih pića. Loša kvaliteta viskija karakterizirana je prisutnošću velikog broja fragmenata glicerola i masnih kiselina (Mosedale i Puech, 1998).

Nakon 18-24 mjeseca odležavanja odabiru se destilati koji idu na finalizaciju, a oni koji su namijenjeni za daljnje starenje se egaliziraju i nastavlja se starenje. Isti postupak se ponavlja nakon 5 godina, s tim da se tada odvajaju destilati koji nastavljaju starenje od onih koji će odmah biti korišteni. Destilati mogu odležavati do 20 i više godina (Lučić, 1986). Klasičnim procesom starenja dobiva se visokokvalitetan proizvod, a problem ovog procesa je njegova dugotrajnost i skupoća.

2.5. VAŽNE KEMIJSKE KOMPONENTE VINSKIH DESTILATA

Alkoholi su derivati ugljikovodika s otvorenim ili zatvorenim lancem u kojima je jedan ili više vodikovih atoma zamijenjen hidroksilnom grupom. Prema broju hidroksilnih grupa dijelimo ih na jedno, dvo, tro i viševalentne, a prema položaju hidroksilne grupe na primarne, sekundarne i tercijarne alkohole. U jakim alkoholnim pićima najviše je zastupljen etil-alkohol, zatim niži i viši alkoholi. Od nižih alkohola zastupljen je metanol, od patočnih, propanol, izobutanol, pentanol, a od viševalentnih glicerol i drugi (Lučić, 1986).

2.5.1. Etanol

Etanol – alkohol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) je glavni sastojak svih alkoholnih pića, posebno destiliranih, gdje je prisutan u visokoj koncentraciji. Kako je poznato, etanol nastaje alkoholnom fermentacijom - vrenjem šećera u prvom redu glukoze i fruktoze iz grožđa, voća i šumskih plodova. Složeni šećeri: saharoza, maltoza i drugi ne previru već se prethodno podvrgavaju hidrolizi na jednostavne šećere, monosaharide i tek tada podliježu fermentaciji. Vrelište etanola iznosi $78,3\text{ }^\circ\text{C}$, te je zastupljen na početku destilacije u najvećoj količini. Tijekom destilacije dolazi do smanjenja koncentracije etanola. Kao najviše zastupljen sastojak, etanol stupa u reakciju s kiselinama i stvara značajne organske spojeve estere, a s aldehidima acetale i poluacetale. Njegovom oksidacijom nastaje acetaldehid, čijom daljnjom oksidacijom nastaje octena kiselina (Lučić, 1986).

Sadržaj etanola u vinskih destilatima je uobičajeno oko 70 % vol., dok je sadržaj etanola u vinjaku nakon dodavanja vode oko 40 % vol. (Tsakirisa i sur., 2014).

2.5.2. Metanol

Metanol (CH_3OH) ili metil-alkohol nastaje razgradnjom pektinskih tvari pod djelovanjem pektolitičkih enzima (pektin-esteraze). Zbog toga je metanol zastupljen više u destilatima dobivenih iz sirovina koje su bogate pektinskim tvarima. Njegova količina ovisi o načinu prerade i fermentacije sirovine. Destilat crnog vina sadrži veću količinu metanola od destilata bijelog vina. Vrelište metanola je $64,7\text{ }^\circ\text{C}$ zbog čega izlazi iz kondenzatora na početku destilacije. Pošto je koeficijent rektifikacije metanola manji od 1, on se pojavljuje i u srednjem toku destilata, a koncentracija mu se postepeno smanjuje te se nalazi i u zadnjem toku destilata (Lučić, 1986).

Metanol se u vinskim destilatima nalazi u koncentraciji od $1\text{-}1,5\text{ mg L}^{-1}$ a.a., toksičan je, te izaziva slijepilo i smrt. Koristi se za denaturiranje alkohola koji se koristi u industrijske svrhe (Lučić, 1986).

2.5.3. Kiseline

Fermentirani proizvodi od voća sadrže većinom ne hlapljive organske kiseline. Alkoholnom fermentacijom nastaju i druge organske kiseline koje su hlapljive. U destilatima je najzastupljenija octena kiselina i zato se u destilatima kiseline izražavaju u obliku octene kiseline. Starenjem destilata dolazi do povećanja koncentracije kiselina, koje nastaju kao posljedica ekstrakcije, hidrolize i oksidacije sastojaka drveta. Povećanjem kiselosti destilati ne gube, već dobivaju na mirisu i okusu. Tijekom destilacije količina kiselina raste, što upućuje na zaključak da kiseline ne stvaraju azeotropne smjese s etanolom i ostalim sastojcima destilata (Lučić, 1986).

Prema Pravilniku o vinu (1996) maksimalna koncentracija hlapljivih kiselina u vinskim destilatima je 2 g L^{-1} , izraženih kao octena kiselina.

2.5.4. Esteri

Esteri su neutralni organski spojevi koji nastaju međusobnom reakcijom alkohola i organskih kiselina. Velika količina estera nastaje tijekom alkoholne fermentacije. Masulj voća ima najviše etanola i octene kiseline te njihovom međusobnom reakcijom nastaje etil-acetat. Količina mu ovisi o vrsti kvasaca i uvjetima fermentacije (Lučić, 1986). Formiranje estera između octene kiseline i viših alkohola je važno, jer može doprinijeti voćnom karakteru. Na primjer, izoamil-acetat koji ima karakterističan okus banana, utječe pozitivno na aromu rakije.

Niske temperature fermentacije pogoduju sintezi voćnih estera kao što su izoamil-acetat, izobutil-acetat, dok više temperature fermentacije pogoduju sintezi estera veće molekulske mase. Više od 160 estera je identificirano u vinu, a većina njih i u rakiji (Tsakirisa i sur., 2014).

Prema Pravilniku o vinu (1996) maksimalna količina estera u vinskim destilatima, izraženih kao etil ester octene kiseline, iznosi od 500 do 2500 mg L⁻¹.

2.5.5. Viši alkoholi

Alkoholi s više od dva ugljikova atoma se nazivaju viši alkoholi. Nastaju tijekom alkoholne fermentacije iz odgovarajućih aminokiselina i šećera. Na konačnu koncentraciju viših alkohola utječe veći broj faktora: soj kvasca, temperatura alkoholne fermentacije, količina prisutnog kisika, pH, bistroća mošta, količina aminokiselina (Orlić i Jeromel, 2010). Najzastupljeniji viši alkoholi u vinskom destilatu su: 2-butanol, propanol, izobutanol, amil alkohol (izoamil alkohol).

Propanol ili n-propil alkohol se nalazi u malim količinama. Nastaje iz amino-butanske kiseline. To je bezbojna tekućina alkoholnog mirisa. Cijela količina izdvaja se na početku destilacije. Lako se miješa s vodom, etanolom i esterima. Smrzava na temperaturi od -126,1 °C, a isparava na temperaturi 97,2 °C. Izobutanol ili sekundarni butil-alkohol, nastaje alkoholnom fermentacijom iz šećera i vanilina. Ima karakterističan miris te u destilat prelazi najvećim dijelom na početku destilacije. Količina mu se smanjuje tijekom destilacija pa ga na kraju destilacije nema. Isparava na 108,1 °C, u vodi je slabo topljiv (10 %), vrlo dobro se otapa u alkoholu i ulazi u sastav eteričnih ulja. Izopentanol (amil-alkohol) je optički aktivan izomer. Od viših alkohola je najzastupljeniji u alkoholnim destilatima. Nastaje iz izo-leucina. To je uljasta tekućina sa manje oštrim mirisom (Lučić, 1986).

2.5.6. Fenolni spojevi

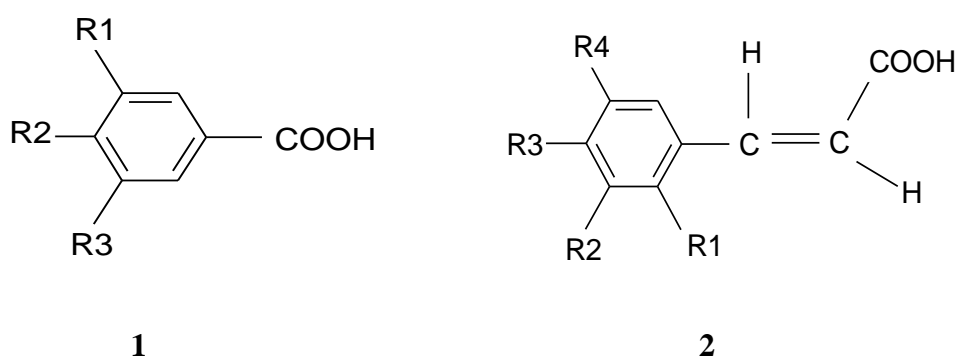
Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u svim biljnim tkivima (voću, povrću). Prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijele se na: fenolne kiseline i flavonoide (Dragović-Uzelac, 2015).

Fenolne kiseline su polifenolni spojevi nastali biosintetskim putem iz acetata preko šikiminske kiseline. Šikiminska kiselina je prvi put izolirana 1885. godine iz biljne vrste

Illicium anisatum L. Sudjeluje kao glavni prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u viših biljkama te mikroorganizmima, ali ne i u životinjskom organizmu (Posavec, 2012). Fenolne kiseline su uglavnom prisutne kao derivati, a dijele se u dvije osnovne skupine: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline (Slika 5). Razlike u strukturi između pojedinačnih hidroksicimetnih ili hidroksibenzojevih kiselina posljedica su stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Dragović-Uzelac, 2015).

Hidroksibenzojeva kiselina nastaje skraćivanjem prostornog lanca u fenilpropanskoj strukturi reakcijama β -oksidacije. Najzastupljenije fenolne kiseline nastale iz hidroksibenzojeve kiseline su: galna, elaginska, vanilinska, 4-hidroksibenzojeva, prokatehinska te siringinska. Galna kiselina je prisutna u hidroliziranim galotaninima, a najveći izvori elaginske kiseline su grožđe, orasi i jagode (Posavec, 2012).

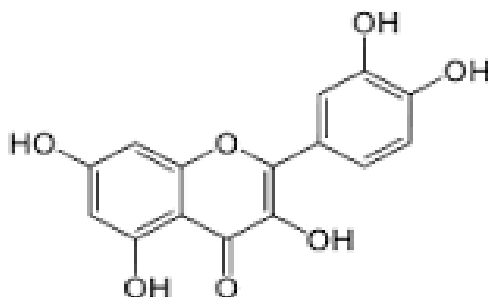
Cimetna kiselina nastaje deaminacijom iz fenilalanina pomoću enzima fenilalanin-amonija-liaze. Pronađena je u svim dijelovima voća, a najveća joj je koncentracija u omotaču zrelog ploda. Fenolne kiseline nastale iz cimetne kiseline su: p-kumarinska, kafeinska, ferulinska te sinapinska kiselina (Posavec, 2012). U prirodi se rijetko pojavljuju u slobodnom obliku, već uglavnom u različitim konjugiranim oblicima, kao amidi te kao esteri (Dragović-Uzelac, 2015).



Slika 5. Kemijska struktura hidroksibenzojevih (1) i hidroksicimetnih (2) kiselina (Dragović-Uzelac, 2015).

Flavonoidi su spojevi koji imaju osnovnu flavansku strukturu koju tvori difenilpropanski kostur C_{15} ($C_6-C_3-C_6$) građen od dva benzenska prstena A i B povezana piranskim prstenom C koji sadrži kisik (Slika 6). Do danas je identificirano preko 4000 različitih flavonoida. Dije

se na: antocijane, flavonole, flavanole, flavone, flavanone, izoflavone, procijanidine i mnoge druge. Razlike između pojedinih flavonoidnih podskupina proizlaze iz razlike u broju i rasporedu hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena, kao i iz prirode i stupnja njihove alkilacije i/ili glikozidacije.



Slika 6. Osnovna kemijska struktura flavonoida (Anonymous 2).

2.6. SENZORSKA PROCJENA

Godine 1975. od strane Zavoda za senzorsku procjenu Instituta za prehrambenu tehnologiju USA dana je sljedeća definicija: “Senzorska procjena je znanstvena disciplina koja potiče, mjeri, analizira i interpretira reakcije onih karakteristika hrane i tvari koje se zapažaju osjetilima vida, mirisa, okusa, dodira i sluha”.

Svojstvo arome i okusa destiliranih pića predstavlja kritičnu točku prihvaćanja od strane potrošača, i zbog toga je pored fizikalno-kemijskih analiza potrebna i senzorska analiza (Piggott i Macleod, 2010).

2.6.1. Senzorsko ocjenjivanje jakih alkoholnih pića

Senzorsko ocjenjivanje jakih alkoholnih pića uključuje ocjenjivanje boje, bistroće, mirisa i okusa. Za uspješno ocjenjivanje moraju biti ispunjeni određeni uvjeti koji uključuju prostor, temperaturu zraka, pribor za degustaciju i drugo (Lučić, 1986). Destilirana pića predstavljaju jedinstvene izazove za senzorske analitičare. Najveći izazov je sadržaj alkohola, što ozbiljno ograničava količinu koja se može degustirati u toku senzorskog ocjenjivanja (Piggott i Macleod, 2010). Broj uzoraka koji se ocjenjuju ne smije prelaziti 30 po danu.

Senzorsko ocjenjivanje jakih alkoholnih pića nije namijenjeno samo potrošaču već je ona obavezni dio, odnosno zadatak svakog proizvođača. Senzorska analiza u tijeku proizvodnje postala je dnevna rutina i već dugi niz godina procjenjivači koriste različite termine i izraze da opišu kvalitetu i karakter nekog pića. Tako su se kroz dugogodišnje iskustvo ljudi koji se bave senzorskom procjenom pića izoštrili u prepoznavanju, ne samo suptilnih razlika koje su izazvane nekom od tehnoloških procesa, nego i promjena koje su konkurenti napravili u svom procesu proizvodnje (Krajnović, 2013).

Da bi se postigao izjednačen okus i miris uzorci se prethodno temperiraju na 15 °C. Također, na ispravnost ocjenjivanja značajan utjecaj ima i sadržaj alkohola, te se zbog veće objektivnosti jakost alkohola smanjuje na 25 vol. % alkohola. Smatra se da je za ocjenjivanje jakih alkoholnih pića pogodna temperatura od 15-20 °C (Lučić, 1986). Procjena se odvija od bezbojnih, mladih vinskih destilata kratkog vremena odležavanja prema obojenim, starijim uzorcima vinskih destilata.

Za senzorsko ocjenjivanje jakih alkoholnih pića preporučuju se tradicionalne staklene čaše u obliku tulipana (Slika 7A). Prema Lučiću (1986) za procjenu se koriste bezbojne, prozirne čaše s drškom, i lagano konusne poput presječenog kokošnjeg jajeta. Brossard (2007) je predstavio niz različitih čaša za senzorsko ocjenjivanje viskija te zamolio ocjenjivače da senzorski ocijene jednak viski iz različitih čaša. Viski koji je ocjenjivan u čašama u obliku tulipana, gdje je dio čaše koji sadrži uzorak širi od otvora, postigao je više rezultate od viskija ocjenjivanog u jednostrano ravnim čašama, pokazujući pri tome da je oblik čaše imao utjecaj na senzorski doživljaj.

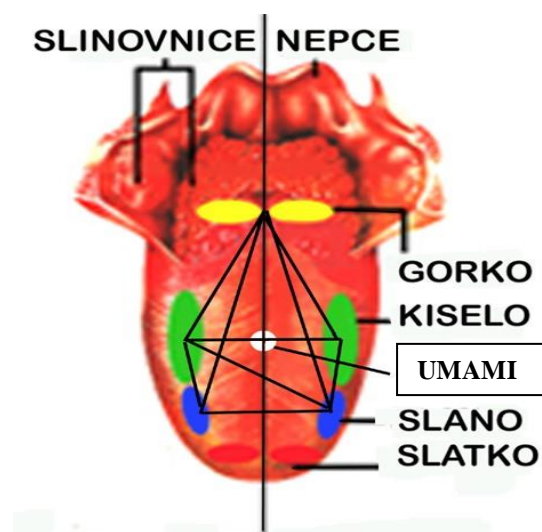


Slika 7A. Tradicionalna staklena čaša za ocjenjivanje jakih alkoholnih pića (Anonymous 3).

