

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Maja Malnar

630/ PI

KVALITETA RAKIJE
ŠLJIVOVICE PROIZVEDENE OD
NOVE SORTE ŠLJIVE TOP KING

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 Karle Hanousek Čiča, mag.ing.biotechn.

Zahvaljujem se izv.prof.dr.sc. Jasni Mrvčić na pruženoj prilici i predloženoj temi diplomskog rada.

Zahvaljujem se mag.ing.biotechn. Karli Hanousek Čiča i dipl.ing. Steli Križanović na vodstvu kroz izradu eksperimentalnog dijela i pomoć pri pisanju rada.

Zahvaljujem se također i doc.dr.sc. Leu Gracin na pomoći oko eksperimentalnog dijela rada.

Kolegici Nevenki Banović zahvaljujem se na svemu i nadam se nastavku kao dokazana dobitna kombinacija.

Roditeljima, dečku i prijateljima dugujem jedno veliko hvala na podršci i vjerovanju u mene, uljepšali ste mi sva iskustva kroz cijeli studij i bez vas sve ove godina ne bi bile tako lijepo razdoblje.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

KVALITETA RAKIJE ŠLJIVOVICE PROIZVEDENE OD NOVE SORTE ŠLJIVE TOP KING

Maja Malnar, 630/PI

Sažetak: Šljiva (lat. *Prunus domestica*) je voće koje se najviše upotrebljava za proizvodnju rakije u Republici Hrvatskoj. Cilj ovoga rada bio je proizvodnja i usporedba rakije šljivovice od dvije vrste šljiva, najčešće upotrebljavane sorte Bistrice i nove sorte Top King, spontanom i dirigiranom alkoholnom fermentacijom pri 30°C, analizirati hlapljive spojeve u prefermentiranim kominama i proizvedenim destilatima te na temelju dobivenih rezultata odrediti razliku u kvaliteti istih. Destilacija je provedena u šaržnom laboratorijskom kotlu uz presijecanje frakcija u kojima su određivane koncentracije 15 hlapljivih spojeva sekundarne arome primjenom plinskog kromatografa s plamenoionizacijskim detektorom (GC-FID). Veći prinos alkohola ostvaren je u spontano i dirigirano prefermentiranim kominama šljive Bistrice u odnosu na prefermentirane komine šljive Top King. S druge strane s obzirom na izmjerenu koncentraciju estera, koji doprinose ugodnom mirisu i okusu dobivenih rakija, kvalitetniji destilati su proizvedeni iz prefermentiranih komina šljive Top King.

Ključne riječi: šljivovica, Bistrice, Top King, spojevi arome, destilati

Rad sadrži: 66 stranica, 28 slika, 10 tablica, 41 literaturnih navoda, 3 priloga

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: *Karla Hanousek Čiča, mag.ing.biotechn.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Branka Levaj*
2. Izv.prof.dr.sc. *Jasna Mrvčić*
3. Izv.prof.dr.sc. *Damir Stanzer*
4. Doc.dr.sc. *Leo Gracin* (zamjena)

Datum obrane: 22. 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

QUALITY OF PLUM SPIRIT PRODUCED OF NEW PLUM VARIETY TOP KING

Maja Malnar, 630/PI

Abstract: Plums (lat. *Prunus domestica*) are a fruit which is mainly used for spirits production in Croatia. The aim of this work was production and comparison of plum spirits from two plum varieties, the most commonly used Bistrica and a new variety Top King, by spontaneous and controlled alcohol fermentation at 30°C. Furthermore, the aim was the analysis of volatile compounds in prefermented marc and produced distillates and determining the difference of distillates quality. The distillation process was performed in a batch laboratory bioreactor with separation of fractions which were analyzed for 15 volatile compounds of secondary aroma by using a gas chromatography with a flame-ionizing detector (GC-FID). A higher alcohol yield was reported in the spontaneous and controlled prefermented mercs of the Bistrica plum compared to the Top King prefermented mercs. On the other hand, based on the measured ester concentration, a class of compounds that are important for the pleasant smell and taste of the produced spirits, distillates of higher quality were produced from prefermented mercs of the Top King plum.

Keywords: plum spirit, Bistrica, Top King, aroma compounds, distillates

Thesis contains: 66 pages, 28 figures, 10 tables, 41 references, 3 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *Jasna Mrvčić*, Associate professor

Technical support and assistance: *Karla Hanousek Čiča*, mag.ing.biotechn.

Reviewers:

1. PhD. *Branka Levaj*, Full professor
2. PhD. *Jasna Mrvčić*, Associate professor
3. PhD. *Damir Stanzer*, Associate professor
4. PhD. *Leo Gracin*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 22. July 2016.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA	2
2.1.1. Voćne rakije	3
2.2. ŠLJIVOVIKA	4
2.2.1. Sirovina (šljiva)	4
2.2.1.1. <i>Sorta Bistrica</i>	5
2.2.1.2. <i>Sorta Top King</i>	6
2.2.2. Tehnološki postupak proizvodnje šljivovice	7
2.2.2.1. <i>Izbor i berba plodova šljive</i>	8
2.2.2.2. <i>Muljanje šljiva, gnječenje, usitnjavanje i odvajanje koštica</i>	8
2.2.2.3. <i>Alkoholna fermentacija (vrenje) komine šljiva</i>	8
2.2.2.4. <i>Destilacija prefermentirane komine</i>	10
2.2.2.5. <i>Odležavanje, dozrijevanje i završna izrada šljivovice</i>	11
2.2.3. Spojevi arome u šljivovici	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Sirovina	13
3.1.2. Radni mikroorganizam	13
3.1.2. Kemikalije	13
3.1.3. Otopine	14
3.1.4. Aparatura	14
3.2. METODE RADA	15
3.2.1. Postupak proizvodnje šljivovice	15
3.2.1.1. <i>Priprema alkoholne fermentacije</i>	15
3.2.1.2. <i>Alkohola fermentacija</i>	16
3.2.1.3. <i>Destilacija</i>	16
3.2.1.4. <i>Stabilizacija destilata</i>	18
3.2.2. Analitičke metode.....	19
3.2.2.1. <i>Određivanje koncentracije šećera metodom po Luff-Schoorlu</i>	19
3.2.2.2. <i>Određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin-Dietrichu</i>	21
3.2.2.3. <i>Plinska kromatografija</i>	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. TIJEK ALKOHOLNE FERMENTACIJE.....	25
4.2. ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA PRISUTNIH U PREFERMENTIRANIM KOMINAMA ŠLJIVA I DESTILATIMA	30

4.2.1. Hlapljivi spojevi arome prisutni u prefermentiranim kominama šljiva	31
4.2.1.1. <i>Alkoholi</i>	34
4.2.1.2. <i>Esteri</i>	36
4.2.1.3. <i>Karbonilni spojevi</i>	36
4.2.2. Hlapljivi spojevi arome prisutni u destilatima	37
4.2.2.1. <i>Alkoholi</i>	38
4.2.2.2. <i>Esteri</i>	47
4.2.2.3. <i>Karbonilni spojevi</i>	57
5. ZAKLJUČCI	62
6. LITERATURA	63
7. PRILOZI	67

1. UVOD

Jaka alkoholna pića (JAP) su pića u kojima je glavni i osnovni sastojak alkohol (etanol) čiji postotak iznosi najmanje 15% vol. alkohola (Pravilnik, 2009). Prirodna jaka alkoholna pića spadaju među najkvalitetnije proizvode JAP-a, jer sadrže sve okusne i mirisne karakteristike sirovina iz kojih su proizvedena (Christofer i Bauer-Cristofer, 2007). U voćnim rakijama alkohol potječe od direktne destilacije prefermentiranih komina voća ili vina, a dobiveni destilat mora imati aromu i okus koji potječe od sirovine.

Šljiva je jedna od najrasprostranjenijih sorti voća i poznato je preko 2500 sorti. Sorte šljiva se dijele na tri skupine: stolne sorte, višenamjenske i rakijske sorte. U Hrvatskoj je najzastupljenija domaća Bistrice, no polako ju istiskuju novije, otpornije sorte kao što je Top King, Top First, Top Five, Top Star itd. Sirovine određuju primarnu aromu voćnim rakijama te zbog toga su od velike važnosti za cijeli proces proizvodnje.

Šljivovica je prirodno jako alkoholno piće koje se proizvodi najviše u europskim zemljama panonskog područja. Kvaliteta rakije najviše ovisi o vrsti i zrelosti šljive, načinu i vremenu berbe plodova, provođenju alkoholne fermentacije, čuvanju prefermentiranih komina do destilacije i o načinu destilacije (Grba, 2009). Slavonska šljivovica ima dugu tradiciju proizvodnje te nosi naziv hrvatskog autohtonog proizvoda. Tradicionalna šljivovica, destilat *Prunus domestica*, sadrži brojne spojeve te ju odlikuje raskošna aroma koju čini veliki broj kemijskih spojeva (razni esteri, viši alkoholi i karbonilni spojevi) koji se nalaze u relativno niskim koncentracijama, ali veoma doprinose kvaliteti i karakterizaciji pića. Iako je glavna komponenta alkohol aromi pridonosi veliki broj hlapljivih spojeva kao što su etil acetat, etil heksanoat, izoamil alkohol, izobutanol, feniletanol i razni drugi (Kostik i sur., 2013).

Cilj ovoga rada biti će proizvodnja i usporedba rakije šljivovice od dvije vrste šljiva, najčešće upotrebljavane sorte Bistrice i nove sorte Top King, spontanom i dirigiranom alkoholnom fermentacijom pri 30°C, analizirati hlapljive spojeve u prefermentiranim kominama i proizvedenim destilatima te na temelju dobivenih rezultata odrediti razliku u kvaliteti istih.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA

Prema Pravilniku (NN 61/09) jaka alkoholna pića namijenjena su ljudskoj uporabi, imaju posebna senzorska svojstva te sadrže minimalno 15% vol. alkohola. Mogu se podijeliti na destilirana pića i likere (slika 1). Dobivaju se alkoholnom fermentacijom iz biljnih sirovina koje sadrže šećer (grožđe i dr. voće), škrob (ječam, kukuruz, raž, krumpir) ili se priređuju miješanjem ekstrakata, esencija i vode s etilnim alkoholom (Kozina i Penavin, 2004).

Etilni alkohol koji se koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića i svih njihovih sastojaka mora biti poljoprivrednog podrijetla (Pravilnik, 2009). Alkohol u tim pićima je rafinirani alkohol dobiven destilacijom i rektifikacijom prefermentiranih komina sirovina koje sadrže šećere, a koje kvasci mogu previrati, kao i od prefermentiranih komina škrobnih sirovina kojima je škrob hidroliziran do fermentabilnih šećera (Anonymous 1). Alkoholna pića ne smiju sadržavati alkohol sintetičkog podrijetla niti neki drugi alkohol koji nije poljoprivrednog podrijetla (Pravilnik, 2009).

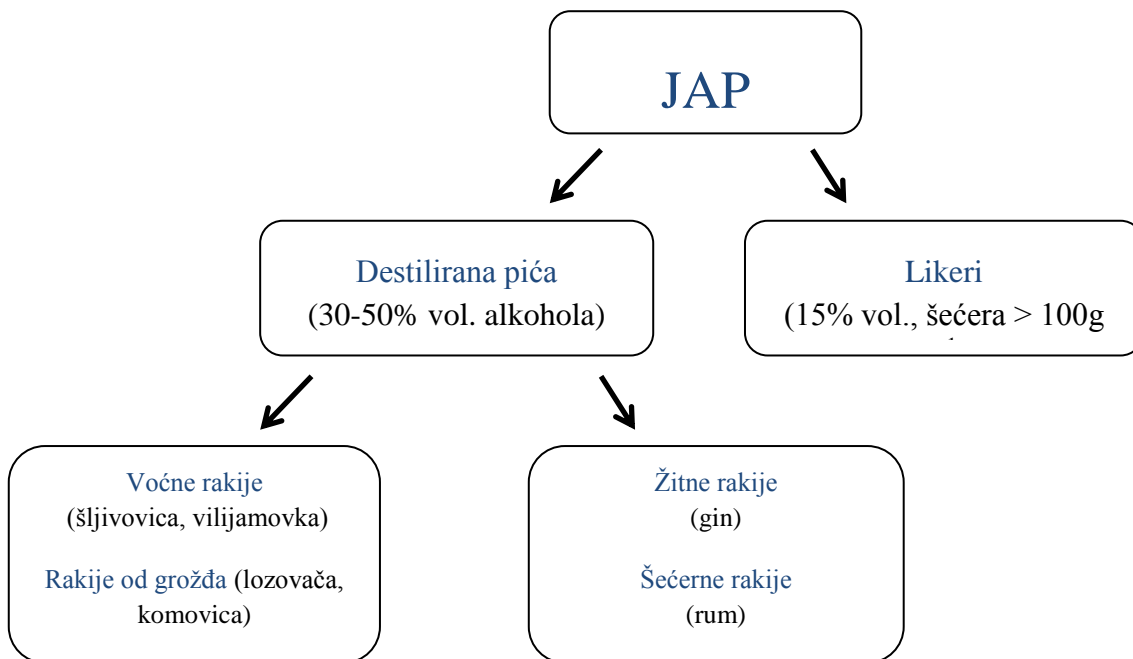
Jaka alkoholna pića (JAP) prema načinu proizvodnje, količini alkohola ili šećera u pićima ili s obzirom na njihovu kvalitetu razlikuju se na:

1. *Prirodna jaka alkoholna pića*- pića koja se proizvode destilacijom prefermentiranih šećernih komina, a karakterizirana su specifičnom aromom koja potječe od sirovina iz kojih su pića proizvedena. U proizvodnji tih pića nije dozvoljena uporaba šećera, škrobnog sirupa ili sirovina na bazi škroba kao i dodavanje sirovog i rafiniranog etilnog alkohola, biljnih proizvoda koji su ekstrahirani rafiniranim etilnim alkoholom, umjetne boje i arome. Primjeri tih pića su šljivovica, konjak, viski, tekila itd.

2. *Umjetna jaka alkoholna pića*- proizvode se maceracijom sirovina u alkoholu, destilacijom prefermentiranih voćnih sokova, aromatskih supstanci. Ta pića sadrže sve arome sirovina iz kojih su proizvedena i to u oplemenjenom obliku jer ne sadrže razne nekorisne supstance. Pošto se sirovine maceriraju u rafiniranom alkoholu, ne sadrže ni aldehide ni patočna ulja. U ovu grupu pića spada poznati maraskino destilat koji se dobiva destilacijom macerata ploda višnje Maraske.

3. *Aromatska vina*- ova pića se proizvode maceracijom dodataka (pelin, limun i sl.) u vinima sa ili bez dodatka šećera. Odnos osnovnog vina i dodataka treba biti najmanje 75%:25% u korist osnovnog vina. Obzirom na sadržaj šećera aromatizirana vina mogu biti suha (manje od 50 g L⁻¹ invertnog šećera), polusuha (50–90 g L⁻¹ invertnog šećera), poluslatka (90–130 g L⁻¹

invertnog šećera) te slatka (više od 130 g L⁻¹ invertnog šećera). U ovu grupu pića spadaju vermut, bermet te gorki likeri (Amaro) (Grba, 2009).



Slika 1. Podjela jakih alkoholnih pića (Mrvčić, 2016).

2.1.1. Voćne rakije

Voćne rakije su jaka alkoholna pića destilirana na manje od 86% vol. alkohola te imaju okus i miris destilirane sirovine (Pravilnik, 2009).

Proizvode se destilacijom iz prefermentirane komine voća ubranog u tehnološkoj zrelosti (Mrvčić, 2016). Rakija se može proizvoditi od svih voćnih vrsta koje sadrže šećer iz kojeg se u tijeku alkoholne fermentacije sintetizira alkohol te drugi spojevi koji doprinose aromi proizvoda (esteri, viši alkoholi). Najpogodnije voćne vrste za proizvodnju rakije su jezgričavo (jabuke i kruške) i koštičave vrste (šljive, trešnje, višnje, marelice i breskve).

Voće za proizvodnju rakije bere se u punoj tehnološkoj zrelosti jer u tom stadiju voće sadrži maksimalnu količinu šećera i najizraženiju sortnu aromu koja je veoma važna za svaku voćnu rakiju (Puškaš, 2011). Za proizvodnju voćnih rakija koristi se svježe ili suho voće koje ima dovoljno fermentabilnih šećera kako bi ih kvasac mogao previrati. Za preradu voća od najveće su važnosti tvari topive u vodi. U svakom je voću golem broj različitih organskih i

mineralnih sastojaka koje proizvedenoj rakiji daju karakteristična svojstva okusa, mirisa i arome (Banić, 2006).

Glavne faze tehnološkog postupka u proizvodnji voćnih rakija su usitnjavanje sirovine, priprema hranjivih podloga, odabir i priprema kvasca, alkoholna fermentacija, destilacija te dozrijevanje ili starenje dobivene rakije. Najpoznatije voćne rakije u Hrvatskoj su lozovača, šljivovica, vilijamovka, jabukovača, višnjevača i sl.

2.2. ŠLJIVOVICA

2.2.1. Sirovina (šljiva)

Šljiva (lat. *Prunus domestica*) ima okrugli ili ovalni plod, meso ploda je slatko, žućkaste boje s košticom u sredini. Šljiva raste kao srednje veliko stablo, manje ili više bujna rasta. Karakterizira ju visok sadržaj dijetalnih vlakana i fenola koji se uglavnom sastoje od flavonola i derivata kafeinske kiseline (ovisno o sorti) koji imaju određene pozitivne učinke na zdravlje ljudi (Kristl i sur., 2011). Sastav šljive čini 80% voda i 20% suha tvar. Nutritivna vrijednost šljive prikazana je u tablici 1. Mogu se konzumirati sirove, mogu se sušiti, prave se džemovi, marmelade i peče se rakija (šljivovica) (Anonymous 2).

Šljiva je voće koje se najviše upotrebljava za proizvodnju rakije. Postoje različite sorte šljiva, a prosječan sadržaj ukupnog šećera kreće se od 10 do 15% ovisno o sorti (Uroš i Puškaš, 2014). Od šljiva s visokim sadržajem šećera dobiva se rakija s dobrim prinosom alkohola.

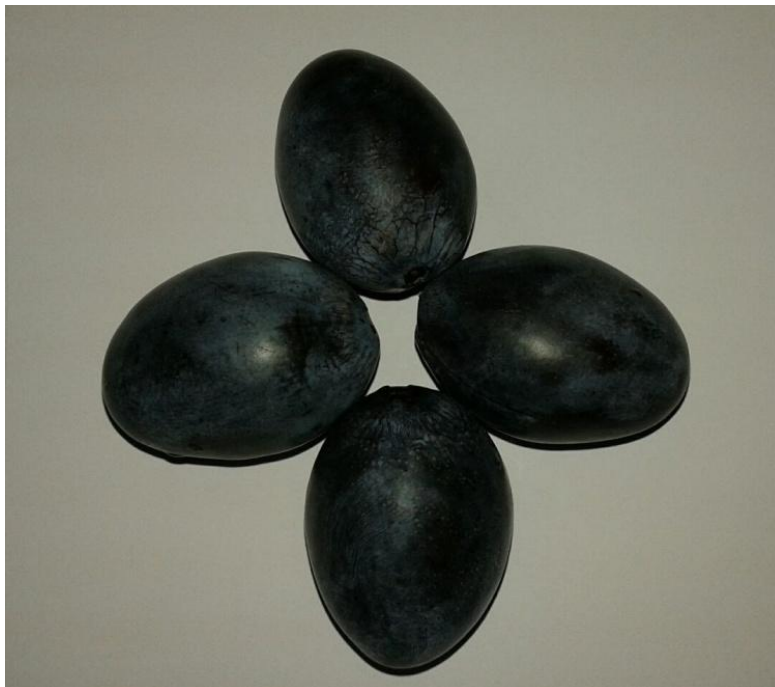
Tablica 1. Nutritivna vrijednost šljive na 100 g ploda (Galović, 2004).

Energetska vrijednost	57-70 Kcal
Bjelančevine	0,5-1,0%
Masti	0,1-0,2%
Ugljikohidrati	8,2-17,6%
Mineralne tvari	0,2-0,9%

Sve sorte šljiva se razlikuju po kvaliteti svojih plodova, obliku, boji, veličini, vremenu sazrijevanja, količini šećera, kiselina, pektinskih i drugih tvari. Na osnovu sastava ploda određuje se njihova kvaliteta (Banić, 2006).

2.2.1.1. *Sorta Bistrica*

Bistrica je hrvatska domaća sorta šljive nepoznatog podrijetla (slika 2). Kako ima više sinonima, u različitim proizvodnim područjima nazivaju je i Požegača, Mađarica, Bosanka, Debelica, Savka itd. Ubraja se u skupinu najboljih šljiva na svijetu, a zbog svoje kvalitete pogodna je za sve oblike prerade (Anonymous 3). Stablo je srednje bujno, u gušćem sklopu raste metlasto (Lučić, 1986). Plodovi su dosta sitni pa su i zbog toga vrlo pogodni za preradu u rakiju. Težina ploda je do 20 g. Veliki dio proizvodnje rakije od šljiva u Hrvatskoj je od sorte Bistrice (Družić i sur., 2007). Ta sorta daje plodove s dobrim odnosom šećera i kiselina te se od njih može dobiti rakija vrhunske kvalitete, vrlo ugodna okusa, posebne i izrazite arome. Plodovi u punoj zrelosti sadrže uobičajeno 10-12% ukupnog šećera, a mogu dostići i do 20% ukupnog šećera (Banić, 2006).



Slika 2. Šljive sorte Bistrica (vlastita fotografija).

2.2.1.2. Sorta Top King

Posljednjih godina mnoge šljivike kod nas i u regiji poharala je virusna bolest šljive (*Prunus virus 7*) ili šarka šljive. Bistrice je najrasprostranjenija sorta šljive, koja se uzgaja u Hrvatskoj, ali je dosta osjetljiva na šarku. Za intenzivan uzgoj sve se više preporučuju nove sorte poput Top King (slika 3). Sorta Top King dobivena je križanjem sorte Čačanska najbolja i Italian prune. To je nešto bujnija sorta od Bistrice, ali karakteristika je da ima izrazito visoku rodnost, bolje se skladišti, manje je osjetljiva na transport i pogodna je za sušenje kao i za konzumaciju u svježem stanju. Plod je srednje veličine oko 35-40 g, tamno plave boje sa maškom na površini. Meso je ploda svijetlo žute boje, čvrsto, sočno i lako se odvaja od koštice (Anonymous 4). Koncentracija šećera u plodu je oko 20-22%. Također pokazalo se da je ta nova sorta pogodna za uzgoj u gustom sklopu i da je iznimno tolerantna na virus šarke šljive zbog čega se počinje sve više uzgajati (Voća i sur., 2009).



