

Kvaliteta rakije loze proizvedene pri različitim uvjetima fermentacije od sorte grožđa Izabela

Banović, Nevenka

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:301309>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Nevenka Banović

663/PI

**KVALITETA RAKIJE *LOZE*
PROIZVEDENE PRI RAZLIČITIM
UVJETIMA FERMENTACIJE OD
SORTE GROŽĐA IZABELA**

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 izv.prof.dr.sc. Jasni Mrvčić na pomoći, savjetima i strpljenju pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Leu Gracin na ukazanoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem mag.ing. Karli Hanousek Čiča i dipl.ing. Steli Križanović na pomoći oko eksperimentalnog dijela rada te ugodne radne atmosfere.

Zahvaljujem bratu, sestri i dečku na pruženoj ljubavi, podršci i razumijevanju.

Najveću zahvalu dugujem svojoj najvjernijoj potpori, roditeljima. Veliko vam hvala na financijskoj pomoći, strpljenju te bezuvjetnoj ljubavi pruženoj tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

KVALITETA RAKIJE *LOZE* PROIZVEDENE PRI RAZLIČITIM UVJETIMA FERMENTACIJE OD SORTE GROŽĐA IZABELA

Nevenka Banović, 663/PI

Sažetak: *Loza* je voćna rakija koja se proizvodi destilacijom prefermentirane komine grožđa. Cilj ovog rada bio je odrediti kvalitetu rakije *loze* dobivene destilacijom iz prefermentirane komine grožđa sorte Izabela, dobivene alkoholnim fermentacijama vođenim spontano i dirigirano uz inokulaciju s kvascem *Saccharomyces cerevisiae* pri temperaturama 20°C i 30°C. Destilacije su provedene u šaržnom laboratorijskom kotlu uz presijecanje frakcija u kojima je zatim određena koncentracija 16 spojeva sekundarne arome primjenom plinskog kromatografa s plamenoionizacijskim detektorom (GC-FID). Rezultati su pokazali da je za dobivanje kvalitetnije rakije poželjno fermentaciju voditi pri nižoj temperaturi uz inokulaciju selekcioniranim kvascem *Saccharomyces cerevisiae*. Odvajanje 1% volumena prefermentirane komine u prvijenac te presijecanje drugog, glavnog toka destilata pri koncentraciji etanola na izlazu od 40%, pokazalo se kao dobra tehnika destilacije koja rezultira optimalnim koncentracijama hlapivih spojeva u destilatu, a koncentracija metanola, spoja koji se u vinu ove sorte nalazi u povišenim koncentracijama, u sve četiri proizvedene *loze* nalazi se unutar koncentracija propisanih Pravilnikom o jakim alkoholnim pićima.

Ključne riječi: kvaliteta, *loza*, kvasac, destilacija, spojevi arome

Rad sadrži: 79 stranica, 31 sliku, 10 tablica, 55 literaturnih navoda, 5 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. *Izv.prof.dr.sc. Damir Stanzer*
2. *Izv.prof.dr.sc. Jasna Mrvčić*
3. *Doc.dr.sc. Leo Gracin*
4. *Izv.prof.dr.sc. Vlatka Petravić Tominac (zamjena)*

Datum obrane: 25. srpanja 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 SPIRIT *LOZA* PRODUCED IN DIFFERENT FERMENTATION CONDITIONS OUT OF GRAPES OF ISABELLA VARIETY

Nevenka Banović, 663/PI

Abstract: *Loza* is a fruit spirit produced by distillation of fermented grape marc. The aim of this study was to determine the quality of *loza* produced by distillation of fermented grapes of Isabella variety. Alcoholic fermentations were conducted spontaneously and controlled by the inoculation with yeast *Saccharomyces cerevisiae* at temperatures of 20°C and 30°C. Distillations were carried out in batch laboratory distilling copper. The concentration of 16 secondary aroma compounds were determined in obtained distillates using a gas chromatograph with flame ionization detection (GC-FID). Fermentation carried out at lower temperature with inoculation by the selected yeast *Saccharomyces cerevisiae* resulted in spirit with better quality. Separation of 1% of fermented grape marc and cutting off the distillate main flow at 40% ethanol, proved to be a good distillation technique. This technique ensured optimal concentrations of volatile compounds in the distillate. Furthermore, concentrations of methanol, a compound that is found in high concentrations in wine of this grape variety, in all four produced batches of *loza* were within the limits prescribed by regulations.

Keywords: quality, spirit *loza*, yeast, distillation, aroma compounds

Thesis contains: 79 pages, 31 figures, 10 tables, 55 references, 5 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. *Damir Stanzer*, Associate professor
2. PhD. *Jasna Mrvčić*, Associate professor
3. PhD. *Leo Gracin*, Assistant professor
4. PhD. *Vlatka Petravić Tominac*, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 25. July 2016.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA.....	2
2.1.1. Voćne rakije	3
2.2. RAKIJA LOZA	5
2.2.1. Sirovina (grožđe).....	5
2.2.1.1. <i>Sorta grožđa Izabela</i>	5
2.2.2. Tehnološki postupak proizvodnje rakije <i>loze</i>	6
2.2.2.1. <i>Priprema sirovine za proizvodnju rakije (berba i muljanje grožđa)</i>	7
2.2.2.2. <i>Alkoholna fermentacija (vrenje) komine</i>	7
2.2.2.3. <i>Destilacija prefermentirane komine</i>	9
2.2.2.4. <i>Odležavanje, dozrijevanje i završna izrada rakije</i>	11
2.2.3. <i>Spojevi arome rakije loze</i>	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Sirovina	15
3.1.2. Radni mikroorganizam	15
3.1.3. Hranjive mikrobiološke podloge	15
3.1.4. Kemikalije	15
3.1.5. Otopine	16
3.1.6. Aparatura	17
3.2. METODE	18
3.2.1. Postupak proizvodnje rakije <i>loze</i>	18
3.2.1.1. <i>Priprema alkoholne fermentacije</i>	18
3.2.1.2. <i>Alkoholna fermentacija</i>	19
3.2.1.3. <i>Destilacija</i>	19
3.2.1.4. <i>Stabilizacija destilata</i>	21
3.2.2. <i>Određivanje epifitne mikroflore grožđa</i>	21
3.2.3. <i>Analitičke metode</i>	22
3.2.3.1. <i>Određivanje šećera metodom po Luff-Schoorlu</i>	22
3.2.3.2. <i>Određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin-Dietrichu</i>	24
3.2.3.3. <i>Plinska kromatografija</i>	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. TIJEK ALKOHOLNE FERMENTACIJE	28

4.2. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA EPIFITNE MIKROFLORE GROŽĐA	33
4.3. ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA PRISUTNIH U PREFERMENTIRANIM KOMINAMA I U DESTILATIMA	38
4.3.1. Hlapivi spojevi prisutni u prefermentiranim kominama grožđa.....	39
4.3.1.1. <i>Alkoholi</i>	42
4.3.1.2. <i>Esteri</i>	43
4.3.1.3. <i>Karbonilni spojevi</i>	44
4.3.2. Hlapivi spojevi prisutni u destilatima.....	45
4.3.2.1. <i>Alkoholi</i>	46
4.3.2.2. <i>Esteri</i>	57
4.3.2.3. <i>Karbonilni spojevi</i>	69
5. ZAKLJUČCI	74
6. LITERATURA	75
7. PRILOZI	80

1. UVOD

Značajan dio prehrambene industrije, kako u svijetu tako i kod nas, čini proizvodnja jakih alkoholnih pića. U primarnoj proizvodnji, jaka alkoholna pića dobivaju se iz alkoholnih destilata. Upravo zbog toga njihova proizvodnja započela je tek u 11. stoljeću kada je pronađena mogućnost kondenzacije lakše hlapljivih supstanci hlađenjem (Grba, 2010).

S obzirom na različite nacionalne i međunarodne zakonske odredbe, specifikacije, pravila za definiranje i opis te predstavljanje takvih pića, na tržištu se ona svrstavaju u različite kategorije. Prema pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09), rakija *loza* ulazi u kategoriju voćnih rakija koje se dijele ovisno o voću iz kojeg se proizvode. Rakija *loza* je tradicionalno bezbojno alkoholno piće proizvedeno isključivo destilacijom prefermentirane komine grožđa. Destilira se zajedno tekući i kruti sadržaj komine na uređajima za destilaciju ili koloni za destilaciju na kojima je moguća destilacija krutog i tekućeg dijela komine (Pravilnik, 2009). *Loza* posjeduje osebujne senzorske karakteristike koje ju razlikuju od drugih rakija od grožđa (komovica, vinjak). Izravan utjecaj na njezine senzorske karakteristike ima tijek vođenja tehnološkog procesa proizvodnje. Sama sirovina, grožđe, sadrži veliki broj različitih spojeva arome koje rakiji daju sortna obilježja (Mujić, 2010). Značajnu ulogu u formiranju spojeva arome tijekom fermentacije imaju kvasci čija aktivnost ovisi o nizu parametara. Neki od parametara koji utječu na rast i aktivnost kvasca su temperatura vođenja alkoholne fermentacije, kemijski sastav sirovine kao izvora nutrijenata te njihova početna koncentracija. Ukoliko se radi o kontroliranoj odnosno dirigiranoj fermentaciji, formiranje spojeva arome tijekom fermentacije ovisit će i o kvaliteti i osobinama odabrane starter kulture (Fleet, 2003). Tijekom procesa destilacije formira se još nekoliko stotina novih spojeva arome koji se izravno odražavaju na kvalitetu rakije. Destilacija u tradicionalnim bakrenim kotlovima podrazumijeva jednostavno odvajanje tri glavna toka pri čemu srednji tok sadrži najveću količinu hlapivih spojeva koji doprinose organoleptičkim svojstvima destilata. Brzina i pravilno prekidanje tokova destilacije utječe na količinu tih primjesa u rakiji (Silva i sur., 1999). Za određivanje kvalitete jakih alkoholnih pića često primjenjivana metoda je metoda plinske kromatografije (GC) s plamenoionizacijskim detektorom (FID) (Luis i sur., 2011). Ta metoda omogućuje određivanje širokog raspona spojeva odgovornih za organoleptička i senzorska svojstva proizvoda.