Boja, bistroća i konzistencija se ocjenjuju osjetilom vida. Mladi destilati su bezbojni ili blago obojeni. Njihovim starenjem u hrastovim bačvama, ovisno o dužini odležavanja, nastaje žućkasta, zlatno-žuta ili smeđa boja. Boja se može korigirati dodatkom karamela. Bistroća se najbolje ocjenjuje ako je čaša sa uzorkom okrenuta prema blagom izvoru svjetlosti. Potrebno je da svjetlost pada na čašu indirektno, a ispred se postavi šaka. Rakija je bistra ako se kroz tekućinu u čaši jasno vide šare na koži. Konzistencija se ocjenjuje kružnim pokretanjem do polovice napunjene čaše sa vinskim destilatom (Lučić, 1986).

Miris se ocjenjuje laganim, kratkotrajnim udisajima iz čaše i zadržavanjem u nosu. Nepoželjno je višestruko ponavljanje s istim pićem, jer dolazi do privikavanja na taj miris. Zbog toga je najvažniji prvi dojam. Kod dužeg ocjenjivanja radi se kraći prekid zbog udisanja čistog zraka i odmora osjeta (Lučić, 1986). U mirisu se ocjenjuju čistoća, intenzitet, kakvoća i harmoničnost (Krajnović, 2013).

Osjetilo okusa sastoji se od čitavog kompleksa raznih osjeta koji jedan drugog prate. Okusni se osjet sastoji iz perifernog i centralnog živčanog podraživanja. Receptori okusa su lokalizirani na točno određenim mjestima jezika, vrhu, bazi i rubovima kao male crvene i svijetle bradavice (Krajnović, 2013). Dolazi do detekcije stimulusa otopljenih u vodi ili pljuvački preko okusnih čvorića koji su primarno smješteni na površini jezika, kao i na sluznici nepca i grla. Osjet slatkoće se nalazi na vrhu jezika, sa strane jezika osjet kiselosti, od sredine prema dnu se nalazi osjet slanosti, a pri dnu jezika i nepca gorko (Slika 7B).



Slika 7B. Osjetila okusa na jeziku (Anonymous 4).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

U ovom radu određivani su pojedini analitički parametri u uzorcima vinskih destilata te je provedeno njihovo senzorsko ocjenjivanje. Od analitičkih parametara određivana je stvarna alkoholna jakost, ukupne kiseline, ukupni esteri, metanol, viši alkoholi i polifenolni profil uzoraka vinskih destilata.

3.1.1. Vinski destilati

Za ovaj rad korišteni su uzorci vinskih destilata firme Badel 1862 d.d. različitog vremena odležavanja. Ukupno je korišteno 13 uzoraka vinskih destilata (Tablica 1), 8 odležanih te 5 neodležanih.

Tablica 1. Uzorci i nazivi vinskih destilata.

Broj uzorka	Naziv vinskih destilata	Karakteristike
1	MIMI	neodležani
2	BENKOVAC	odležani
3	BONOLLO	neodležani
4	SEGESTICA	kratko odležani
5	V.D. STARI 1	odležani
6	V.D. STARI 2	odležani
7	VRŠAC	kratko odležani
8	SEGESTICA	odležani
9	V.D. BENKOVAC	odležani
10	VRŠAC	odležani
11	BENKOVAC desertni	neodležani
12	BENKOVAC dp.	neodležani
13	ALVINNESA	neodležani

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje stvarne alkoholne jakosti

Princip metode

Određivanje količine alkohola temelji se na određivanju relativne gustoće uzorka na temperaturi od 20 °C u odnosu prema destiliranoj vodi temperature 20 °C. Na osnovu tako dobivene relativne gustoće, očitava se udio alkohola iz tablica po Osbornu. Primjenjuje se u alkoholnim pićima koja ne sadrže ekstrakt ili ga sadrže u neznatnoj količini (rafinirani etilni alkohol, voćni destilati, voćne rakije).

Aparatura i pribor

- analitička vaga s točnošću od $\pm 0,1$ mg
- vodena kupelj s termostatom s točnošću $\pm 0,05^\circ\text{C}$
- piknometar s ubrušenim čepom volumena 50 mL - baždaren i označen piknometar kojemu je određena vodena vrijednost.

Postupak rada

Piknometar volumena 50 mL ispere se tri puta s uzorkom, te napuni istim nešto iznad oznake. Tekućina u piknometru temperira se 30 minuta u vodenoj kupelji pri 20 °C. Nakon temperiranja tekućina koja je iznad oznake izvadi se papirnatim štapićem, a piknometar se obriše staničevinom. Suhi piknometar se važe (P_1). Rezultati se iskazuju na navedeni način:

$$\text{Relativna gustoća} = P_1 - P_2 / V.V.$$

Gdje je:

P_1 - masa piknometra s uzorkom (g)

P_2 - masa praznog piknometra (g)

V.V. - vodena vrijednost piknometra (interne laboratorijske tablice)

Iz dobivene vrijednosti relativne gustoće, iz tablica po Osbornu (NN 53/91) očitava se količina alkohola izražena u % vol.

3.2.2. Određivanje ukupnih kiselina

Princip metode

Princip metode za određivanje ukupnih kiselina temelji se na titraciji alkoholnih pića s 0,1 mol L⁻¹ otopinom natrijevog hidroksida (NaOH) uz fenolftalein kao indikator. Metoda se primjenjuje za određivanje ukupnih kiselina kod svih vrsta alkoholnih pića.

Aparatura i pribor

- pipeta volumena 50 mL
- Erlenmeyerova tikvica volumena 250 mL
- bireta.

Kemikalije

- titrival 0,1 mol L⁻¹ NaOH
- fenolftalein (C₂₀H₁₄O₄; Mr 318,33).

Priprema otopina

- 1 g fenolftaleina otopa se u 70 mL 96 % alkohola i 30 mL destilirane vode.

Postupak rada

Otpipetira se 50 mL uzorka u Erlenmeyer-ovu tikvicu i titrira uz fenolftalein kao indikator, s 0,1 mol L⁻¹ NaOH do promjene boje (bezbojno → ružičasto). Na osnovu utroška lužine za titraciju, izrazi se količina ukupne kiseline, kao octena, u mg L⁻¹ tekućine ili prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/2009) u g 100 L⁻¹ a.a.

3.2.3. Određivanje viših alkohola (plinska kromatografija GC/FID)

Priprema uzorka za injektiranje

U odmjerne tikvici od 100 mL uzorak se temperira u vodenoj kupelji 30 min. na 20 °C. Uzorak se prenese u tikvicu za destilaciju, destilira se na aparaturi s povratnim hladilom.

Destilat se hvata u istu odmjernu tikvicu od 100 mL u kojoj se uzorak temperira. Režimom destilacije se odvoje hlapive komponente sadržane u uzorku. Tako pripremljen uzorak služi za kvantitativno određivanje sadržaja hlapivih komponenti u uzorku.

Injektiranje uzorka

Određivanje viših alkohola provedeno je plinskom kromatografijom gdje su pripremljeni uzorci direktno injektirani pomoću injekcione mikrolitarske igle. Plinska kromatografija zasniva se kao i ostale kromatografske metode na diferencijalnoj sorpciji sastojaka smjese, koja se kreće u odnosu na neki kruti ili tekući sorbens. Kromatografska analiza služi za odjeljivanje i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka prisutnih u složenim smjesama.

Princip metode

U plinskoj kromatografiji inertni plin nositelj, koji je mobilna odnosno pokretna faza, eluira sastojke smjese iz kolone napunjene stacionarnom fazom. Stacionarna faza u plinsko-adsorpcijskoj kromatografiji je čvrsta tvar velike specifične površine na kojoj se adsorbiraju analizirani sastojci.

Sastojci analiziranog uzorka razdvajani su na osnovi različitih fizikalnih i kemijskih interakcija s mobilnom i stacionarnom fazom. U detektoru svaka komponenta izaziva određenu aktivnost koja je registrirana. Odziv detektora na pisaču je zabilježen kao kromatogram. Kromatogram je dvodimenzionalni dijagram koji pokazuje, kao funkcija vremena, parametre koji ovise o trenutačnoj koncentraciji svakog pojedinog sastojka uzorka koji izlazi iz kolone (Marković, 2014).

Instrument koji je korišten za analizu je Agilent Technologies 6890N - Network GC System (Slika 8), s ugrađenim plameno – ionizacijskim detektorom (FID detector).



Slika 8. Plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N - Network GC System
(Anonymous 5).

Kao plin nosioc upotrebljava se vodik H_2 visokog stupnja čistoće (min 5.0 čistoće), a make up plin dušik N_2 (min 5.0 čistoće). Pritisci na redukcionim manometrima su za vodik cca 4,2 bara, dušik cca 4,5 bara i sintetski zrak cca 4 bara. Korištena je kapilarna kolona DB WAX, duljine 30 m, promjera kolone 0,32 mm s debljinom filma stacionarne faze 0,25 μm - kapilarna kolona. Metoda se primjenjuje za određivanje metanola, etil-acetata te viših alkohola 2-butanola, n-propanola, i-butanola, n-butanola, i i-amilnog alkohola (O.I.V. - Metode analize alkoholnih pića i alkohola – modificirano, 1994). Trajanje analize je 30 min., temperatura kolone plinskog kromatografa iznosi od 35 °C do 220 °C, a protok plina nosioca (H_2) iznosi 40 mL min⁻¹.

Postupak rada

Otopina za umjeravanje viših alkohola napravljena je kako slijedi: u odmjernu tikvicu od 100 mL sa cca 40 mL 65 % vol. etanola redom se pipetira i zabilježi odvaga: n-butanol (cca 0,4 mL), izo-butanol (cca 4,5 mL), butanol-2 (cca 1,0 mL), n-propanol (cca 2,0 mL). Za izo amilni alkohol: u odmjernu tikvicu od 50 mL sa cca 20 mL 65 % vol. etanola pipetira se cca 8 mL izo-amilnog alkohola, zabilježi odvaga i nadopuni do 50 mL 65 % vol. etanolom.

Nakon izrade standardne otopine i internog standarda (n-amilni alkohol) započinje priprema uzorka. U odmjernu tikvicu od 10 mL, trbušastom pipetom dodaje se 10 mL uzorka i 0,1 mL internog standarda te se sadržaj tikvice promućka. Slijedi injektiranje 1 μL pripremljenog uzorka. Nakon završetka analize GC software automatski radi kvantifikaciju, a

rezultati se ispisuju u izvještaju i printaju. Kvantitativna analiza temelji se na uspoređivanju visine ili površine analiziranog pika s visinom ili površinom pika standarda. Površina pika proporcionalna je količini višeg alkohola u plinu nosiocu koji ulazi u detektor kromatografskog pika i izračunava se integriranjem pomoću integratora u računalu kao najtočnijim načinom.

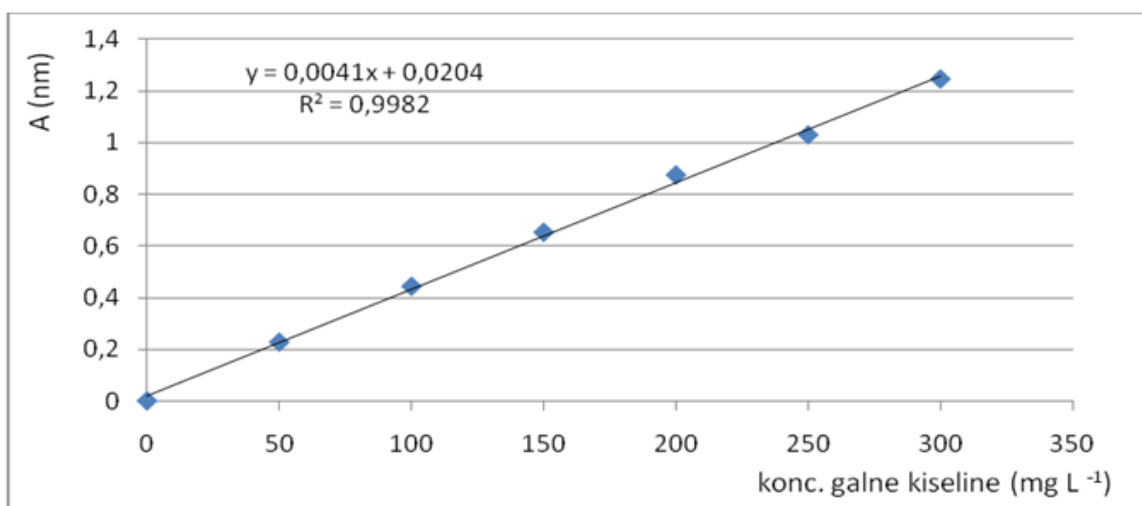
3.2.4. Određivanja ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa

Princip metode

Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibdenove i fosfomolibdenove kiseline. Pri oksidaciji fenolnih tvari, ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid, koji su plavo obojeni. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom. Spektrofotometrijski se određuje intenzitet nastalog obojenja na 765 nm, pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku. Kao standard se koristi galna kiselina (Singleton i Rosi, 1965).

Postupak rada

Za određivanje ukupnih fenola u uzorcima vinskih destilata u odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira se 300 μL uzorka, 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode. Dodani sastojci u odmjernoj tikvici se pomiješaju i nakon 5 minuta se doda 1,5 mL natrijevog karbonata (Na_2CO_3) nakon čega se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom. Odmjerna tikvica se termostatira na 50 °C 20 min te se nakon toga mjeri apsorbancija na 765 nm. Slijepa proba se priprema na isti način kao i uzorak, ali se umjesto 300 μL uzorka doda toliko destilirane vode. Na osnovu očitane apsorbancije crta se baždarni pravac ovisnosti koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}) o apsorbanciji (Slika 9).



Slika 9. Baždarni pravac za određivanje fenolnih spojeva spektrofotometrijski s pomoću Folin-Ciocalteu reagensa.

3.2.5. Određivanje fenolnih spojeva HPLC metodom

Priprema otopine standarda

Razrjeđivanjem standardnih otopina kiselina (Sigma, Fluka, Aldrich) pripremljene su otopine određenih koncentracija fenolnih spojeva. Standardne otopine su korištene za određivanje retencijskih vremena te za izradu baždarnih pravaca (Tablica 3). Iz ovisnosti površine ispod pika o masenoj koncentraciji standarda, prikazani su baždarni pravci te izračunate pripadajuće jednadžbe pravaca.

Priprema uzorka

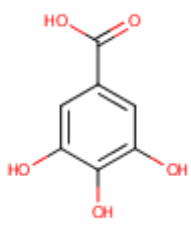
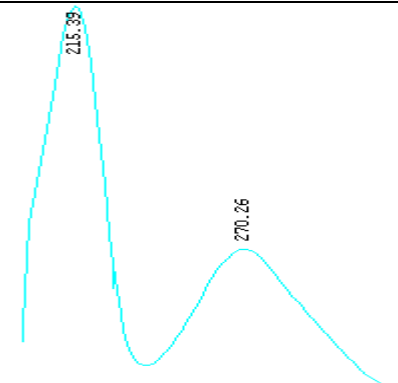
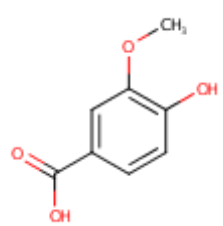
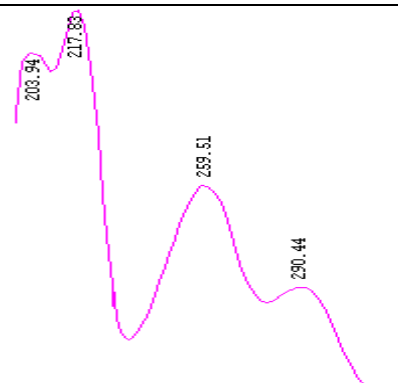
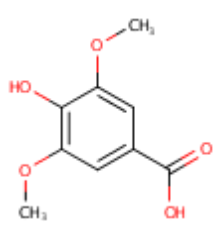
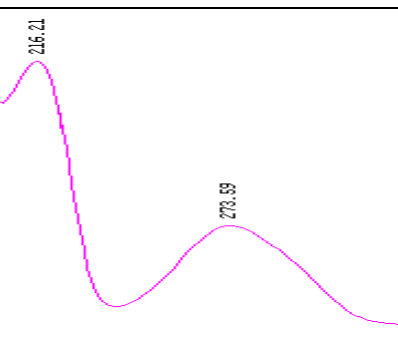
Uzorci vinskih destilata su pripremljeni prema modificiranoj metodi objašnjenj u radu Canas i sur. (2008). Volumen originalnog uzorka vinskog destilata od 10 mL se otpari na rotavaporu u tikvici s okruglim dnom na temperaturi od 40 °C. Nakon što uzorak otpari u tikvicu se dodaje 5 mL destilirane vode te se pH se podesi sa 2,6 M HCl na pH=2. Otopina se prelije u plastičnu epruvetu (falcon) te se doda 5 mL etil acetata. Uzorak se potom centrifugira 6 minuta na 4000 okr min⁻¹. Nakon centrifugiranja dolazi do odvajanja faza. U gornjoj fazi, u etil acetatu su otopljeni fenoli te se ta faza odvoji u staklenu bočicu s čepom, a na donju fazu doda se novih 2,5 mL etil acetata te se ponovno centrifugira i odvoji gornja faza. Postupak s

2,5 mL etil acetata ponovi se još jednom. Nakon toga etil acetat otpari se dušikom. Na fenole izdvojene na taj način dodaje se 1 mL metanola i uzorak se čuva u zamrzivaču do određivanja na HPLC uređaju (Tablica 2).