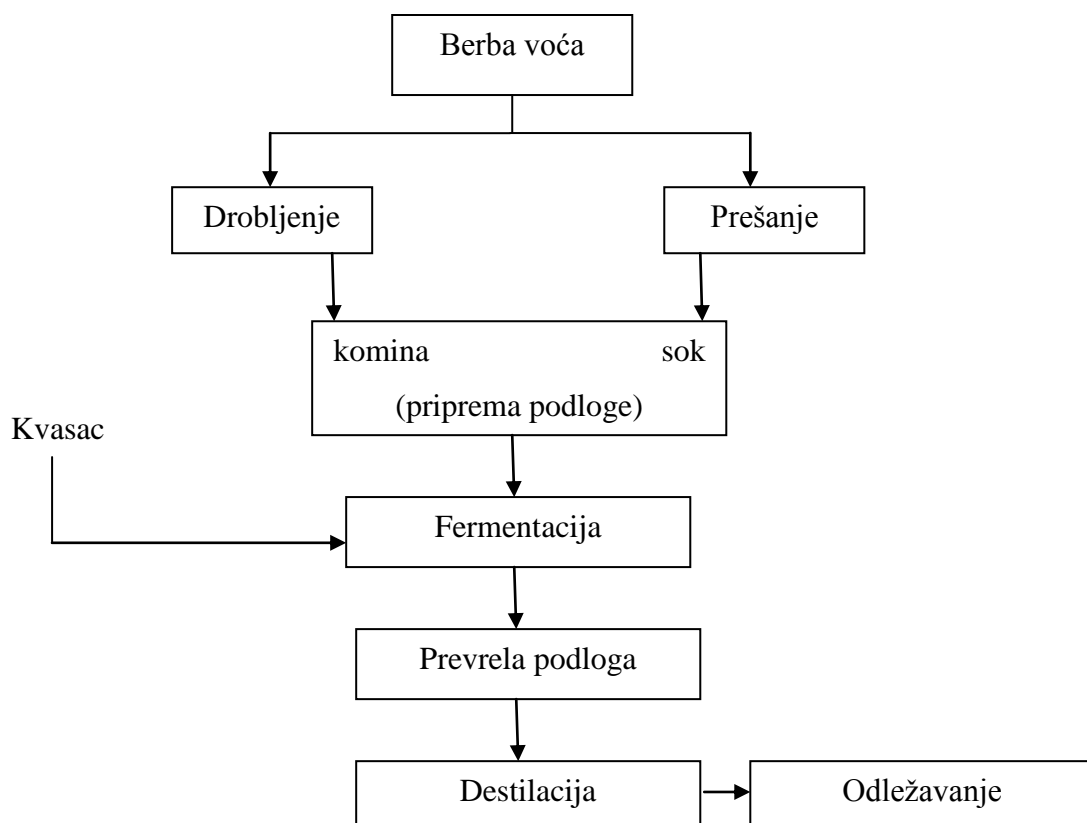
Slika 3. Šljive sorte Top King (vlastita fotografija).

2.2.2. Tehnološki postupak proizvodnje šljivovice

Zemlje srednje i istočne Europe imaju dugu tradiciju u proizvodnji rakije od šljiva. Zbog različitih metoda proizvodnje, posebice procesa fermentacije i destilacije, razlike u konačnim proizvodima variraju od regije do regije (Sádecká i sur., 2015).

Priprema i fermentacija sirovine, proces destilacije i odležavanje (dozrijevanje) su bitni faktori koji utječu na dobivanje voćne rakije (Rusu Coldea i sur., 2011). Tehnologija prerade šljiva u rakiju uključuje sljedeće operacije (slika 4):

- Izbor i berba plodova
- Muljanje šljiva, gnječenje, usitnjavanje i odvajanje koštica
- Alkoholna fermentacija (vrenje) komine šljiva
- Destilacija prefermentirane komine
- Odležavanje, dozrijevanje i završna izrada šljivovice



Slika 4. Osnovna shema proizvodnje voćnih rakija (Grba, 2009).

2.2.2.1. Izbor i berba plodova šljive

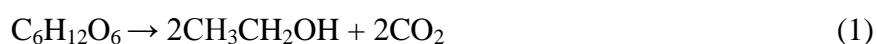
Za pravilno vođenje tehnološkog procesa potrebni su zreli i zdravi plodovi šljive. Plodovi se beru u fazi kada dostignu tehnološku zrelost, jer je tada najpovoljniji odnos šećera i kiselina, iako je od značaja i odnos između ukupne količine šećera i saharoze (Lučić, 1986.). Zrelost hrvatskih autohtonih sorti se prepoznaje po mirisu plodova koji poprima specifičnu primarnu aromu i po boji svojstvenoj za pojedinu vrstu zrelog ploda (Galović, 2004). Šljive se beru ručno ili pomoću posebnih uređaja koji rade na mehaničkom ili hidrauličkom načelu (tresilice). Potrebno je ukloniti ostatke lišća, peteljki i grančica jer mogu umanjiti kvalitetu gotovog proizvoda i uzrokovati nepoželjan okus (Banić, 2006).

2.2.2.2. Muljanje šljiva, gnječenje, usitnjavanje i odvajanje koštica

Usitnjavanje voća je obavezna mehanička radnja. Ako se plodovi šljive cijeli koriste za proces alkoholne fermentacije, tada će proces biti spor, posebno ako su plodovi tvrdi i čvrsti. Usitnjeno voće lakše otpušta arome i šećer, alkoholna fermentacija počinje ranije i završava u kraćem vremenu uz veći prinos alkohola. Plodovi se usitnjavaju u mlinovima za voće, a muljanje se može obaviti i muljačom s valjcima. Preporuča se da se koštice u potpunosti uklone iz komine, u suprotnom treba paziti da ne bude izdrobljeno više od 5% koštica od ukupne količine jer će se inače u rakiji stvoriti veća količina opasne i otrovne cijanovodične kiseline, koja rakiji daje okus i gorak miris po košticama. Zbog toga je potrebno ukloniti koštice iz komine, ali prije same destilacije moguće je dodati malu količinu cijelih koštica kako bi se dobila šljivovica karakteristične arome (Banić, 2006).

2.2.2.3. Alkoholna fermentacija (vrenje) komine šljiva

Alkoholna fermentacija (vrenje) je anaeroban, biokemijski proces transformacije monosaharida (glukoza, fruktoza) u alkohol i ugljični dioksid pomoću kvasca kako je prikazano sljedećom jednačbom (1):



Napretkom alkoholne fermentacije sintetizirani alkohol onemogućava rast većini bakterijskih vrsta. Ugljični dioksid koji se nakuplja na površini komine također onemogućava razmnožavanje većini mikroorganizama osiguravajući dominantnost kvasca (Grba, 2009). Kvalitativni i kvantitativni sastav mikroflore tijekom fermentacije voćne komine uglavnom

ovisi o sljedećim faktorima: podrijetlu voća, postupku proizvodnje, vrsti proizvedenog pića, početnoj koncentraciji stanica, temperaturi, pH i koncentraciji etanola. U ranoj fazi alkoholne fermentacije ne dominiraju *Saccharomyces* vrste, nego posebice vrste drugih rodova kao što su *Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum* (50-75% ukupnog broja kvasaca) i *Candida*, posebice *C. stellata* i *C. pulcherrima*.. Kada koncentracija alkohola dosegne 4-6% vol. vrste kvasaca iz roda *Saccharomyces*, posebice *S. cerevisiae*, dovršavaju alkoholnu fermentaciju (Grba, 2009).

Kvasci su jednostanični mikroorganizmi koji provode proces fermentacije, pretvaraju šećer u komini u alkohol te sintetiziraju potrebne tvari arome i ostale spojeve koji daju dobar ukus i miris destilatu. Voćna komina je odličan medij jer sadrži sve tvari koje su potrebne za razvoj mikroorganizama. Kvasci iz roda *Saccharomyces* su najstariji komercijalni upotrebljavani mikroorganizmi i vrlo se često upotrebljavaju u proizvodnji pića. Najpoznatiji kvasac iz roda *Saccharomyces* je vrsta *S. cerevisiae* zbog visoke fermentacijske aktivnosti i dobrog podnošenja različitih ekstremnih uvjeta okoline, prisutnih u industrijskim pogonima (Grba, 2009). Na površini plodova šljiva prisutno je mnoštvo spontane mikroflore koja je odgovorna za provođenje procesa fermentacije (Fleet, 2003). No, radi boljeg iskorištenja komina se inokulira komercijalnim kvascem. Na taj način proces alkoholne fermentacije se odvija u kontroliranim uvjetima (dirigirana fermentacija).

Odvijanjem fermentacije podešavaju se uvjeti u kojima se ona odvija. Trajanje alkoholne fermentacije komine od šljiva ovisi o puno čimbenika od kojih su najznačajniji sljedeći: temperatura, koncentracija šećera u plodu, način provođenja procesa (zatvoren ili otvoren fermentor) (Banić, 2006). Kvascima najbolje odgovara temperatura od 25-30°C i pH između 4-5 (Galović, 2004). Optimalna temperatura za početak alkoholne fermentacije je 20-22°C (Lučić, 1986). Fermentacija šljiva pri temperaturi od 15-20°C traje oko 4-5 tjedana, a pri temperaturi od 25°C, 6-10 dana. Kraj fermentacije se može točno odrediti praćenjem količine šećera u komini analitičkim metodama te se smatra završenom ako je postotak šećera ispod 0,3% (Anonymous 1).

Tijekom fermentacije dolazi do ekstrakcije različitih tvari iz dijelova ploda, ali i do biosinteze različitih organskih spojeva (organske kiseline, viši i niži alkoholi, aldehidi, esteri i dr.) (Grba, 2009).

2.2.2.4. Destilacija prefermentirane komine

Razne primjese u destilatu, njihova količina i međusoban odnos imaju presudni značaj za kvalitetu i svojstva pića. Svi isparljivi sastojci nisu jednako vrijedni za kvalitetu voćne rakije. Prisutnost nekih sastojaka u rakiji je poželjno, a drugih nije. Veliko je umijeće pravilno voditi destilaciju i dobiti rakiju čistog mirisa na voćnu vrstu od koje potiče, harmoničnu po ukusu i potpuno bistru (Jović, 2006).

Nakon završetka alkoholne fermentacije prefermentirana komina šljiva prebacuje se u kotlove za destilaciju. Proces destilacije je potrebno provesti odmah nakon završene fermentacije ili najkasnije 2-3 tjedna nakon fermentacije kako bi se spriječilo djelovanje plijesni i bakterija koje uzrokuju kvarenje komine (Grba, 2009). Destilacija je postupak u kojem se zagrijavanjem tekuća faza prevodi u plinovitu i zatim se ta plinovita faza kondenzira odnosno ukapljuje. Time je omogućeno razdvajanje tekuće smjese hlapljivih komponenata na relativno čiste komponente. Razdvajanje se zasniva na različitim vrelištima etanola (78,3°C) i vode (100°C), odnosno različitim vrelištima drugih spojeva arome prisutnih u prefermentiranoj komini (Banić, 2006). Tijekom destilacije odvijaju se različite kemijske reakcije koje definiraju konačnu kvalitetu proizvoda. Jačina destilata zavisi o sadržaju alkohola u voćnoj komini, konstrukciji uređaja za destilaciju i vrsti voća. Destilat u početku dostiže jačinu 50-60 %vol. alkohola, a zatim jačina slabi. Postupak destilacije može se provoditi kontinuirano, diskontinuirano ili frakcijskom destilacijom (Guymon, 2009). Diskontinuirana destilacija prefermentirane komine šljiva može se provoditi jednokratno i dvokratno.

Jednokratna destilacija je tradicionalni postupak u kojemu se dobiju tri toka: prvijenac (bašica), srce i patoka (plavić). Prvijenac se sastoji od hlapljivih štetnih komponenata koje zajedno sa esterima isparavaju na niskim temperaturama sve do 64,7°C. Sadrži vrlo visoki udio alkohola, i do 75% te nije za upotrebu i odstranjuje se. Drugi tok ili srce je srednji destilat i njegova kvaliteta karakterizira gotov proizvod. Hvata se na temperaturi oko 78°C i kao rezultat je rakija jačine 35-38% vol. alkohola, a pri kušanju mora imati miris i okus odgovarajući za vrstu voća ili sorte koji se koristio u tehnološkom procesu proizvodnje rakije. Patoka (treći tok) se destilira nakon srednje frakcije dok jačina na izlasku ne sadrži manji udio od 2-3% vol. alkohola. Sastoji se od viših alkohola čija destilacija započinje na oko 96°C, pa sve do 118°C, kada počinje destilacija octene kiseline. Sadrži oko 5% vol. alkohol (Galović, 2004).

Dvokratnom destilacijom dobije se bolja kvaliteta rakije od šljiva. Prva faza je destilacija prefermentirane komine sa ili bez odvajanja prvijenca, kako bi se koncentrirao etanol i odvojili kruti sastojci. U drugoj fazi destilacija sirovog destilata odvaja se na tri toka kao i u procesu jednokratne destilacije, također s ciljem koncentriranja etanola i pročišćavanja destilata (Mrvčić, 2016). Postupak destilacije mora teći polako kako bi se sve frakcije mogle odvojiti i postići intenzivna aroma (Galović, 2004).

2.2.2.5. Odležavanje, dozrijevanje i završna izrada šljivovice

Nakon destilacije, šljivovica odležava određeno vrijeme (proces dozrijevanja). Tijekom procesa dozrijevanja dolazi do esterifikacije viših alkohola, pri čemu nastaju poželjne arome. Na taj način destilat postaje blažim i okusom ugodniji. Što je proces dozrijevanja dulji, to će kvaliteta dobivene rakije biti bolja (Banić, 2006). Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) slavonska šljivovica odležava u bačvama od slavonske hrastovine minimalno 18 mjeseci pri čemu se razvija karakteristična aroma i boja. Bačve se u pravilu ne pune do vrha nego se ostavlja 2-5% volumena bačve praznim radi oksidacijsko-redukcijskih procesa sazrijevanja i starenja destilata. Napunjene i zatvorene bačve se čuvaju u prostorijama stabilne temperature od 16-20°C i vlažnosti zraka oko 75% (Galović, 2004).

2.2.3. Spojevi arome u šljivovici

Pod utjecajem kvasca *S. cerevisiae* te drugih mikroorganizama koji metaboliziraju ugljikohidrate, masne kiseline, aminokiseline i druge spojeve prisutne u sirovini fermentacijom nastaje mnogo različitih spojeva. Glavni spoj nastao metabolizmom ugljikohidrata je etanol, a uz njega značajni su i esteri, viši alkoholi, aldehidi, ketoni i organske kiseline (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Spojevi arome su odgovorni za kvalitetu dobivenih jakih alkoholnih pića. Mogu se svrstati u četiri skupine (Miličević i sur., 2012):

1. Primarni spojevi arome (koji se pojavljuju za vrijeme zrenja ploda)
2. Sekundarni spojevi arome (nastaju tijekom alkoholne fermentacije)
3. Tercijarni spojevi arome (formirane tijekom destilacijskog postupaka)
4. Kvaterni spojevi arome (nastaju tijekom procesa sazrijevanja)

Koncentracije tih spojeva ovise o podrijetlu supstrata te kvascima koji sudjeluju u procesu alkoholne fermentacije. Tijekom procesa destilacije aromatski spojevi prisutni u komini šljiva zbog različitih temperatura vrelišta se izdvajaju u određenim tokovima. Najčešće prisutni spojevi u rakiji šljivovici su:

Etanol- poželjna komponenta u rakiji, glavni produkt alkoholne fermentacije. Tijekom destilacije izdvaja se na kraju prvog toka, vrelišta 78°C (Galović, 2004). Na početku destilacije prisutan je u većoj koncentraciji, a kasnije mu se koncentracija smanjuje (Lučić, 1986). Prema Pravilniku (NN 61/09) destilat slavonske šljivovice sadrži od 37,5-42,5% vol. alkohola.

Esteri- kemijski spojevi koji nastaju tijekom ukomljavanja i zrenja šljivovice. Esteri su spojevi nastali reakcijom između karboksilne skupine organske kiseline i hidroksilne skupine alkohola ili fenola (Tsakiris i sur., 2014). Esteri rakiji daju specifičnu aromu. Prilikom destilacije isparavaju na nižoj temperaturi od etanola te su odgovorni za osjet mirisa i okusa istovremeno (Galović, 2004).

Metanol- nastaje tijekom fermentacije hidrolizom metoksi grupa u pektinskim spojevima koje sadrži voće. Smatra se štetnom kemijskom tvari. Najčešće je prisutan u malim količinama, ali to ipak ovisi o sirovini i načinu prerade. Iako je poželjno da se izdvoji u prvijencu moguća je prisutnost i u ostalim tokovima dobivenima tijekom procesa destilacije. Destilat slavonske šljivovice treba sadržavati maksimalno 1200 g metanola po hektolitr 100% vol. alkohola (Pravilnik, 2009).

Aldehidi- smatraju se nositeljima neugodnoga mirisa, a nastaju tijekom fermentacije komine šljiva. Tijekom procesa destilacije isparavaju prvi, prije bilo kojega drugoga kemijskoga spoja.

Patočno ulje- točan sastav se mijenja i ovisan je o vrsti sirovine koja se fermentira. Sastoji se uglavnom od viših alkohola koji nastaju fermentacijom ali ne od glukoze već od određenih aminokiselina u procesu razgradnje proteina. Oštar bockajući miris i paljenje u grlu prilikom konzumacije proizvoda dokaz je da u dovoljnoj mjeri nisu izdvojeni destilacijom viši alkoholi, čija destilacija započinje na oko 96°C (Galović, 2004).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovina

U ovome radu kao sirovina za proizvodnju šljivovice korištene su dvije sorte šljiva, sorte Bistrice i Top King, uzgojene i ubrane 2015. u voćnjaku Hrvatskog centra za poljoprivredu, hranu i selo, Donja Zelina.

3.1.2. Radni mikroorganizam

Pri izradi diplomskog rada kao radni mikroorganizam za dirigiranu fermentaciju korišten je suhi aktivni kvasac *Saccharomyces cerevisiae* BM-45 komercijalnog naziva Vrelko proizvođača Danstar Ferment A.G.

3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene u eksperimentalnom djelu su:

- 35-36% klorovodična kiselina (HCl) p.a., Ficher Chemical, UK
- octena kiselina min. 96% (CH₃COOH) p.a., Carlo Erba Reagentes, Francuska
- kalijev ferocijanodom (K₄(Fe(CN)₆) x 3 H₂O) p.a., Kemika
- cinkov sulfat pentahidrat (ZnSO₄ x 5 H₂O) p.a., Gram-Mol, Hrvatska
- bakrov (II) sulfat pentahidrat (CuSO₄ x 5 H₂O) p.a., Alkaloid, Makedonija
- limunska kiselina (C₆H₈O₇) p.a., Gram-Mol, Hrvatska
- bezvodni natrijev karbonat (Na₂CO₃) p.a., Gram-Mol, Hrvatska
- kalijev jodid (KI) p.a., Gram-Mol, Hrvatska
- sumporna kiselina (H₂SO₄) p.a., Ficher Chemical, UK
- škrob, p.a., Kemika, Hrvatska
- kalijev hidroksid (KOH) p.a., T.T.T. , Hrvatska
- natrijev hidroksid (NaOH) p.a., Kemika, Hrvatska
- kalijev bikromat (BaCrO₄) p.a., Kemika, Hrvatska
- natrijev tiosulfat (Na₂S₂O₃) p.a., Kefo, Hrvatska
- fenoftalein, p.a., Kemika, Hrvatska
- destilirana voda, PBF, Hrvatska

3.1.3. Otopine

Otopine korištene u eksperimentalnom dijelu rada i njihova priprema navedena je u Prilogu I.

3.1.4. Aparatura

Popis aparature korištene u izradi ovoga rada prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Popis aparature korištene u izradi eksperimentalnog dijela rada.

Uređaj/ stroj	Proizvođač
Analitička vaga	Kern KB
Šaržni destilacijski kotao	Fresl obrt
Vodena kupelj	Memmert
Plinski kromatograf (GC) s plamenoionizacijskim detektorom (FID)	Hewlett - Packard HP 5890
Aparatura Martin-Dietrichu (za određivanje alkohole)	Staklena aparatura
Aparatura po Luff-Schoorlu (za određivanje šećera)	Staklena aparatura
Termostat (GC)	Ikom
HSS bočice (20 mL)	Restek Bellefonte
Čepovi za HSS bočice	Restek Bellefonte
Laboratorijsko posuđe (tikvice od 10,25,50 mL, čepovi za tikvice, pipete, mikropipete)	
HSS uzorkivač	Hewlett-Packard HP 7694

3.2. METODE RADA

3.2.1. Postupak proizvodnje šljivovice

Proizvodnja šljivovice sastoji se od sljedećih faza:

1. Priprema alkoholne fermentacije
2. Alkoholna fermentacija
3. Proces destilacije
4. Stabilizacija destilata

3.2.1.1. Priprema alkoholne fermentacije

Prvi postupak u proizvodnji šljivovice je priprema sirovine. Budući da u prosincu nije sezona branja voća, korištene su šljive dugotrajno skladištene u hladnjači na temperaturi od -20°C . Četiri Erlenmeyerove tikvice od 2 L napunjene su sa 2 kilograma odmrznutih i usitnjenih šljiva (s košticama). Dvije tikvice sadržavale su sortu šljive Bistrice, a druge dvije sortu Top King.

Za provedbu dirigitirane alkoholne fermentacije za obje sorte šljiva, izvršena je inokulacija suhim aktivnim kvascem *S. cerevisiae*, u koncentraciji $0,2\text{ g L}^{-1}$ voća. Tikvice su zatvorene vrelnjačama kako bi CO_2 koji nastaje tijekom fermentacije izlazio van te osigurali anaerobni uvjeti (slika 5).



Slika 5. Erlenmeyerova tikvica sa vrelnjačom (Top King, dirigitirana fermentacija, 30°C)
(vlastita fotografija).

3.2.1.2. *Alkohola fermentacija*

Proces alkoholne fermentacije provodio se spontano (djelovanjem prirodno prisutne mikroflore na plodu šljiva) i dirigirano (inokulacijom suhog aktivnog kvasca *S. cerevisiae*) u termostatu na temperaturi od 30°C za obje sorte, Bisticu i Top King. Ta je vrijednost optimalna temperatura za metaboličku aktivnost kvasca. Proces je završen kada koncentracija šećera padne na $\approx 0 \text{ g L}^{-1}$, odnosno kada se udio alkohola znatno ne mijenja.

3.2.1.3. *Destilacija*

Postupak destilacije spontano i dirigirano prefermentiranih komina šljiva sorte Bistrice i Top King provodio se u šaržnom laboratorijskom kotlu za destilaciju (slika 6).



Slika 6. Laboratorijski šaržni kotao za destilaciju (vlastita fotografija).

Destilacije su započete u ohlađenom bakrenom destilacijskom kotlu (volumena 5 L) na sobnoj temperaturi, uz polagano podizanje temperature, što je osiguralo pravilan i ujednačen mlaz destilata. Na taj način se poželjnim aromama osigurava dovoljno vremena za isparavanje, a ukapljenom destilatu da iz hladila izlazi u obliku pravilnog, ujednačenog, tankog mlaza. Šljivovica je dobivena jednokratnom destilacijom. Destilacija je vođena u tri glavna toka: prvi tok (prvijenac), drugi tok (srednji tok, srce) i treći tok (patoka). Destilati svakog toka hvatani su u dvije frakcije. Destilati prvog toka hvatani su u dvije frakcije ukupnog volumena 20 mL, što iznosi 1% vol. prefermentirane komine. Presijecanje druga dva toka provedeno je praćenjem udjelu alkohola pomoću denzimetrijskog alkoholometra. Drugi

tok se hvatao do izmjerenih ~ 40% alkohola na izlazu iz kotla, a treći ~ 30% alkohola. Destilacijom su dobiveni destilati čije su karakteristike navedene u tablicama 3-6.