Cilj ovog rada će biti određivanje kvalitete rakije *loze* dobivene destilacijom iz prefermentirane komine grožđa sorte Izabela čija je kvaliteta uvjetovana različitim parametrima fermentacije i primijenjene tehnike razdvajanja destilata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA

Jaka alkoholna pića prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) su alkoholna pića namijenjena za ljudsku potrošnju koja imaju posebna senzorska svojstva i koja sadrže minimalno 15% vol. alkohola. Dobivena su izravno destilacijom prirodno prefermentiranih sirovina poljoprivrednog podrijetla ili maceracijom odnosno sličnom preradom bilja u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla.

Proizvodnja jakih alkoholnih pića temelji se na alkoholnoj fermentaciji šećera iz voća odnosno svih biljnih sirovina koje sadrže visok udjel šećera i škroba. Fermentaciji i određenim kemijskim promjenama osim šećera podliježu i drugi sastojci biljnih sirovina. Neki od tih sastojaka su pektin i aminokiseline koje se također nalaze u destilatu (Mujić, 2010).

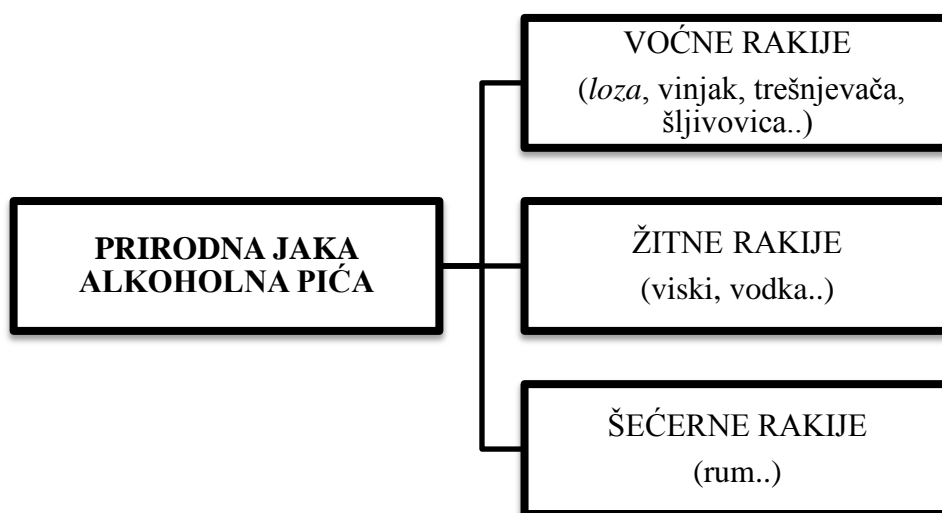
Etilni alkohol koji se koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića i svih njihovih sastojaka mora biti poljoprivrednog podrijetla. Takvom alkoholu se ne smije osjetiti miris i okus drugačiji od onoga koji potječe od upotrijebljenih sirovina, a minimalna alkoholna jakost je 96,0% vol. (Pravilnik, 2009). Dobiven je destilacijom i rektifikacijom prevrelih hranjivih šećernih podloga te od prevrelih komina škrobnih sirovina, u kojima je škrob hidroliziran do fermentabilnih šećera koje kvasci mogu prevreti. Kada se radi o voćnim rakijama, alkohol potječe od direktne destilacije prevrelih komina voća ili vina (Grba, 2010).

Jaka alkoholna pića se s obzirom na način proizvodnje, količini alkohola ili šećera u pićima, ili obzirom na njihovu kvalitetu mogu podijeliti na: prirodna jaka alkoholna pića (npr. konjak, viski), umjetna jaka alkoholna pića (npr. maraskino) i aromatska vina (npr. vermut, amaro).

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 ni dodavanje sirovog i rafiniranog etilnog alkohola, biljnih proizvoda koji su ekstrahirani rafiniranim etilnim alkoholom, umjetnih boja i aroma. Prirodna jaka alkoholna pića se dijele prema sirovini iz koje se proizvode (slika 1).

2. Umjetna jaka alkoholna pića- proizvode se maceracijom sirovina u alkoholu, destilacijom macerata te njihovim miješanjem s etilnim alkoholom i aromatskim supstancama. Ta pića sadrže sve arome sirovina iz kojih su proizvedena i to u oplemenjenom obliku jer ne sadrže razne nepoželjne spojeve nastale tijekom fermentacije. S obzirom da se maceracija provodi u rafiniranom alkoholu, ne sadrže ni aldehide ni patočna ulja.

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) (Grba, 2010).



Slika 1. Podjela prirodnih jakih alkoholnih pića (Grba, 2010)

2.1.1. Voćne rakije

Voćne rakije proizvode se isključivo alkoholnom fermentacijom i destilacijom mesnatih plodova voća ili mošta od voća, bobica ili zelenih dijelova (sa ili bez koštica), destilirane na manje od 86% vol.

Pravilnikom o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) definirano je 46 jakih alkoholnih pića među kojima se, u devetoj kategoriji, nalazi rakija od voća. Rakija od voća se označava tako da iza riječi »rakija« stoji ime voća, bobica ili zelenih dijelova od kojih je rakija proizvedena kao npr. rakija od grožđa.

Ova vrsta rakija proizvodi se iz prefermentirane komine voća ubranog u tehnološkoj zrelosti odnosno kada je voće prikladno za preradu te ima optimalan odnos šećera, kiselina i tvari arome (Mrvčić, 2016). Za njihovu proizvodnju mogu se koristiti gotovo sve vrste voća i drugih biljnih sirovina koje sadrže dovoljnu količinu šećera (marelice, breskve, jabuke, maline). Sirovine mogu biti i sušeno voće, razni ostaci koji se dobiju preradom voća, kao što su kom i trop voća, talozi vina (Mujić, 2010). Može se uzimati i voće koje nije prikladno za dulje čuvanje i skladištenje, prezrelo i oštećeno. Iz takvog voća se može dobiti još uvijek dobra rakija, a za rakije prvorazredne kvalitete potrebno je uzimati samo zrelo, neoštećeno i dobro čuvano voće. Pri odabiru voćnih sirovina posebna pozornost se posvećuje sastavu voća od kojeg se rakija priprema jer se na tome temelji vrijednost svake rakije. Različite organske i mineralne tvari prisutne u voću daju voću, a kasnije i rakiji od tog voća, karakteristična svojstva kao što su okus, miris, aroma i boja (Banić, 2006).

Tehnologija proizvodnje različitih voćnih rakija temelji se na određenim glavnim fazama proizvodnje neovisno o kojem se voću radi. Faze proizvodnje uključuju usitnjavanje sirovine, pripremu hranjive podloge i pripremu kvasca, fermentaciju, destilaciju te doradu i dozrijevanje proizvoda (Grba, 2010). U voćne rakije ulaze i rakije od grožđa, a to su vinjak, cognac, armagnac, komovica, *loza* i droždenka (Mrvčić, 2016).

Rakije od grožđa međusobno se razlikuju ovisno o tome koji dio prefermentirane komine se destilira (vino, trop, cijedena ili necijedena komina). Komovica se, za razliku od *loze*, proizvodi samo od ostatka nakon cijedenja komine, koma (Mujić, 2010). Proizvodnja komovice na tradicionalan način karakteristična je za Mediteranske zemlje kao što su Grčka, Španjolska, Portugal, Italija. Rakije proizvedene na tradicionalan način u šaržnim (alambic) kotlovima posjeduju karakteristike koje ih razlikuju od industrijski proizvedenih pića. Takav način proizvodnje je specifičan i vezan za tradiciju i povijest pojedine zemlje u kojoj se proizvodi (Lukić i sur., 2011a). Rakija komovica najčešće se proizvodi kako bi se iskoristio nusproizvod pri proizvodnji vina pa je i proizvodnja najopsežnija u zemljama s bogatom vinskom proizvodnjom. Ovisno o državi u kojoj se proizvodi poznata je pod različitim nazivima. U Italiji je poznata pod nazivom „grappa“, „bagaceira“ u Portugalu, „orujo“ u Španjolskoj, „eau-de-vie de marc“ u Francuskoj te „tsipouro“ u Grčkoj (Lopez-Vazquez i sur., 2010).

Proizvodnja rakije *loze* karakteristična je za područje Makedonije i Srbije te južni dio Hrvatske gdje se često konzumira i predstavlja nacionalno piće. Komovica je na tom području manje popularna zbog jakog mirisa i okusa komine (Milanov i sur., 2014).