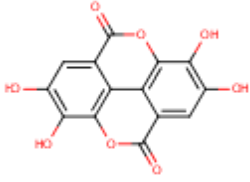
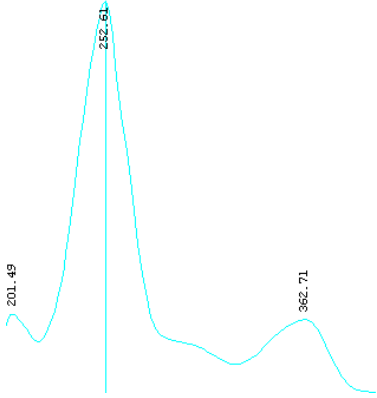
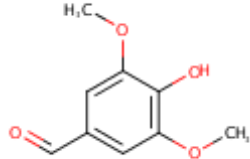
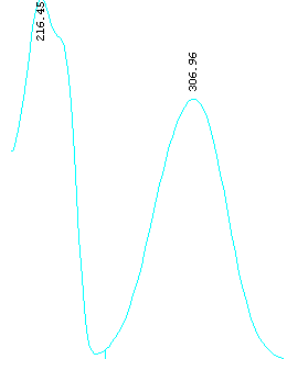
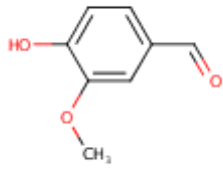
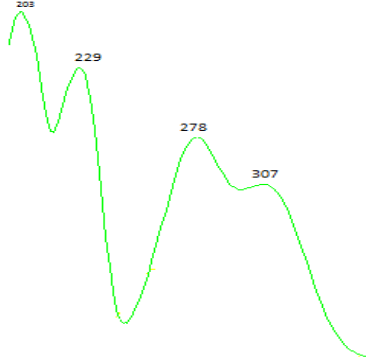
Tablica 2. Uvjeti rada HPLC-a.

Kromatograf	ProStar Varian 230
Kolona	Nucleosil 5u C18 100A, phenomenex
Pokretna faza	Otapalo A: 0,2% orto fosforna kiselina
	Otapalo B: Metanol
	Otapalo C: Acetonitril
Eluiranje	96% A, 2% B, 2% C (protok: 1,5 mL/min)
Detektor	Photodiode Array
Temperatura kolone	30 °C
Vrijeme trajanja	25min
Injektirani volumen	20 µL
Vrijeme uravnoteženja kolone	10 min

Tablica 3. Valne duljine, retencijska vremena i UV spektri pojedinih fenolnih spojeva detektiranih u uzorcima vinskih destilata.

Fenolni spojevi	Rt min	λ_{\max} nm	Spektar
Hidroksibenzojeve kiseline			
Galna 	5,1	280	
Vanilinska 	11,1	260	
Siringinska 	11,8	280	

Tablica 3. Valne duljine, retencijska vremena i UV spektri pojedinih fenolnih spojeva detektiranih u uzorcima vinskih destilata (nastavak).

<p>Elaginska</p> 	<p>18,7</p>	<p>360</p>	
<p>Hidroksibenzojevi aldehidi</p>			
<p>Siring aldehyd</p> 	<p>14,0</p>	<p>320</p>	
<p>Vanilin</p> 	<p>13,0</p>	<p>260</p>	

3.2.6. Senzorsko ocjenjivanje

Senzorsko ocjenjivanje provedeno je od strane certificiranih, iskusnih i dugogodišnjih ocjenjivača u ocjenjivanju vinskih destilata. Za senzorsko ocjenjivanje vinskih destilata korištene su tradicionalne staklene čaše u obliku tulipana. Uzorci vinskih destilata alkoholne jakosti veće od 40 % vol. razrijeđeni su dodatkom destilirane vode. U staklenu čašu u obliku tulipana, doda se 20 mL uzorka vinskog destilata i razrijedi dodatkom 30 mL destilirane vode. Senzorska svojstva (vanjski izgled, miris, okus i aroma u ustima) razumljivo su opisana i prikazana u obliku tablice u poglavlju rezultata.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ALKOHOLNA JAKOST

Osnovni i zajednički sastojak svih jakih alkoholnih pića je etanol. Izražava se kao alkoholna jakost ili količina alkohola izražena kao vol. % alkohola, a definira se kao omjer volumena čistog alkohola prisutnog u proizvodu i ukupnog volumena proizvoda pri temperaturi od 20 °C, izražen u postotku (Pravilnik, 2009). Etanol je sintetiziran u prirodnim jakim alkoholnim pićima tijekom fermentacije ugljikohidrata sa kvascima i odgovoran je za osnovni sastav alkoholnih pića. Koncentracija etanola u različitim tipovima alkoholnih pića definirana je službenim propisima koji su u skladu sa međunarodnim standardima (Kostik i sur., 2013). U tablici 4 prikazana je alkoholna jakost uzoraka vinskih destilata.

Tablica 4. Alkoholna jakost uzoraka vinskih destilata.

Uzorci vinskih destilata	Alkoholna jakost (% vol.)
1	76,57
2	71,89
3	81,77
4	66,96
5	73,58
6	67,16
7	64,66
8	69,98
9	68,48
10	39,86
11	77,05
12	75,23
13	76,99

Iz rezultata dobivenih za koncentraciju etanola u uzorcima vinskih destilata (Tablica 4) može se vidjeti da se vrijednosti kreću u rasponu od 66,96 % vol. do 81,77 % vol., a izuzetak je uzorak vinskog destilata 10 koji ima alkoholnu jakost 39,86 % vol., što upućuje da je to vinski destilat razrijeđen na konzumnu vrijednost. Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (2009), vinski destilat sadrži stvarnog alkohola do 86 % vol. Iz dobivenih rezultata prikazanih tablicom 4, može se vidjeti da svi uzorci vinskih destilata zadovoljavaju vrijednost propisanu Pravilnikom i imaju alkoholnu jakost manju od 86 % vol. Prema Tsakirisi i sur. (2014) sadržaj etanola u vinskim destilatima je uobičajeno oko 70 % vol., dok je sadržaj etanola u vinjaku nakon dodavanja vode oko 40 % vol.

4.2. UKUPNE KISELINE

Destilati voćnih sirovina uglavnom sadrže hlapljive organske kiseline od kojih je dominantna octena kiselina. Ona čini, ovisno o vrsti pića, od 60 do 90 % ukupne kiselosti jakih alkoholnih pića (Nykanen i sur., 1991). Nastaje kao sekundarni produkt alkoholne fermentacije, ali i kao rezultat oksidacije alkohola uz prisustvo bakterija octene kiseline (Spaho, 2007). U tablici 5 prikazan je udjel ukupnih kiselina u uzorcima vinskih destilata.

Tablica 5. Udjel ukupnih kiselina u uzorcima vinskih destilata.

Uzorci vinskih destilata	Ukupne kiseline (g 100 L ⁻¹ a.a.)
1	11,75
2	36,72
3	7,68
4	8,96
5	134,54
6	26,18
7	52,70
8	81,45
9	53,97
10	37,79
11	37,24
12	82,99
13	19,44

Koncentracije ukupnih kiselina kod analiziranih vinskih destilata iznose od 7,68 g 100 L⁻¹ a.a. do 134,54 g 100 L⁻¹ a.a. (Tablica 5). Prema istraživanju Tsakirise i sur. (2014) koncentracije octene kiseline pronađene u vinskim destilatima kreću se u rasponu od 20 g 100 L⁻¹ a.a. do 100 g 100 L⁻¹ a.a., što se većim dijelom podudara sa rezultatima dobivenima analizom ovih vinskih destilata. U istraživanju karakteristika vinskih destilata proizvedenih od različitih sorti grožđa, Miličević (2001) navodi vrijednosti koncentracije ukupnih kiselina od 21,20 g 100 L⁻¹ a.a. do 64,68 g 100 L⁻¹ a.a. Ako se u postupku destilacije na vrijeme ne odvoji srednji tok od patoke odnosno dopusti miješanje ova dva toka, dobit će se proizvod neugodnog kiselog mirisa i okusa, što upućuje na nedovoljno odvajanje treće frakcije u kojoj se nalazi octena kiselina te ima za posljedicu povećanu koncentraciju kiselina u dobivenom destilatu (Popović i sur., 2009). Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (2009) vinski

destilat je proizvod koji sadrži količinu hlapivih tvari od najmanje 125 g 100 L⁻¹ a.a., gdje se ubrajaju sve hlapive tvari osim etanola i metanola.

4.3. ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA PRISUTNIH U UZORCIMA VINSKIH DESTILATA

Osim etilnog alkohola, glavne aktivne komponente alkoholnog pića, gotovo sva alkoholna pića sadrže hlapljive i ne-hlapljive komponente. Prisutne su u različitim koncentracijama, ovisno o vrsti alkoholnog pića i metodama proizvodnje (Kostik i sur., 2013). Glavne hlapljive komponente u destilatima, osim etanola, su: metanol, etil-acetat, i-amil alkohol, i-butanol, n-propanol, 2-butanol i n-butanol. Hlapivi spojevi u analiziranim vinskim destilatima su analizirani plinskom kromatografijom (GC/FIS) - Agilent Technologies 6890N, a u nastavku ovog rada prikazani su dobiveni rezultati.

4.3.1. Ukupni esteri

Ukupne estere čini velika skupina sastojaka koja doprinosi senzorskoj kvaliteti alkoholnih pića. Prema Tsakirisi i sur. (2014) esteri daju važan doprinos razvoju voćnih aroma u vinskim destilatima. U tablici 6 prikazan je udjel ukupnih estera u uzorcima vinskih destilata.

Tablica 6. Udjel ukupnih estera u uzorcima vinskih destilata.

Uzorci vinskih destilata	Ukupni esteri (g 100 L⁻¹ a.a.)
1	40,4
2	28,5
3	7,0
4	10,7
5	144,2
6	77,6
7	63,1
8	117,6
9	4,5
10	69,8
11	15,3
12	17,0
13	26,7

Koncentracije estera u analiziranim uzorcima vinskih destilata iznose od 4,5 g 100 L⁻¹ a.a. do 144,2 g 100 L⁻¹ a.a. (Tablica 6). Prema Tsakirisi i sur. (2014) sadržaj etil estera se u vinskih destilatima povećava tijekom starenja, kao posljedica spore esterifikacije različitih organskih kiselina s etanolom. Nasuprot tome, neki vinski destilati sadrže osjetno manje količine etil estera od drugih. Analizirajući vinske destilate Miličević (2001) navodi da sadrže ukupnih estera od 58,14 g 100 L⁻¹ a.a. do 108,4 g 100 L⁻¹ a.a., što je unutar Pravilnikom (1996) definiranih vrijednosti koje iznose od 50 do 250 g 100 L⁻¹ a.a., ali vidljivo je da su to nešto niže vrijednosti ukupnih estera te mogu biti posljedica povišenog udjela alkohola i smanjene ukupne kiselosti kod vina korištenih za destilaciju. Prema Kostik i sur. (2013) srednje vrijednosti koncentracija etil acetata za istraživane uzorke rakija kreću se od 3,6 g 100 L⁻¹ a.a. za komovicu, do 404 g 100 L⁻¹ a.a. za rakiju od šljiva.

4.4.2. Metanol

Metanol nastaje enzimskom razgradnjom metoksiliranog pektina. Općenito, njegova količina ovisi o količini prisutnog pektina u voću koje se koristi za fermentaciju. Koncentracija metanola pogodna je za dokazivanje autentičnosti voćnih destilata (Kostik i sur., 2013). Metanol je sastojak koji lako hlapi, tako da se tijekom destilacije može koncentrirati i do količina opasnih za ljudsko zdravlje. Zbog toga se određuje i prati koncentracija metanola u svakom destilatu kako ne bi prešla maksimalan udio koji je određen zakonskom regulativom i iznosi za vinske destilate 200 grama po hektolitru preračunato na 100 % vol. alkohola. U tablici 7 prikazan je udjel metanola u uzorcima vinskih destilata.

Tablica 7. Udjel metanola u uzorcima vinskih destilata.

Uzorci vinskih destilata	Metanol (g 100 L ⁻¹ a.a.)
1	104,6
2	140,8
3	26,5
4	0,2
5	42,6
6	46,7
7	112,2
8	79,4
9	13,8
10	106,4
11	53,9
12	49,5
13	56

Koncentracije metanola u ispitivanim uzorcima vinskih destilata iznose od 0,2 do 140 g 100 L⁻¹ a.a. (Tablica 7). Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (2009) maksimalni sadržaj metanola u rakiji od vina iznosi 200 grama po hektolitrju preračunato na 100 % vol. alkohola. Iz dobivenih rezultata svi uzorci vinskih destilata zadovoljavaju zakonsku regulativu, i imaju koncentraciju metanola manju od one propisane Pravilnikom. Prema Tsakirisi i sur. (2014) koncentracija metanola u destilatima komovice kreće se od 30 do 70 g 100 L⁻¹ a.a. Analizirajući hlapljive komponente u različitim uzorcima jakih alkoholnih pića Kostik i sur. (2013) navode da se koncentracije metanola u uzorcima rakija kreću u rasponu od 2,24 g 100 L⁻¹ a.a. za lozovaču, do 1903 g 100 L⁻¹ a.a. za rakiju od šljiva. Prema Rodriguez Madrera i sur. (2013) prilikom odležavanja vinskih destilata u bačvama, dolazi do manjih gubitaka metanola tijekom isparavanja.

4.4.3. Viši alkoholi

Viši alkoholi su karakteristične komponente koje nastaju iz aminokiselina metabolizmom kvasaca tijekom alkoholne fermentacije voća i drugih sirovina. Količine ovih spojeva ovise o količini aminokiselina u voću. Viši alkoholi imaju značajan utjecaj na okus alkoholnih pića te pripadaju tvarima sekundarne arome (Kostik i sur., 2013). Tijekom starenja može doći do smanjenja sadržaja viših alkohola, a mogući razlozi su isparavanje,

esterifikacija, reakcije oksidacije i sorpcije (Rodriguez Madrera i sur., 2013). Glavni viši alkoholi koji se mogu pronaći u vinskim destilatima u najvećim koncentracijama su: 1-propanol (n-propil alkohol), 1-butanol (n-butil alkohol), 2-butanol (sekundarni butil alkohol), izobutanol (2-metil-1-propanol) i izoamil alkohol (3-metil-1-butanol i 2-metil-1-butanol) (Lachenmeier i sur., 2007). U ovom radu koristit će se trivijalna imena viših alkohola radi lakše usporedbe dobivenih rezultata s literaturnim podacima. U tablici 8 prikazan je udjel viših alkohola u uzorcima vinskih destilata.

Tablica 8. Udjel viših alkohola u uzorcima vinskih destilata.