Tablica 3. Destilati dobiveni destilacijom prefermentirane komine šljiva Bistrice (spontana fermentacija pri 30°C).

Podjela tokova	Podjela frakcija	Kratice	Jačina destilata (%)	Volumen destilata (mL)	Napomene
1. tok	1. frakcija	1T/1F	-	10	-
	2. frakcija	1T/2F	-	10	-
2. tok	1. frakcija	2T/1F	52	50	-
	2. frakcija	2T/2F	42	86	mutno
3. tok	1. frakcija	3T/1F	32	50	mutno
	2. frakcija	3T/2F	25	40	mutno

Tablica 4. Destilati dobiveni destilacijom prefermentirane komine šljiva Bistrice (dirigirana fermentacija pri 30°C).

Podjela tokova	Podjela frakcija	Kratice	Jačina destilata (%)	Volumen destilata (mL)	Napomene
1. tok	1. frakcija	1T/1F	-	10	-
	2. frakcija	1T/2F	-	10	-
2. tok	1. frakcija	2T/1F	54	50	-
	2. frakcija	2T/2F	44	84	-
3. tok	1. frakcija	3T/1F	34	50	-
	2. frakcija	3T/2F	25	84	-

Tablica 5. Destilati dobiveni destilacijom prefermentirane komine šljiva Top King (spontana fermentacija pri 30°C).

Podjela tokova	Podjela frakcija	Kratice	Jačina destilata (%)	Volumen destilata (mL)	Napomene
1. tok	1. frakcija	1T/1F	-	10	-
	2. frakcija	1T/2F	-	10	-
2. tok	1. frakcija	2T/1F	46	50	-
	2. frakcija	2T/2F	38	38	-
3. tok	1. frakcija	3T/1F	31	50	-
	2. frakcija	3T/2F	25	33	-

Tablica 6. Destilati dobiveni destilacijom prefermentirane komine šljiva Top King (dirigirana fermentacija pri 30°C).

Podjela tokova	Podjela frakcija	Kratice	Jačina destilata (%)	Volumen destilata (mL)	Napomene
1. tok	1. frakcija	1T/1F	-	10	-
	2. frakcija	1T/2F	-	10	-
2. tok	1. frakcija	2T/1F	45	50	-
	2. frakcija	2T/2F	38	40	-
3. tok	1. frakcija	3T/1F	32	50	-
	2. frakcija	3T/2F	25	50	mutno

3.2.1.4. Stabilizacija destilata

Destilati su prije daljnje analize plinskom kromatografijom radi stabilizacije arome čuvani 2 mjeseca u zatvorenim bočicama na sobnoj temperaturi.

3.2.2. Analitičke metode

3.2.2.1. *Određivanje koncentracije šećera metodom po Luff-Schoorlu*

Prije provođenja eksperimenta određena je koncentracija šećera u plodu šljive Bistrice i Top King. Svaki dan do završetka fermentacije uzimani su uzorci iz komine šljiva iz svake od 4 tikvice u kojima se provodila fermentacija za određivanje koncentracije šećera. Koncentracija šećera u plodovima i kominama šljiva određivana je metodom po Luff-Schoorlu (Trajković i sur., 1983). Metoda se temelji na oksidaciji direktno reducirajućih šećera, pri čemu se dvovalentni Cu iz Luff-ove otopine reducira u jednovalentni Cu. On se izlučuje kao Cu (I) oksid. Suvišak Cu u otopini H₂SO₄ određuje se titrimetrijski s natrijevim tiosulfatom (Na₂S₂O₃). Ispituje se i utrošak natrijeva tiosulfata za slijepu probu. Uz pomoć Priloga III iz razlike rezultata dviju titracija (slijepa proba i uzorka) očita se koncentracija šećera. Prije same analize uzorke je potrebno pripremiti.

Priprema uzorka ploda

Odvaže se 10 g usitnjenog i homogeniziranog uzorka ploda u Erlenmyerovu tikvicu od 250 mL, doda se 100 mL destilirane vode, promiješa se i grije na vodenoj kupelji 10-15 min. Ohlađeni sadržaj kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL, doda se 1-2 g CaCO₃, 5 mL Carrez I i 5 mL Carrez II otopine, nadopuni destiliranom vodom do oznake i promućka. Ostavit se 10 minuta da se istaloži, a nakon toga filtrira u Erlenmeyerovu tikvicu od 300 mL. Za određivanje koncentracije šećera uzima se 25 mL dobivenog filtrata.

Priprema uzorka komine

Uzorak komine razrijedi se tako da u 1 litri nema više od 8 g šećera (Prilog II). 25 mL uzorka odnosno razrijeđenog uzorka otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL, doda se 50 ml destilirane vode te 5 mL otopine Carrez I. Promućka se, doda se 5 ml otopine Carrez II. Ponovo se promućka, nadopuni destiliranom vodom do oznake, promućka i ostavi stajati 10 minuta nakon čega se filtrira. Za određivanje koncentracije šećera uzima se 25 mL filtrata.

Određivanje koncentracije šećera

U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 25 mL prethodno dobivenih filtrata i doda 50 mL destilirane vode. Tikvicu se drži u vodenoj kupelji temperature oko 70°C tako da sadržaj tikvice u roku 5 minuta postigne temperaturu 67-70°C. Kada sadržaj tikvice postigne

tu temperaturu doda se 5 ml 35-36% HCl. Nakon toga se sadržaj tikvice drži točno 5 minuta na temperaturi 67-70°C uz često protresivanje. Nakon inverzije sadržaj tikvice se u ledenoj kupelji brzo ohladi na 20°C, doda se nekoliko kapi (do 5 kapi) indikatora fenolftaleina i neutralizira s 30%-tnom otopinom KOH. Neutralizacija se provodi do pojave ružičaste boje. Nakon toga se brzo doda nekoliko kapi octene kiseline do nestanka obojenja. Odmjerna tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake i protrese. Za daljnju analizu uzima se 25 mL ove invertirane otopine koja se doda u tikvicu od 300 mL (okrugla tikvica s ravnim dnom i ubrušenim grlom) u koju je prethodno otpipetirano 25 mL Luff-ove otopine. Tikvicu se brzo stavi na tronožac s azbestnom mrežicom i tikvica se spoji na povratno hladilo. Uz jaki plamen zagrijava se do vrenja do kojeg bi trebalo doći u roku 2 minute. Vrenje traje točno 10 minuta, a zatim ohladi pod mlazom hladne vode. Nakon potpunog hlađenja doda se lagano uz potresivanje 25 mL 25%-tne otopine H₂SO₄. Tijekom dodavanja H₂SO₄ dolazi do oslobađanja CO₂ zbog čega se otopina pjenuje pa je potrebno polagano dodavati. Zatim se dodaje 10 mL 30%-tne otopine KI i 2 mL 1%-tne otopine škroba koji služi kao indikator (dodatkom H₂SO₄ otopina postaje svijetloplava, dodatkom KI žućkasta, a dodatkom škroba smeđa). Sadržaj tikvice se titrira sa 0,1 N otopinom natrijeva tiosulfata do promjene boje u svijetlokrem (boja puti) koja se treba zadržati 1 min. Ako se pri titraciji troši manje od 5 ml natrijevog tiosulfata znači da treba odabrati veće razrjeđenje. Za izračun je potrebno postupak ponoviti i za slijepu probu: otpipetira se 25 mL destilirane vode u okruglu tikvicu s ravnim dnom (300 mL) u koju je prethodno otpipetirano 25 mL Luff-ove otopine, a daljnji postupak je isti kao i za uzorak.

Račun:

Iz razlike utrošenog volumena (mL) natrijeva tiosulfata za titraciju slijepa probe i uzorka pomoću Prilog III očitava se masa (mg) prisutnog šećera te se koncentracija šećera računa prema formuli 1:

$$\text{Količina šećera (g L}^{-1}\text{)} = a * 0,16 * 4 * f \quad (1)$$

a- masa (mg) šećera očitana iz Priloga III

0,16- faktor za preračunavanje u g L⁻¹

f- faktor razrjeđenja (ako se početni uzorak razrjeđivao)

4- dodatni faktor razrjeđenja (25 mL u 100 mL)

3.2.2.2. *Određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin-Dietrichu*

Svaki dan do završetka fermentacije uzimani su uzorci iz komina šljiva za određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin-Dietrichu (Kretschmar, 1955). Alkohol se u prisutnosti sulfatne kiseline sa kalijevim bikromatom oksidira u octenu kiselinu. Oksidacija obično ne ide dalje jer je octena kiselina u tim uvjetima stabilna. Preostali kalijev bikromat uz dodatak kalijeva jodida izlučuje elementarni jod. Elementarni jod se titrira natrijevim tiosulfatom, uz škrob kao indikator.

Postupak:

Alkalnoj vodi (10 mL) doda se uzorak (max. 1 mL) (razrijediti uzorak prema potrebi) u kojem se određuje alkohol. Spoji se aparatura tako da je "most" uronjen u otopinu kalijeva bikromata (20 mL). Destilacija traje do promjene boje uzorka. Nakon hlađenja do sobne temperature, uzorku se dodaje kalijev jodid na vrh špatule i 1 mL otopine škroba te se otopina titrira natrijevim tiosulfatom do pojave plavozelene boje uzorka.

Volumni udio alkohola izračunava sve prema formuli 2:

$$\text{EtOH (\%)} = \frac{(V1 - V2) * f}{V_{uzorka}} * r \quad (2)$$

V1- utrošak natrijeva tiosulfata za slijepu probu

V2- utrošak natrijeva tiosulfata za uzorak

f- faktor (0,146)

r- razrjeđenje

3.2.2.3. *Plinska kromatografija*

Plinska kromatografija je metoda prikladna za identifikaciju i specifikaciju pojedinih voćnih aroma. Primjenom plinske kromatografije mogu se odrediti glavne i sporedne komponente voćnih rakija (Winterova i sur., 2008).

Sustav za analizu uzoraka plinskom kromatografijom se sastoji od injektora, mobilne faze (plin), kolone ispunjene stacionarnom fazom, pećnice, detektora te računalnog sustava za obradu podataka. Analiza započinje kada se injektirani uzorak raspline na vrhu kolone, prolazi kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom nošen mobilnom fazom. (Rouessac i

Rouessac, 2007). 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. Odvajanje komponenata plinskom kromatografijom moguće je ako se komponente uzorka koje se žele razdvojiti razlikuju u tlaku para i/ili intenzitetu interakcije sastojak- stacionarna faza. Razdvojene komponente karakterizirane su retencijskim vremenom (R_t) tj. vremenom zadržavanja koje je prošlo između uvođenja uzorka do pojave pojedinih pikova (Poole, 2003).

Analiza prefermentiranih komina zadnjeg dana fermentacije i destilata provodila se plinskom kromatografijom pomoću plinskog kromatografa (GC) s plamenoionizacijskim detektorom (FID)-Hewlett-Packard HP 5890 i „headspace“ automatskog uzorkivača (HSS) (slika 7) čiji uvjeti rada su navedeni u tablicama 7 i 8.



Slika 7. Plinski kromatograf (GC) s plamenoionizacijskim detektorom (FID) – Hewlett Packard HP 5890 (vlastita fotografija).

Tablica 7. Uvjeti rada HSS-GC-FID.

Temperatura pećnice	80°C
Vrijeme uravnoteženja	10 min
Vrijeme injektiranja	0,2 min
Protok plina nosača	7,85 mL min ⁻¹
Pritisak u bočici	7 Psi
Plin nosač	N ₂
Volumen uzorka	5 mL

Tablica 8. Uvjeti rada plinskog kromatografa.

Temperatura injektora	220°C
Temperatura detektora	250°C
Plin nosač	N ₂
Temperaturni program	38°C, 4 → 170°C, 20°C min ⁻¹ → 190°C, 40°C min ⁻¹ , 4 min
Brzina plina nosača	160 Psi
„Splitless“	3 min
Kolona	RTX-624 (J&W): 30 m; i.d. = 0,32 mm; 1,8 µm

Priprema uzorka destilata za analizu

2,5 mL destilata se odpipetira u odmjernu tikvicu od 50 mL. Potom se doda destilirane vode malo ispod oznake, a nakon toga se mikropipetom interni standard volumena 90,3 µL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. U HSS bočicu otpipetira se 5 mL prethodno pripremljenog uzorka za analizu. Bočice se zatvaraju silikonskim čepovima predviđenim za HSS bočice te stavljaju na određeno mjesto na „headspace“ automatskom uzorkivaču. Uzorak se zagrijava na 80° C kako bi se postiglo isparavanje hlapljivih komponenti, koje se potom prebacuju u injektor plinskog kromatografa gdje se provodi analiza.

Priprema uzoraka prefermentirane komine šljive za analizu

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se 20 mL prefermentirane komine šljive zadnjeg dana fermentacije, doda se 45,2 μ L internog standarda i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Daljnji postupak je isti kao i gore naveden za uzorke destilata.

Kvantifikacija hlapljivih spojeva

Kvantifikacija hlapljivih spojeva arome provedena je računalnom analizom podataka dobivenih programom HP-chem pomoću metode unutarnjeg standarda. Spojevi su identificirani na temelju položaja pika pojedinog spoja na vremenskoj osi, tj. njihovih retencijskih vremena. Identifikacija i kvantifikacija hlapljivih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenom zadržavanja standardne otopine pojedinog spoja arome (acetaldehid, diacetil, metanol, propanol, izobitanol, izoamil alkohol, 1-heksanol, feniletanol, etil acetat, izoamil acetat, dietil sukcinat, 2-fenietil acetat, etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanat). Kvantitativne vrijednosti pojedinačnih ispitivanih hlapljivih spojeva izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca pripadajućih standardnih otopina navedenih spojeva arome. Određivanje kvantitativnog udjela hlapljivih spojeva arome u prefermentiranim kominama i destilatima provedena je primjenom modificirane metode (Kovačević Ganić i sur., 2003)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. TIJEK ALKOHOLNE FERMENTACIJE

Fermentacija je biološki proces koji rezultira određenim promjenama komponenata u sirovini (Nout, 2014). Tijek alkoholne fermentacije ovisi o utrošku šećera iz plodova šljiva, pri čemu nastaje određena količina alkohola. Šljive mogu sadržavati 10-15% šećera, ovisno o sorti, od kojih su značajni glukoza i fruktoza koje kvasci mogu previrati (Uroš i Puškaš, 2014). Alkoholna fermentacija je završena kada se potroši sav šećer, odnosno kada se koncentracija šećera smanji na koncentraciju ispod 2 g L^{-1} . Proces se može provoditi spontano, zbog prirodno prisutne mikroflore na površini plodova šljiva. Spontana fermentacija, zbog nekontroliranih uvjeta, odvija se sporije pa je krajnji produkt vrlo promjenjiv, što često mijenja organoleptička i kemijska svojstva i postoji veća mogućnost kvarenja završnog proizvoda fermentacije. Zbog toga, proces fermentacije se može provoditi kontrolirano (dirigirano) inokulacijom komercijalnim kvascem. Proces fermentacije također je potrebno provoditi u zatvorenim posudama s malim otvorom za izlazne plinove pri čemu se stvaraju anaerobni uvjeti koji onemogućuju gubitak sintetiziranog etanola (Grba, 2009). Cilj ovoga dijela rada bio je pratiti tijek alkoholne fermentacije, spontane i dirigirane, za dvije sorte šljiva, Bistrice i Top King, pri 30°C .

Početna koncentracija šećera u plodu i potrošnja tog šećera mjerena je metodom po Luff-Schoorlu (Trajković i sur., 1983), dok je koncentracija nastalog produkta (alkohola) određivana metodom po Martin-Dietrichu (Kretschmar i sur., 1955).

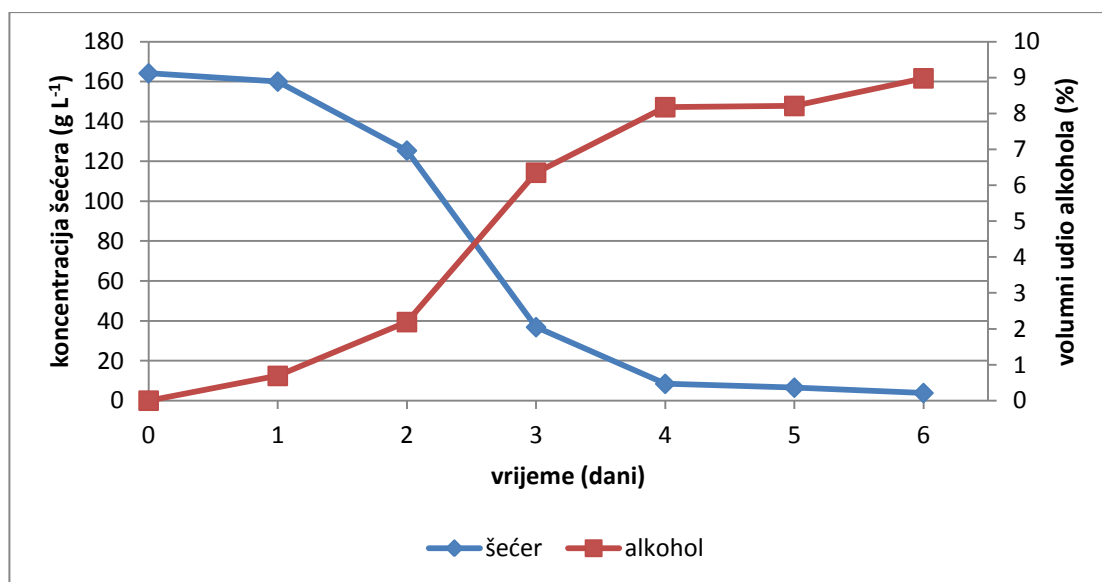
Dobiveni rezultati za koncentraciju šećera u plodu šljiva prikazani su u tablici 9, a dijagrami tijeka potrošnje supstrata (šećera) i nastanka produkta (alkohola) prikazani su na slikama 8-11.

Tablica 9. Koncentracija šećera u plodovima šljiva.

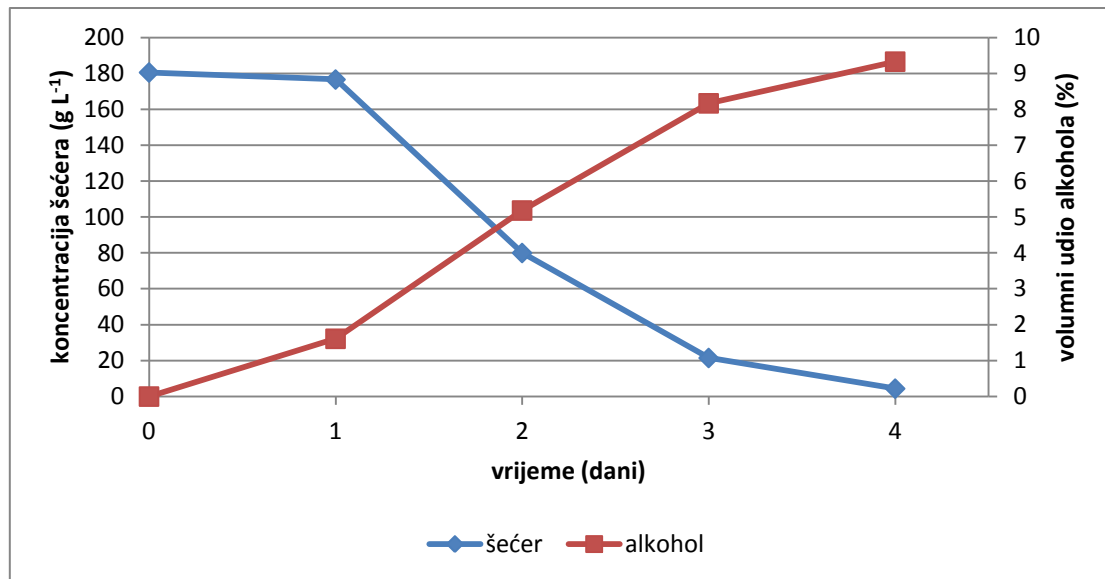
Sorta	Koncentracija šećera u plodu (g L^{-1})
Bistrica	81,36
Top King	155,36

Koncentracije šećera u plodu šljiva prikazane u tablici 9 jasno prikazuju da je veća koncentracija u plodu šljive Top King nego u Bistrici. Veći udio šećera u plodovima šljive Top King povećava mogućnosti njene prerade. Koncentracija šećera u plodu Bistrice korištene u ovome eksperimentu odgovara literaturnim podacima autora Voća i suradnici (2009) dok su autori Družić i suradnici (2007) izmjerili nižu koncentraciju šećera, $56,36 \text{ g L}^{-1}$. Koncentracija šećera u plodu šljive Top ($64,55 \text{ g L}^{-1}$) autora Voća i suradnici (2009) i plodu šljive Top King u radu autora Bozhkova (2014) ($93,59 \text{ g L}^{-1}$) su nižih vrijednosti u odnosu na koncentraciju šećera u plodu šljive Top King korištene u ovome radu. Odstupanja su moguća zbog različitih klimatskih uvjeta i geografskog položaja mjesta uzgoja.

Ovisno o sorti šljive proces dirigitane fermentacije završio je 4. dan za Bisticu (slika 9) te 2. dan za Top King (slika 11) u odnosu na 6 dana za Bisticu i 4 dana za Top King koliko je bilo potrebno za provođenje spontane fermentacije obje sorte (slike 8 i 10). Inokulacijom komercijalnim kvascem (*S. cerevisiae*) utječe se na vrijeme odvijanja procesa alkoholne fermentacije, što se podudara sa rezultatima dobivenima u radu Satora i Tuszyński (2010) gdje se inokulacijom *S. cerevisiae* fermentacija šljive Bistrice na temperaturi od 25°C odvijala 5 dana.



Slika 8. Dinamika potrošnje supstrata (šećera) i nastanka produkta (alkohola) kod spontane fermentacije sorte Bistrice pri 30°C .