2.2. RAKIJA LOZA

2.2.1. Sirovina (grožđe)

Za proizvodnju grožđa služe mnogi kultivari vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Vinova loza pripada velikoj porodici *Vitaceae*, a najveći broj vrsta pripada rodu *Vitis*. Plod vinove loze je bobica koja je građena od pokožice, mesa i sjemenke. Najveći dio čini meso dok su u kožici smještene tvari arome i boje. Ovisno o sorti, boja grožđa varira od zelenožute, bijeložute, svijetloružičaste do tamnoplave (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Glavni šećeri u grožđu su glukoza i fruktoza koje se najčešće prisutne u otprilike jednakim omjerima. U prezrelom grožđu veći je udio fruktoze, dok je u nezrelom veći udio glukoze. Sadržaj šećera varira ovisno o sorti i zrelosti ploda (Jackson, 2008). Udio šećera u grožđu je od 9 - 23% (Nikičević i Tešević, 2010). Osim šećera grožđe sadrži nešto bjelančevina, vinsku i jabučnu kiselinu, kalij, kalcij, željezo, magnezij, mangan, vitamine C i B skupine, nešto pektina i tanina (Mujić, 2010).

Grožđe je najčešće sirovina za proizvodnju vina, ali se od njega može proizvoditi i rakija. U slučaju da grožđe nije dovoljno zrelo pa nema dovoljno šećera za proizvodnju vina, tada se može proizvesti rakija. Također, ako se radi o nekim ranim stolnim sortama grožđa koje su podložne oštećenju i brzom početku truljenja umjesto u vino može se preraditi u rakiju *lozu* (Banić, 2006). Međutim, izborom kvalitetnih sorti grožđa mogu se dobiti sorte rakije s posebno finom aromom koja je 4-5 puta intenzivnija nego originalno vino (Keršek i Savković, 2012).

2.2.1.1. Sorta grožđa Izabela

Sorta grožđa Izabela je hibrid američke loze *Vitis labrusca* i europske loze *Vitis vinifera*. Porijeklom iz Sjeverne Amerike, a u naše krajeve dolazi krajem 19. stoljeća. Značajna obilježja ove sorte grožđa su visoka plodnost i otpornost na filokseru (lisna uš iz porodice *Phylloxeridae*). Uzgaja se većinom u kontinentalnom dijelu Hrvatske, ali pretežito na okućnicama. Iznimno je bujna rasta, a uz to ima velike široke listove pa se po tome lako raspoznaje. Bobice su krupne, ljubičasto-modre boje (slika 2), a ova sorta grožđa ima prepoznatljiv miris tzv. fox miris (Penavin, 2004). Taj fox miris pripisuje se upravo kao obilježje koje potječe od loze *Vitis labrusca*, dok s druge strane aroma koja ju također karakterizira je aroma jagode koja se povezuje s visokim sadržajem furaneola u mesu ove sorte grožđa (Zabetakis i sur., 1999). Kod nas se zabranjuje proizvodnja vina od sorte grožđa

Izabela kao i od ostalih direktno rodnih hibrida (Zakon o vinu, 2003) stoga se ona najčešće koristi u druge svrhe (jelo, pripremu sokova i pekmeza).



Slika 2. Sorta grožđa Izabela (Anonymus, 2011)

2.2.2. Tehnološki postupak proizvodnje rakije *loze*

Za proizvodnju rakije od grožđa, *loze*, mogu se koristiti različite sorte grožđa, a na području Srbije za najčešće se koristi autohtona sorta Smederevka (Ranković i sur., 2004). Kvaliteta rakije *loze* osim o sorti vinove loze, klimatskim uvjetima i tlu na mjestu uzgoja grožđa, ovisi o karakteristikama i načinu vođenja fermentacije. Također, ovisi nakon kojeg vremena od završetka fermentacije se provodi destilacija i o samoj metodi destilacije te o načinu skladištenja gotovih destilata (Vukosavljević i sur., 2015).

Tehnologija proizvodnje rakije *loze* uključuje ove operacije:

- priprema sirovine (berba i muljanje grožđa)
- alkoholna fermentacija (vrenje) komine
- destilacija prefermentirane komine
- odležavanje, dozrijevanje i završna izrada rakije

2.2.2.1. Priprema sirovine za proizvodnju rakije (berba i muljanje grožđa)

Berba grožđa najčešće se obavlja ručno pri čemu se grožđe bere s peteljka. Smatra se da je kvaliteta *loze* bolja ako se iz komine uklone peteljke, ali to nije nužno (Banić, 2006). Za proizvodnju *loze* najbolje je koristiti grožđe s 10-15% šećera i 6-12% kiselina jer se preradom takvog grožđa dobije vino slabije kvalitete (Mujić, 2010).

Grožđe se odmah nakon berbe podvrgne muljanju pomoću muljače na valjcima. Izmuljano grožđe naziva se komina. Usitnjavanje omogućuje brži tijek odvijanja procesa alkoholne fermentacije (Mujić, 2010). U tom stanju grožđe je sklono kvarenju pa ga je potrebno što prije staviti u daljnji proces kako bi se izbjegao duži kontakt sa zrakom i moguće kvarenje (Berglund, 2004).

2.2.2.2. Alkoholna fermentacija (vrenje) komine

Alkoholna fermentacija groždane komine je složen biokemijski proces u kojem kvasci imaju značajnu ulogu u transformaciji šećera u etanol, ugljikov dioksid i brojne druge sekundarne metabolite (Ciani i sur., 2010). Proces alkoholne fermentacije je anaeroban, a ugljikov dioksid koji nastaje pri izlasku iz komine izaziva njezino pjenjenje što podsjeća na vrenje. Kako alkoholna fermentacija napreduje tako stvoreni alkohol djeluje inhibicijski na većinu bakterijskih vrsta te se njihov broj smanjuje. Ugljikov dioksid koji se tijekom fermentacije nakuplja na površini komine onemogućava rast plijesnima i aerobnim bakterijama. Tako stvoreni uvjeti pogoduju samo kvascima koji jedini zaostaju na kraju fermentacije. Sinteza alkohola (etanola) odvijat će se sve dok ima šećera u komini (Grba, 2010).

Pri proizvodnji rakije *loze*, kao i pri proizvodnji drugih alkoholnih pića iz fermentabilnih sirovina, alkoholna fermentacija može biti vođena na dva načina. Može se provoditi spontano, s pomoću na sirovini prirodno prisutnom mikroflorom ili dodatkom selekcioniranih kvasaca (Nikičević i Tešević, 2010).

Spontana fermentacija je složen proces čiji je tijek teško predvidjeti. Ona je rezultat djelovanja više vrsta kvasaca, ali i bakterija i plijesni prirodno prisutnih na površini grožđa. U tom slučaju autohtona mikroflora grožđa uvjetuje brzinu i trajanje fermentacije. Najznačajniji kvasci prisutni tijekom spontane fermentacije su kvasci *Klockera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima* i *Candida stellata* koji se svrstavaju u skupinu ne-*Saccharomyces* vrsta (Combina i sur., 2005). Njihova aktivnost je izražena u ranijim fazama fermentacije jer im je rast u kasnijim fazama fermentacije inhibiran sintetiziranim etanolom. Međutim, ti kvasci su značajni za proizvodnju hlapivih spojeva arome. Odgovorni su za nastanak spojeva kao što su

esteri, viši alkoholi, kiseline i monoterpeni (Swiegers i sur., 2005). Kada koncentracija etanola poraste daljnju fermentaciju provodi i završava kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet, 2003).

Dirigirana odnosno kontrolirana fermentacija provodi se pomoću inokuliranog selekcioniranog kvasca, a najčešće se radi o kvascu *S. cerevisiae*. On dominira tijekom cijele fermentacije i ima značajnu ulogu u suzbijanju ostalih ne-*Saccharomyces* vrsta (Ciani i sur., 2010). Neki od kriterija odabira selekcioniranog kvasca su svojstva kvasca koja utječu na karakteristike fermentacije te njegov utjecaj na kvalitetu krajnjeg proizvoda. Vrlo je važno da odabrani kvasac nije spor te da ne uzrokuje zastoj u fermentaciji. Poželjno je da taj kvasac daje uravnotežen niz metabolita koji povoljno utječu na aromu bez neželjenih hlapivih tvari (octena kiselina, etil acetat) (Swiegers i sur., 2005). Upotreba selekcioniranog kvasca osigurava brz početak fermentacije s minimalnom fazom prilagodbe (*lag* fazom). Na taj način moguće je definirati trajanje procesa fermentacije što može pozitivno pridonijeti aromi proizvoda.

Tijek alkoholne fermentacije ovisan je o temperaturi na kojoj se fermentacija provodi. Temperatura utječe na vrijeme trajanja fermentacije, odnosno na trenutak kada će ona započeti i završiti. Iacumin i suradnici (2012) navode da fermentacija vođena pri višim temperaturama (36°C) može ograničiti rast ne-*Saccharomyces* vrsta već u prvim danima fermentacije. Na taj način se sprječava nastanak nepoželjnih metabolita koje te vrste kvasaca produciraju.

Toriya i suradnici (2003) ispitivali su utjecaj temperature na rast kvasca *S. cerevisiae* te su njihovi rezultati pokazali da fermentacija pri nižim temperaturama (15°C-20°C) počinje sporije zbog duže faze prilagodbe (*lag* faze) te je potreban duži period za postizanje maksimalnog broja stanica kvasca. U trenutku kada je postignut maksimalni broj stanica kvasca (10^8 CFU mL⁻¹) konstantan je tijekom cijelog procesa (dugačka stacionarna faza). Autori također navode da je sličan maksimalan broj stanica kvasca postignut i pri višim temperaturama fermentacije (25°C i 30°C) iako je joj je početna brzina bila brža nego pri nižim temperaturama. Pri najvišoj ispitivanoj temperaturi (35°C) gotovo da i nije zabilježena *lag* faza. Odmah je nastupila eksponencijalna faza te je maksimalan broj stanica kvasca dosegnut ranije. Kod te fermentacije uočena je kratka stacionarna faza. Faza odumiranja nastupila je ranije u odnosu na ostale fermentacije. Duljina fermentacije i maksimalan broj stanica kvasca bilo je sličan pri svim proučavanim temperaturama. Razlika je vidljiva u tome

da viša temperatura uzrokuje bržu smrtnost stanica, a time i sporiju potrošnju šećera u odnosu na niže temperature.