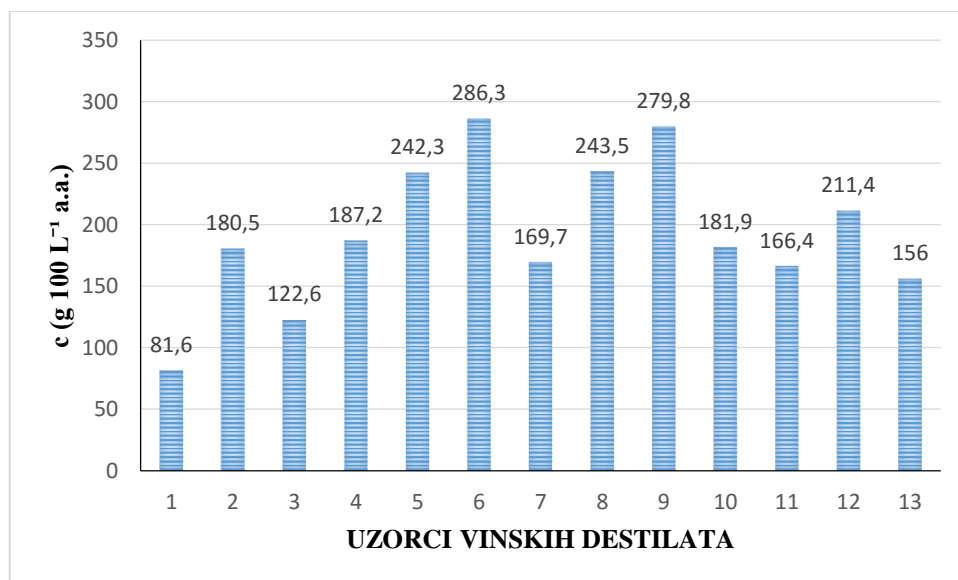
Uzorcima vinskih destilata	Viši alkoholi (g 100 L ⁻¹ a.a.)
1	112,5
2	268,7
3	176,8
4	245,1
5	375,9
6	378,8
7	243,0
8	370,2
9	385,5
10	259,0
11	212,0
12	284,2
13	212,1

Koncentracije viših alkohola u ispitivanim uzorcima vinskih destilata iznose od 112,5 g 100 L⁻¹ a.a. do 385,5 g 100 L⁻¹ a.a. (Tablica 8). Analizirajući vinske destilate različitih sorti grožđa Miličević (2001) navodi da se koncentracije viših alkohola kreću od 101,8 g 100 L⁻¹ a.a. do 243 g 100 L⁻¹ a.a., što su nešto niže vrijednosti od onih dobivenih ovom analizom. Analizirajući maksimalne koncentracije alkohola u jakim alkoholnim pićima, Lachenmeier i sur. (2007) navode srednju vrijednost viših alkohola u jakim alkoholnim pićima 400 g 100 L⁻¹ a.a. te da koncentracija viših alkohola ne bi trebala preći koncentraciju od 1000 g 100 L⁻¹ a.a.

4.4.3.1. i-amilni alkohol

Koncentracije i-amilnog alkohola u ispitivanim uzorcima vinskih destilata prikazane su grafički (Slika 10) i iznose od 81,6 g 100 L⁻¹ a.a. do 286,3 g 100 L⁻¹ a.a. Prema Christoph i

Bauer-Christoph (2007) smjesa 2-metil-1-butanola i 3-metil-1-butanola koja se jednim imenom naziva i-amilni alkohol čini 40-70 % sadržaja viših (fusel) alkohola. Pridonosi voćnom okusu te koncentracija i-amilnog alkohola u vinskim destilatima iznad $480 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ a.a. ima aromatski opis "alkoholan", "sladak" ili "draži" te može negativno utjecati na aromu vinskih destilata.

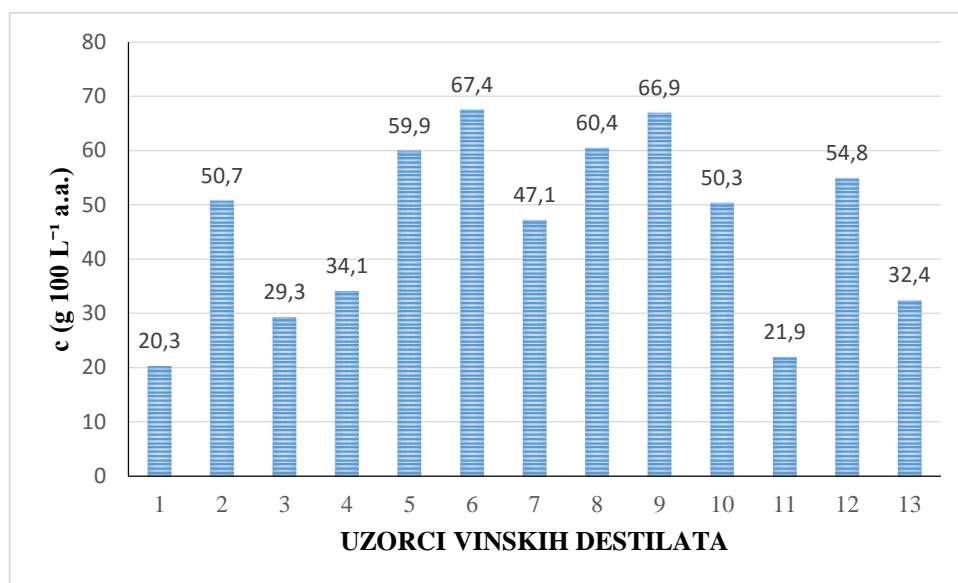


Slika 10. Koncentracije i-amilnog alkohola u uzorcima vinskih destilata određene plinskom kromatografijom (GC/FID).

Prema istraživanju Kostik i sur. (2013) i-amilni alkohol je najzastupljeniji viši alkohol u svim ispitivanim uzorcima destilata od grožđa i šljiva, što se podudara s rezultatima dobivenima u ovom dijelu rada, gdje je i-amilni alkohol također prisutan u najvećim koncentracijama. Prema istraživanju Herraiz i sur. (1990) vrijednosti i-amilnog alkohola u vinskim destilatima kreću se u rasponu od $100 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ a.a. do $500 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ a.a. što je unutar vrijednosti dobivenih ovom analizom. Prema istraživanju Versini i sur. (2009) vrijednosti i-amilnog alkohola u destilatima jabuke kreću se u rasponu od $213 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ a.a. do $359 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ a.a., dok su Winterova i sur. (2008) utvrdili koncentracije i-amilnog alkohola u rakiji od jabuka od $170,5 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ a.a. do $422,5 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ a.a.

4.4.3.2. *i*-butanol

Koncentracije *i*-butanola u ispitivanim uzorcima vinskih destilata prikazane su grafički (Slika 11) i kreću se u rasponu od 20,3 g 100 L⁻¹ a.a. do 67,4 g 100 L⁻¹ a.a. Prema Christoph i Bauer-Christoph (2007) najvažniji viši alkoholi, uz *i*-amilni alkohol, su *i*-butanol i *n*-propanol te imaju sladni okus ili okus po spaljenom. Njihova koncentracija u destilatima može široko varirati i ovisi prvenstveno o tipu destilacije, razdvajanja i frakcioniranja.



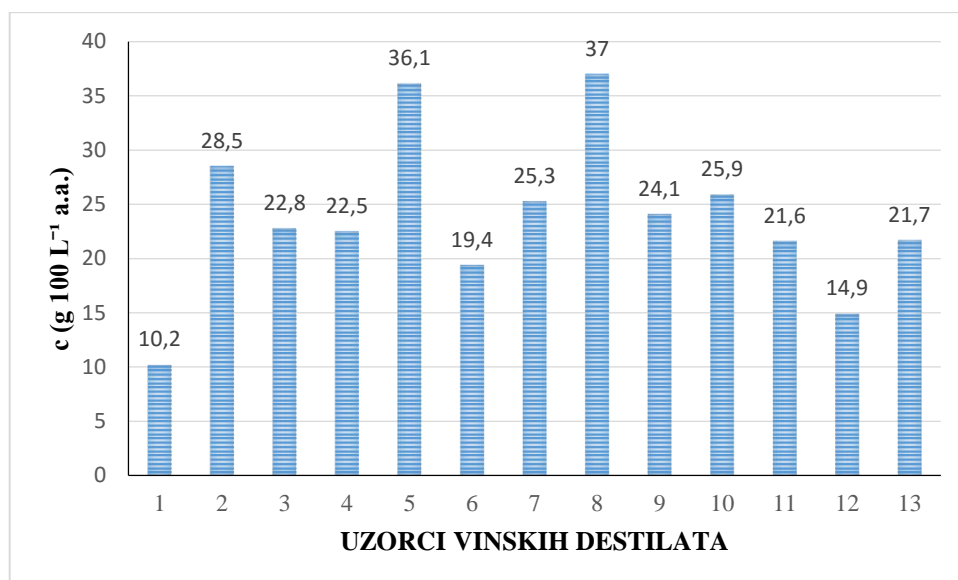
Slika 11. Koncentracije *i*-butanola u uzorcima vinskih destilata određene plinskom kromatografijom (GC/FID).

Analizirajući vinske destilate Herraiz i sur. (1990) navode da se koncentracije *i*-butanola kreću u rasponu od 10 g 100 L⁻¹ a.a. do 100 g 100 L⁻¹ a.a. što je unutar vrijednosti dobivenih ovom analizom. Prema istraživanju Versini i sur. (2009) vrijednosti *i*-butanola u destilatu jabuke kreću se u rasponu od 45,5 g 100 L⁻¹ a.a. do 114,9 g 100 L⁻¹ a.a., dok su Winterova i sur. (2008) ustanovili da se koncentracija *i*-butanola u rakiji od jabuka kreće u rasponu od 39,2 g 100 L⁻¹ a.a. do 96,8 g 100 L⁻¹ a.a.

4.4.3.3. *n*-propanol

Koncentracije *n*-propanola u uzorcima vinskih destilata utvrđene analizom iznose od 10,2 g 100 L⁻¹ a.a. do 37 g 100 L⁻¹ a.a. Dobiveni rezultati su prikazani grafički (Slika 12).

Prema Dragone i sur. (2008) n-propanol može biti indikator bakterijskog kvarenja, jer njegova prisutnost u povišenim koncentracijama može biti rezultat mikrobiološkog kvarenja sirovine tijekom skladištenja u nepovoljnim uvjetima te se koncentracije n-propanola u destilatima kreću u rasponu od 10 g 100 L⁻¹ a.a. do 200 g 100 L⁻¹ a.a.



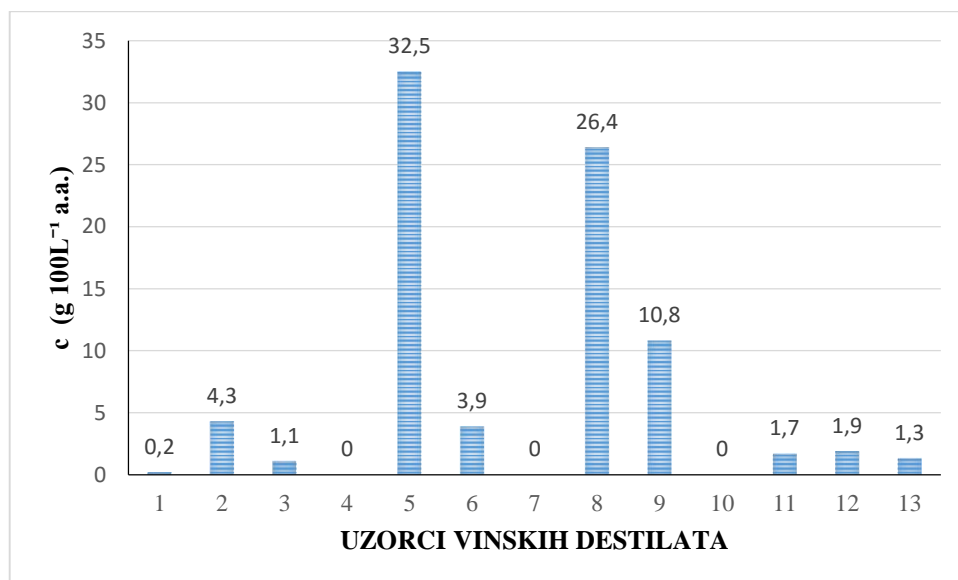
Slika 12. Koncentracije n-propanola u uzorcima vinskih destilata određene plinskom kromatografijom (GC/FID).

Prema istraživanju Péna i sur. (2008) vrijednosti n-propanola u uzorcima vinskih destilata kreću se u rasponu od 12,4 g 100 L⁻¹ a.a. do 22,5 g 100 L⁻¹ a.a. što su nešto niže vrijednosti od onih dobivenih ovom analizom. U istraživanju karakterizacije destilata jabuke koje su proveli Versini i sur. (2009) vrijednosti n-propanola u destilatima jabuke kreću se u rasponu od 43,0 g 100 L⁻¹ a.a. do 53,0 g 100 L⁻¹ a.a. Prema Winterova i sur. (2008) koncentracije n-propanola u rakiji od jabuka kreću se u rasponu od 12,1 g 100 L⁻¹ a.a. do 229 g 100 L⁻¹ a.a.

4.4.3.4. 2-butanol

Koncentracije 2-butanola u ispitivanim uzorcima vinskih destilata iznose od 0 g 100 L⁻¹ a.a. do 32,5 g 100 L⁻¹ a.a. (Slika 13). Prema Christoph i Bauer-Christoph (2007) granične vrijednosti 2-butanola su visoke, i zbog toga 2-butanol ne pridonosi značajno okusu vinskih destilata. Vrijednosti 2-butanola veće od 50 g 100 L⁻¹ a.a. ukazuju na bakterijsko kvarenje

sirovina korištenih za dobivanje vinskog destilata. Prema tome, visoke koncentracije 2-butanola mogu biti pokazatelji loših destilacijskih tehnika.

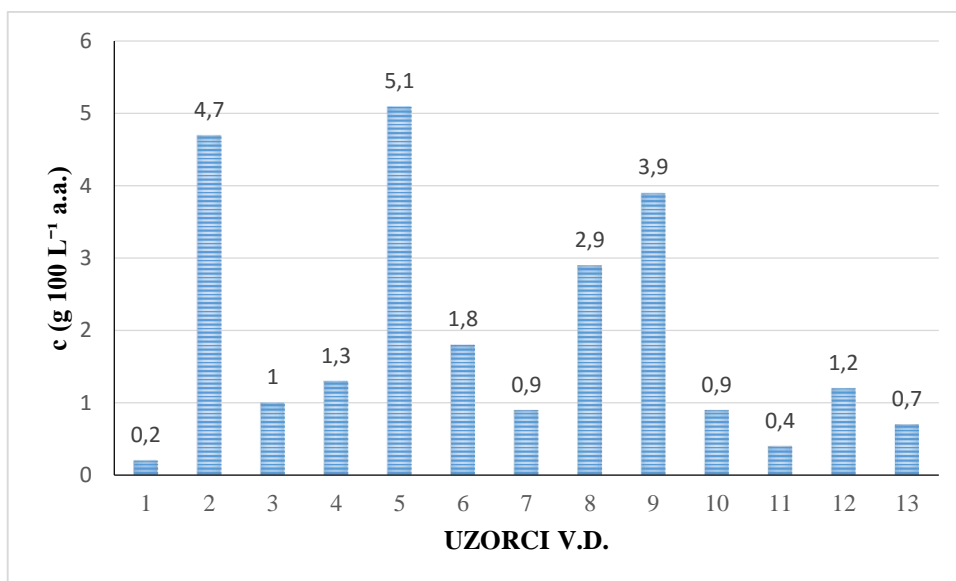


Slika 13. Koncentracije 2-butanola u uzorcima vinskih destilata određene plinskom kromatografijom (GC/FID).

Prema istraživanju Winterova i sur. (2008) vrijednosti 2-butanola u rakiji od jabuka kreću se u rasponu od 8 g 100 L⁻¹ a.a. do 32,3 g 100 L⁻¹ a.a., što su nešto više vrijednosti od onih dobivenih ovom analizom. Razlog niske koncentracije 2-butanola može biti isparavanje ili reakcije sorpcije do kojih dolazi tijekom odležavanja vinskih destilata.

4.4.2.5. *n*-butanol

Koncentracije *n*-butanola u ispitivanim uzorcima vinskih destilata prikazane su grafički (Slika 14) i kreću se u rasponu od 0,2 g 100 L⁻¹ a.a. do 5,1 g 100 L⁻¹ a.a. Prema Christoph i Bauer-Christoph (2007) *n*-butanol, kao i 2-butanol, ima visoke granične vrijednosti i zbog toga ne pridonosi značajno okusu vinskih destilata. Koncentracija *n*-butanola ispod 3 g 100 L⁻¹ a.a. tipična je za destilate višnje, dok kod ostalih voćnih destilata koncentracija *n*-butanola može iznositi i do 100 g 100 L⁻¹ a.a.



Slika 14. Koncentracije n-butanola u uzorcima vinskih destilata određene plinskom kromatografijom (GC/FID).

Prema istraživanju Herraiz i sur. (1990) koncentracije n-butanola u vinskim destilatima kreću se u rasponu od 0,5 g 100 L⁻¹ a.a. do 2 g 100 L⁻¹ a.a. što su niže vrijednosti od onih dobivenih ovom analizom. U istraživanju karakterizacije destilata jabuke provedene od Versini i sur. (2009) vrijednosti n-butanola u destilatima jabuke kreću se u rasponu od 7,5 g 100 L⁻¹ a.a. do 10,0 g 100 L⁻¹ a.a., dok su Winterova i sur. (2008) ustanovili da se koncentracije n-butanola u rakiji od jabuka kreću u rasponu od 8 g 100 L⁻¹ a.a. do 20,5 g 100 L⁻¹ a.a.

U tablici 9 prikazane su srednje vrijednosti koncentracija viših alkohola dobivenih ovom analizom te su uspoređene sa rezultatima dobivenih istraživanjem drugih autora.