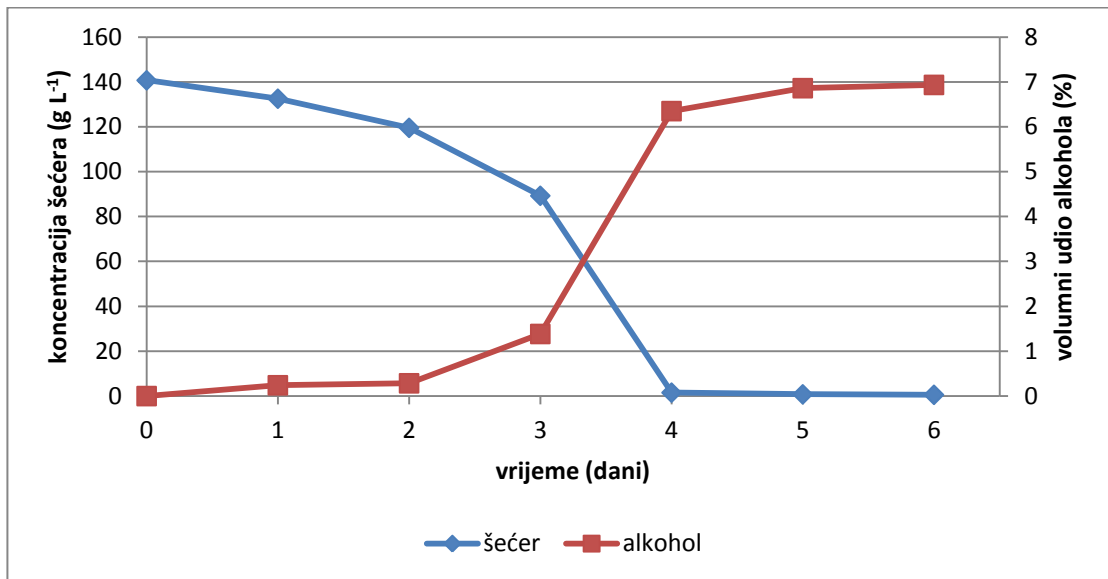


Slika 9. Dinamika potrošnje supstrata (šećera) i nastanka produkta (alkohola) kod dirigitane fermentacije sorte Bistrice pri 30°C.

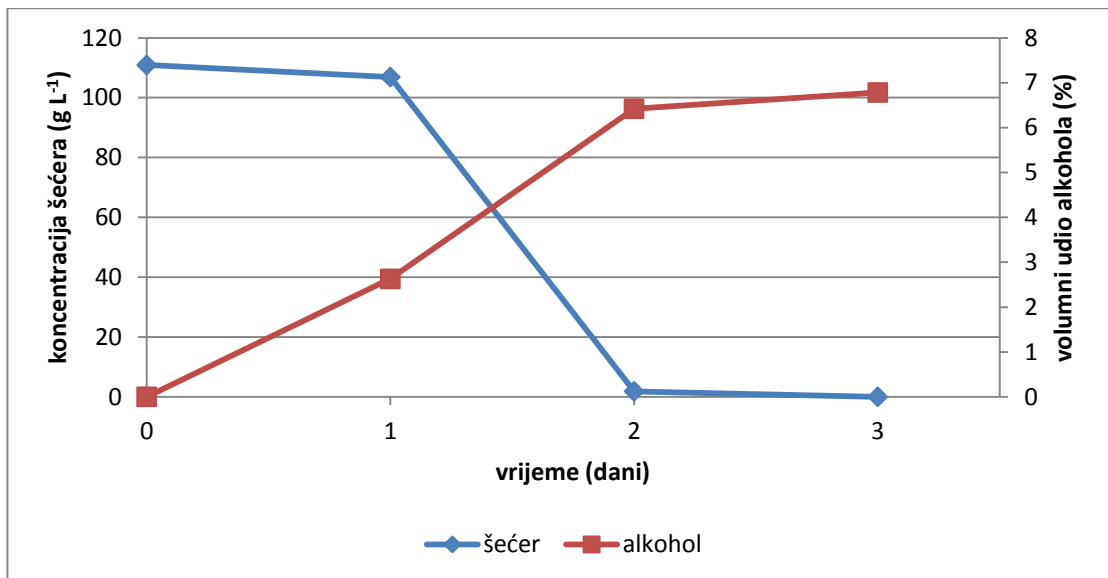
Tijekom procesa fermentacije smanjuje se koncentracija šećera, a povećava prinos alkohola u komini šljiva. Slike 8 i 9 prikazuju dobivene vrijednosti za koncentracije šećera i prinos alkohola u prefermentiranim kominama šljive Bistrice određivane svaki dan do završetka spontane i dirigitane alkoholne fermentacije. Dobivena vrijednost za koncentraciju šećera u komini 0. dana spontane fermentacije šljive Bistrice u ovome radu su više (164,14 g L⁻¹) u odnosu na koncentraciju šećera izmjerene u komini za šljivu Bisticu u radu autora Satora i Tuszyński (2010) koja je iznosila 90-95 g L⁻¹.

Glavni produkt alkoholne fermentacije je alkohol etanol. Slika 9 prikazuje prinos tog alkohola u dirigitano prefermentiranoj komini šljive Bistrice (9,33%) te je nešto veći nego prinos alkohola u spontano prefermentiranoj komini (8,98%) (slika 8). Prinos alkohola dobiven u ovome eksperimentu u spontano prefermentiranoj komini šljive Bistrice iznosio je 8,98% te je veći od prinosa alkohola izmjeren u radu Satora i suradnici (2013) koji je iznosio 7,2-7,5% odvijanjem spontane fermentacije na temperaturi od 20°C u trajanju od 30 dana. Zhang i suradnici (2012) također su imali manji prinos alkohola (7,34%) u komini šljive Bistrice, gdje se spontana fermentacija provodila 12 dana na temperaturi od 21-23°C. Prinos alkohola u dirigitano prefermentiranoj komini šljive Bistrice dobiven u ovome radu je 9,33% i veći je u odnosu na prinos alkohola u komini Bistrice (6,5%) koja se koristila u eksperimentu

Satora i Tuszyński (2010), gdje je fermentacija inokulacijom *S. cerevisiae* trajala pet dana na 25°C.



Slika 10. Dinamika potrošnje supstrata (šećera) i nastanka produkta (alkohola) kod spontane fermentacije sorte Top King pri 30°C.



Slika 11. Dinamika potrošnje supstrata (šećera) i nastanka produkta (alkohola) kod dirigirane fermentacije sorte Top King pri 30°C.

Izmjerena koncentracija šećera u komini šljive Top King 0. dana kod obje fermentacije je manja u odnosu na koncentraciju u komini šljive Bistrice (slika 10 i 11). Iako je očekivano da će veće koncentracije šećera u 0. danu fermentacije biti u komini Top King, zbog povećanog udjela šećera u plodu, rezultati to ipak nisu pokazali. Smanjena koncentracija šećera je moguća zbog različite veličine i mase te stupnja zrelosti plodova šljive. Šljiva Top King daje veće plodove u odnosu na šljivu Bisticu te plodovi mogu težiti i do dva puta više te kod pripreme za alkoholnu fermentaciju nije došlo do ujednačenog usitnjavanja i izdvajanja šećera iz plodova Top King za razliku od Bistrice.

U prefermentiranoj komini šljive Top King kod oba procesa fermentacije (slike 10 i 11) je prinos alkohola manji u odnosu na prefermentirane komine šljive Bistrice (slike 8 i 9) zbog manje koncentracije šećera u komini izmjerene 0. dana alkoholne fermentacije. Pri odvijanju spontane fermentacije (slika 10) prinos alkohola u prefermentiranoj komini Top King je približno jednak (6,93%) prinosu alkohola u dirigitano prefermentiranoj komini šljive (6,78%) (slika 11).

4.2. ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA PRISUTNIH U PREFERMENTIRANIM KOMINAMA ŠLJIVA I DESTILATIMA

U proizvodnji jakih alkoholnih pića, destilacija je tehnološka operacija koja slijedi nakon uspješno završene alkoholne fermentacije voćne kome. Hlapljivi spojevi nastali tijekom procesa alkoholne fermentacije sudjeluju u formiranju ukupne arome rakije (Banić, 2006). Neadekvatna destilacija može uzrokovati mnoge nedostatke koje je teško eliminirati u sljedećim tehnološkim procesima pa se destilacija može smatrati najvažnijom operacijom tijekom proizvodnje voćnih rakija (Spaho i sur., 2013). Za proizvodnju tradicionalne šljivovice bitan je proces odvajanja tokova (frakcija). U dobivenim destilatima su u različitim koncentracijama prisutni određeni poželjni i nepoželjni spojevi.

Iako je glavna komponenta jakih alkoholnih pića etanol, u manjim koncentracijama prisutni su i drugi različiti spojevi koji doprinose aromi te u konačnici kvaliteti krajnjeg proizvoda. Ti spojevi su viši alkoholi, esteri, aldehidi, ketoni, kiseline itd. Neki od hlapljivih spojeva kao što su metanol i acetaldehid imaju toksičan učinak te su od posebne važnosti za praćenje tijekom destilacije u određenim frakcijama (Rusu i sur., 2011). U zadnjem dijelu ovog rada cilj je bio analizirati hlapljive spojeve u prefermentiranim kominama i proizvedenim destilatima te na temelju dobivenih rezultata odrediti razliku u kvaliteti istih s obzirom na različite uvjete vođenja fermentacija.

Analiza hlapljivih spojeva prisutnih u prefermentiranim kominama zadnjeg dana fermentacije i dobivenim destilatima provedena je na plinskom kromatografu (GC) s plamenoionizacijskim detektorom (FID)-Hewlett-Packard HP 5890. Kvantifikacija hlapljivih spojeva arome provedena je računalnom analizom podataka dobivenih programom HP-chem pomoću metode internog standarda. Uzorci su analizirani u dvije paralele te se kasnije izračunala srednja vrijednost iz dobivenih koncentracija pojedinog spoja i provela statistička obrada podataka.

Rezultati koncentracija hlapljivih komponenti prisutni u prefermentiranim kominama i destilatima prikazani su na slikama 12-28.

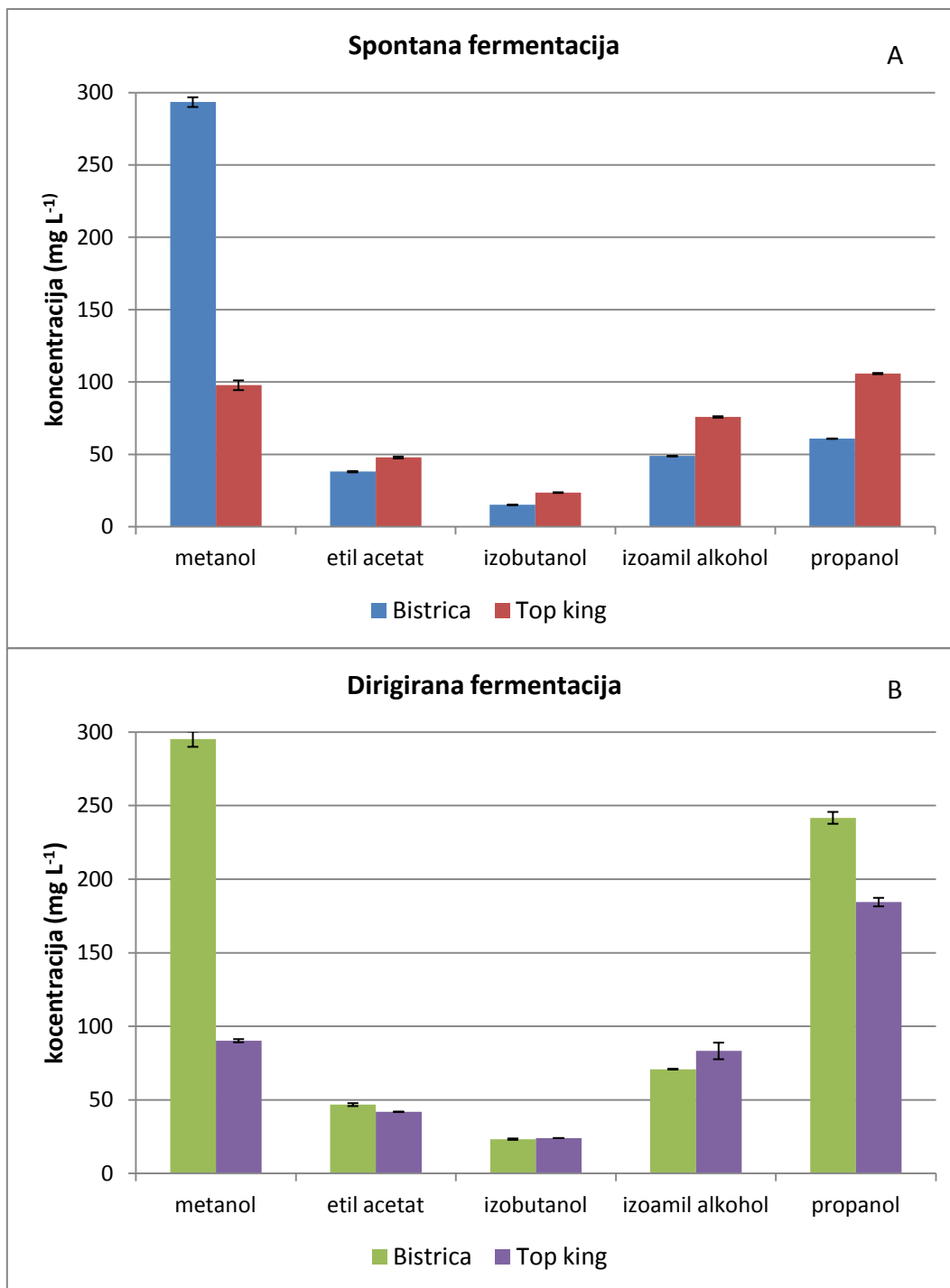
U radu su korištena trivijalna imena identificiranih hlapljivih spojeva arome zbog češće upotrebe tih naziva u literaturi, a njihova imena po IUPAC nomenklaturi navedena su u tablici 10.

Tablica 10. Popis trivijalnih imena analiziranih hlapljivih spojeva arome, njihova pripadajuća IUPAC nomenklatura i pripadajući miris pojedinog spoja.

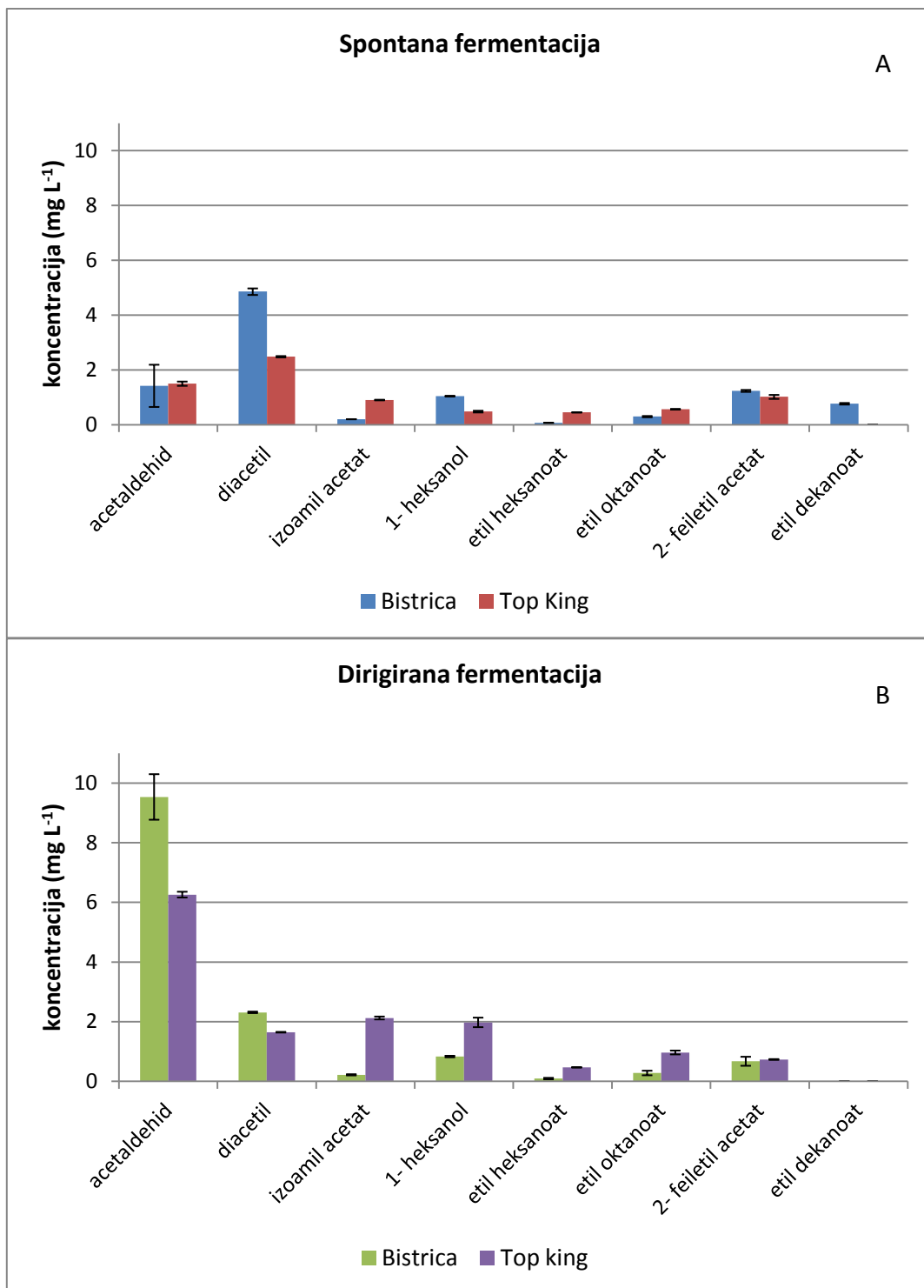
Trivijalno ime	IUPAC nomenklatura	Miris (Christoph i Bauer-Christoph, 2007)
Acetaldehid	Etanal	Oporni miris
Diacetil	2,3-butandion	Miris po maslacu
Metanol	Metanol	Alkoholni miris
Propanol	Propan-1-ol	Alkoholni miris
Izobutanol	2-metilpropan-1-ol	Alkoholni miris
Izoamil alkohol	3-metilbutan-1-ol	Sladni miris
1-heksanol	Heksan-1-ol	Alkoholni miris
Feniletanol	2-feniletanol	Miris na ružu
Etil acetat	Etil acetat	Miris na aceton
Izoamil acetat	3-metilbut-1-il acetat	-
Dietil sukcinat	Dietil ester butandionske kiseline	-
2-feniletil acetat	2-feniletil acetat	Miris na ružu, med i voćni miris
Etil heksanoat	Etil heksanoat	Miris na jabuku, bananu
Etil oktanoat	Etil oktanoat	Miris na ananas, krušku
Etil dekanooat	Etil dekanooat	Cvjetni miris

4.2.1. Hlapljivi spojevi arome prisutni u prefermentiranim kominama šljiva

Tijekom alkoholne fermentacije dolazi do sinteze raznih komponenata. Uz etanol sintetiziraju se viši alkoholi, metanol, esteri te karbonilni spojevi. Ovisno o koncentraciji, ovi spojevi utječu pozitivno ili negativno na kvalitetu dobivene prefermentirane komine šljiva. Njihove koncentracije se znatno mijenjaju u daljnjem procesu obrade, procesu destilacije. Dobiveni rezultati hlapljivih spojeva arome prisutnih u spontano i dirigirano prefermentiranim kominama šljive Bistrice i Top King prikazani su na slikama 12 i 13.



Slika 12. Usporedba koncentracija 1. skupine analiziranih hlapljivih spojeva arome u: A- spontano, B- dirigirano prefermentiranim komina šljive Bistrice i Top King.



Slika 13. Usporedba koncentracija 2. skupine analiziranih hlapljivih spojeva arome u: A- spontano, B- dirigirano prefermentiranim komina šljive Bistrice i Top King.

4.2.1.1. Alkoholi

a) Metanol

Metanol nastaje djelovanjem enzima pektin metilesteraze te nema nikakav utjecaj na senzorska svojstva konačnog proizvoda fermentacije niti stupa u reakciju s drugim spojevima koji se u njemu nalaze (Grba, 2009). U visokim koncentracijama spoj je toksičan. Rezultati koncentracija metanola na slici 12 jasno prikazuju razliku između prefermentirane komine Bistrice i Top King. Bistrica ima znatno veću koncentraciju metanola (293,48-295,141 mg L⁻¹) i do tri puta u odnosu na Top King (90,20-97,82 mg L⁻¹). Razlog tome može biti veća aktivnost pektin metilesteraze prisutne kod šljive Bistrice. Dobivena koncentracija metanola u spontano prefermentiranoj komini šljive Bistrice (293,48 mg L⁻¹) je niža u odnosu na vrijednost dobivena u radu Satora i suradnici (2013), gdje je koncentracija metanola u spontano prefermentiranoj komini šljive Bistrice iznosila 591 mg L⁻¹. Izmjerene koncentracije metanola u spontano i dirigitano prefermentiranim kominama šljive Bistrice i Top King su slične, zbog čega se može zaključiti da inokulacija kvascem *S. cerevisiae* nije imala značajan utjecaj na koncentraciju metanola.

b) Viši alkoholi

Viši alkoholi (izobutanol, izoamil alkohol, propanol, 1-heksanol) sintetiziraju se razgradnjom aminokiselina djelovanjem kvasca tijekom alkoholne fermentacije u voću. Izobutanol i izoamil alkohol se većinom sintetiziraju iz valina, leucina i izoleucina te drugih aminokiselina i šećera, dok se propanol sintetizira uglavnom iz treonina i šećera (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Oni doprinose senzorskim karakteristikama i kvaliteti voćnih rakija (Satora i sur., 2013). Koncentracija viših alkohola u voćnim rakijama ovisi o materijalu koji se koristio tijekom procesa fermentacije (Satora i sur., 2010).

Koncentracije viših alkohola prisutnih u prefermentiranim kominama šljiva obje sorte prikazani su na slici 12 i 13. Veća koncentracija izobutanola je prisutna u spontano prefermentiranoj komini Top King (slika 12, A) u odnosu na spontano prefermentiranu kominu Bistrice. Komine dobivene dirigitanim procesom fermentacije pokazuju iste koncentracije izobutanola i kod šljive Bistrice i Top King (slika 12, A). Koncentracija izobutanola iz rada autora Satora i suradnici (2013) je iznosila 35,4 mg L⁻¹ u spontano

prefermentiranoj komini Bistrice te je viša od koncentracije spoja u spontano prefermentiranoj komini šljive Bistrice u ovome radu ($15,16 \text{ mg L}^{-1}$).

Izoamil alkohol može činiti i do 50% ukupnih viših alkohola (Grba, 2009). Veća koncentracija izoamil alkohola izmjerena je u prefermentiranim kominama šljive Top King pri oba procesa fermentacije (slika 12). Koncentracije izoamil alkohola u dirigirano prefermentiranim kominama obje sorte šljive su viših vrijednosti (slika 12, A) u odnosu na koncentraciju izoamil alkohola u spontano prefermentiranim kominama šljiva (slika 12, B).

Koncentracija propanola izmjerena u spontano i dirigirano prefermentiranim kominama šljiva je prikazana na slici 12. Vidljiva je razlika između spontane i dirigirane fermentacije, kao i razlika između sorti. Tijekom spontane fermentacije u većoj koncentraciji je prisutan u prefermentiranoj komini Top King (slika 12, A), a tijekom dirigirane fermentacije u prefermentiranoj komini Bistrice (slika 12, B). Koncentracija propanola koju navode Satora i suradnici (2013) ($14,1 \text{ mg L}^{-1}$) je niže vrijednosti u odnosu na koncentraciju propanola u komini šljive Bistrice ($60,1 \text{ mg L}^{-1}$) dobivene provođenjem spontane fermentacije u ovome radu.