Osim na duljinu trajanja fermentacije, temperatura fermentacije utječe i na aromu prefermentirane komine, odnosno destilata.

Niže temperature pogoduju nastanku veće koncentracije estera koji su odgovorni za svježje, voćne arome dok više temperature utječu na povećanje koncentracije spojeva arome odgovorne za cvjetne mirise te mirise na bananu i ananas. Upravo zbog toga temperatura fermentacije se može koristiti kao faktor koji će služiti u svrhu podešavanja arome i okusa proizvoda na željenu kvalitetu (Molina i sur., 2007)

Trajanje alkoholne fermentacije komine, osim o temperaturi, ovisi i o udjelu šećera u grožđu, a obično traje od 4 do 10 dana (Keršek i Savković, 2012). Uvjete fermentacije potrebno je podesiti na parametre koji povoljno djeluju na aktivnost kvasca, a to je pH 4-5 i temperatura 25-35°C (Grba, 2010).

2.2.2.3. Destilacija prefermentirane komine

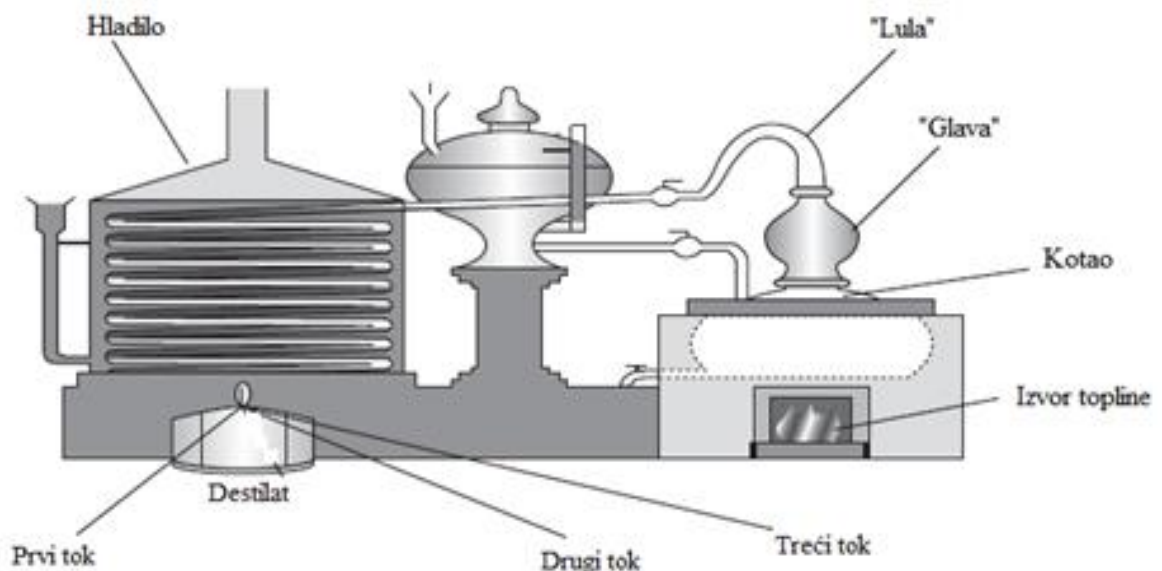
Nakon završetka alkoholnog vrenja, prefermentiranu kominu potrebno je u što kraćem roku destilirati. Ukoliko to nije moguće, prefermentiranu kominu potrebno je čuvati pri nižim temperaturama kako bi se spriječile moguće neželjene promjene, prije svega oksidacija etanola do octene kiseline (Nikičević i Tešević, 2010).

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 hlapivih 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, kao i o njihovoj topivosti u etanolu, odnosno vodi. Alkohol (etanol) i voda su glavni sastojci prefermentirane komine grožđa pa zagrijavanjem isparava više alkohola u odnosu na vodu (Banić, 2006). Tijekom destilacije se odvija niz kompleksnih kemijskih reakcija koje imaju veliki utjecaj na koncentraciju pojedinog spoja arome u proizvodu. Cilj destilacije je izdvojiti etanol u povoljnom omjeru sa spojevima arome, tako da zajedno destilatu daju kvalitetu i karakteristike potrebne za konkretan proizvod (Nikičević i Tešević, 2010).

Loza najbolje kvalitete dobije se ako se prefermentirana komina destilira na diskontinuiranim kotlovima (slika 3) dvostrukom destilacijom. Prvo se destilira

prefermentirana komina u cilju izdvajanja alkohola, a redestilacija se provodi uz izdvajanje frakcija u cilju pročišćavanja i pojačavanja destilata (Lučić, 1986).

Proizvod prve destilacije je „meka rakija“ s udjelom alkohola od 20-50%. Dobiveni destilat ide na drugu destilaciju sa svrhom koncentriranja etanola i spojeva arome te pročišćavanja od neželjenih sastojaka. Brzina prelaženja određenih spojeva arome u destilat ovisi o njihovom koeficijentu isparavanja. On predstavlja odnos količine određenog spoja arome u parnoj fazi u odnosu na količinu tog spoja u destilatu (Nikičević i Tešević, 2010). Odvajanje tvari provodi se frakcijskom destilacijom odnosno odvajanjem destilata u prvi, drugi i treći tok. Prvi tok ili prvijenac (*eng. head*) je prvi dio kondenzata, mutan je i sadrži veliki udio metanola (Silva i Malcata, 1999). Vrijeme prekida pojedinog toka destilacije uvelike ovisi o iskustvu osobe koja vodi destilaciju i o koncentraciji alkohola koja se procjenjuje denzitometrijski. Kada se procijeni da je prvi tok gotov, hvata se drugi, srednji tok ili srce (*eng. heart*). Destilat srednjeg toka poželjne je bistrine, a udio alkohola u njemu iznosi 45-50%. Zadnji tok, patoka ili plavić (*eng. tail*) neugodnog je mirisa s većim udjelom viših alkohola i kiselina (Mrvčić, 2016).



Slika 3. Prikaz osnovnih dijelova kotla za diskontinuiranu destilaciju (Louw i Lambrechts, 2012)

2.2.2.4. Odležavanje, dozrijevanje i završna izrada rakije

Nakon destilacije dobiveni sirovi destilat ima oštar, grub i neharmoničan miris. Zbog toga takvi destilati nisu pogodni odmah za konzumaciju već je potrebno njihovo odležavanje. Sirovi destilat *loze* odležava u inertnim posudama nekoliko mjeseci radi stabilizacije (Nikičević i Tešević, 2010). U procesu odležavanja i dozrijevanja u destilatu se odvijaju kemijski procesi oksidacije i redukcije kojima podliježu primarni i sekundarni sastojci destilata. Dolazi do povećanja koncentracija ukupnih aromatičnih i mirisnih tvari koje značajno utječu na kvalitetu konačnog proizvoda (Mujić, 2010). Rakija *loza* na tržište najčešće dolazi bezbojna, a može se koristiti kao osnova za proizvodnju rakija travarica tako da se u nju dodaju ljekovite biljke.

2.2.3. Spojevi arome rakije *loze*

Rakije od grožđa karakterizirane su prisutnošću različitih hlapivih spojeva koji čine njihovu aromu. Spojevi arome rakije od grožđa, *loze* kao i drugih voćnih rakija mogu se klasificirati u četiri glavne skupine ovisno o fazi nastajanja (Miličević i sur., 2012):

- 1.) Primarni spojevi arome- potječu od sirovine i nositelji su sortnih obilježja
- 2.) Sekundarni spojevi arome- spojevi nastali tijekom procesa fermentacije
- 3.) Tercijarni spojevi arome- spojevi koji se razvijaju tijekom procesa destilacije
- 4.) Kvarterni spojevi arome- spojevi formirani tijekom odležavanja destilata

Aromatski potencijal sirovine (grožđa) sastoji se od slobodnih hlapivih komponenata i prekursora arome u različitim oblicima koji aromu oslobađaju svojom razgradnjom (Nikičević i Tešević, 2010).

Fermentacijom nastaju spojevi pod utjecajem kvasca *S. cerevisiae* te drugih mikroorganizama koji metaboliziraju ugljikohodrate, masne kiseline, aminokiseline i druge spojeve prisutne u sirovini. 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).

Formiranje, degradacija i interakcija spojeva arome tijekom cijelog tehnološkog procesa proizvodnje kao i tijekom odležavanja utječu na konačna senzorska svojstva rakije (Nikičević i Tešević, 2010).

Važne skupine spojeva koje čine aromu *loze* kao i ostalih rakija od grožđa, a i drugih voćnih rakija su:

ALKOHOLI- u svim jakim alkoholnim pićima pa tako i u rakiji *lozi* najzastupljeniji alkohol je etanol. Produkt je alkoholne fermentacije, a prisutan je u destilatu tijekom cijele destilacije. Na početku destilacije prisutan je u većoj koncentraciji, a kasnije mu se koncentracija smanjuje (Lučić, 1986). Destilacija *loze* se prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) provodi tako da destilat sadrži od 60-75% vol. alkohola.