Tablica 9. Srednja vrijednost koncentracija viših alkohola.

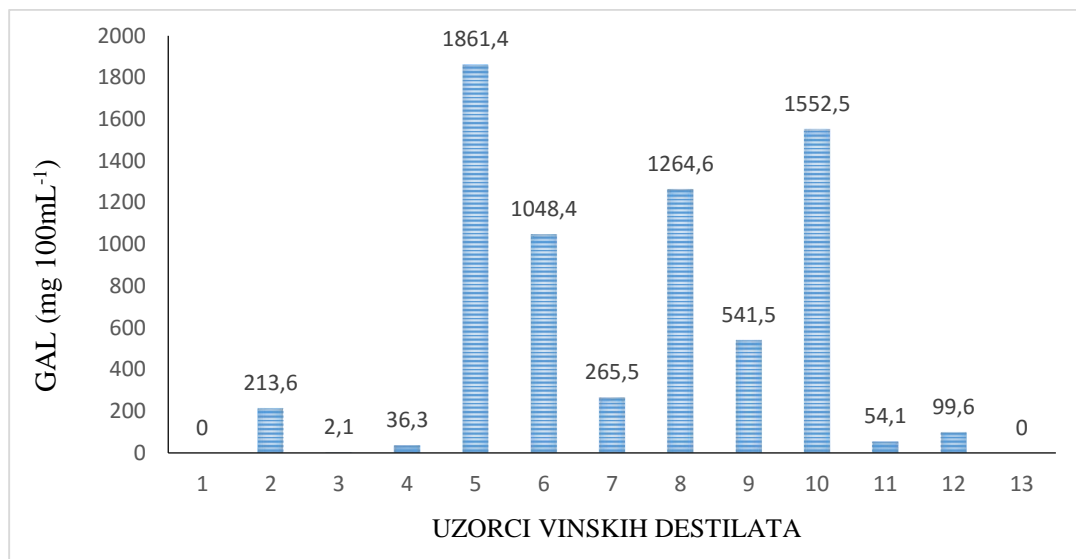
C _{sr.v.} (g 100 L ⁻¹ a.a.)				
Viši alkoholi	Uzorci vinskih destilata	Literaturni podatci		
	13 uzoraka	35 uzoraka komovice	20 uzoraka vinjaka	
i-amilni alkohol	193,01	176,6	128	Kostik i sur., 2013
i-butanol	45,8	36,7	40,8	Kostik i sur., 2013
n-propanol	23,8	42	33,2	Kostik i sur., 2013
n-butanol	1,92	3,68	1,4	Kostik i sur., 2013

Iz dobivenih rezultata prikazanih tablicom 9, može se vidjeti da su srednje vrijednosti koncentracija i-amilnog alkohola i i-butanola dobivenih ovom analizom, veće u odnosu na srednje vrijednosti prikazanih literaturnih podataka. Srednja vrijednost n-propanola prema literaturnim podacima za 35 uzoraka komovice i 20 uzoraka vinjaka je veća u odnosu na srednju vrijednost n-propanola dobivenu ovom analizom, dok je srednja vrijednost provedene analize za n-butanol unutar vrijednosti navedenih literaturnih podataka.

4.4. ODREĐIVANJE UKUPNE KOLIČINE POLIFENOLNIH SPOJEVA SPEKTOFOTOMETRIJSKOM METODOM

Polifenoli u piće dospijevaju iz sirovine ili iz drvenih bačvi u kojima piće odležava. Sukladno tome, najniže vrijednosti fenolnih spojeva prisutne su u uzorcima vinskih destilata bez ili s kratkim vremenom odležavanja u bačvama. Prema Rodriguez-Solana i sur. (2014), identifikacija fenola je ključna zbog njihovog utjecaja na kemijski sastav i senzorska svojstva koja su rezultat starenja destilata. Ove fizikalno-kemijske promjene ovisne su o nekoliko faktora, kao što su botanička vrsta drveta, tehnologija proizvodnje bačvi, njihova prethodna namjena, uvjeti starenja, sadržaj alkohola i ukupna kiselost destilata. Rezultati koncentracija ukupnih polifenolih spojeva u uzorcima vinskih destilata izraženi su kao ekvivalenti galne kiseline.

U analiziranim uzorcima vinskih destilata koncentracija ukupnih fenola izražena preko galne kiseline kreće se od 0 mg 100 mL⁻¹ do 1861 mg 100 mL⁻¹ (Slika 15).



Slika 15. Koncentracije ukupnih polifenolnih spojeva u uzorcima vinskih destilata određene spektrofotometrijski s Folin-Ciocalteu reagensom.

Veća koncentracija polifenolnih spojeva posljedica je starenja vinskih destilata u drvenim bačvama. Starenje vinskih destilata u drvenim bačvama rezultira unaprjeđenjem senzorskih karakteristika vinskih destilata te se mijenja njihov polifenolni sastav. Prema Canas i sur. (2008) koncentracija ukupnih fenola izražena preko galne kiseline u odležanim vinskim destilatima iznosi 934 mg 100 mL⁻¹. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su uzorci vinskih destilata s koncentracijom ukupnih fenola izraženih preko galne kiseline od 0 mg 100 mL⁻¹ do 99,6 mg 100 mL⁻¹ neodležani ili kratko odležani vinski destilati, dok su uzorci vinskih destilata s koncentracijom ukupnih fenola izraženih preko galne kiseline > 200 mg 100 mL⁻¹ do 1861 mg 100 mL⁻¹ odležani vinski destilati.

4.5. ODREĐIVANJE POLIFENOLNOG PROFILA UZORAKA VINSKIH DESTILATA TEKUĆINSKOM KROMATGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

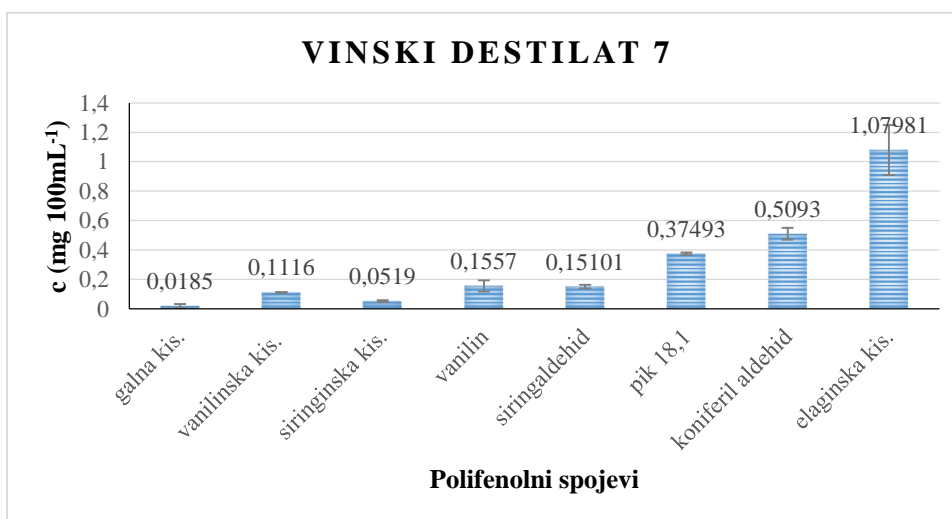
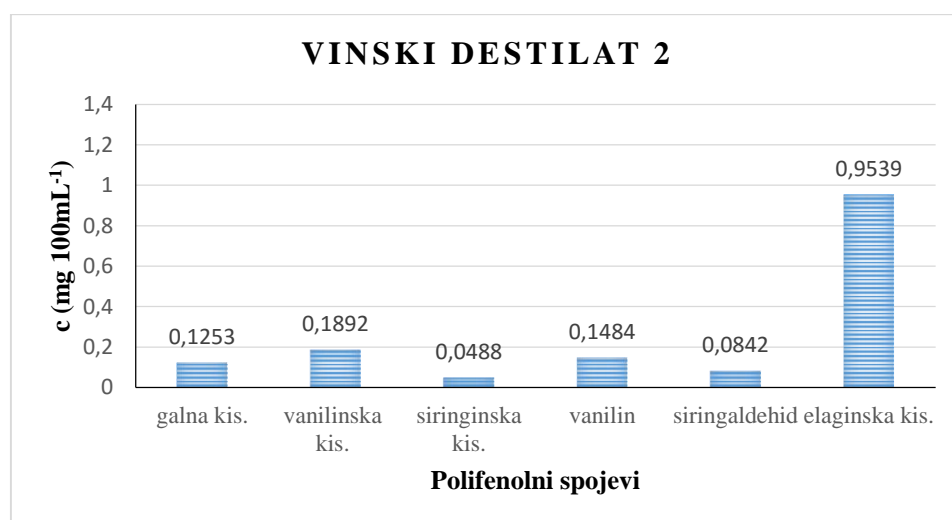
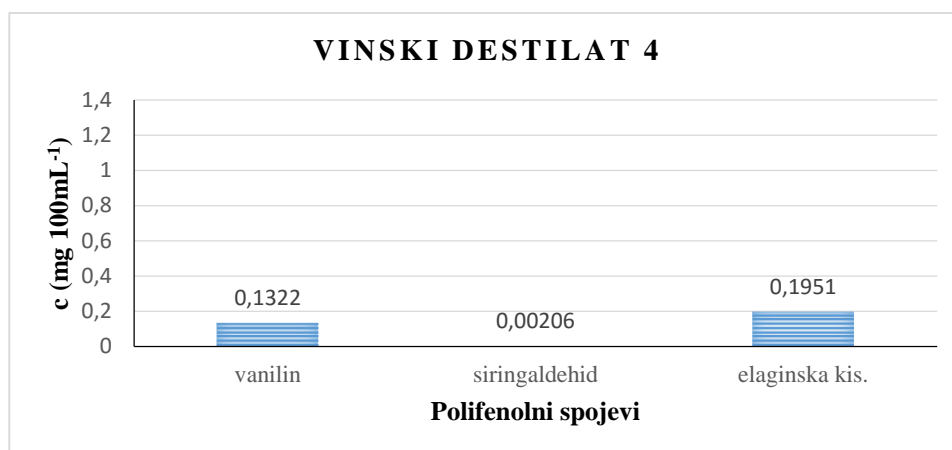
Osnovni koncept pozitivnog djelovanja većine biološki aktivnih spojeva na organizam je njihovo antioksidativno djelovanje. Snažno antioksidacijsko djelovanje koje se iskazuje hvatanjem slobodnih radikala te vezanjem metalnih iona, prekursora pri stvaranju slobodnih radikala, prepisuje se fenolnim spojevima. Fenolni spojevi u prirodi su rijetko prisutni u slobodnom obliku aglikona. Nalaze se uglavnom esterificirani s malim organskim kiselinama,

konjugirani sa šećernim jedinicama ili u polimernom obliku. Tako je broj mogućih struktura vrlo velik, od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline, do visoko polimernih spojeva, kao što su kondenzirani tanini. Pojedina jaka alkoholna pića također sadrže fenolne spojeve. Voćni i biljni likeri te travarice bogate su biološki aktivnim komponentama koje potječu od sirovine (voća ili bilja) koja se macerira u vodeno-alkoholnoj bazi tijekom pripreme likera. Biološki aktivne spojeve sadrže i destilati koji stare u drvenim bačvama. Prema Canas i sur. (2008) neka istraživanja pokazuju snažnu antioksidativnu aktivnost nekih fenolnih kiselina, posebno galne i elaginske kiseline. Konzumiranje hrane i pića sa visokim sadržajem fenolnih spojeva povezuje se sa smanjenjem kardiovaskularnih bolesti i raka. Podatak o ukupnoj količini fenolnih spojeva (TPC) ne daje kompletnu informaciju o biološkoj vrijednosti neke namirnice već je potrebno odrediti pojedinačne fenolne spojeve prisutne u namirnici. Kako bi se odredilo koje se točno fenolne kiseline nalaze u pojedinim uzorcima vinskih destilata i u kojim koncentracijama, korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Za odjeljivanje pojedinih fenolnih spojeva korištena je gradijentna elucija, a za identifikaciju i kvantifikaciju metoda vanjskog standarda. Zbog nedostupnosti pojedinih standarda za tumačenje rezultata korišteni su literaturni podaci o UV spektrima pojedinih fenolnih spojeva. Nebojani destilati ne sadrže fenolne spojeve jer su termolabilni pa se fenolni spojevi grožđa i vina raspadnu tijekom destilacije. Stoga su u ovom dijelu rada analizirani samo obojeni destilati za koje se smatra da su odležavali. Zbog lakše interpretacije rezultata, uzorci vinskih destilata podijeljeni su u 3 skupine prema koncentraciji fenolnih spojeva:

- Uzorci vinskih destilata sa nižom koncentracijom fenolnih spojeva (Slika 16)
- Uzorci vinskih destilata sa srednjom koncentracijom fenolnih spojeva (Slika 17)
- Uzorci vinskih destilata sa najvišom koncentracijom fenolnih spojeva (Slika 18)
- Uzorak doradenog vinskog destilata (Slika 22).

Kromatogrami pojedinih uzoraka prikazani su slikama 19-21 i 23.

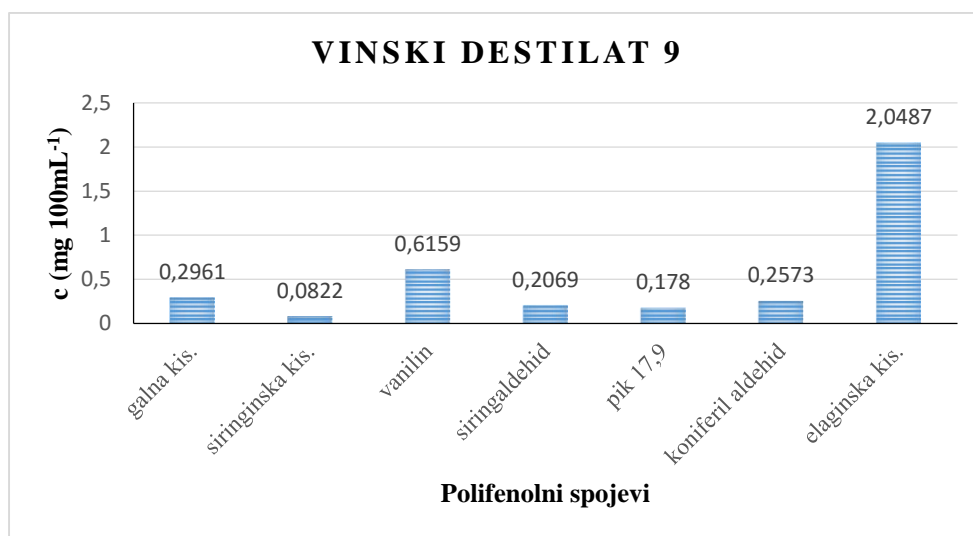
- Uzorci vinskih destilata sa nižom koncentracijom fenolnih spojeva



Slika 16. Grafički prikaz uzorka vinskih destilata sa nižom koncentracijom fenolnih spojeva.

Iz dobivenih rezultata prikazanih na slici 16, mogu se vidjeti značajne razlike u koncentraciji fenolnih spojeva između prikazanih uzoraka. U svim prikazanim uzorcima vinskih destilata dominira elaginska kiselina kao najzastupljeniji spoj. Također, u svim uzorcima vinskih destilata prisutan je vanilin i siringaldehid, te su za uzorke vinskih destilata 2 i 7 karakteristične i galna kiselina, vanilinska i siringinska kiselina koje nisu identificirane u uzorku vinskog destilata 4. Elaginska i galna kiselina te siringaldehid su jedni od uobičajenih i dominantnih spojeva u odležanim destilatima. Prema Giménez i sur. (2000) vanilin je jedan od aldehida koji doprinosi aromi vinskih destilata, lako se dobije na industrijskoj razini te ga proizvođači mogu dodavati u proizvode, stimulirajući tako karakter starenja. Koncentracije elaginske kiseline u rezultatima iznose $0,19 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$, $0,95 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ i $1,08 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$. Prema literaturnim podacima (www.phenol-explorer.eu, Goldberg i sur., 1999) koncentracije elaginske kiseline kreću se od $0,23 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ do $3,07 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$. Prema Jaarsveldt i Hattingh (2012) veća koncentracija siringaldehida ukazuje na dobru kvalitetu alkoholnog pića. Koncentracija galne kiseline iznosi $0,125 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ i $0,018 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ u uzorcima 2 i 7, dok se rezultati drugih autora kreću od $0,1 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ do $0,47 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$. Prema Rodríguez-Solana i sur (2014) veći omjer između galne kiseline/vanilina ukazuje na bolju kvalitetu rakija. Iz dobivenih rezultata veći omjer galne kiseline/vanilina ima uzorak vinskog destilata 2. Prema literaturnim podacima (www.phenol-explorer.eu, Goldberg i sur., 1999) koncentracije siringinske kiseline kreću se od $0,04$ do $0,21 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$, što se podudara sa rezultatima dobivenim u ovom eksperimentu. U uzorku vinskog destilata 7 identificiran je i fenolni spoj koniferilaldehid, koji je karakterističan za starije uzorke. Iz svega navedenog, može se zaključiti kako je uzorak vinskog destilata 4 kratko odležavan. Koncentracija vanilina, siringaldehida, vanilinske kiseline i siringinske kiseline koje nastaju iz lignina rastu tijekom starenja te se može zaključiti kako su uzorci vinskog destilata 2 i 7 kvalitetniji i duže odležavani u odnosu na uzorak vinskog destilata 4.