Koncentracija viših alkohola, izobutanola, izoamil alkohola i propanola je viša u prefermentiranim kominama šljive Bistrice i Top King dirigiranog procesa zbog inokulacije komercijalnim kvascem *S. cerevisiae* čime se posljedično povećava i mogućnost sinteze određenih viših alkohola.

1-heksanol je viši alkohol koji nastaje tijekom alkoholne fermentacije hidrolizom odgovarajućih acetata iz peteljki i lišća šljive (Spaho i sur., 2013). Uzrokuje neugodan, gorak okus rakije te ga sintetiziraju ne-*Saccharomyces* vrste kvasaca. Slika 13 jasno prikazuje razliku koncentracija spoja između sorti, gdje je veća koncentracija spoja izmjerena u spontano prefermentiranoj komini Bistrice u odnosu na spontano prefermentiranu kominu Top King. U dirigirano prefermentiranoj komini veća koncentracija spoja je prisutna kod šljive Top King.

4.2.1.2. Esteri

Tijekom alkoholne fermentacije sintetiziraju se brojni esteri, ali najveći značaj imaju acetatni esteri viših alkohola (etil acetat, izoamil acetat i 2-feniletal acetat) i etil esteri masnih kiselina (etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanat) (Tešević i sur., 2005).

Etil acetat ima značajan utjecaj na organoleptička svojstva voćnih rakija (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Spontano prefermentirana komina šljive Bistrice sadrži nižu koncentraciju etil acetata u odnosu na spontano prefermentiranu kominu šljive Top King (slika 12, A), dok je ta razlika suprotna u slučaju dirigirane fermentacije (slika 12, A). Koncentracija etil acetata u spontano prefermentiranoj komini Bistrice iznosi 38,09 mg L⁻¹ te je niža od koncentracije u prefermentiranoj komini šljive Bistrice autora Satora i suradnici (2013) koji su izmjerili koncentraciju estera 91,6 mg L⁻¹. Niža koncentracija etil acetata u prefermentiranoj komini moguća zbog najveće koncentracije etil acetata sintetizirane na početku alkoholne fermentacije, dok je njegova koncentracija u zadnjoj fazi procesa najniža (Satora i sur., 2013). Ostali esteri u prefermentiranim kominama šljiva, izoamil acetat, etil heksanoat, etil dekanat i 2-feniletal acetat imaju niske koncentracije (slika 13). Koncentracija navedenih estera je viša kod prefermentiranih komina šljive Top King u odnosu na prefermentirane komine šljive Bistrice oba procesa fermentacije, osim u slučaju 2-feniletal acetata čija je koncentracija viša u spontano prefermentiranoj komini Bistrice (slika 13, A). 2-feniletal acetat i izoamil acetat su esteri koji su nastali esterifikacijom octene kiseline, etanola i viših alkohola. Nastaju tijekom alkoholne fermentacije te su nosioci voćno-cvjetne arome (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Etil dekanat detektiran je samo u spontano prefermentiranoj komini Bistrice kako je prikazano na slici 13, prema čemu se može zaključiti da inokulacija kvascem *S. cerevisiae* nije imala utjecaj na sintezu estera. Niske koncentracije estera u kominama šljiva zadnjeg dana fermentacije obje sorte mogu biti razlog sinteze spojeva u početnoj fazi alkoholne fermentacije djelovanjem kvasca *S. cerevisiae* (Satora i sur., 2013).

4.2.1.3. Karbonilni spojevi

a) Acetaldehid

Karbonilni spojevi, acetaldehid i diacetil, nalaze se u različitim koncentracijama u spontano i dirigirano prefermentiranim kominama šljiva kao što je prikazao na slici 13. Acetaldehid je važan karbonilni spoj koji nastaje kao međuprodukt razgradnje piruvata

djelovanjem enzima piruvat dekarboksilaze tijekom fermentacije. Poželjno je da je prisutan u nižim koncentracijama (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Spontano prefermentirane komine imaju nižu koncentraciju acetaldehida u odnosu na dirigirano prefermentirane komine obje sorte. Spontano prefermentirane komine sorte Top King i Bistrice imaju približno jednaku koncentraciju acetaldehida (slika 13, A). Tijekom provođenja dirigirane fermentacije veća koncentracija spoja je prisutna u prefermentiranoj komini Bistrice nego u komini Top King (slika 13, A).

b) Diacetil

Diacetil je spoj koji je odgovoran za miris koji podsjeća na maslac te se može pojaviti u voćnim prefermentiranim kominama. Formiraju ga bakterije mliječne kiseline tijekom malolaktične fermentacije. Visoke koncentracije diacetila su moguće pri spontanim i nekontroliranim procesima, zbog povećanog udjela jabučne kiseline (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Dobivene koncentracije diacetila u prefermentiranim kominama šljiva se razlikuju između spontane i dirigirane fermentacije, kao i između samih sorti (slika 13). Koncentracija spoja je veća u spontano prefermentiranim kominama za obje sorte u odnosu na dirigirano prefermentirane komine. Koncentracija diacetila u prefermentiranim kominama Bistrice je veća u odnosu na prefermentirane komine Top King kod u procesa fermentacije kako je prikazano na slici 13, B. Redukcijom diacetila nastaje karbonilni spoj acetoin koji se većinom sintetizira u ranijim fazama fermentacije djelovanjem *S. cerevisiae* (Satora i sur., 2010). Zbog toga su niže koncentracije diacetila u prefermentiranim kominama šljiva koje su ispitivane u ovome eksperimentu.

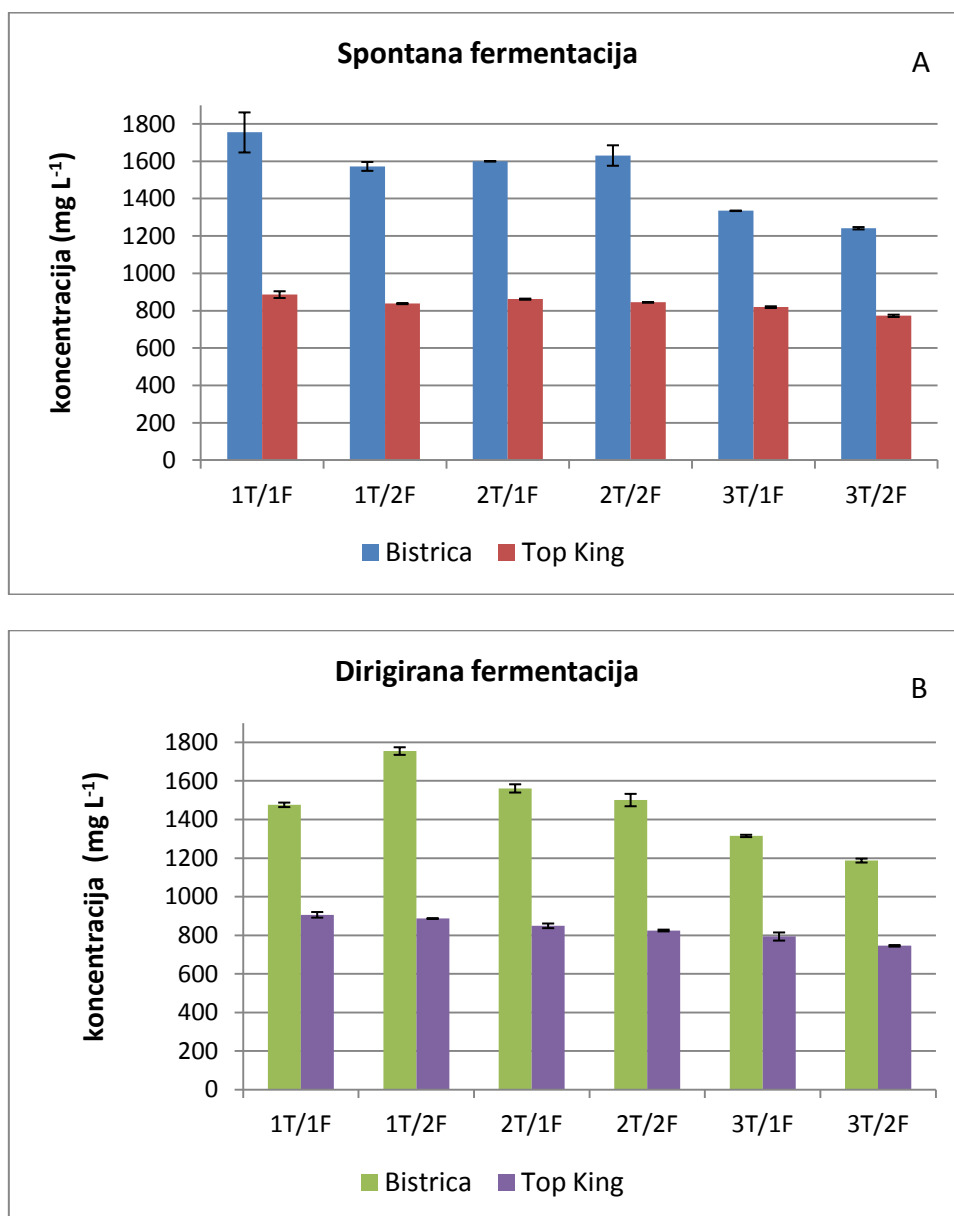
4.2.2. Hlapljivi spojevi arome prisutni u destilatima

Hlapljivi spojevi arome mogu se podijeliti na one podložne kemijskim promjenama tijekom destilacije i one koji tim promjenama nisu podložni, odnosno na spojeve čija se koncentracija mijenja tijekom destilacije i spojeve kojima koncentracija ostaje nepromijenjena (Nikićević i Tešević, 2010). Primijenjenom analitičkom metodom analize hlapljivih spojeva određivano je 15 najznačajnijih spojeva koji sudjeluju u formiranju sekundarne arome destilata, odnosno potječu od alkoholne fermentacije te njome nije bilo moguće odrediti spojeve koji pridonose formiranju sorte arome rakije. Na slikama od 14-28 prikazane su

dobivene koncentracije detektiranih hlapljivih spojeva arome prisutnih u destilatima spontano i dirigrano prefermentiranih komina šljive Bistrice i Top king.

4.2.2.1. Alkoholi

a) Metanol



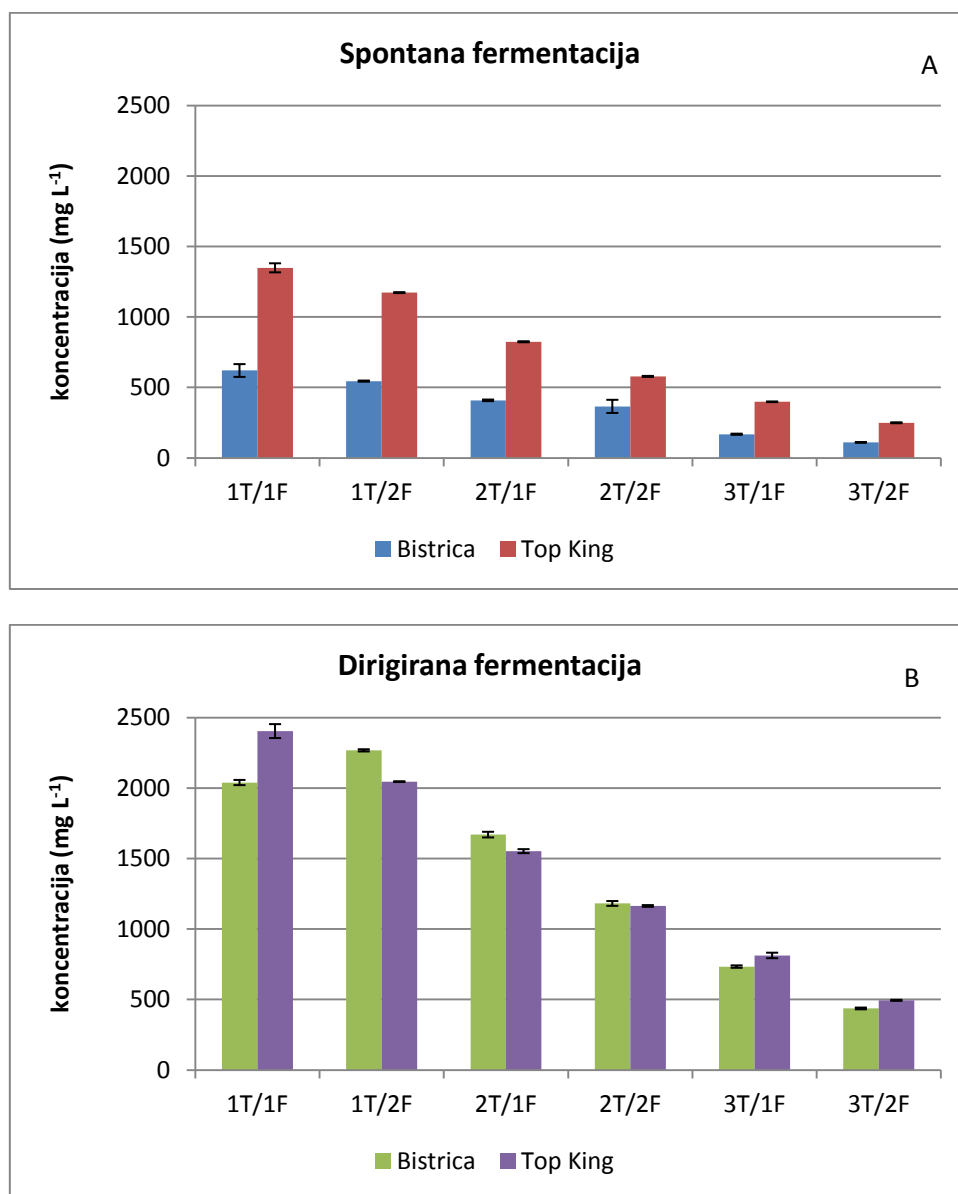
Slika 14. Usporedba koncentracija metanola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigrano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.

Koncentracija metanola parametar je za određivanje autentičnosti specifičnih sirovina u voćnim rakijama (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

Tijekom destilacije metanol je prisutan u svim tokovima destilata obje sorte u oba procesa fermentacije (slika 14, A i B). U destilatima dobivenima iz spontano i dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice su izmjerene više koncentracije metanola, i do dva puta, nego u destilatima Top King. Destilati spontano prefermentirane komine šljive Top King imaju nižu koncentraciju metanola ($772,96-886,34 \text{ mg L}^{-1}$) u odnosu na rakiju dobivene destilacijom spontano prefermentirane komine šljive Top korištene u radu Tupajić i suradnici (2006) u kojoj je koncentracija metanola iznosila $3303,6 \text{ mg L}^{-1}$. Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN61/09) količina metanola u rakiji dobivene destilacijom voćne komine trebala bi iznositi do 6000 mg L^{-1} računato na 40% vol. alkohola. Koncentracije metanola u rakijama šljivovicama sorte Bistrice i Top King dobivene u ovom radu su nižih koncentracija od propisane. Prema tome rakije su sigurne za konzumaciju te nema opasnosti od štetnog utjecaja prisutnog metanola na zdravlje.

b) Viši alkoholi

Propanol

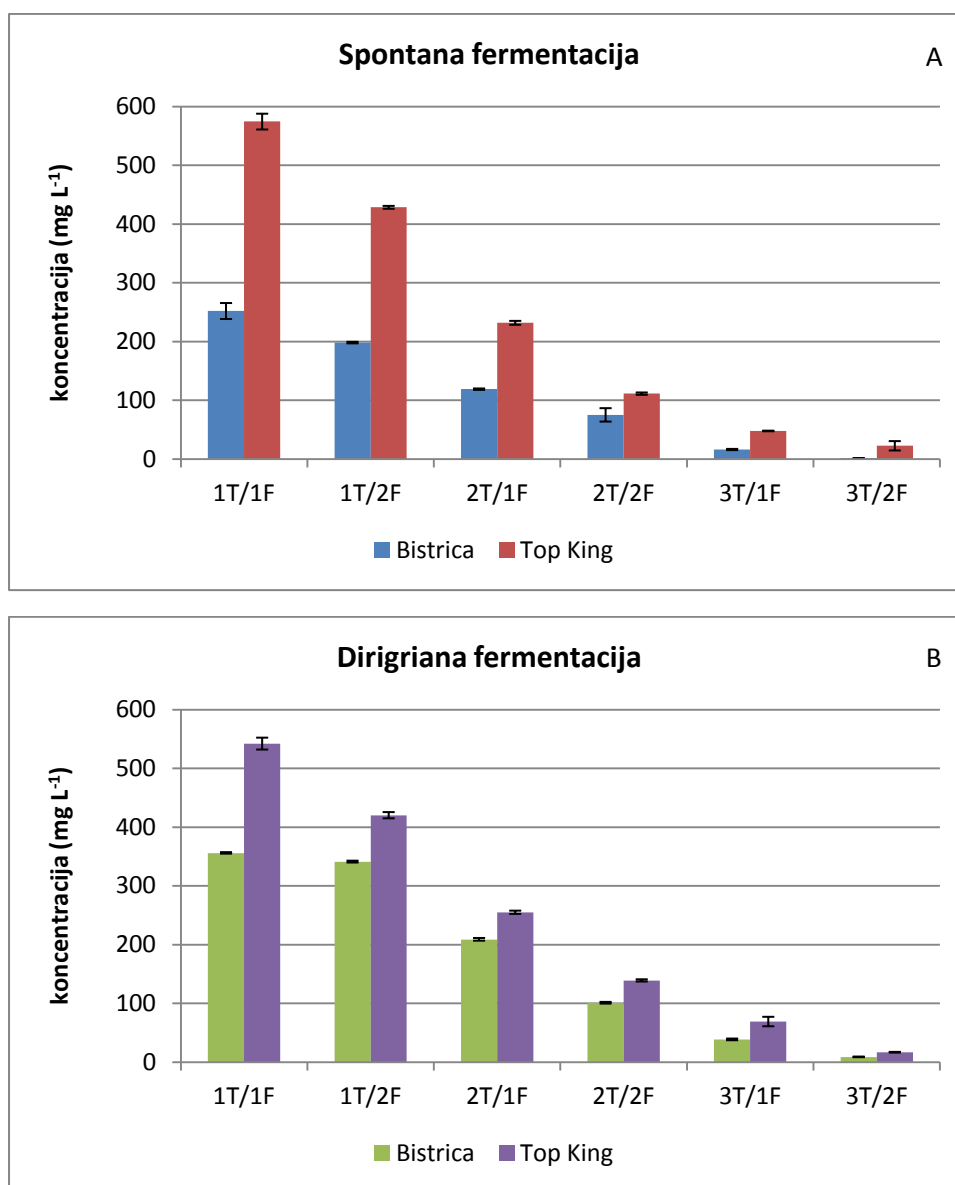


Slika 15. Usporedba koncentracija propanola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.

Viši alkoholi ili patočna ulja su kvantitativno najveća skupina hlapljivih spojeva u rakijama (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Prisutni su tijekom cijele destilacije, ali do njihovog nakupljanja, ovisno o točki vrenja i koncentraciji etanola u sirovini koja se destilirala, dolazi nekada u prvijencu, a nekada u patoci (Vidrih i Hribar 1999).

Koncentracije višeg alkohola propanola u destilatima drugog toka, koji se koristi za konzumaciju spontano prefermentirane komine Top King su viših vrijednosti od koncentracije u destilatima srednjeg toka šljive Bistrice (slika 15, A). Koncentracija propanola u destilatima srednjeg toka dirigitirano prefermentirane komine Bistrice viša nego u destilatima drugog toka dirigitirano prefermentirane komine šljive Top King (slika 15, B). Najviše vrijednosti spoja su prisutne u prvome toku destilata obje sorte spontano i dirigitirano prefermentirane komine te u sljedećim tokovima te vrijednosti opadaju. Koncentracije propanola u destilatima dirigitirano prefermentirane komine Bistrice u drugom toku (srcu) su raspona 1181,37-1669,61 mg L⁻¹ te su viših vrijednosti u odnosu na koncentracije za drugi tok (1634 mg L⁻¹) u radu Spaho i suradnici destilata dobivenih iz dirigitirano prefermentiranih komina šljive Bistrice na temperaturi od 19±1°C (2013). Vrijednosti propanola u destilatima spontano prefermentirane komine šljive Bistrice (110,21-620,10 mg L⁻¹) i šljive Top King (249,41-1348,56 mg L⁻¹) u ovome radu su unutar raspona koncentracija propanola u šljivovici, 356-3084 mg L⁻¹, koju navode Winterova i suradnici (2008).

Izobutanol

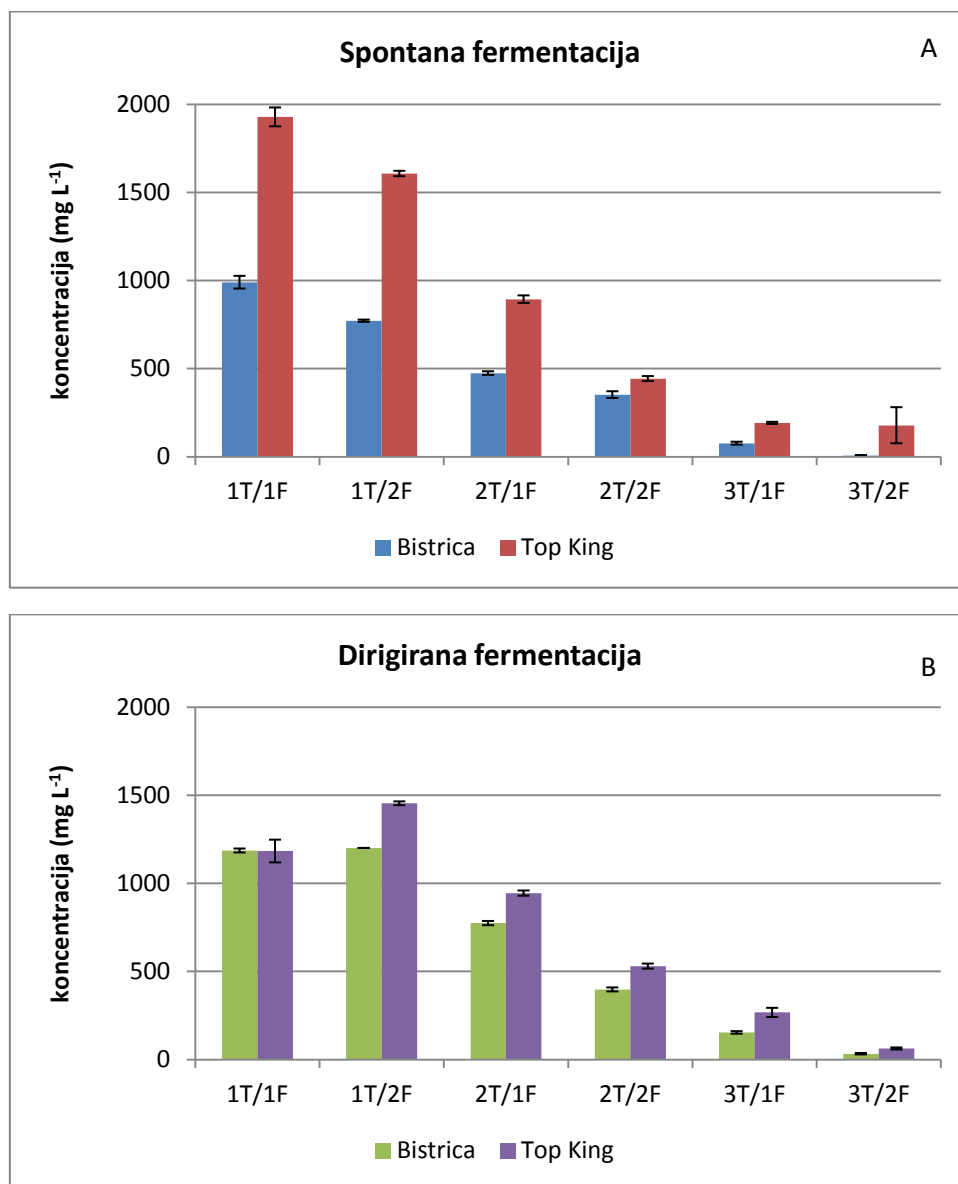


Slika 16. Usporedba koncentracija izobutanola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.