Metanol nije produkt alkoholne fermentacije već je posljedica hidrolize pektina gdje su karboksilne skupine galakturonske kiseline esterificirane s metanolom (Grba, 2010). Najčešće je prisutan u malim količinama, ali to ipak ovisi o sirovini i načinu prerade. Postupkom jednokratne destilacije nemoguće ga je u potpunosti odvojiti od etanola, a koncentracija mu se postepeno smanjuje tijekom destilacije. Ne utječe na organoleptička svojstva rakije jer je okusom sličan etanolu. Koncentraciju metanola u rakiji potrebno je kontrolirati zbog njegovog toksičnog djelovanja na zdravlje (Nikičević i Tešević, 2010).

Vrlo važnu skupinu alkohola koji doprinose aromi rakije čine viši alkoholi. To su alkoholi s više od dva ugljikova atoma. Koncentracija tih alkohola u destilatima ovisi o sorti grožđa, temperaturi i vremenu trajanja fermentacije te o primijenjenoj destilacijskoj tehnici. Neki od predstavnika viših alkohola u rakiji su n-propanol, n-butanol, izobutanol, izoamil alkohol i aromatski feniletanol (Silva i Malcata, 1999). Pokazuju veću hlapivost od etanola do 42% vol. etanola u destilatu. Pri višim koncentracijama etanola njihova hlapivost se smanjuje i tada se izdvajaju u zadnjem toku (patoka, plavić). Dio patočnih primjesa netopljiv je u vodi i uljnog je karaktera pa se još nazivaju patočna ulja (*eng. fusel oil*) (Nikičević i Tešević, 2010). *Loza* prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) mora imati minimalno 150 mg viših alkohola po litri 100% vol. alkohola.

ESTERI- su spojevi nastali reakcijom između karboksilne skupine organske kiseline i hidroksilne skupine alkohola ili fenola. Ova skupina spojeva vrlo je važna u formiranju aromatskog potencijala rakije dajući joj voćni karakter (Tsakiris i sur., 2014).

Najznačajniji esteri u rakiji su etil acetat i etil laktat. Etil acetat se najčešće nalazi u prvom toku destilacije dok je etil laktat najčešći u zadnjem. Uz navedene estere u rakiji su značajni i etil esteri masnih kiselina nastali kao rezultat reakcije između etanola i prekursora

zasićenih monokarboksilnih kiselina (etil heksanoat (kaproat), etil oktanoat (kaprilat), etil dekanat (kaprat)) te acetatni esteri nastali između octene kiseline i viših alkohola (izoamil acetat i 2-feniletil acetat).

Postupak destilacije može imati značajan utjecaj na prisutnost estera u rakiji. Gotovo svi esteri imaju nisku točku vrelišta i izdvajaju se u ranoj fazi destilacije. Zbog toga je potrebno kontrolirati u kojem će se trenutku prekinuti prvi tok destilacije kako bi se esteri zadržali u poželjnim koncentracijama (Nikičević i Tešević, 2010).

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09) *loza* mora sadržavati minimalno 50 g estera po hektolitr 100% vol. alkohola. U istraživanju Milanova i suradnika (2014) navodi se da je veći udio ukupnih estera prisutan u destilatima destiliranim nakon dužeg perioda od alkoholne fermentacije (70 dana) u odnosu na one destilirane 10 dana od završetka fermentacije. U periodu između završene fermentacije i destilacije dolazi do nastanka estera između alkohola i kiselina sintetiziranih tijekom alkoholne fermentacije.

KARBONILNI SPOJEVI- glavni karbonilni spoj alkoholne fermentacije je acetaldehid koji nastaje kao međuprodukt razgradnje piruvata. Pravilnim prekidanjem prvog toka destilacije može ga se odvojiti iz drugog toka odnosno „srca“ zbog niske točke vrenja (20,8°C) (Nikičević i Tešević, 2010). Acetaldehid može nastati i oksidacijom etanola (Lučić, 1986). Toksičnost ovog spoja povezuje se s mučninom i povraćanjem koje se javljaju nakon konzumacije pića u kojem je prisutan u većim koncentracijama. Diacetil, keton nastaje djelovanjem bakterija mliječne kiseline uslijed malolaktične fermentacije (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Njegova koncentracija u rakiji ovisi o koncentraciji prisutnoj u početnom uzorku korištenom za destilaciju te o primijenjenoj tehnici destilacije.

TERPENI- najčešće su prisutni u pokožici bobice grožđa i nosioci su cvjetnog mirisa. Identificirano je oko 40 terpena u grožđu, a najznačajniji su linalol, α -terpineol, nerol, geraniol i citronelol. Osjetilni prag ovih spojeva je relativno nizak, svega nekoliko stotina mikrograma po litri. Visoka temperatura destilacije i nizak pH mogu dovesti do oksidacije terpena što može negativno utjecati na aromu (Tsakiris i sur., 2014)

Najznačajniji spojevi i njihova količina u *lozi* prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Najznačajniji spojevi *loze* (Mujić, 2010)

SASTOJCI	KOLIČINA	
	najmanja	najveća
Alkohol (vol. %)	40	50
Kiseline (mg L ⁻¹)	100	1000
Metanol (vol. % a.a.)	0,15	0,5
Esteri (mg L ⁻¹ a.a.)	600	4000
Viši alkoholi (mg L ⁻¹ a.a.)	1500	6000
Aldehidi (mg L ⁻¹ a.a.)	50	500
Furfurol (mg L ⁻¹ a.a.)	-	25

a.a.-apsolutni alkohol

Najznačajniji utjecaj na aromu rakije *loze* ima kvaliteta sirovine stoga je od izrazite važnosti odrediti pravo vrijeme za berbu. Kako bi se aromatične komponente sirovine sačuvale, potrebno je kontrolirati cijeli tijek tehnološke proizvodnje rakije. Najkvalitetnije *loze* dobiju se od muškarnih sorata grožđa (Nikičević i Tešević, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovina

Sorta grožđa koje je korišteno u ovom eksperimentu je Izabela. Grožđe je ubrano u rujnu 2015. godine u vinogradu koji se nalazi na području sjeverozapadne Hrvatske, općina Farkaševac.

3.1.2. Radni mikroorganizam

Pri izradi diplomskog rada kao radni mikroorganizam za dirigitiranu fermentaciju korišten je suhi aktivni vinski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* BM-45 na tržištu Republike Hrvatske poznat kao Vrelko, proizvođača Danstar Ferment A.G.

3.1.3. Hranjive mikrobiološke podloge

Hranjive podloge korištene u radu su WL (Wallerstein Laboratory) hranjiva podloga (Green i Gray, 1950) (selektivna podloga za kvasce) te YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) hranjiva podloga (Li i sur., 2007) (podloga pogodna za rast velikog broja mikroorganizama).

Navedene podloge služile su za izolaciju epifitne mikroflore odnosno mikroorganizama odgovornih za vođenje spontane fermentacije pri 20°C. Hranjive podloge WL i YPD pripremljene su otapanjem sastojaka (Prilog I i II) u tikvicama volumena 1 L. Nakon toga podlogama je podešen pH zadan prema propisu. Pripremljene podloge sterilizirane su u autoklavu na 121°C, pod tlakom od 1,5 bara u trajanju od 15 min. U mikrobiološkom zaštitnom kabinetu podloge su izliveno u Petrijeve zdjelice. Nakon što su podloge ohlađene i očvrstnute, pogodne su za naciepljivanje.

3.1.4. Kemikalije

Kemikalije korištene u ekperimentalnom dijelu rada su:

- kvaščev ekstrakt, Biolife, Italija
- tripton, Biolife, Italija
- glukoza, p.a., Merck, Njemačka
- kalijev dihidrogen fosfat (KH₂PO₄) p.a., Kemika, Hrvatska
- kalijev klorid (KCl) p.a., Gram-Mol, Hrvatska
- kalcijev klorid (CaCl₂) p.a., Gram-Mol, Hrvatska
- magnezijev sulfat (MgSO₄) p.a., Alkaloid, Makedonija
- željezov klorid (FeCl₃) p.a., Kemika, Hrvatska

- manganov sulfat ($\text{MnSO}_4(\text{H}_2\text{O})$) p.a., Alkaloid, Makedonija
- bromokrezol zeleno (bojilo) p.a., Kemika, Hrvatska
- agar, Liofilchem, Italija
- pepton, p.a, Merck, Njemačka
- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- octena kiselina, min. 96% (CH_3COOH) p.a, Carlo Erba Reagents, Francuska
- kalij heksacijanoferat (II)-trihidrat ($\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)\text{x}3\text{H}_2\text{O}$) p.a., Kemika, Hrvatska
- cinkov sulfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4\text{x}7\text{H}_2\text{O}$) p a., Gram-Mol, Hrvatska
- bakrov (II) sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4\text{x}5\text{H}_2\text{O}$) p.a., Alkaloid, Makedonija
- limunska kiselina ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) p.a., Gram-Mol, Hrvatska
- bezvodni natrijev karbonata (Na_2CO_3) p.a., Gram-Mol, Hrvatska
- kalijev jodid (KI) p.a., Gram-Mol, Hrvatska
- 35-36% klorovodična kiselina (HCl) p.a., Fisher Chemical, UK
- sumporna kiselina (H_2SO_4) p.a., Fisher 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 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) p.a., Kemika, Hrvatska
- natrijev tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) p.a., Kefo, Hrvatska
- fenolftalein p.a., Kemika, Hrvatska

3.1.5. Otopine

Otopine korištene u eksperimentalnom dijelu rada i njihova priprema nalaze se u Prilogu III.