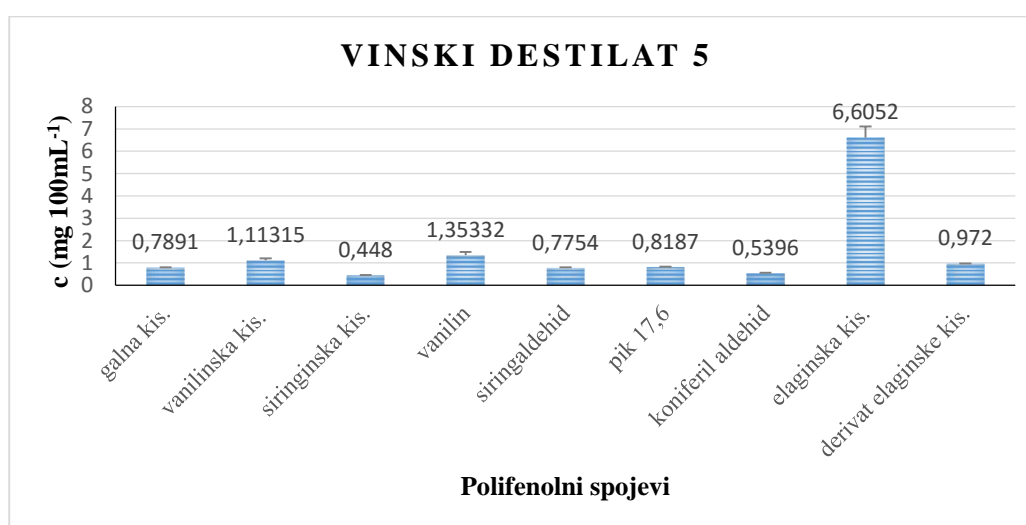
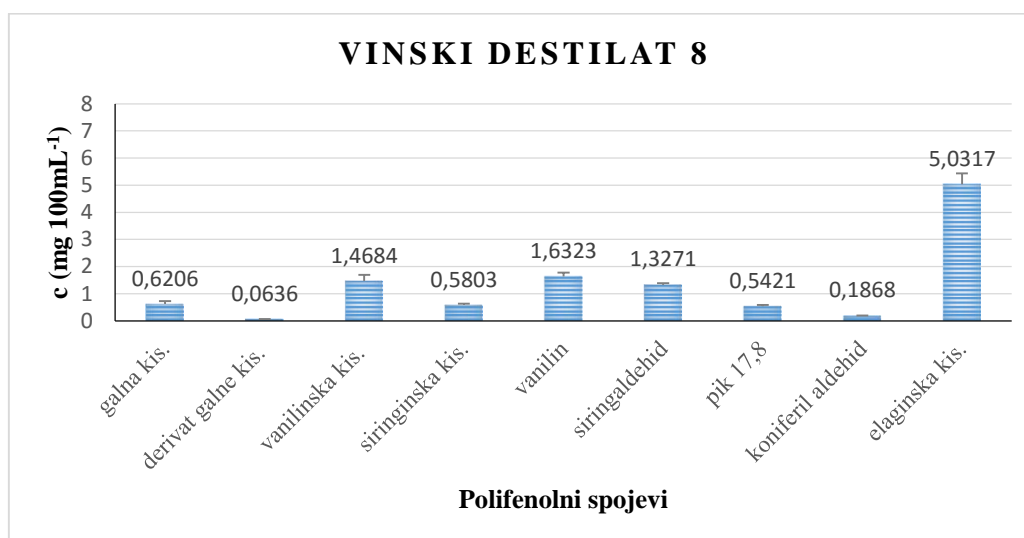
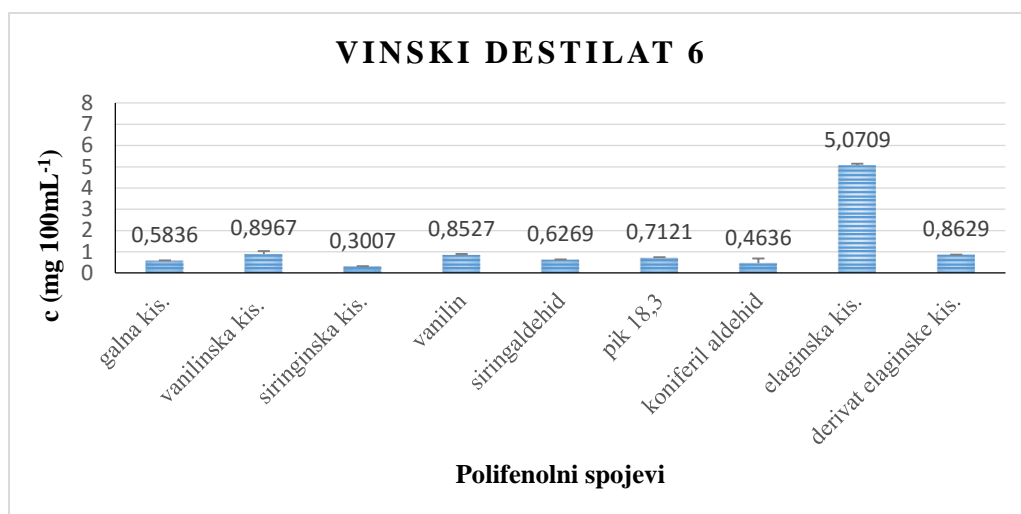
- Uzorci vinskih destilata sa srednjom koncentracijom fenolnih spojeva



Slika 17. Grafički prikaz uzorka vinskog destilata sa srednjom koncentracijom fenolnih spojeva.

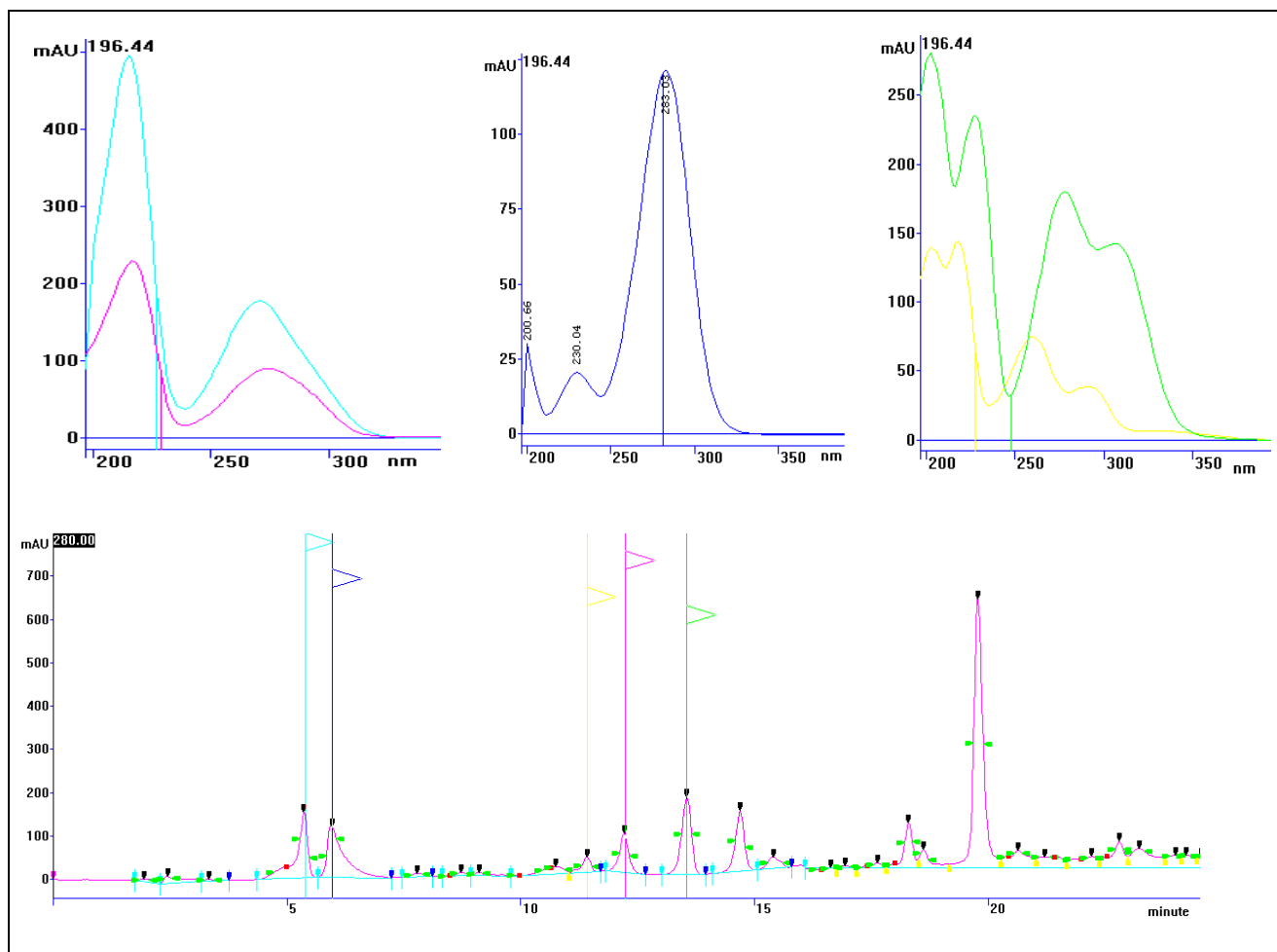
Iz dobivenih rezultata prikazanih na slici 17, analizom je utvrđeno da uzorak vinskog destilata 9 također sadrži elaginsku kiselinu kao najzastupljeniji spoj. Za uzorak vinskog destilata 9 karakteristična je i galna kiselina, siringska, vanilin, siringaldehid, te koniferilaldehid. Koncentracije elaginske, galne i siringske kiseline podudaraju se sa ranije spomenutim literaturnim podacima. Koncentracija vanilina u uzorku vinskog destilata 9 iznosi 0,615 mg 100 mL⁻¹, dok se koncentracije vanilina u rezultatima drugih autora (www.phenol-explorer.eu, Goldberg i sur., 1999) kreću od 0,02 mg 100 mL⁻¹ do 0,15 mg 100 mL⁻¹, što je manje od rezultata dobivenih ovom analizom. Prema tome, moguće je da je vanilin dodan naknadno, zbog njegovog doprinosa aromi vinskih destilata. Koncentracija siringaldehida je veća u odnosu na prethodna 3 uzorka vinskog destilata, te iznosi 0,207 mg 100 mL⁻¹, što je u skladu sa literaturnim podacima (www.phenol-explorer.eu, Goldberg i sur., 1999) gdje se koncentracija siringaldehida kreće od 0,02 mg 100 mL⁻¹ do 0,27 mg 100 mL⁻¹. Koncentracija fenolnih spojeva raste tijekom starenja vinskih destilata te se može zaključiti kako je uzorak vinskog destilata 9 duže odležavan od prethodna 3 uzorka vinskog destilata.

- Uzorci vinskih destilata sa najvišom koncentracijom fenolnih spojeva



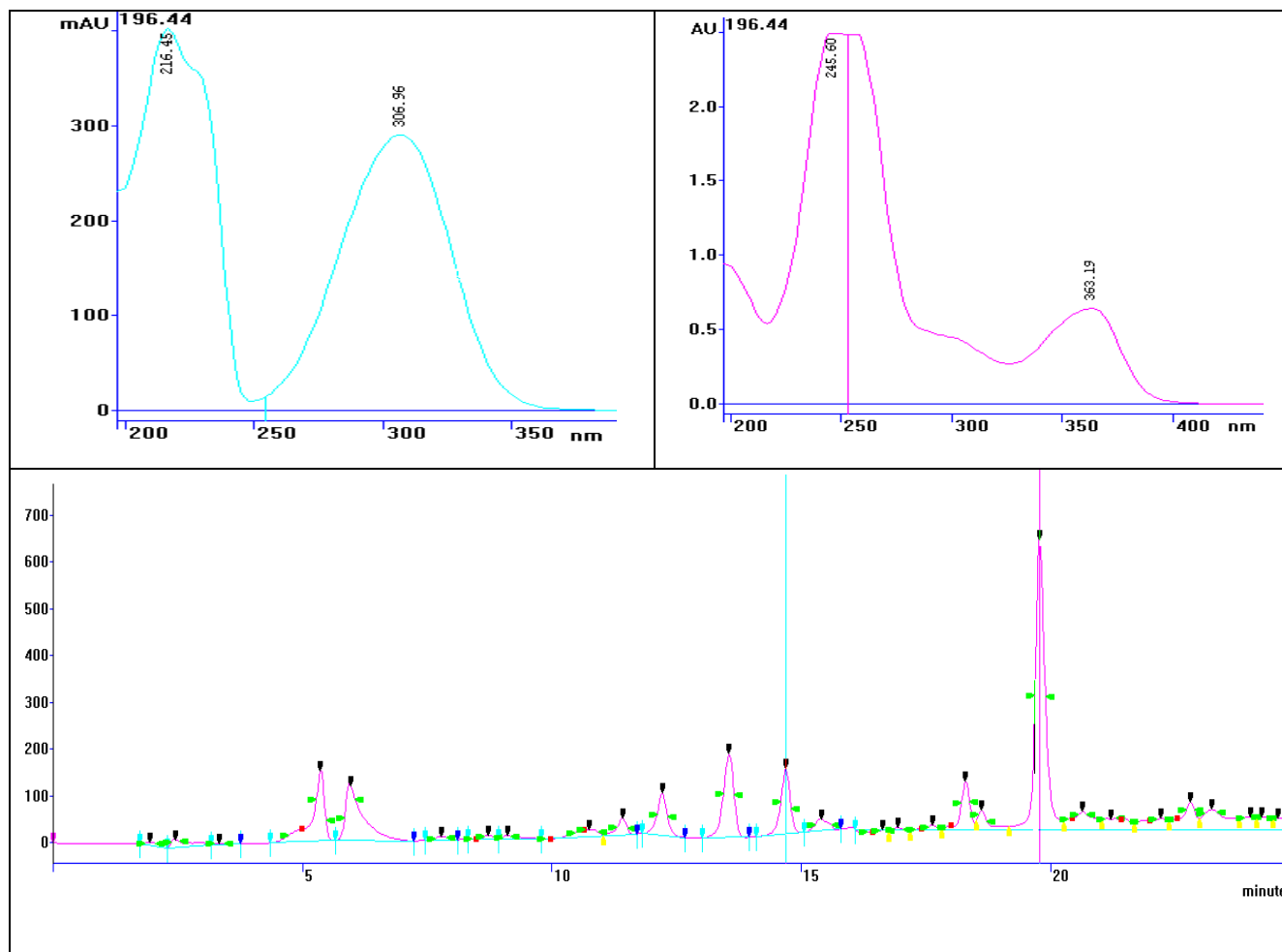
Slika 18. Grafički prikaz uzoraka vinskih destilata sa najvišom koncentracijom fenolnih spojeva.

Iz dobivenih rezultata prikazanih na slici 18, također se mogu vidjeti značajne razlike u koncentraciji fenolnih spojeva između prikazanih uzoraka vinskih destilata. Kao i u preostalim uzorcima vinskih destilata, elaginska kiselina dominira kao najzastupljeniji spoj. Koncentracije elaginske kiseline u uzorcima vinskih destilata iznose 5,071 mg 100 mL⁻¹, 5,031 mg 100 mL⁻¹ i 6,605 mg 100 mL⁻¹, što je više od koncentracije elaginske kiseline navedene u literaturnim podacima koji su ranije spomenuti. Koncentracija galne i siringinske kiseline u sva tri uzorka vinskog destilata također premašuju koncentracije ovih fenolnih spojeva navedenih u literaturnim podacima, kao i koncentracija siringaldehida. Koncentracija vanilina je također veća u odnosu na spomenute literaturne navode, te je analizom utvrđeno kako je najveća koncentracija vanilina zastupljena u uzorku vinskog destilata 8. Također, u sva tri uzorka vinskih destilata identificiran je koniferilaldehid, koji je karakterističan za starije uzorke. Veći omjer galne kiseline/vanilina, koji ukazuje na bolju kvalitetu vinskih destilata, posjeduje uzorak vinskog destilata 6. Kao što je ranije spomenuto, koncentracija fenolnih spojeva raste sa starenjem vinskih destilata te se može zaključiti s obzirom na prikazane rezultate, kako su ovi uzorci vinskih destilata najduže odležavani te je analizom utvrđeno da najveću koncentraciju fenolnih spojeva posjeduje uzorak vinskog destilata 5.