Koncentracija izobutanola u svim destilatima Top King je viša u odnosu na destilate šljive Bistrice u oba procesa fermentacije (slika 16, A i B). Najviše vrijednosti spoja su prisutne u prvim tokovima (prvijencu) destilata spontano i dirigirano prefermentiranih komina Bistrice i Top King. Koncentracija izobutanola u destilatima obje sorte u oba procesa fermentacije tijekom destilacije konstantno opada. Koncentracije spoja u srednjem destilatu spontano prefermentirane komine šljive Top King (111,35-231,92 mg L⁻¹) nižih su

vrijednosti u odnosu na destilat srednjeg toka sorte šljive Top dobiven destilacijom spontano prefermentirane komine autora Tupajić i suradnici (2006) (470 mg L^{-1}).

Izoamil alkohol



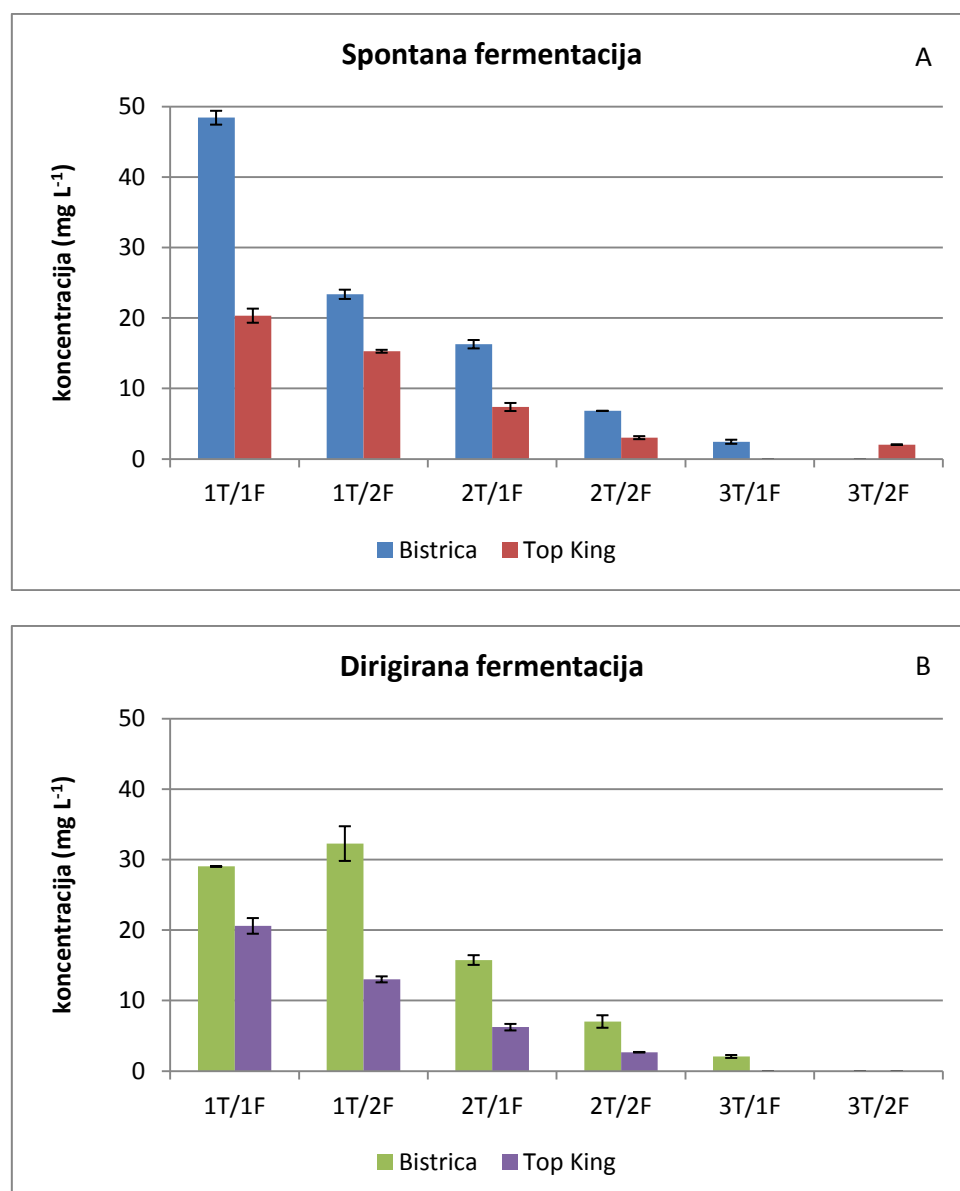
Slika 17. Usporedba koncentracija izoamil alkohola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.

Izoamil alkohol je najčešći spoj prisutan u različitim destilatima nastao djelovanjem kvasca, ovisno o prirodi sirovine (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Koncentracija izoamil

alkohola u destilatima srca iz prefermentiranih komina šljive Top King pri oba procesa fermentacije je veća u odnosu na destilate srca šljive Bistrice (slika 17, A i B). Tupajić i suradnici (2006) navode koncentraciju izoamil alkohola u destilatu drugoga toka spontano prefermentirane komine šljive Top od 1354 mg L^{-1} te je više koncentracije nego u destilatu spontano prefermentirane komine drugog toka Top King u ovoga rada ($442,55\text{-}893,44 \text{ mg L}^{-1}$). Koncentracija izoamil alkohola u radu autora Kostik i suradnici (2013) je u rasponu koncentracija $988 - 1356 \text{ mg L}^{-1}$ u šljivovici dobivene destilacijom spontano prefermentirane komine Bistrice te je viših vrijednosti nego koncentracija u destilatima spontano prefermentirane komine Bistrice $32,76\text{-}1200,52 \text{ mg L}^{-1}$ u ovome radu.

Omjer izobutanola i izoamil alkohola može se koristiti za prepoznavanje sorti šljiva u proizvodnji rakije. Taj omjer je poželjan 1:1 u šljivi Bistrici (Spaho i sur., 2013). U ovome radu taj omjer nije postignut te je iznosio 0,61. Za sortu Top King taj podatak je nepoznat.

1-heksanol

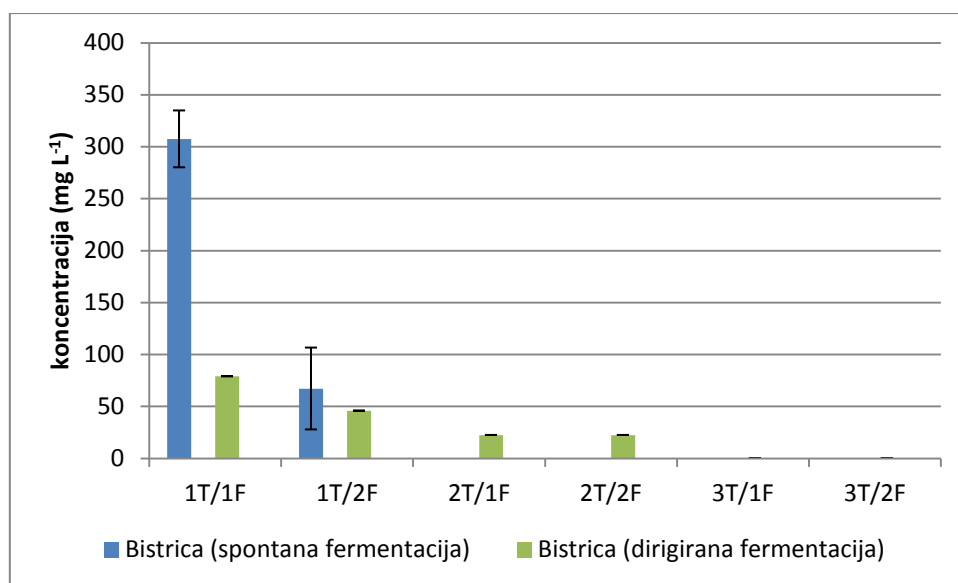


Slika 18. Usporedba koncentracija 1-heksanola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.

U prvome toku detektirana je najviša koncentracija 1-heksanola u obje sorte šljive Bistrice i Top King spontane i dirigirane fermentacije (slika 18, A i B). Koncentracija spoja u destilatima srednjeg toka spontano i dirigirano prefermentirane komine Top King je niža u odnosu na destilate srednjeg toka šljive Bistrice. 1-heksanol je alkohol za kojeg se smatra da ima pozitivan utjecaj na aromu rakije kada je prisutan u koncentraciji do 20 mg L⁻¹ (Apsstolopoulou i sur., 2005). Koncentracije 1-heksanola u destilatima srednjeg toka obje

sorte šljive su unutar tih granica ($< 16,29 \text{ mg L}^{-1}$). Vrijednosti dobivene u ovom radu za koncentraciju 1-heksanola u destilatima dirigitano prefermentirane komine Bistrice iznose $2,07\text{-}32,28 \text{ mg L}^{-1}$ te su više nego koncentracije u destilatima dirigitano prefermentirane komine Bistrice u radu Spaho i suradnici (2013) ($4\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$). Rakija šljivovica dobivena iz spontano prefermentirane komine Bistrice u radu Satora i Tuzynski (2010) ima višu koncentraciju 1-heksanola ($76,5 \text{ mg L}^{-1}$) u odnosu na koncentraciju spoja u destilatima Bistrice u ovome radu ($2,45\text{-}48,42 \text{ mg L}^{-1}$).

Feniletanol



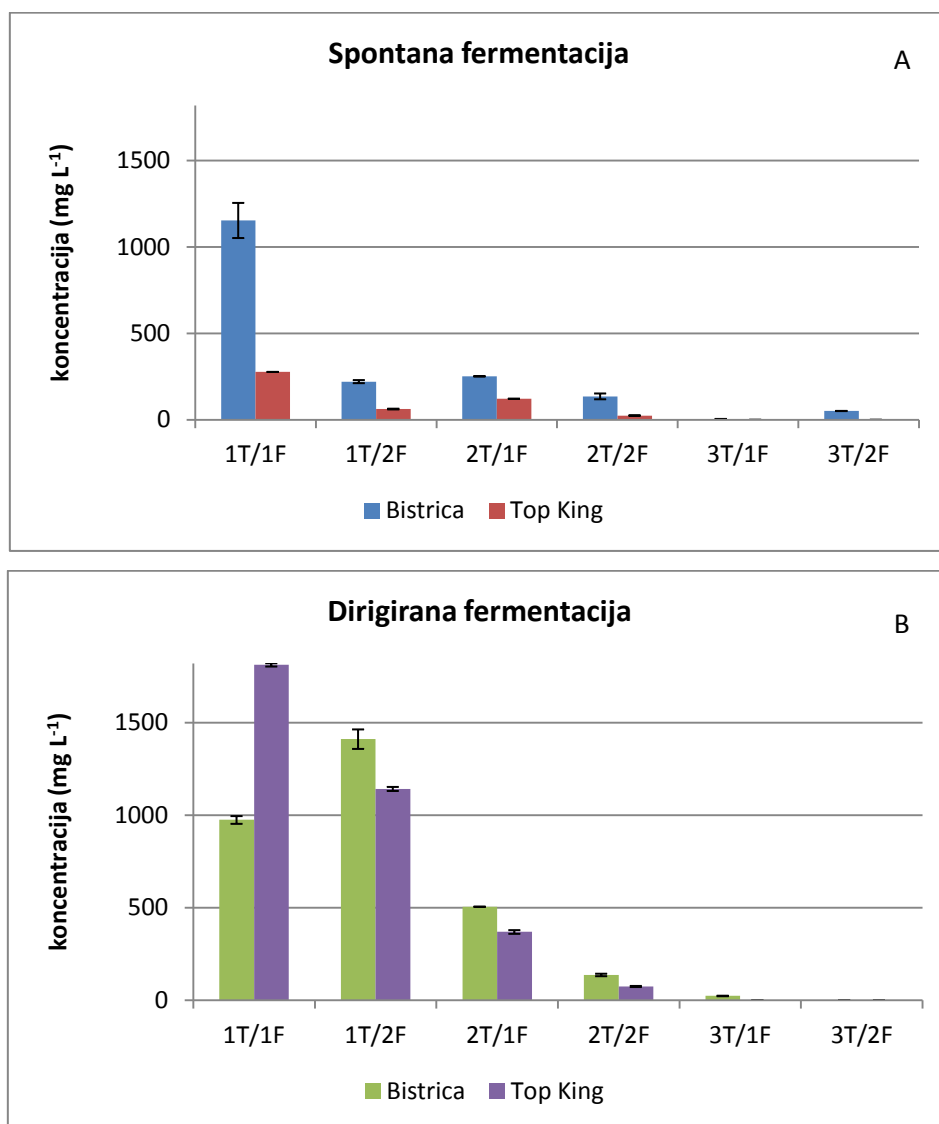
Slika 19. Usporedba koncentracija feniletanola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom spontano i dirigitano prefermentirane komine šljive Bistrice.

Koncentracija feniletanola ovisi o sastavu sirovine koji se koristi za proces fermentacije te o uvjetima provođenja fermentacije. Sintetiziraju ga kvasci, najčešće *S. cerevisae*. Odlikuje ga ugodan miris na ruže, a koncentracija u destilatima ovisi o provođenju procesa destilacije (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Feniletanol je detektiran samo u destilatima Bistrice (slika 19). Destilacijom spontano prefermentirane komine Bistrice spoj se koncentrirao u prvijencu, dok je u destilatima dobivenim iz dirigitano prefermentirane komine Bistrice prisutan i u srcu. Budući da je ovaj spoj, za razliku od prefermentiranih komina,

detektiran samo u destilatima moguće je da se u prefermentiranim kominama nalazi u vrlo niskim koncentracijama, ispod praga detekcije.

4.2.2.2. Esteri

a) Etil acetat

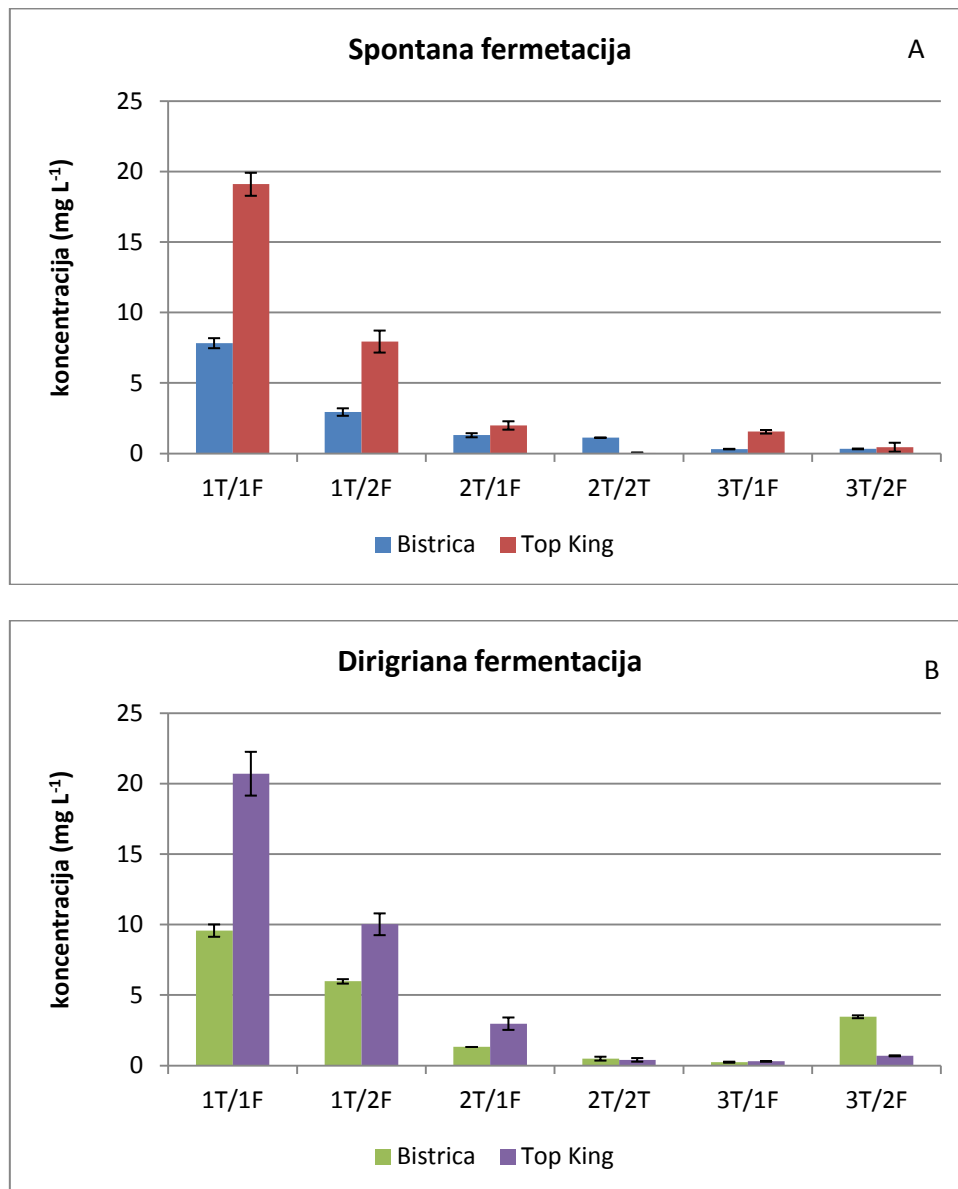


Slika 20. Usporedba koncentracija etil acetata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.

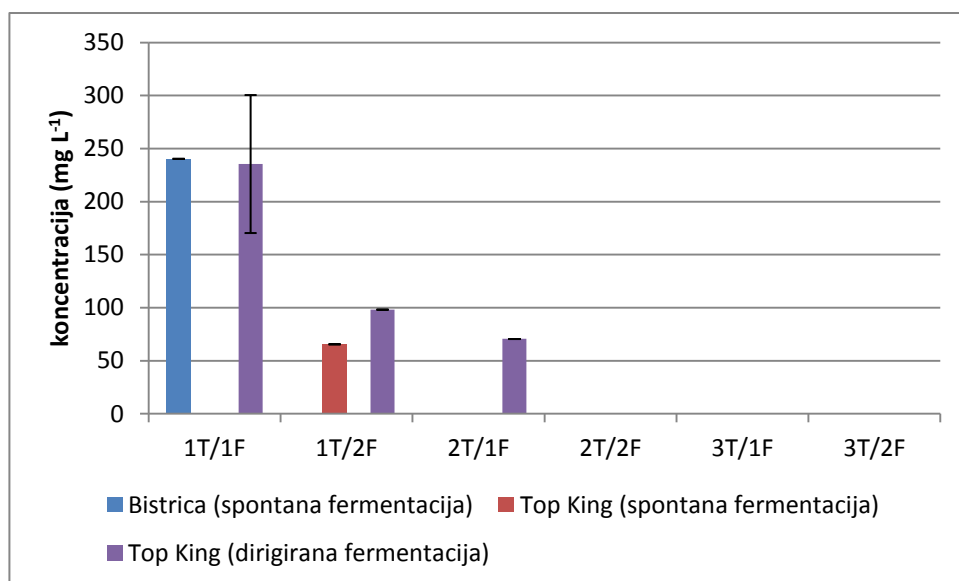
Esteri su skupina spojeva koji doprinose aromi rakije. Njihova koncentracija i međusobni omjeri su od velike važnosti za okusa a doprinose i ugodnim, voćnim i cvjetnim mirisom (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

Jedan od glavnih predstavnika estera je acetatni ester, etil acetat, koji u većoj mjeri nastaje djelovanjem aerobnih bakterija octene kiseline (Tsakiris i sur., 2014). Sadržaj etil acetata u rakijama se povećava tijekom procesa starenja (odležavanja). Najviša koncentracija etil acetata izmjerena je u destilatu prvoga toka (prve frakcije) spontano prefermentirane komine Bistrice (slika 20, A) i destilatu prvoga toka (prve frakcije) dirigirano prefermentirane komine Top King (slika 20, B). U destilatu drugog toka dobiven iz spontano i dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice izmjerena je viša koncentraciju ovoga estera u odnosu na koncentraciju u destilatu drugoga toka šljive Top King. U malim koncentracijama doprinosi ugodnom mirisu dobivenih destilata, dok pri višim može uzrokovati oštar i neugodan miris (Spaho i sur., 2013). Koncentracije izmjerene u destilatima dirigirano prefermentirane komine Bistrice u ovom eksperimentu (23,34-1411,05 mg L⁻¹) viših su vrijednosti u odnosu na koncentracije izmjerene u rakiji proizvedene destilacijom dirigirano prefermentirane komine Bistrice u radu Kostik i suradnika (2013) (51-404 mg L⁻¹). Koncentracija etil acetata u destilatima srca spontano prefermentirane komine Top King (62,45-121,82 mg L⁻¹) u ovom eksperimentu je niža od koncentracije u destilatu šljive Top u radu autora Tupajić i suradnici (2006) koja je iznosila 625 mg L⁻¹. Koncentracije etil acetata u destilatima sva tri toka dirigirano prefermentirane komine Bistrice u ovome eksperimentu (0-1411,05 mg L⁻¹) su nižih vrijednosti u odnosu na koncentracije navedene u radu Spaho i suradnici (2013) koji su u rasponu od 24-13822 mg L⁻¹ za tri toka destilata.

b) Etil heksanoat i dietil sukcinat



Slika 21. Usporedba koncentracija etil heksanoata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigitano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.



Slika 22. Usporedba koncentracija dietil sukcinata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom spontano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King te dirigirano prefermentirane komine šljive Top King.