3.1.6. Aparatura

Popis korištene aparature pri izradi ovog eksperimenta prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Popis korištene aparature

Uređaj/ stroj	Proizvođač (Tip)
Analitička vaga	Kern KB
pH-metar	Schott
Mikrobiološki zaštitni kabinet (laminar)	Klima oprema
Šaržni destilacijski kotao	Fresl obrt
Autoklav	Sutjeska
Vodena kupelj	Memmert
Plinski kromatograf (GC) s plamenoionizacijskim detektorom (FID)	Hewlett-Packard HP 5890
Aparatura po Martin-Dietrichu (za određivanje alkohola)	Staklena aparatura
Aparatura po Luff-Schoorlu (za određivanje šećera)	Staklena aparatura
MALDI-TOF Biotyper	Bruker Daltonik
Termostat (uzorci)	Ikom
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)	
HSS uzorkivač	Hewlett-Packard HP 7694

3.2. METODE

3.2.1. Postupak proizvodnje rakije *loze*

Proizvodnja rakije *loze* uključivala je slijedeće faze:

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

3.2.1.1. Priprema alkoholne fermentacije

Postupak kojim započinje proizvodnja rakije *loze* je priprema sirovine tj. grožđa. Grožđe se usitnilo, a zatim su napunjene četiri Erlenmeyerove tikvice od 2 L sa 2 kg usitnjenog grožđa; dvije tikvice za spontanu te dvije za kontroliranu (dirigiranu) fermentaciju na temperaturama od 20°C, odnosno 30°C.

Za dirigiranu fermentaciju korišten je inokulum, suhi aktivni vinski kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*. Njime je inokulirano grožđe u dvije Erlenmeyerove tikvice dodatkom 0,2 g suhog aktivnog kvasca na 1 L grožđa. Fermentacija je anaeroban proces pa Erlenmeyerove tikvice moraju biti zatvorene vrelnjačama da se spriječi ulazak zraka, a omogući izlazak fermentacijom nastalog CO₂ (slika 4).



Slika 4. Postavljena alkoholna fermentacija u Erlenmeyerovim tikvicama s vrelnjačom, spontana i dirigirana fermentacija pri 20°C (vlastita fotografija)

3.2.1.2. Alkoholna fermentacija

Osim utjecaja dodatka inokuluma na tijek fermentacije i kvalitetu proizvedene *loze*, pratio se i utjecaj temperature. Stoga su dvije tikvice (spontana i dirigrirana) tijekom procesa fermentacije držane u termostatu pri temperaturi od 20°C, a druge dvije (spontana i dirigrirana) u termostatu pri temperaturi od 30°C.

Tijekom fermentacije pratio se utrošak supstrata (šećera iz grožđa) te nastanka produkta (etanola). Proces se zaustavlja u trenutku kada se potroši sav šećer odnosno kada se koncentracija alkohola ustali.

3.2.1.3. Destilacija

Destilacija prefermentiranih komina provedena je dva tjedna nakon završetka fermentacije. Uzorci su do destilacije čuvani u hladnjaku na 4°C. Destilacija je provedena u šaržnom laboratorijskom kotlu za destilaciju (slika 5).



Slika 5. Šaržni laboratorijski kotao za destilaciju (vlastita fotografija)

Destilacije su započete u ohlađenom bakrenom destilacijskom kotlu (volumena 5 L) na sobnoj temperaturi, uz polagano i konstantno zagrijavanje prefermentirane komine. Na taj način osigurano je poželjnim aromama dovoljno vremena za isparavanje, a ukapljenom destilatu izlaz iz hladila u obliku pravilnog, ujednačenog i tankog mlaza. *Loza* je dobivena jednokratnom destilacijom odnosno tradicionalnim postupkom destiliranja na konzumnu

vrijednost od 40% vol. alkohola. Količina sirovine nije bila dovoljna za provođenje dvostruke destilacije pa su s obzirom na to koncentracije alkohola u završnom destilatu bile niže od onih Pravilnikom propisanih (60-75% vol. alkohola). Destilacija je vođena u tri glavna toka: prvi tok (prvijenac), drugi tok (srednji tok, srce) i treći tok (plavić). Destilati prvog toka hvatani su u dvije frakcije, ukupnog volumena 20 mL, što iznosi 1% volumena prefermentirane komine. Presijecanje druga dva toka provedeno je praćenjem udjelu alkohola pomoću denzimetrijskog alkoholometra. Drugi tok podijeljen je u tri frakcije (dvije frakcije po 50 mL i treća frakcija hvatana do izmjerenih ~ 40% alkohola na izlazu iz kotla). Treći tok činila je samo jedna frakcija (<40% alkohola). Destilacijom su dobiveni destilati čije su karakteristike navedene u tablicama 3-6.

Tablica 3. Destilati dobiveni destilacijom spontano prefermentirane komine pri 30°C

podjela tokova	podjela frakcija	kratice	jačina destilata (%)	volumen destilata (mL)	opaske
1. TOK	1. frakcija	1T/1F	-	10	
	2. frakcija	1T/2F	-	10	
2. TOK	1. frakcija	2T/1F	52,5	50	
	2. frakcija	2T/2F	45	50	
	3. frakcija	2T/3F	38	80	
3. TOK	1. frakcija	3T/1F	16,25	200	mutan

Tablica 4. Destilati dobiveni destilacijom dirigrano prefermentirane komine pri 30°C

podjela tokova	podjela frakcija	kratice	jačina destilata (%)	volumen destilata (mL)	opaske
1. TOK	1. frakcija	1T/1F	-	10	pojava prstena*
	2. frakcija	1T/2F	-	10	
2. TOK	1. frakcija	2T/1F	55	50	
	2. frakcija	2T/2F	48,75	50	
	3. frakcija	2T/3F	36,25	157	
3. TOK	1. frakcija	3T/1F	14,38	200	mutan

Tablica 5. Destilati dobiveni destilacijom spontano prefermentirane komine pri 20°C

podjela tokova	podjela frakcija	kratice	jačina destilata (%)	volumen destilata (mL)	opaske
1. TOK	1. frakcija	1T/1F	-	10	pojava prstena*
	2. frakcija	1T/2F	-	10	
2. TOK	1. frakcija	2T/1F	55	50	
	2. frakcija	2T/2F	50	50	
	3. frakcija	2T/3F	38	138	
3. TOK	1. frakcija	3T/1F	18,8	200	mutan

Tablica 6. Destilati dobiveni destilacijom dirigirano prefermentirane komine pri 20°C

podjela tokova	podjela frakcija	kratice	jačina destilata (%)	volumen destilata (mL)	opaske
1. TOK	1. frakcija	1T/1F	-	10	pojava prstena*
	2. frakcija	1T/2F	-	10	
2. TOK	1. frakcija	2T/1F	55	50	
	2. frakcija	2T/2F	48,75	50	
	3. frakcija	2T/3F	37,5	128	
3. TOK	1. frakcija	3T/1F	16,9	200	mutan

* pojava prstena - može se povezati sa zaostalim patočnim uljima od prethodne destilacije; prsten je izdvojen, a za daljnju analizu korišten je preostali volumen destilata

3.2.1.4. Stabilizacija destilata

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

3.2.2. Određivanje epifitne mikroflore grožđa

Izolacija mikroorganizama

Za izolaciju mikroorganizama prirodno prisutnih na grožđu, provedeno je naciepljivanje uzoraka komina uzetih 0., 1., 2., 3., 4. i 7. dana tijekom spontane fermentacije pri 20°C.

Uzorci su naciepljivani na dvije različite hranjive podloge: WL podloga i YPD podloga u volumenu 100 µL razrijeđenog uzorka. Uzorci su razrijeđeni do 10⁻⁴. Naciepljene

podloge su termostahirane na 30°C, 48h. Na osnovu morfoloških razlika, od poraslih kolonija odabrane su različite kolonije (označene slovima C-O) koje su izolirane i identificirane.

Cijeli postupak razrjeđenja, a kasnije i naciepljivanja provodi se u sterilnim uvjetima koji su osigurani radom u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu (laminar) kako bi se izbjegla kontaminacija neželjenim mikroorganizmima. Uzorci uzeti 0., 1., 2., 3., 4. i zadnjeg (7.) dana spontane fermentacije pri 20°C razrjeđivani su na način da se 1 ml uzetog uzorka sterilno prenese u sterilnu epruvetu i doda 9 mL sterilne vode. Na taj način postignuto je razrjeđenje 10^{-1} , a zatim se provode daljnja razrjeđenja u falkonicama od 1 mL. U nju se doda 900 μ L sterilne vode i 100 μ L prethodnog razrjeđenja te se na taj način provode razrjeđenja sve do željenog 10^{-4} razrjeđenja. Kada se dobije željeno razrjeđenje na podlogu se pomoću pipetora odpipetira 100 μ L razrjeđenja i po podlozi razmaže pomoću sterilnog štapića po Drigalskom.

Identifikacija izoliranih mikroorganizama

Identifikacija izoliranih, morfološki različitih kolonija provedena je pomoću uređaja MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonik). Za priprema uzoraka primjenjivana je proširena direktna metoda i metoda ekstrakcije EtOH-FA prema uputama proizvođača.

MALDI Biotyper radi na principu snimanja spektra masa nepoznatog mikroorganizma i njegove usporedbe s referentnim bazama podataka za identifikaciju.