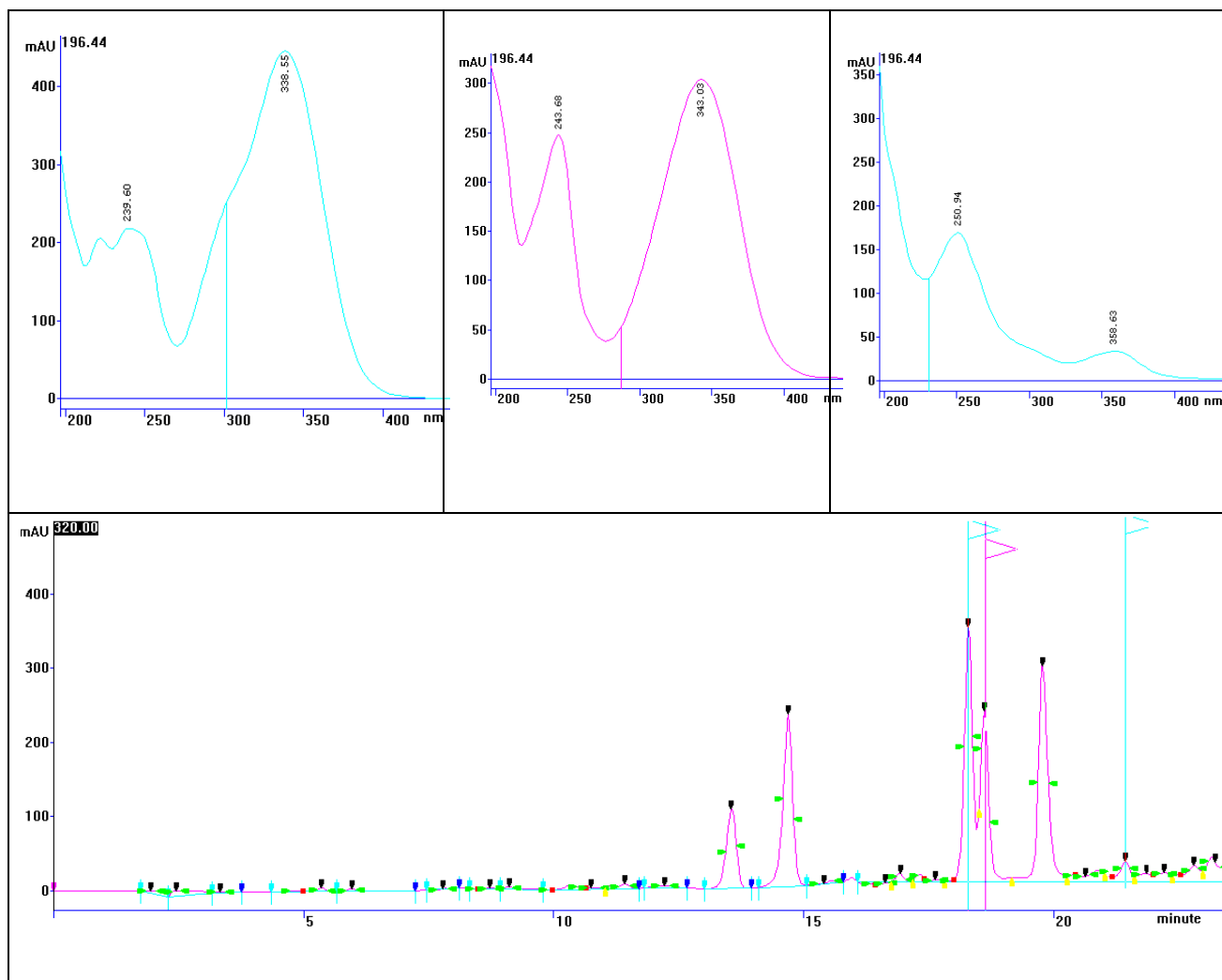
Slika 19. Kromatogram vinskog destilata odležavanog u drvenim bačvama (uzorak 6) snimljen pri 280 nm s pripadajućim spektrima (--- galna kiselina, --- siringinska kiselina, --- karamel, ---vanilinska kiselina, --- vanilin).

Na slici 19 prikazan je kromatogram uzorka vinskog destilata označenog brojem 6 snimljen pri 280 nm. Kromatogram prikazuje UV spektre galne, siringinske, vanilinske kiseline, karamela i vanilina koji apsorbiraju svjetlost pri valnoj duljini od 280 nm.



Slika 20. Kromatogram vinskog destilata odležavanog u drvenim bačvama (uzorak 6) snimljen pri 280 nm s pripadajućim spektrima (--- siring aldehyd, --- elaginska kiselina).

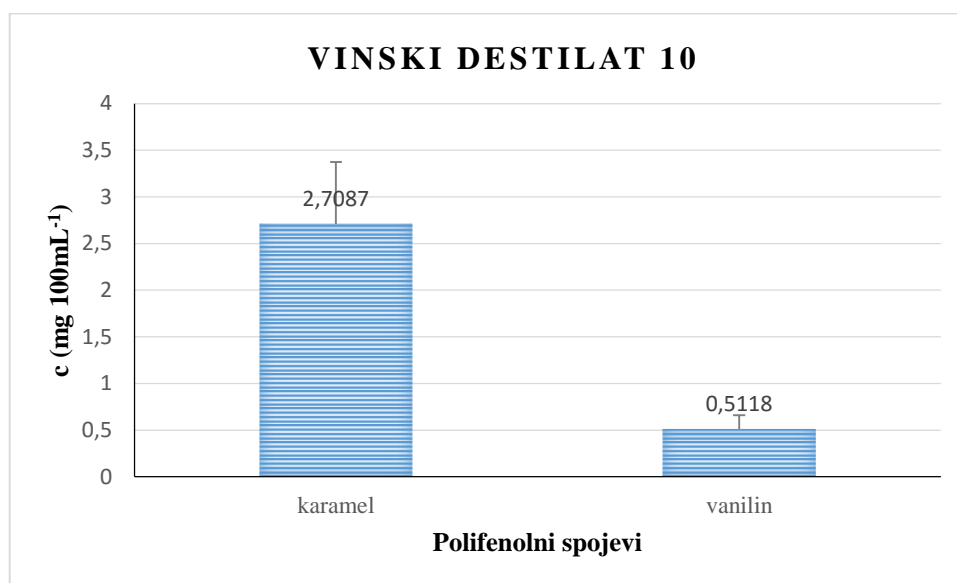
Na slici 20 prikazan je kromatogram vinskog destilata označenog brojem 6 koji je snimljen pri 280 nm. Kromatogram prikazuje UV spektre siring aldehyda i elaginske kiseline s apsorpcijom svjetlosti pri valnoj duljini od 280 nm.



Slika 21. Kromatogram vinskog destilata odležavanog u drvenim bačvama (uzorak 6) snimljen pri 320 nm s naznačenim neidentificiranim pikovima u 17,9 (----) i 18,3 minuti (---- predpostavka - koniferil aldehid) te u 22,8 minuti (---- derivat elaginske kiseline).

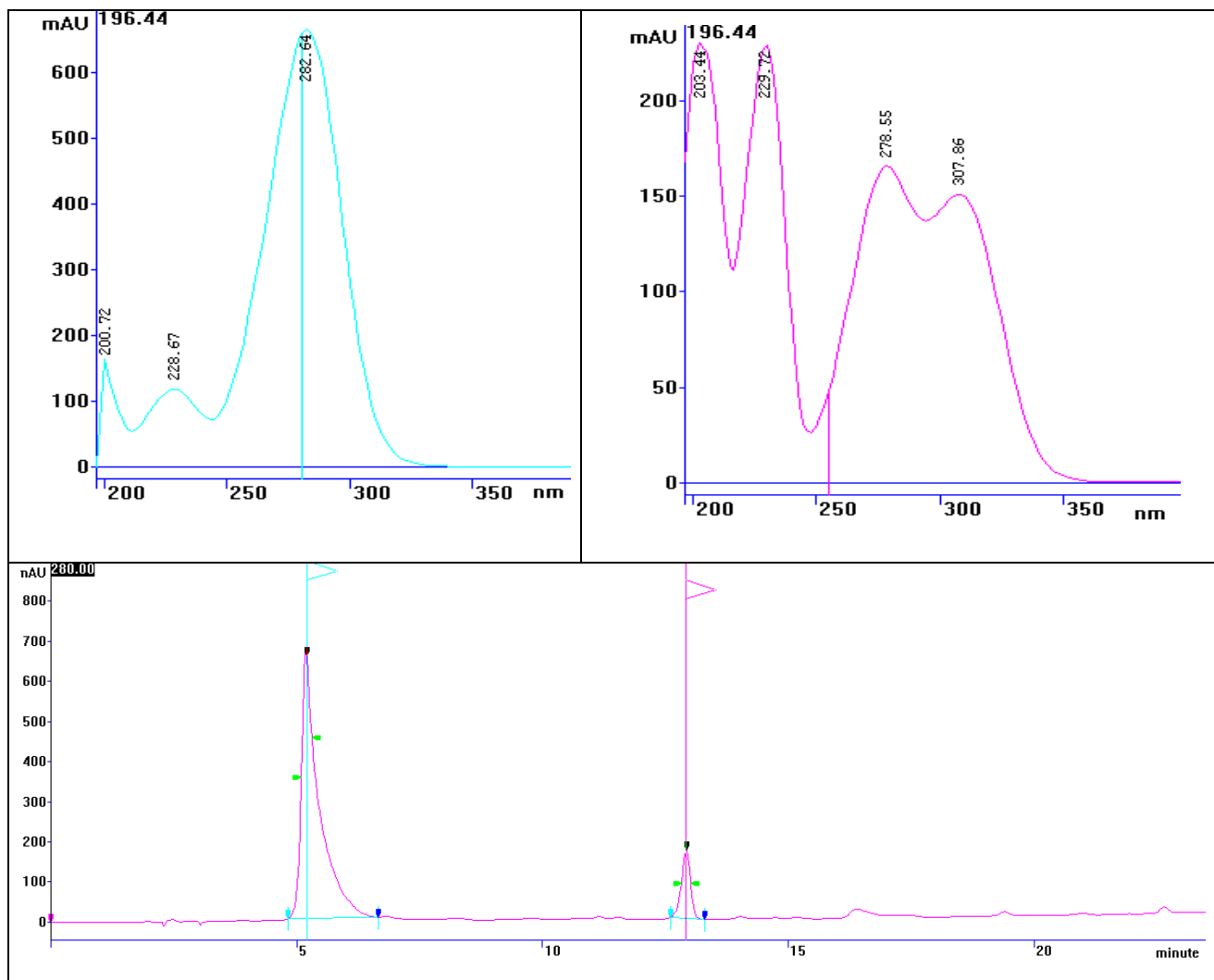
Na slici 21 prikazan je kromatogram uzorka vinskog destilata označenog brojem 6 snimljen pri valnoj duljini od 320 nm. Kromatogram prikazuje UV spektre s naznačenim neidentificiranim spojevima retencijskog vremena 17,9 min i 18,3 min koji imaju sposobnost apsorpcije svjetlosti pri 320 nm, kao i UV spektar derivata elaginske kiseline.

- Uzorak dorađenog vinskog destilata



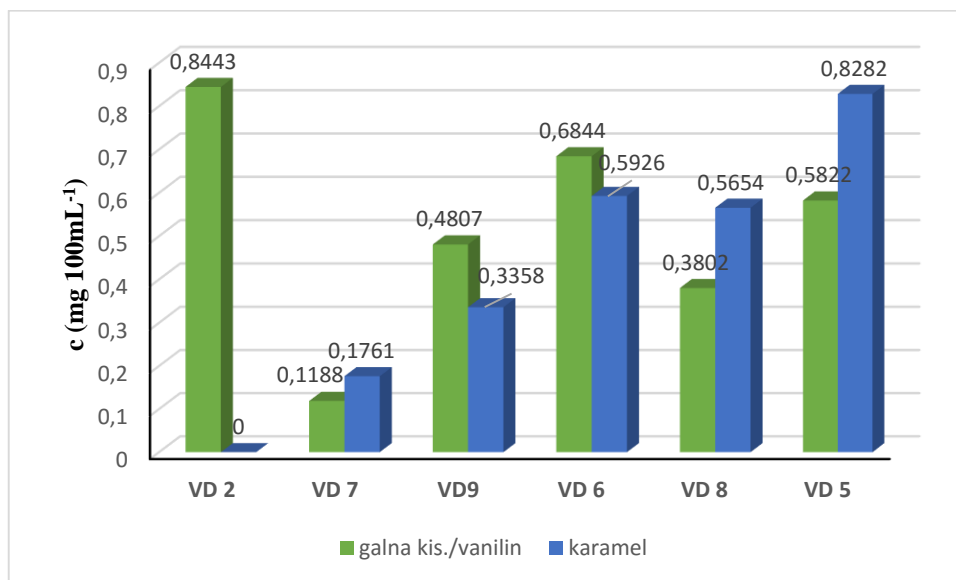
Slika 22. Grafički prikaz uzorka dorađenog vinskog destilata.

Iz dobivenih rezultata prikazanih na slici 22, analizom je utvrđeno kako uzorak vinskog destilata 10 sadrži vanilin u koncentraciji od 0,512 mg 100 mL⁻¹ te karamel u koncentraciji od 2,708 mg 100 mL⁻¹. Visoke koncentracije vanilina i karamela, kao i ne postojanost ostalih fenolnih spojeva karakterističnih za odležane destilate, dokaz su da uzorak vinskog destilata nije odležavao, već su vanilin i karamel dodani naknadno (Slika 23). Vanilin je dodan kao doprinos aromi vinskog destilata, a karamel je dodan kao pojačivač boje, kako bi nastala boja karakteristična za destilate odležavane u drvenim bačvama. Po intenzivnoj zlatno-smeđoj boji potaknutoj od karamela, zavaravaju se potrošači da konzumiraju kvalitetni vinski destilat koji je odležavao.



Slika 23. Kromatogram neodležanog vinskog destilata (uzorak 10) obojanog karamelom i aromatiziranog vanilinom. Kromatogram je snimljen pri 280 nm, (---- karamel, ---- vanilin).

Na slici 24 grafički su prikazani rezultati koncentracije karamela u uzorcima vinskih destilata očitani preko površine za galnu kiselinu te rezultati omjera između galne kiseline i vanilina koji ukazuju na kvalitetu vinskih destilata.



Slika 24. Grafički prikaz koncentracije karamela i omjera galne kis/vanilina u uzorcima vinskih destilata.

Rezultati prikazani na slici 24, poredani su prema koncentraciji fenolnih spojeva u pojedinim uzorcima vinskih destilata, od manjih prema najvećima. Prema Van Jaarsveld i sur. (2009) omjer između galne kiseline i vanilina se povećava sa razinom tostiranja. Prilikom proizvodnji bačvi, provodi se paljenje unutrašnjeg dijela bačve, odnosno tostiranje. Različite razine tostiranja utječu i na aromu vinskih destilata, tako da srednje razine tostiranja (15-20 min.) daju arome tosta i vanilije, dok visoko tostiranje oslobađa arome dima i začina. Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da najveći omjer između galne kiseline i vanilina ima uzorak vinskog destilata 2 te analizom u uzorku vinskog destilata 2 nije identificiran karamel, što ukazuje da boja vinskog destilata u potpunosti potječe od hrastove bačve u kojoj je destilat odležavao. Od uzoraka sa najvećom koncentracijom fenolnih spojeva, najveći omjer između galne kiseline i vanilina ima uzorak vinskog destilata 6, što ukazuje da je to jedan od kvalitetnijih uzoraka vinskih destilata. Analizom je utvrđeno da je najveća koncentracija karamela prisutna u uzorku vinskog destilata 5, kao i da posjeduje najveću koncentraciju fenolnih spojeva. S obzirom na detektirane fenolne kiseline karakteristične za drvo hrasta

može se zaključiti kako su uzorci vinskih destilata odležavali te je karamel dodan kako bi naglasio boju pića koja se inače dobiva starenjem vinskih destilata u hrastovim bačvama. Bitno je naznačiti da je dodavanje pojačivača boje i arome karakteristika i velikih i malih proizvođača jakih alkoholnih pića u Republici Hrvatskoj.