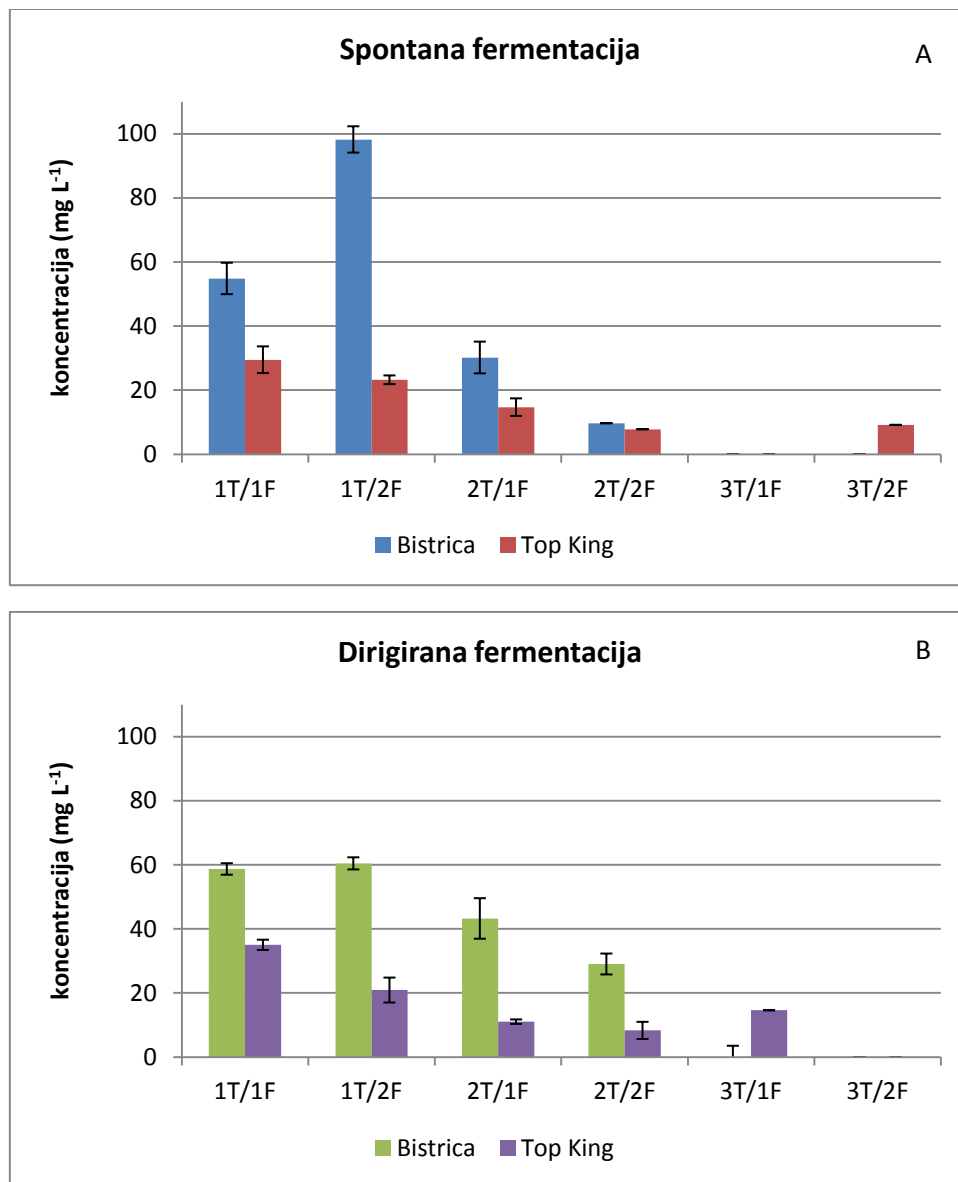
Etil esteri masnih kiselina nastaju kao rezultat reakcije etanola i prekursora zasićenih monokarbonskih kiselina. Etil heksanoat karakterizira ugodan miris jabuke ili banane (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

Najviše vrijednosti spoja su izmjerene u prvijencu Top King za oba procesa fermentacije (slika 21). U destilatu prve frakcije drugog toka spontano i dirigirano prefermentirane komine šljive Top King izmjerene su veće koncentracije etil heksanoata u odnosu na prvu frakciju drugog toka šljive Bistrice. No u destilatu srednjeg toka (druga frakcija) spontano i dirigirano prefermentirane komine viša koncentracija estera je izmjerena u rakiji šljive Bistrice. Prema literaturnim navodima autora Christoph i Bauer-Christoph (2007) koncentracija etil heksanoata bi trebala biti u rasponu od 0,4-3,2 mg L⁻¹ dok je u ovome radu koncentracija estera izmjerena u destilatima obje sorte šljiva kod oba procesa fermentacije znatno viša.

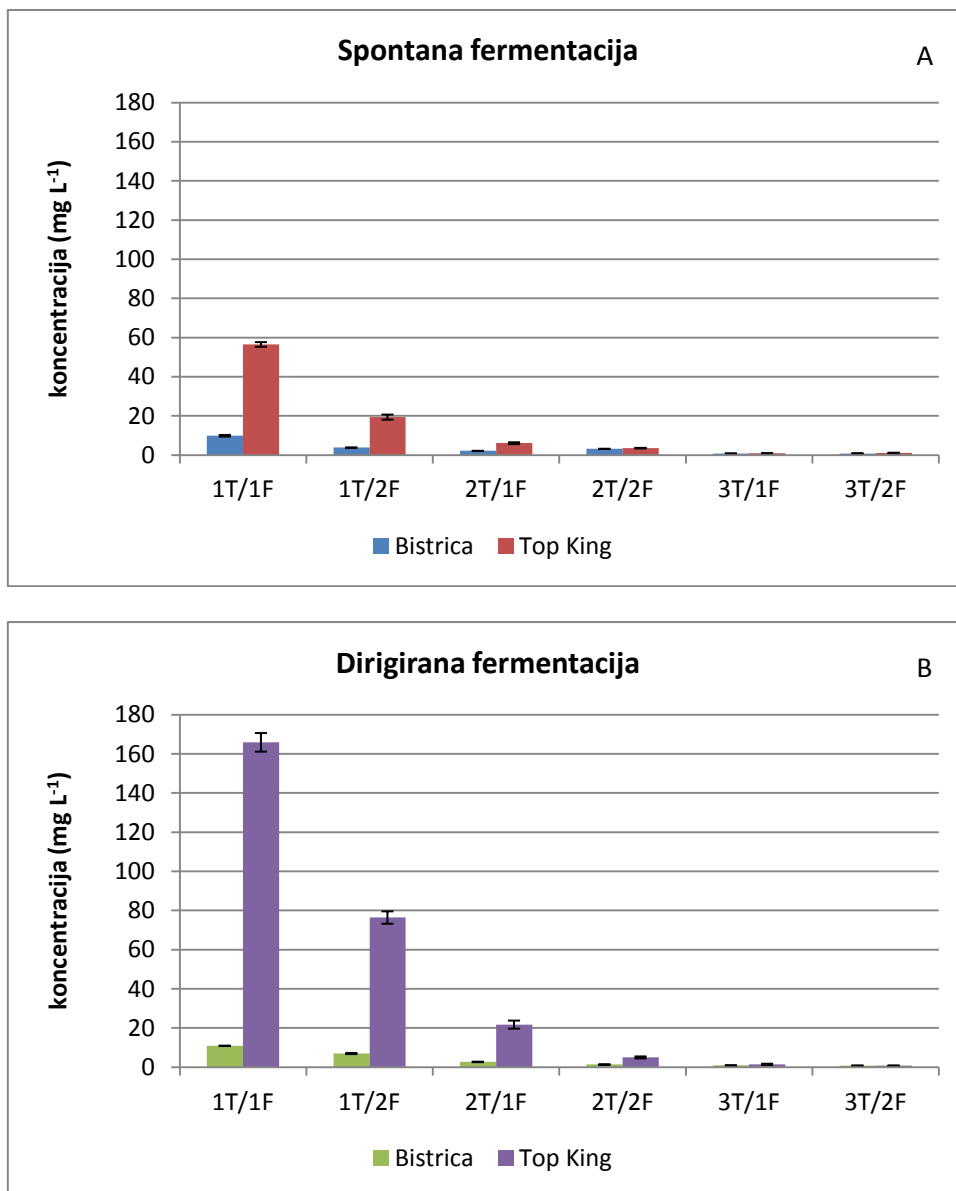
Dietil sukcinat je detektiran u destilatima spontano prefermentirane komine prvog toka šljive Bistrice i Top King, a u destilatima dirigirano prefermentirane komine samo u prvom i drugom toku šljive Top King kako je prikazano na slici 22. Christoph i Bauer-Christoph (2007) navode da bi vrijednosti spoja trebale biti u rasponu od 2-12 mg L⁻¹, što je znatno niže od koncentracije dietil sukcinata izmjerene u destilatima Bistrice i Top King, oba procesa fermentacije u ovome radu. Dietil sukcinat, kao i feniletanol, nije detektiran niti kod jednog

uzorka prefermentiranih komina, a detektiran je u prvijecu i srcu obje sorte . Može se pretpostaviti da su koncentracije ovog spoja u prefermentiranim kominama bile ispod granica detekcije, a destilacijom je došlo do njegova koncentriranja ili je tijekom stajanja komine došlo do naknadne sinteze ovog spoja djelovanjem bakterija.

c) 2-feniletil acetat i izoamil acetat



Slika 23. Usporedba koncentracija 2- feniletil acetata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigrano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.



Slika 24. Usporedba koncentracija izoamil acetata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.

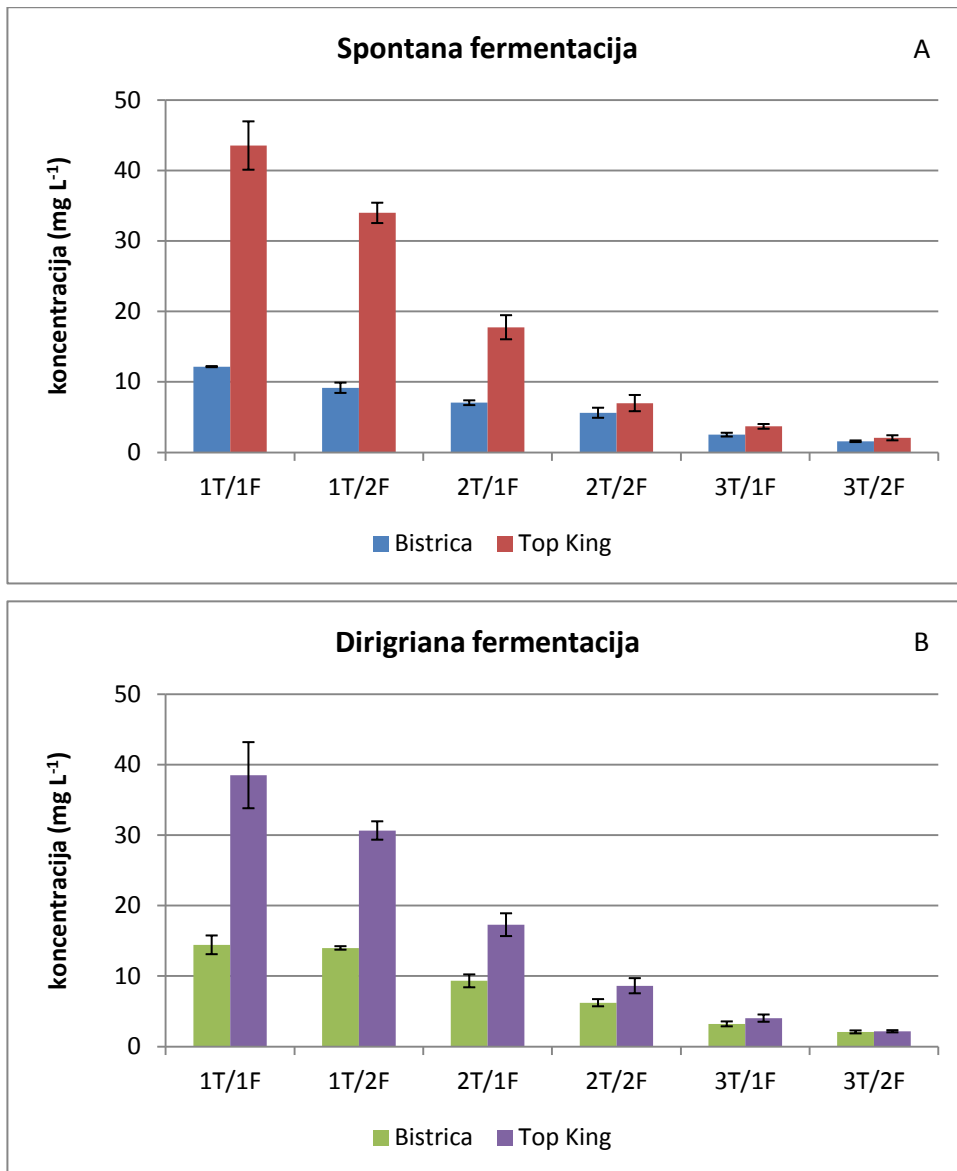
2-fenietil acetat karakterizira miris meda i ruže, a izoamil acetat miris voća, banane i kruške. Procesom starenja rakije podložni su hidrolizi pa im se smanjuje koncentracija.

Prosječna koncentracija 2-fenietil acetata u voćnim rakijama je 4-12 mg L⁻¹ (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Destilati svih tokova dobiveni iz prefermentirane komine šljive Top King imaju više vrijednosti spoja u odnosu na koncentraciju spoja izmjerenu u destilatima dobivenima iz prefermentirane komine šljive Bistrice (slika 23). U destilatu zadnjeg, trećeg toka spontane fermentacije šljive Bistrice 2-fenietil acetat nije

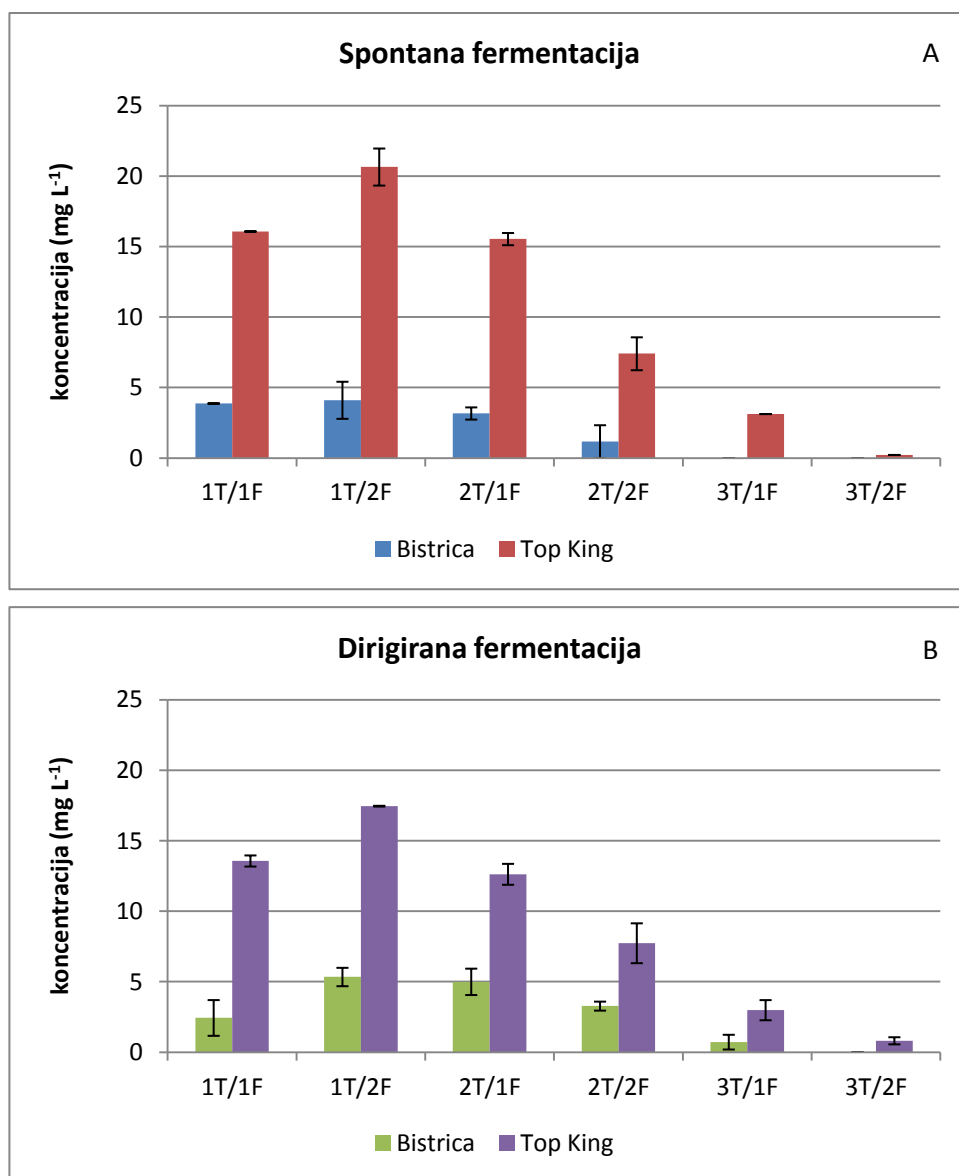
detektiran dok u destilatima šljive Top King nije detektiran u prvoj frakciji trećeg toka spontane fermentacije i drugog frakciji trećeg toka dirigitane fermentacije.

Autori Christoph i Bauer-Christoph (2007) navode da bi koncentracija izoamil acetata u voćnim rakijama trebala biti 1,2-12 mg L⁻¹. Te vrijednosti odgovaraju rasponu koncentracija spoja izmjerene u destilatima spontano (0,78-9,91 mg L⁻¹) i dirigitano prefermentirane komine Bistrice (0,77-10,91) dok koncentracije navedenog estera u destilatima spontano (0,83-56,54 mg L⁻¹) i dirigitano prefermentiranih komina Top King (0,77-165,92 mg L⁻¹) su više (slika 24). U destilatima srca viša koncentracija spoja je izmjerena kod šljive Top King u odnosu na destilat srca Bistrice u oba procesa fermentacije.

d) Etil oktanoat i etil dekanolat



Slika 25. Usporedba koncentracija etil oktanoata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.



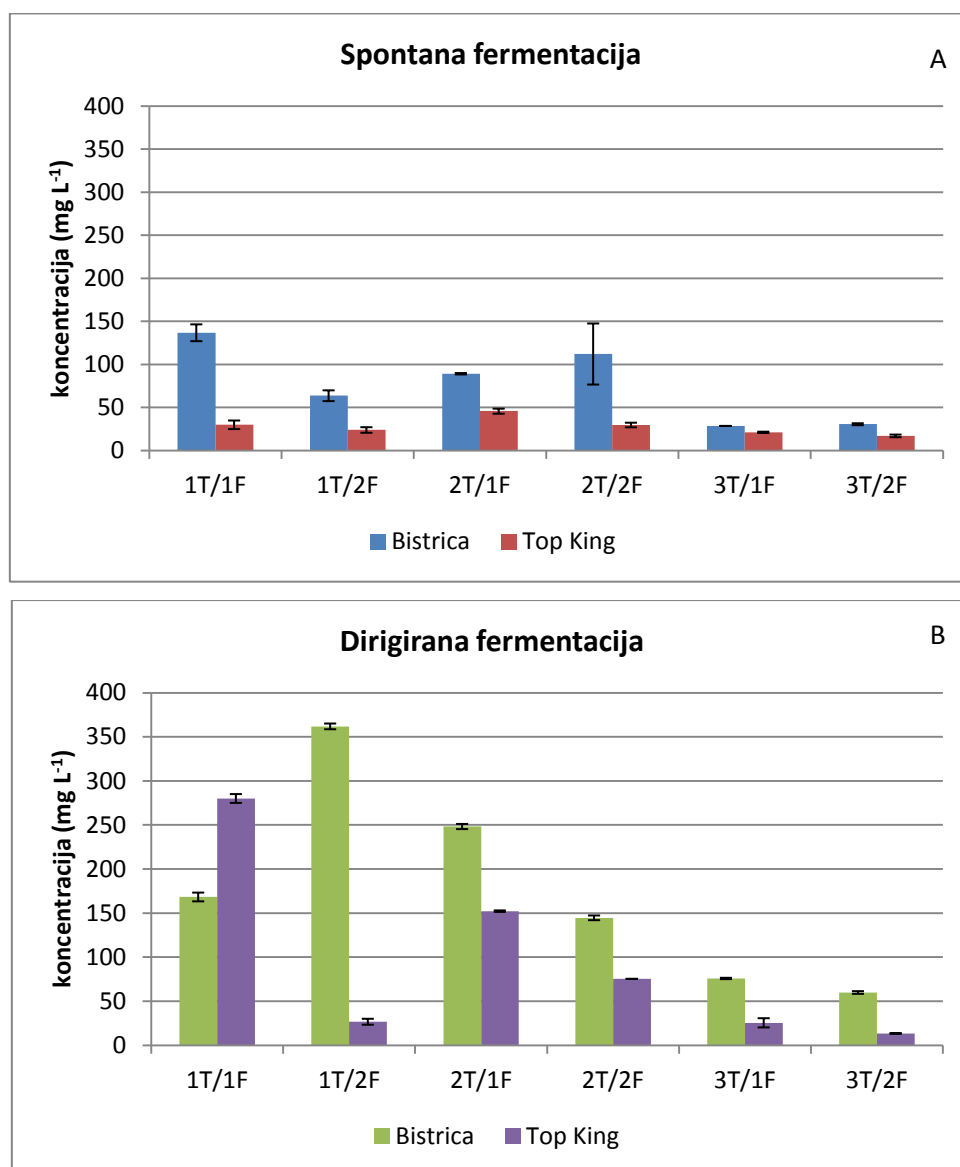
Slika 26. Usporedba koncentracija etil dekanooata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.

Etil oktanoat je ester od velike važnosti za okus voćnih rakija te destilatima daje ugodan miris koji podsjeća na ananas. Uz etil oktanoat, etil dekanooat je među alifatskim esterima najznačajniji ester koji nastaje reakcijom između etanola i masnih kiselina, mirisa ruže (Grba, 2009). Najviše koncentracije etil oktanoata (slika 25) i etil dekanooata (slika 26) izmjerene su u destilatima prvoga toka (prvijenca) spontano i dirigirano prefermentiranih komina Top King. Također koncentracija spoja u destilatima drugog toka (srca) šljive Top King oba procesa fermentacije viših su vrijednosti u odnosu na koncentracije izmjerene u destilatima drugog toka (srca) šljive Bistrice. Autori Christoph i Bauer-Christoph (2007)

navode koncentraciju etil oktanoata u rasponu 4 do 20 mg L⁻¹ te etil dekanoata od 4 do 36 mg L⁻¹. Koncentracije izmjerene u destilatima srca sorte šljive Bistrice i Top King kod oba procesa fermentacije odgovaraju navodima u literaturi (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Iako je etil dekanoat detektiran samo u spontano fermentiranoj komini Bistrice, navedeni ester koncentrirao se tijekom destilacije kod obje sorte šljive ali u većim koncentracijama u destilatima Top King. Zbog viših koncentracija ovih spoja u destilatima srca koji su poželjni u voćnim destilatima, aromatičnija i kvalitetnija rakija je dobivena destilacijom prefermentirane komine šljive Top King.