3.2.3. Analitičke metode

3.2.3.1. Određivanje šećera metodom po Luff-Schoorlu

Koncentracija šećera u komini određivana je metodom po Luff-Schoorlu (Trajković i sur., 1983). Uzimani su uzorci komine grožđa iz svake od četiri tikvice u kojima se provodila fermentacija pod određenim uvjetima. Uzorci su uzimani svakoga dana sve do završetka fermentacije. Uzorak 0. dana uzet je neposredno nakon muljanja grožđa.

Metoda se temelji na oksidaciji direktno reducirajućih šećera, pri čemu se divalentni Cu iz Luff-ove otopine reducira u jednovalentni Cu. On se izlučuje kao Cu (I) oksid. Suvišak Cu u otopini H_2SO_4 određuje se titrimetrijski s natrijevim tiosulfatom ($Na_2S_2O_3$). Ispituje se i utrošak natrijevog tiosulfata za slijepu probu. Uz pomoć Priloga V iz razlike rezultata dviju titracija (slijepa probe i uzorka) očitava se koncentracija šećera. Prije same analize uzorke je potrebno pripremiti.

Priprema uzorka komine

Uzorci komine razrijede se tako da u 1 L nemaju više od 8 g šećera (Prilog IV). 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 daljnju analizu se uzima 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 u 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 natrijevog 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) natrijevog tiosulfata za titraciju slijepe probe i uzorka pomoću Priloga V očitava se masa (mg) prisutnog šećera te se koncentracija šećera računa prema formuli 1:

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

a- masa (mg) šećera očitana iz Priloga V

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)

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

Volumni udio alkohola određivan je u komini grožđa svakoga dana fermentacije, sve do završetka, metodom po Martin-Dietrichu (Kretschmar, 1955). Metoda se temelji na oksidaciji alkohola u prisutnosti sulfatne kiseline sa kalijevim bikromatom 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 vrhu špatule i 1 mL otopine škroba, te se otopina retitrira natrijevim tiosulfatom do pojave plavozelene boje uzorka. Volumni udio alkohola se izračunava se prema formuli 2:

$$\text{EtOH (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) * f}{V_{uzorka}} * r \quad (2)$$

V1- utrošak natrijevog tiosulfata za slijepu probu

V2- utrošak natrijevog tiosulfata za uzorak

f- faktor (0,146)

r- razrjeđenje

3.2.3.3. Plinska kromatografija

Metoda plinske kromatografije omogućava detekciju i kvantifikaciju velikog broja hlapivih spojeva prisutnih u destilatima i na taj način je omogućena ocjena kvalitete analiziranih destilata (López-Vázquez i sur., 2010).

Plinska kromatografija je kromatografska analitička tehnika koja ulazi u skupinu kolonskih kromatografija, a služi za razdvajanje i kvantifikaciju hlapivih komponenata smjese (Kolb i Ettre, 2006).

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).

U koloni se komponente ispitivanog uzorka razdvajaju pomoću selektivne interakcije između stacionarne i mobilne faze. Razdvajanje u koloni rezultira pojavom serije pikova koji se detektiraju na detektoru, a ispisuju se u obliku kromatograma. Razdvojene komponente karakterizirane su retencijskim vremenom (R_t) tj. vremenom zadržavanja, koje je prošlo između uvođenja uzorka do pojave pojedinih pikova. Površina ispod pojedinačnih pikova je proporcionalna njihovoj koncentraciji (Kolb i Ettre, 2006).

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 6) čiji uvjeti rada su navedeni u tablicama 7 i 8.



Slika 6. Plinski kromatograf (GC) s plamenoionizacijskim detektorom (FID)-Hewlett-Packard HP 5890 (vlastita fotografija)

Tablica 7. Uvjeti rada HSS-GC

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

5 mL destilata se odpipetira u odmjernu tikvicu od 50 mL. Potom se doda destilirane vode malo ispod oznake, a nakon toga se mikropipetom doda 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 hlapivih komponenti, koje se potom prebacuju u injektor plinskog kromatografa gdje se provodi analiza.

Priprema uzoraka prefermentirane komine grožđa za analizu

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

Kvantifikacija hlapivih spojeva

Kvantifikacija hlapivih spojeva arome provedena je računalnom analizom podataka dobivenih programom HP-chem pomoću metode internog standarda.

Spojevi su identificirani na temelju položaja pika pojedinog spoja na vremenskoj osi tj. njihovih retencijskih vremena (R_t).

Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih ispitivanih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenom zadržavanja standarda. Kvantitativne vrijednosti pojedinačnih ispitivanih hlapivih spojeva izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca pripadajućih standarda.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. TIJEK ALKOHOLNE FERMENTACIJE

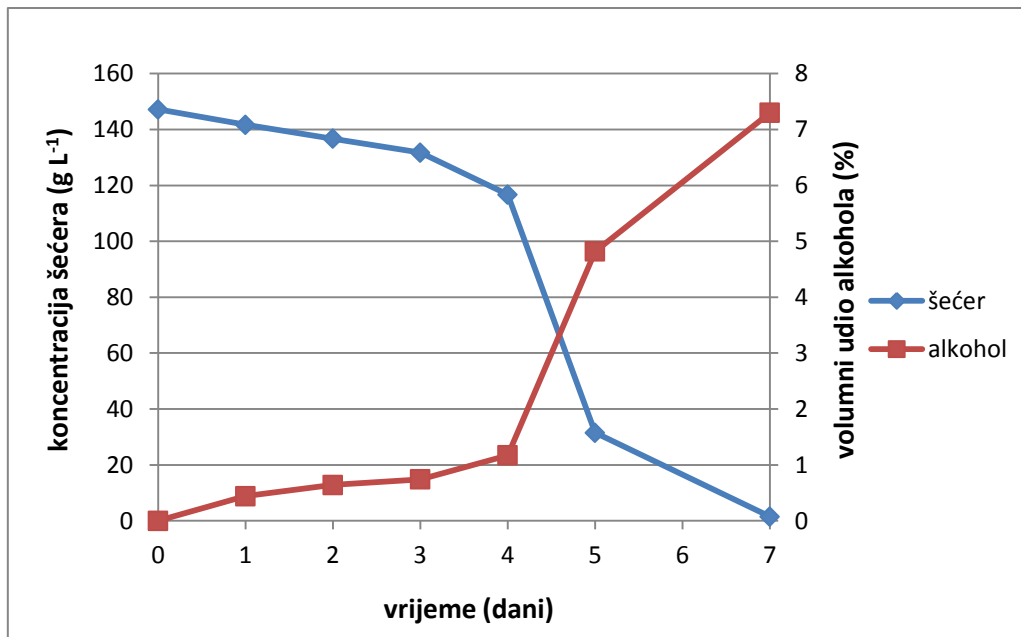
Alkoholna fermentacija je glavna faza u postupku proizvodnje rakije *loze*. Pravilno vođenje tog procesa je od izuzetne važnosti jer na kvalitetu krajnjeg proizvoda izravan utjecaj imaju spojevi sintetizirani tijekom alkoholne fermentacije. Način na koji je moguće pratiti tijek tog procesa temelji se na određivanju utroška supstrata i nastanka produkta. Glavni supstrat kvascima u tijeku alkoholne fermentacije za proizvodnju alkohola je šećer iz sirovine. U grožđu su najznačajniji šećeri heksoze fruktoza i glukoza koje imaju istu molekulsku formulu, ali različitu strukturnu formulu, što utječe na njihova fizikalno kemijska svojstva (Tronchoni i sur., 2009). S tehnološkog gledišta vrlo je važno moći odrediti dinamiku potrošnje početne količine supstrata kako bi se moglo predvidjeti vrijeme trajanja alkoholne fermentacije odnosno njen završetak. Alkoholna fermentacija je završena kada se potroši sav šećer, odnosno kada se koncentracija šećera smanji na koncentraciju ispod 2 g L^{-1} .

Na koncentraciju alkohola (etanola) koji se sintetizira tijekom alkoholne fermentacije, osim udjela šećera u sirovini, ima i temperatura fermentacije. Fermentacija je znatno brža pri višim temperaturama u odnosu na niže temperature, ali je nedostatak taj da pri višim temperaturama dolazi do većeg gubitka etanola zbog isparavanja. Također, temperatura može utjecati i na vrstu i koncentraciju sintetiziranih sekundarnih metabolita.