4.6. SENZORSKO OCJENJIVANJE UZORAKA VINSKIH DESTILATA

Senzorsko ocjenjivanje provedeno je na 13 različitih vinskih destilata u proizvodnom pogonu Badel 1862 d.d..

Ocjenjivanje se provodilo u tri faze:

- neodležani vinski destilat
- vinski destilat kratkog vremenskog odležavanja
- odležani vinski destilat.

Senzorsko ocjenjivanje je provedeno od strane certificiranih,iskusnih i dugogodišnjih ocjenjivača te je opisano i prikazano u tablici 10.

Tablica 10. Senzorsko ocjenjivanje uzoraka vinskih destilata.

1. Uzorak br. 1 Mimi (76, 57%)	Neodležan vinski destilat, ima laganu cvjetnu notu te nije pogodan za odležavanje.
2. Uzorak br. 3 Bonollo (81,77%)	Neodležan vinski destilat. Ima izraženiju vinsku notu, dominira ulje groždanih koštica te nije pogodan za odležavanje.
3. Uzorak br. 11 Benkovac dp. 1 (77, 05%)	Neodležan vinski destilat. Osjeti se zelena vinska nota te posjeduje laganu cvjetnu notu. Okusno je mekši te je pogodan za odležavanje, za razliku od prethodna dva vinska destilata.
4. Uzorak br. 12 Benkovac dp. 2. (75, 23%)	Sličan je uzorku br. 3 , s tim da u okusu ima jednu laganu notu na vinski talog. Ovo je komercijalni vinski destilat, odnosno može se koristiti za razne kupaže, a ne isključivo za proizvodnju vinjaka.
5. Uzorak br. 13 Alanessa (76,99%)	Vinski destilat koji je okusno intenzivniji na grožđe. Ima slabije izraženu vinsku notu, pitak je, može se koristiti pri proizvodnji vinjaka. Odležava do jednu godinu.

Tablica 10. Senzorsko ocjenjivanje uzoraka vinskih destilata (nastavak).

6. Uzorak br. 4 Segestica (66,96%)	Vinski destilat koji posjeduje laganu vinsku notu. Ima slabije izraženu drvenastu notu te se može koristiti za proizvodnju Brandyja. Ovo je komercijalni vinski destilat.
7. Uzorak br. 2 Benkovac (71,89%)	Odležani vinski destilat koji je izuzetno mirisno i okusno usklađen. Ima laganu vinsku notu po osušenim bobicama grožđa.
8. Uzorak br. 7 Vršac (64,66%)	Vinski destilat koji je na odležavanju. Dosta je raštrkan, mirisno prazan. Kod ovog vinskog destilata miris ne prati okus. U okusu ima laganu vinsku notu, notu drveta i notu suhog grožđa, dok se to u mirisu vinskog destilata ne osjeti.
9. Uzorak br. 9 VD Benkovac (68,48%)	U ovom uzorku vinskog destilata se i mirisno i okusno osjeti vinski talog dok su ostale komponente slabije izražene. VD Benkovac se može koristiti u pripremi kupaža za različite vinjake
10. Uzorak br. 5 VD Stari 1 (hladna stabilizacija) (73,58%)	Vinski destilat koji ima intenzivnu vinsku aromu, intenzivnu drvenu notu te je pogodan za proizvodnju Glembya, Hennessyja i ostalih teških robusnih vinjaka.
11. Uzorak br. 6 VD Stari 2 (67,16%)	Vinski destilat koji ima intenzivnu drvenu notu, odležan preko 20 godina. Ovaj vinski destilat se može koristiti kao vinjak samo da se razrijedi. Godišnji kalo mu iznosi od 7-10%, bez ikakvih je mana. Proizvodio je se od biranih vina.
12. Uzorak br. 8 Segestica odležana (69,98%)	Kupljeni vinski destilat koji posjeduje notu drveta, te je čipsiran. Starenje ovog vinskog destilata nije prirodno, neharmoničan je te se ne može koristiti samostalno nego samo u kupažama.
13. Uzorak br. 10 Vršac odležani (39,86%)	Kupljeni vinski destilat. Posjeduje povišenu koncentraciju aldehida te visoku koncentraciju sumpora. Nije proizveden od vina koja su namijenjena za proizvodnju vinskih destilata, već od ostataka.

Između uzoraka vinskih destilata s nižom koncentracijom fenolnih spojeva, utvrđeno je da uzorak vinskog destilata 2 ima najveći omjer galne kiseline i vanilina. Veći omjer ukazuje na bolju kvalitetu vinskih destilata te je također prema senzorskoj ocjeni uzorak vinskog

destilata 2 ocjenjen kao izuzetno mirisno i okusno usklađen. Također, analizom je utvrđeno kako najveću koncentraciju fenolnih spojeva, koji nastaju iz lignina tijekom starenja, posjeduje uzorak vinskog destilata 5 te je i senzorski ocjenjeno kako uzorak vinskog destilata 5 ima intenzivnu drvenu notu. Između uzoraka sa najvišom koncentracijom fenolnih spojeva, najveći omjer galne kiseline i vanilina ima uzorak vinskog destilata 6. Uzorak vinskog destilata 6 najbolje je i senzorski ocjenjen, kao vinski destilat koji ima intenzivnu drvenu notu, bez ikakvih mana te da se može koristiti kao vinjak kad se razrijedi. Najviše koncentracije ukupnih estera određene su također u uzorcima vinskih destilata 5, 6 i 8, što je i očekivano budući da su to uzorci koji su odležavali (Tablica 1 i 10). Iznimka je uzorak 10, koji je također imao visoku koncentraciju ukupnih estera i vodi se kao odležali vinski destilat, ali je HPLC analiza pokazala da se radi o doradenom vinskom destilatu (Slika 22). Uzorci 5, 6 i 8 te uzorak 9 imali su i najvišu koncentraciju viših alkohola (Tablica 8) što također pridonosi poželjnoj aromi vinskih destilata.

Proizvodnja kvalitetnih vinskih destilata je odlučujući čimbenik za dobivanje vrhunskih vinjaka. Odležavanjem vinskih destilata dolazi do promjene u njihovom sastavu, što se izravno odražava na njihova senzorska svojstva i kvalitetu. U ovom radu istraživana je utjecaj odležavanja vinskih destilata na njihove fizikalno-kemijske te senzorske karakteristike. Rezultati su pokazali da se starenjem vinskih destilata značajno povećava udio fenolnih spojeva koji utječu na kvalitetu vinskih destilata. U neodležanim vinskim destilatima nisu identificirani fenolni spojevi zbog njihove termolabilnosti pa se fenolni spojevi grožđa i vina raspadnu tijekom destilacije. Odsutnost fenolnih spojeva ima izravan utjecaj i na kvalitetu neodležanih vinskih destilata jer fenolni spojevi imaju značajan utjecaj na kemijski sastav i senzorska svojstva vinskih destilata. Ovaj rad ima znanstveni doprinos istraživanju utjecaja odležavanja na sastav i kvalitetu vinskih destilata te poticanje proizvodnje vinskih destilata uz odležavanje jer se time može značajno povećati njihova kvaliteta.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi provedenih kemijskih analiza i senzorske procjene, dobivenih rezultata i provedene rasprave te proučene znanstvene literature mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Vrijednosti koncentracije etanola u uzorcima vinskih destilata kreću se u rasponu od 39,86 % vol. do 81,77 % vol. te svih 13 uzoraka vinskih destilata zadovoljava vrijednost propisanu Pravilnikom.
2. Vrijednosti koncentracija određivanih hlapljivih komponenti u svim uzorcima vinskih destilata više su od minimalnih koncentracija propisanih Pravilnikom, dok su vrijednosti metanola manje od maksimalne koncentracije metanola propisane Pravilnikom.
3. U uzorcima vinskih destilata koji nisu ili su kratko odležavali, fenolni spojevi nisu detekirani ili su detektirani u niskim koncentracijama, dok je najviša koncentracija fenolnih spojeva ($1861,4 \text{ mg } 100\text{mL}^{-1} \text{ GAL}$) zabilježena u uzorku vinskog destilata označenog brojem 5.
4. Galna, vanilinska, siringinska i elaginska kiselina te vanilin i siringaldehid najzastupljeniji su fenolni spojevi u uzorcima vinskih destilata.
5. Najveći omjer između galne kiseline i vanilina koji ukazuje na bolju kvalitetu vinskog destilata ima uzorak vinskog destilata označen brojem 6.
6. Analizom polifenolnih spojeva u uzorcima vinskih destilata koji su odležavali, moguće je odrediti da li je boja i aroma vinskih destilata formirana tijekom njihovog starenja ili se radi o simuliranju uvjeta starenja dodatkom boje i umjetnih aroma.
7. Od trinaest uzoraka vinskih destilata, senzorski je najbolje ocjenjen uzorak vinskog destilata označen brojem 6 što se podudara sa rezultatima kemijske analize.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2016) Hrastove bačve za odležavanje vinskih destilata, <<http://migros.rs/Asortiman/Burad.html>>. Pristupljeno 6. svibnja 2016.

Anonymous 2 (2016) Osnovna kemijska struktura flavonoida, <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Quercetina>>. Pristupljeno 7. svibnja 2016.

Anonymous 3 (2016) Tradicionalna staklena čaša za ocjenjivanje jakih alkoholnih pića, <<https://www.google.hr/search?q=tradicionalne+staklene+%C4%8Da%C5%A1e+u+obliku+tulipana>>. Pristupljeno 15. svibnja 2016.

Anonymous 4 (2016) Osjetila okusa na jeziku, <<https://www.google.ba/search?q=osjet+jezika>>. Pristupljeno, 9. svibnja 2016.

Anonymous 5 (2016) Plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N - Network GC System, <<https://www.google.hr/search?q=Plinski+kromatografi>>. Pristupljeno 2. svibnja 2016.

Brossard, P. (2007) The effects of the glass on the perception of the whisky flavours, <<http://www.whisky-news.com/En/reports/whisky-glasses.pdf>>. Pristupljeno 10. svibnja 2016.

Canas, S., Casanova, V., Belchiol Pedro, A. (2008) Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *J. Food Compos. Anal.* **21**, 626-633.

Christoph, N., Bauer-Christoph, C. (2007) Flavour of Spirit Drinks: Raw Materials, Fermentation, Distillation, and Ageing. U: *Flavours and Fragrances* (Berger, R.G., ured.), Schmidt & Vöckler GbR., Leipzig, str. 219-239.

Combina, M., Elia, A., Mercadola, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C. (2005) Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* **99**, 237-243.

Database on Polyphenol Content in Foods, <<http://www.phenol-explorer.eu>>. Pristupljeno 29. Svibnja 2016.

Dragone, G., Mussatto, S. I., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A. (2009) Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem.* **112**, 929-935.

Dragović-Uzelac, V. (2015) Fenolni spojevi, <www.pbf.hr>. Pristupljeno, 30. travnja 2016.

- Giménez, R., Villalón, M., López, H., Navarro, M., Cabrera, C., Olalla, M., Quesada, J. J., López, M. C. (2000) Determination of galic acid in commercial Brandies using high performance liquid chromatography. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **3**, 13-20.
- Goldberg, D. M., Hoffman, B., Yang, J., Soleas, G.J. (1999) Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3978-3985.
- Gomez, E., Laencina, J., Martinez, A. (1994) Vinification effects on changes in volatile compounds of wine. *J. Food Sci.* **2**, 406-409.
- Herraiz, M., Reglero, G., Herraiz, T., Loyola, E. (1990) Analysis of wine distillates made from muscat grapes (Pisco) by multidimensional gas chromatography and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1540-1543.
- Kostik, V., Memeti, S., Bauer, B. (2013) Gas-chromatographic analysis of some volatile congeners in different types of strong alcoholic fruit spirits. *J. Hyg. Eng. Des.* **4**, 98-102.
- Krajnović, M. (2013) Utjecaj hlapljivih komponenti i metanola na senzorsku kvalitetu rakija proizvedenih od šljiva na tradicionalan i industrijski način. *Završni specijalistički rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.
- Lachenmeier, D., Haupt, S., Schulz, K. (2008) Defining maximum levels of higher alcohols in alcoholic beverages and surrogate alcohol products. *Regul. Toxicol. Pharm.* **50**, 313-321.
- Lučić, R. (1986) Proizvodnja jakih alkoholnih pića, Nolit, Beograd.
- Miličević, B. (2001) Utjecaj vinske sorte na aromu vinskih destilata. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.
- Mosedale J. R., Puech, J-L. (1998) Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Sci. & Tech.* **9**, 95-101.
- Mrvčić, J. (2016) Voćne, žitne i šećerne rakije, <www.pbf.hr>. Pristupljeno, 24. travnja 2016.
- Nykanen, L., Nykanen, I., Maarse, H. (1991) Distillated beverages. U: Volatile compounds in Food and Beverages (Maarse, H., ured.), Marcel Decker, New York, str. 547-580.
- OIV 1994, Metode analize alkoholnih pića i alkohola – modificirano.
- Orlić, S., Jeromel, A. (2010) Proizvodnja vina. U: Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji (Grba, S., ured.), Plejada, Zagreb, str. 141-162.

- Peña, R. M., Braciela, J., Herrero, C., Garcia Martin, S. (2008) Headspace solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry analysis of volatiles in orujo spirits from a defined geographical origin. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 2788-2794.
- Piggot, J. R., Macleod, A. (2010) Sensory quality control of distilled beverages. U: Sensory analysis for food and beverages quality control (Kilcast, D., ured.) Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 262-274.
- Popović, B., Nikićević, N., Gavrilović-Damnjanović, J., Mitrović, O., Srećković, M., Ogašanić, D. (2009) Uticaj momenta destilacije prevrelog kljuka šljive na kvalitet šljivovice. *Voćarstvo.* **43**, 107-118.
- Posavec, S. (2012) Polifenolni profil i antioksidativna aktivnost jakih alkoholnih pića proizvedenih na području Republike Hrvatske. *Diplomski rad.* Prehrambeno-biotehnoški fakultet u Zagrebu.
- Pravilnik o jakim alkoholnim pićima (2009) *Narodne novine* **61**, Zagreb.
- Pravilnik o vinu (1996) *Narodne novine* **96**, Zagreb.
- Regadon, J. A., Perez, F., Valdes, M. E., Demiguel, C., Ramirez, M. (1997) A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microb.* **3**, 247-254.
- Rodríguez Madrera, R., Hevia, A. G., Suárez Valles, B. (2013) Comparative study of two aging systems for cider brandy making. Changes in chemical composition. *Food Sci. Technol.* **54**, 513-520.
- Rodríguez Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., Cortés Diéguez, S. (2014) First approach to the analytical characterization of barrel-aged grape marc distillates using phenolic compounds and colour parameters. *Food Technol. Biotechnol.* **52**, 391-402.
- Rose, L.M. (1985) Distillation design in practice, Elsevier science publishing company, New York.
- Sahor, R. (1999) Proizvodnja proizvoda od vinskog destilata. *Interna skripta.* Zagreb.
- Singleton, V. L., Rosi, Jr. J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with photomolybdenic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* **16**, 144-158.
- Spaho, N. (2007) Efekti presijecanja toka destilacije sirovih destilata šljive na distribuciju viših alkohola i estera. *Doktorska disertacija.* Sarajevo.
- Stehlik-Tomas, V., Grba, S. (2010) Proizvodnja jakih alkoholnih pića. U: Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji (Grba, S., ured.) Plejada, Zagreb, str. 230-252.
- Tsakiris, A., Kallithraka, S., Kourkoutas, Y. (2014) Grape brandy production, composition, and sensory evaluation. *J. Sci. Food Agr.* **94**, 404-414.

Van Jaarsveld, F. P., Hattingh, S. (2012) Rapid induction of ageing character in brandy products. Aging and general overview. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **33**, 225-252.

Van Jaarsveld, F. P., Hattingh, S., Minnaar, P. (2009) Rapid induction of ageing character in brandy products. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **30**, 24-37.

Versini, G., Franco, M. A., Moser, S., Barchetti, P., Manca, G. (2009) Characterization of apple distillates from native varieties of Sardinia island and comparison with other Italian products. *Food Chem.* **113**, 1176-1183.

Winterova, R., Mikulíková, R., Mazáč, J., Havalec, P. (2008) Assessment of the authenticity of fruit spirits by gas chromatography and stable isotope ratio analyses. *Czech J. Food Sci.* **26**, 368-375.