4.2.2.3. Karbonilni spojevi

a) Acetaldehid



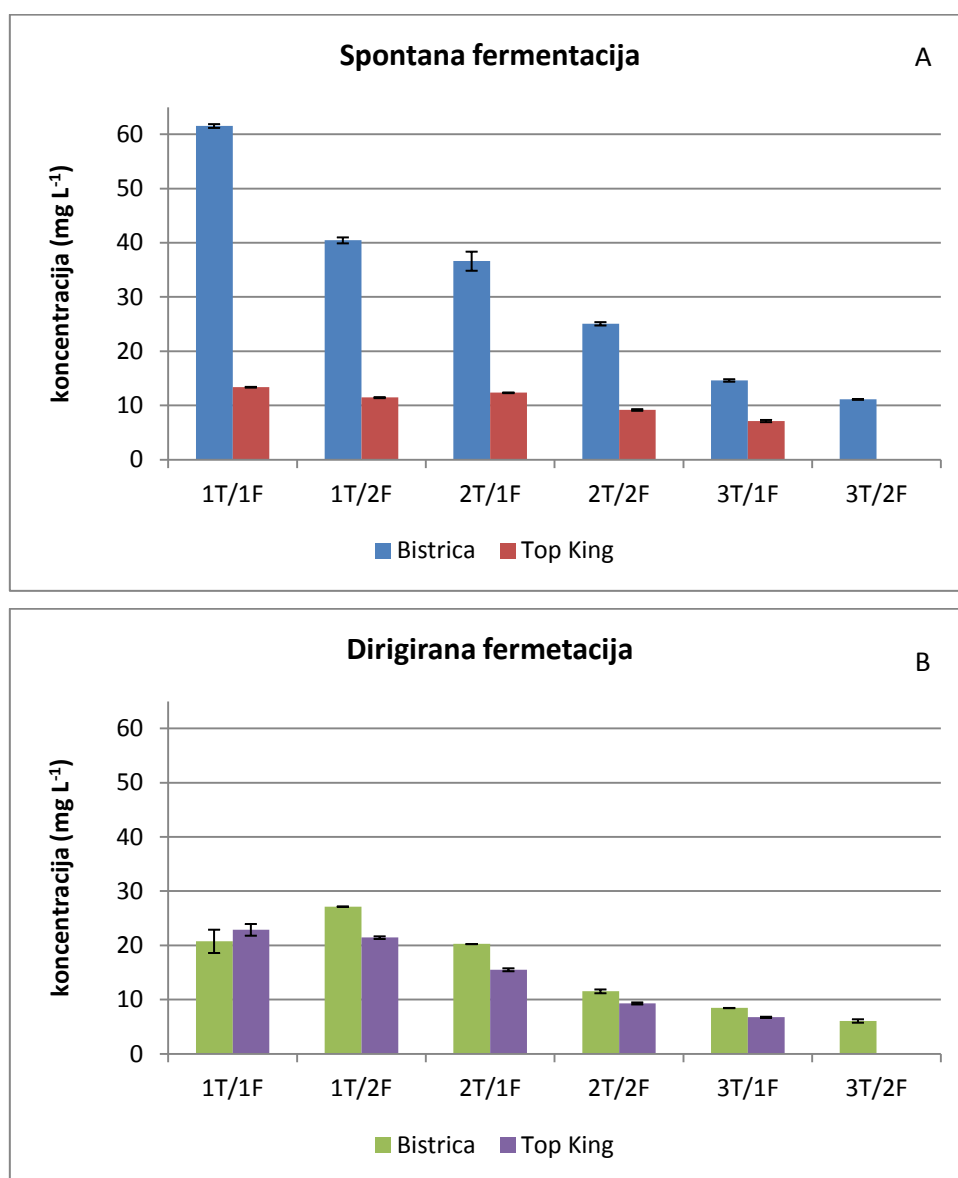
Slika 27. Usporedba koncentracija acetaldehida u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigirano prefermentirane komine šljive Bistrice i Top King.

Acetaldehid je hlapljiva komponenta koja u nižim koncentracijama daje ugodnu voćnu aromu dok pri višim može uzrokovati neugodan miris destilata. Prosječna koncentracija ovog spoja u voćnim rakijama je 2-160 mg L⁻¹ (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

Dobivena koncentracija acetaldehida prisutnog u destilatima prikazana je na slici 27. Najviša koncentracija acetaldehida je izmjerena u destilatima prvoga toka (prvijenca)

dobivenima iz dirigitano prefermentiranih komina Bistrice i Top King kao što je prikazano na slici 27 (B). U drugom toku (srcu), destilatu koji se koristi za konzumaciju, veće koncentracije spoja su prisutne u destilatu dobivenom iz prefermentirane komine šljive Bistrice obje fermentacije u odnosu na destilate dobivene iz prefermentirane komine Top King (slika 27, A i B). Vrijednost acetaldehida u rakiji dobivenoj od spontano prefermentirane komine šljive sorte Top (konc. 131 mg L^{-1}) na 20°C u radu Tupajić i suradnici (2006) je viša u odnosu na rezultate za destilate dobivene iz spontano prefermentirane komine šljive Top King u ovome radu ($17,07\text{-}45,76 \text{ mg L}^{-1}$).

b) Diacetil



Slika 28. Usporedba koncentracija diacetila u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom: A- spontano te B- dirigirano prefermentirane kominе šljive Bistrice i Top King.

Kvasac *S. cerevisae* reducira diacetil u acetoin. Zbog toga koncentracija acetoina ovisi o koncentraciji diacetila u voćnim kominama tijekom procesa fermentacije. Tijekom provođenja spontanog procesa fermentacije koncentracija acetoina je viših vrijednosti zbog nekontroliranog procesa, dok je kod dirigirane fermentacije djelovanjem *S. cerevisae* koncentracija niža (Satora i Tuzynski. 2010).

Ta razlika je jasno vidljiva na destilatima dobivenima iz spontano i dirigirano prefermentiranih kominа šljive Bistrice, dok kod destilata Top king ta razlika nije vidljiva

(slika 28, A i B). U prvijencu su prisutne najviše koncentracije spoja u destilatima spontano prefermentirane komine šljive Bistrice (40,46-61,55 mg L⁻¹). Christoph i Bauer-Christoph (2007) navode raspon poželjnih koncentracije diacetila u voćnim rakija 0,1-12 mg L⁻¹ što je manje u odnosu na koncentracije spoja u destilatima srca dobivenima iz spontano prefermentirane komine šljive Top King u ovom radu. U većim količinama diacetil može uzrokovati neugodan miris po maslacu u voćnim rakijama. Zbog niskih vrijednosti koncentracija ovog spoja (< 12,35 mg L⁻¹) u odnosu na ostale destilate Bistrice kvalitetniji destilati dobiveni su iz spontano prefermentirane komine šljive Top King.

Proizvodnja šljiva u Republici Hrvatskoj, unatoč vrlo povoljnim ekološkim uvjetima i bogatoj tradiciji, kontinuirano se smanjuje. Stoga je neophodna njezina temeljita revitalizacija. Najviše se koristi sorta Bistrica, podložna neizlječivom virusu šarke. Revitalizacija proizvodnje šljive moguća je jedino uvođenjem novih otpornijih sorti, kao što je Top King. U ovome radu ispitana je kvaliteta dobivene voćne rakije od šljive Top King alkoholnom fermentacijom pri različitim uvjetima te jednokratnom destilacijom u laboratorijskom bakrenom kotlu. Sorta Bistrica korištena je za usporedbu. Rezultati su pokazali da se ova nova sorta može koristiti za proizvodnju jednako kvalitetne rakije šljivovice, tradicionalne hrvatske voćne rakije. Stoga je doprinos ovoga rada daljnje poticanje uzgoja, istraživanja i prerade novih sorti šljiva.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih eksperimenata, dobivenih i obrađenih rezultata te proučene znanstvene literature mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. U prefermentiranim kominama šljiva sorte Top King izmjeren je manji prinos alkohola u odnosu na prefermentirane komine šljiva sorte Bistrica, unatoč višoj koncentraciji šećera u plodu šljive Top King, najvjerojatnije zbog težeg oslobađanja soka iz plodova ove sorte.
2. Dobivene vrijednosti metanola u destilatima obje sorte zadovoljavaju uvjete maksimalne količine metanola u rakijama od voćnih komina prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN61/09).
3. Viši alkoholi propanol, izobutanol i izoamil alkohol prisutni su u višim koncentracijama u drugom toku destilata šljive sorte Top King u odnosu na drugi tok destilata šljive sorte Bistrice dok je 1-heksanol prisutan u višim koncentracijama u destilatu šljive sorte Bistrice.
4. Na osnovu koncentracije karbonilnih spojeva, acetaldehida i diacetila, u drugom toku destilata šljive sorte Top King u odnosu na sortu Bistricu, kvalitetnija rakija dobivena je od sorte šljive Top King.
5. Koncentracije estera izoamil acetata, etil heksanoata, etil oktanoata i etil dekanoata su veće u destilatima šljive sorte Top King nego u destilatima šljive sorte Bistrice za razliku od etil acetata i 2-fenietil acetata čije koncentracije su više u destilatima šljive sorte Bistrice.
6. Budući da je aromatičnija rakija dobivena destilacijom iz prefermentirane komine šljive sorte Top King potrebno je provesti daljnja istraživanja mogućnosti prerade ove, nove sorte šljive.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2016) Proizvodnja jakih alkoholnih pića, <<https://sr.scribd.com/doc/78021863/Jaka-Alkoholna-Pica>> Pristupljeno 11. travnja 2016.

Anonymous 2 (2016) Šljiva, <<https://hr.wikipedia.org/wiki/%C5%A0ljiva>>. Pristupljeno 4. travnja 2016.

Anonymous 3 (2016) Izbor soorata šljive, <http://pinova.hr/hr_HR/bazaznanja/vocarstvo/vocne-vrste/sljiva/izbor-sorata-sljive>. Pristupljeno 4. travnja 2016.

Anonymous 4 (2016) Stare hrvatske voćke, <<http://www.starehrvatskevocke.com/sljiva.html?start=90>> Pristupljeno 4. travnja 2016.

Apostolopoulou, A. A., Flouros, A. I., Demertzis, P. G., Akrida-Demertzi, K. (2005) Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. *Food Control* **16**, 157–164.

Banić, M. (2006) Rakije, whisky i liker, *Gospodarski list*, Zagreb, str. 70-78.

Bozhkova, V. (2014) Chemical composition and sensory evaluation of plum fruits. *Trakya University Journal of Natural Sciences* **15**, 31-35.

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

Fleet, G. H. (2003) Yeast in fruit and fruit products. U: *Yeast in food* (Boekhout, T., Robert, V., ured.) Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 267-287.

Galović, S. (2004) Šljivarstvo i prirodna šljivovača, ŽELJA-PRINT, Osijek.

Grba, S. (2009) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Plejada d.o.o., Zagreb.

Guymon, J. F. (2009) Chemical Aspects of Distilling Wines into Brandy. U: *Chemistry of Winemaking* (Dinsmoor Webb, A., ured.) American Chemical Series, Washington, D. C., str. 232-253.

Jović, S. (2006) Priručnik za spravljanje rakije, Partenon, Beograd.

Kostik, V., Memeti, S., Bauer, B. (2013) Gas-chromatographic analysis of some volatile congeners in different types of strong alcoholic fruit spirits. *Journal of Hygienic Engineering and Design* **4**, 98-102.

Kovačević Ganić, K., Staver, M., Pršurić, Đ., Banović, M., Komes, D., Gracin, L. (2003) Influence of Blending on the Aroma of Malvasia Istriana Wine. *Food Technol. Biotechnol.* **41**, 305-314.

Kozina, B., Penavin, K. (2004) *Vino A – Ž*, Naklada Zadro, Zagreb.

Kretschmar, H. (1955) *Hefe und alcohol*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 579-600.

Kristl, J., Slekoves, M., Tojnko, S., Unuk, T. (2011) Extractable antioxidants and non extractable phenolics in the total antioxidant activity of selected plum cultivars (*Prunus domestica L.*): Evolution during on-tree ripening. *Food Chemistry* **125**, 29-32.

Lučić, R. (1986) *Proizvodnja jakih alkoholnih pića*, Nolit, Beograd.

Miličević, B., Lukić, I., Babić, J., Šubarić, D., Miličević, R., Ačkar, Đ., Miličević, D. (2012) Aroma and sensory characteristics of Slavonian plum brandy. *Technologica acta* **5**, 1-7.

Mrvčić, J. (2016) *Voćne, žitne i šećerne rakije*. <www.pbf.hr>. Pristupljeno 6. travnja 2016.

Nikićević, N., Tešević, V. (2010) *Proizvodnja voćnih rakija vrhunskog kvaliteta*, NIK-PRESS, Beograd.

Nout, M.J.R. (2014) Food technologies: Fermentation. *Encyclopedia of Food Safety* **3**, 168-177.

Pool, C.F. (2003) *Essence of chromatography*. Elsevier Inc., Amsterdam, Nizozemska.

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

Rouessac, F., Rouessac, A. (2007) *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, 2. Izd. (preveli Rouessac, F. i sur.), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

Rusu Coldea, T.E., Socaciu, C., Pârv, M., Vodnar, D. (2011) Gas-Chromatographic Analysis of Major Volatile Compounds Found in Traditional Fruit Brandies from Transylvania, Romania. *Not. Bot. Horti. Agrobi.* **39**, 109-116.

Sádecká, J., Jakubíková, M., Májek P., Kleinová A. (2015) Classification of plum spirit drinks by synchronous fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry* **196**, 783-790.

Satora, P., Tuszynski, T. (2010) Influence of indigenous yeasts on the fermentation and volatile profile of plum brandies. *Food Microbiology* **27**, 418-424.

Satora, P., Tuszynski, T., Tomczyk E. (2010) Enological profile of *Saccharomyces cerevisiae* yeast isolated from fermenting plum mashes. *Acta. Sci. Pol., Technol. Aliment.* **9**, 33-44.

Satora, P., Drozd, P., Sroka, P., Tarko, T. (2013) The composition of selected volatile compounds in fermented mashes obtained from different varieties of plums. *Potravinarstvo* **7**, 218-221.

Spaho, N., Durr, P., Grba, S., Velagić-Habul, E., Blesić, M. (2013) Effects of distillation cut on the distribution of higher alcohols and esters in brandy produced from three plum varieties. *J. Inst. Brew.* **119**, 48-56.

Tešević, V., Nikićević, N., jovanović, A., Djoković, D., Vujisić, Lj., Vučković, I., Bonić, M. (2005) Volatile Components from Old Plum Brandies. *Food Technol. Biotechnol.* **43**, 367-372.

Trajković, J., Baras, J., Mirić M., Šiler, S. (1983) Analize životnih namirnica, Tehnološko Metalurški fakultet, Beograd, str. 115-152.

Tsakiris, A., Kallithraka, S., Kourkoutas, Y. (2014) Grape brandy Production, Composition and Sensory evaluation. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 404-414.

Tupajić, P., Čmelik, Z., Družić J. (2006) Kakvoća rakija proizvedenih od šljive (*Prunus domestica*) kultivara Elena, Top i Felsina. *Promologia Croatica* **12**, 263-270.

Uroš, D. M., Puškaš, V. S. (2014) Influence of fermentation conditions on production of plum (*Prunus domestica* L.) wine: A response surface methodology approach. *Hem. Ind.* **68**, 199-206.

Vidrih, R., Hribar, J. (1999) Synthesis of higher alcohols during cider processing. *Food Chem.* **67**, 287-294.

Voća, S., Galić, A., Šindrak, Z., Dobričević, N., Pliestić, S., Družić, J. (2009) Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Three Plum Cultivar. *Agriculturae Conspectus Scientifi. Cus.* **74**, 273-276.

Winterová, R., Mikulíková, R., Mazáč, J., Havelec, P. (2008) Assessment of the Authenticity of Fruit Spirits by Gas Chromatography and Stable Isotope Ratio Analyses. *Czech J. Food Sci.* **26**, 368-375.

Zhang, H., Woodams, A., Hang, Y. D. (2012) Factors Affecting the Methanol Content and Yield of Plum Brandy. *J. Foods Sci.* **77**, 79-82.

7. PRILOZI

Prilog I. Popis i priprema korištenih otopina u eksperimentalnom dijelu rada.

➤ **Carrez I otopina**

- 15% otopina kalij-heksacijanoferata (g/v); 15 g $K_4(Fe(CN)_6) \times 3 H_2O$ otopi se i nadopuni do oznake 100 mL destiliranom vodom.

➤ **Carrez II otopina**

- 30% otopina cink sulfata (g/v); 30 g $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ otopi se i nadopuni do 100 mL destiliranom vodom.

➤ **Luff-ova otopina**

-25 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$ otopi se u 100 mL destilirane vode. 50 g limunske kiseline otopi se u 200 ml destilirane vode. U 400 mL zagrijane vode (40-50°C) doda se 143,7 g bezvodnog natrijevog karbonata. Pusti se da se ohladi na 20°C. U odmjernu tikvicu od 1000 mL ulije se prvo otopina bezvodnog natrijevog karbonata te se vrlo polagano i uz oprezno miješanje doda otopina limunske kiseline. Miješa se dok sav CO_2 ne izađe te se doda otopina bakrovog sulfata i nadopuni destiliranom vodom do 1000 mL. Ostavi se da stoji preko noći te sutradan filtrira. Filtrirana otopina je dobra za duži period korištenja ako je dobro zatvorena.

➤ **30% otopina KI (g/v)**

- 30 g KI se otopi i nadopuni destiliranom vodom do oznake 100 mL.

➤ **25% H_2SO_4**

- 180 mL H_2SO_4 za 1 L.

➤ **1% otopina škroba**

- 1 g škroba na 100 mL zagrije se do vrenja i kuha 1 minutu.

➤ **30% KOH (g/g)**

- 30 g KOH se otopi i nadopuni destiliranom vodom do oznake 100 mL.

➤ **Otopina fenolftaleina**

- 0,1% otopina fenolftaleina u 60% otopini etanola.

➤ **Kalijev bikromat**

- 0,2 mol L^{-1} ; 45 g kalijeva bikromata se otopi u 500 ml destilirane vode u tikvici od 1 L i sa koncentriranom H_2SO_4 se nadopuni do oznake.

➤ **Natrijev tiosulfat**

- 0,1 mol L^{-1} ; titrival otopina poznate koncentracije se otopi u 1 L kako bi se dobila koncentracija od 0,1 mol L^{-1} .

➤ **2%-tna otopina škroba**

- otopi se 2 g škroba u 100 ml destilirane vode te se prokuha.

➤ **Alkalna voda**

- pripremi se 1 mol otopina NaOH te se doda 1,5 mL te otopine u 100 mL destilirane vode, nadopuni se do oznake.

Prilog II. Postupak za razrjeđenje uzorka za određivanje koncentracije šećera metodom po Luff-Schoorlu.

Pretpostavljena količina šećera (g L⁻¹)	Razrjeđenje	Faktor razrjeđenja
0-8	Direktno	1
8-20	1:2,5	2,5
20-40	1:5	5
40-100	1:10	10
100-180	1:25	25
180-360	1:50	50

Prilog III. Izračunavanje sadržaja invertnog šećera.

ml 0,1 N Na ₂ S ₂ O ₃	mg invertnog šećera	ml 0,1 N Na ₂ S ₂ O ₃	mg invertnog šećera	ml 0,1 N Na ₂ S ₂ O ₃	mg invertnog šećera	ml 0,1 N Na ₂ S ₂ O ₃	mg invertnog šećera
0,1	0,24	4,0	9,70	8,0	19,80	12,0	30,30
0,2	0,48	4,1	9,95	8,1	20,06	12,1	30,57
0,3	0,72	4,2	10,20	8,2	20,32	12,2	30,84
0,4	0,96	4,3	10,45	8,3	20,58	12,3	31,11
0,5	1,20	4,4	10,70	8,4	20,84	12,4	31,38
0,6	1,44	4,5	10,95	8,5	21,10	12,5	31,65
0,7	1,68	4,6	11,20	8,6	21,36	12,6	31,92
0,8	1,92	4,7	11,45	8,7	21,62	12,7	32,19
0,9	2,16	4,8	11,70	8,8	21,88	12,8	32,46
		4,9	11,95	8,9	22,14	12,9	32,73
1,0	2,40	5,0	12,20	9,0	22,40	13,0	33,00
1,1	2,64	5,1	12,45	9,1	22,66	13,1	33,27
1,2	2,88	5,2	12,70	9,2	22,92	13,2	33,54
1,3	3,12	5,3	12,95	9,3	23,18	13,3	33,81
1,4	3,36	5,4	13,20	9,4	23,44	13,4	34,08
1,5	3,60	5,5	13,45	9,5	23,70	13,5	34,35
1,6	3,84	5,6	13,70	9,6	23,96	13,6	34,62
1,7	4,08	5,7	13,95	9,7	24,22	13,7	34,89
1,8	4,32	5,8	14,20	9,8	24,48	13,8	35,16
1,9	4,56	5,9	14,45	9,9	24,74	13,9	35,43
2,0	4,80	6,0	14,70	10,0	25,00	14,0	35,70
2,1	5,04	6,1	14,95	10,1	25,26	14,1	35,98
2,2	5,28	6,2	15,20	10,2	25,52	14,2	36,26
2,3	5,52	6,3	15,45	10,3	25,78	14,3	36,54
2,4	5,76	6,4	15,70	10,4	26,04	14,4	36,82
2,5	6,00	6,5	15,95	10,5	26,30	14,5	37,10
2,6	6,24	6,6	16,20	10,6	26,56	14,6	37,38
2,7	6,48	6,7	16,45	10,7	26,82	14,7	37,66
2,8	6,72	6,8	16,70	10,8	27,08	14,8	37,94
2,9	6,96	6,9	16,95	10,9	27,34	14,9	38,22
3,0	7,20	7,0	17,20	11,0	27,60	15,0	38,50
3,1	7,45	7,1	17,46	11,1	27,87	15,1	38,78
3,2	7,70	7,2	17,72	11,2	28,14	15,2	39,06
3,3	7,95	7,3	17,98	11,3	28,41	15,3	39,34
3,4	8,20	7,4	18,24	11,4	28,68	15,4	39,62
3,5	8,45	7,5	18,50	11,5	28,95	15,5	39,90
3,6	8,70	7,6	18,76	11,6	29,22	15,6	40,18
3,7	8,95	7,7	19,02	11,7	29,49	15,7	40,46
3,8	9,20	7,8	19,28	11,8	29,76	15,8	40,74
3,9	9,45	7,9	19,54	11,9	30,03	15,9	41,02

ml 0,1 N Na₂S₂O₃	mg invertnog šećera	ml 0,1 N Na₂S₂O₃	mg invertnog šećera	ml 0,1 N Na₂S₂O₃	mg invertnog šećera	ml 0,1 N Na₂S₂O₃	mg invertnog šećera
16,0	41,30	17,0	44,20	18,0	47,10	19,0	50,00
16,1	41,59	17,1	44,49	18,1	47,39	19,1	50,30
16,2	41,88	17,2	44,78	18,2	47,68	19,2	50,60
16,3	42,17	17,3	45,07	18,3	47,97	19,3	50,90
16,4	42,46	17,4	45,36	18,4	48,26	19,4	21,20
16,5	42,75	17,5	45,65	18,5	48,55	19,5	21,50
16,6	43,04	17,6	45,94	18,6	48,84	19,6	51,80
16,7	43,33	17,7	46,23	18,7	49,13	19,7	52,10
16,8	43,62	17,8	46,52	18,8	19,42	19,8	52,40
16,9	43,91	17,9	46,81	18,9	19,71	19,9	52,70