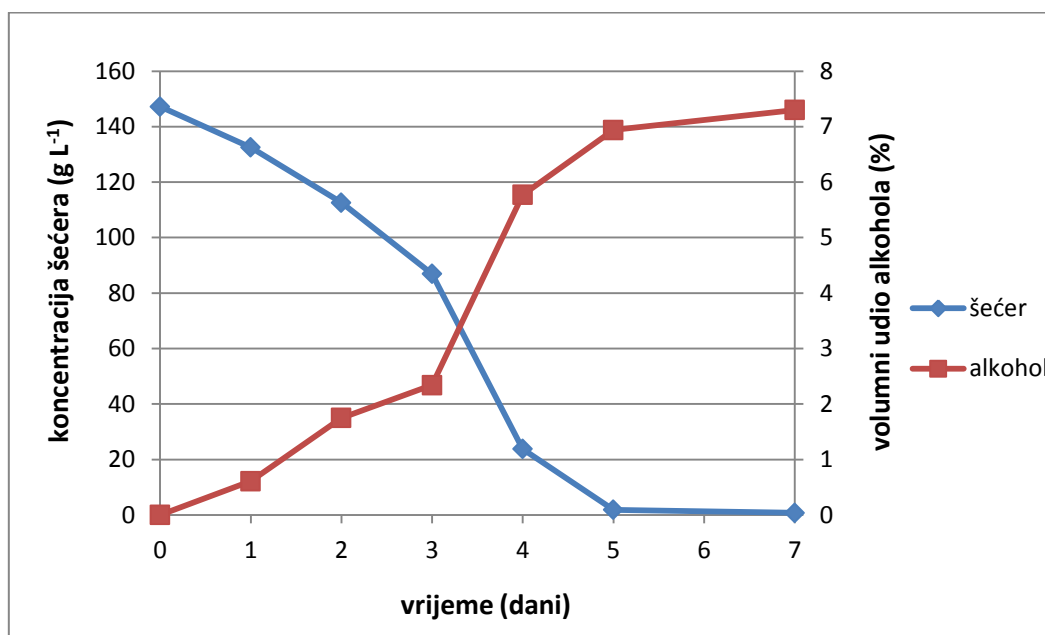
Proces fermentacije se može voditi spontano uz prirodnu mikrofloru pri čemu se on odvija sporije zbog nekontroliranih uvjeta te je krajnji produkt te fermentacije promjenjiv (Grba, 2010). Suprotno, kako bi se omogućio pravilniji i homogeniji tijek fermentacije često se pribjegava dirigiranoj fermentaciji odnosno inokulaciji selekcioniranim kvascem.

Cilj ovog dijela rada bio je pratiti tijek alkoholne fermentacije, spontane i dirigirane pri dvije različite temperature, 20°C i 30°C te na temelju dobivenih rezultata odrediti koji od navedenih čimbenika ima značajniji utjecaj na dinamiku odvijanja fermentacije.

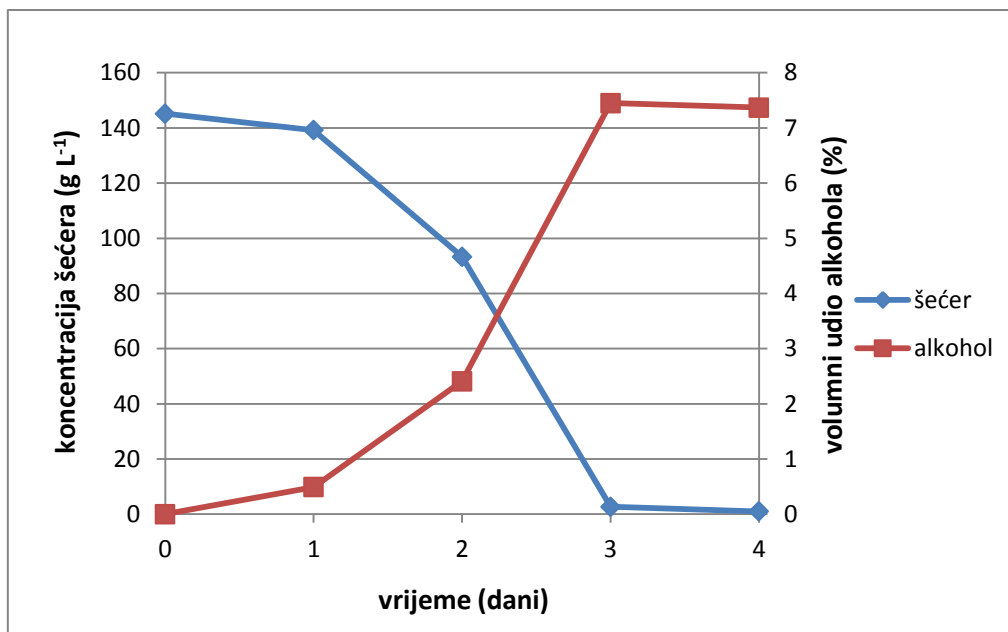
Potrošnja supstrata (šećera) mjerena je metodom po Luff-Schoorlu (Trajković i sur., 1983), dok je koncentracija nastalog produkta (alkohola) određivana metodom po Martin-Dietrichu (Kretschmar, 1955). Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 7-10.



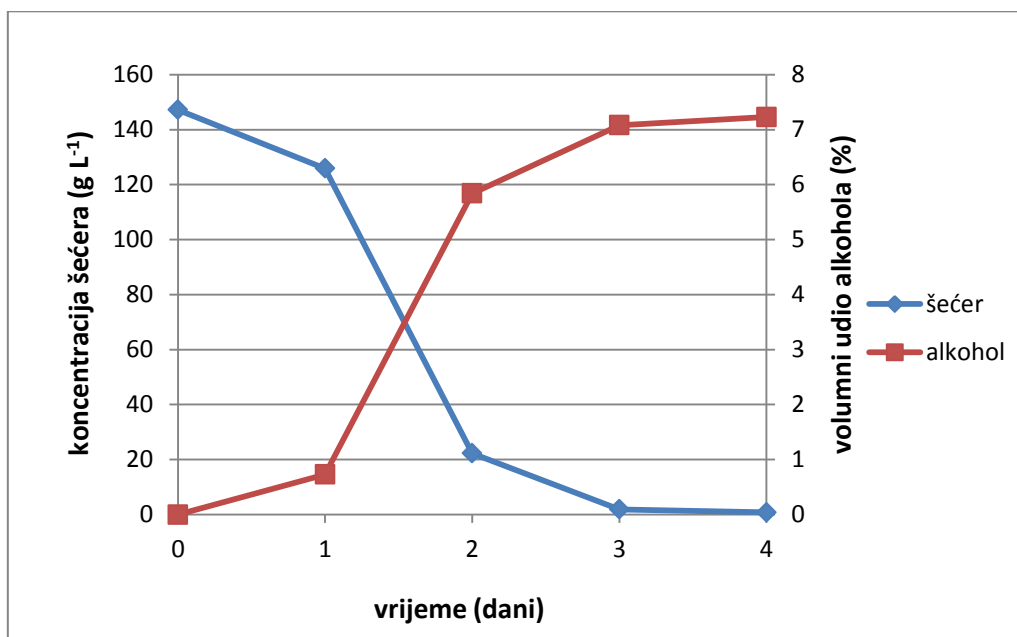
Slika 7. Dinamika potrošnje supstrata (šećera) i nastanka produkta (alkohola) kod spontane fermentacije pri 20°C



Slika 8. Dinamika potrošnje supstrata (šećera) i nastanka produkta (alkohola) kod dirigitane fermentacije pri 20°C



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



Slika 10. Dinamika potrošnje supstrata (šećera) i nastanka produkta (alkohola) kod dirigitane fermentacije pri 30°C

Jedan od parametara za određivanje napretka alkoholne fermentacije je udio šećera u početnoj sirovini. U početnom uzorku dobivenom neposredno nakon muljanja grožđa izmjerena koncentracija šećera u grožđu za sve četiri fermentacije bila je gotovo jednaka i iznosila je 145,2-147,2 g L⁻¹ (slike 7-10). Budući da je izmjerena koncentracija šećera u sirovini u granicama optimalnih vrijednosti šećera u hranjivim podlogama za uzgoj kvasaca (5-15%), nije očekivan značajan utjecaj supstrata (šećera) na razliku u brzini odvijanja i duljini trajanja između fermentacija vođenih pri različitim uvjetima. Početna koncentracija šećera određena u uzorcima korištenim u ovom radu odgovara onim izmjerenim u grožđu sorte Izabela ubrane u ranoj zrelosti (141,2 g L⁻¹) u istraživanju Sabir i suradnici (2010). Autori su uspoređivali pet sorti grožđa ubranih u određenom stupnju zrelosti (nezrela faza, početak zrelosti, rana zrelost i zrela faza). Nešto veća koncentracija šećera u toj sorti u odnosu na vrijednosti izmjerene u ovom radu dobivene su za zadnju, zrelu fazu (181,2 g L⁻¹). Također je veća koncentracija šećera u grožđu sorte Izabela izmjerena u radu Herrera i Miño (2011), a iznosila je 168 g L⁻¹. Neki od parametara koji mogu dovesti do razlike u početnom udjelu šećera u istoj sorti grožđa osim faze zrelosti su i vrsta tla te klimatske prilike na području uzgoja grožđa.

Budući da je koncentracija šećera u svim uzorcima bila približno ista, očekivano je da u ovom slučaju na dinamiku odvijanja fermentacije značajan utjecaj imaju temperatura i inokulacija selekcioniranim kvascem *S. cerevisiae*. Metabolička aktivnost kvasca pod izravnim je utjecajem temperature vođenja procesa fermentacije što se ujedno odražava na duljinu trajanja tog procesa (Tronchoni i sur., 2009).

Upotrebom selekcioniranog kvasca postiže se brža fermentacija što je postignuto i u ovom radu uzimajući u obzir fermentacije vođene pri 20°C. U tom slučaju spontana fermentacija trajala je 7 dana (slika 7) dok je dirigirana fermentacija trajala 5 dana (slika 8). Za razliku od fermentacija vođenih pri nižoj temperaturi, fermentacije vođene pri višoj temperaturi (30°C) trajale su jednako dugo, tri dana (slika 9 i 10). Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima Herrera i Miño (2011) koji su također uspoređivali spontanu i dirigiranu (pomoću kvasca *Saccharomyces bayanus*) fermentaciju pri čemu su obje fermentacije trajale jednako dugo (15 dana). Upotreba selekcioniranog kvasca kod više temperature nije došla do izražaja u odnosu na epifitnu mikrofloru korištenog grožđa, ali je postignuto skraćanje trajanja fermentacije u odnosu na fermentacije vođene pri nižoj temperaturi. Prema tome se može zaključiti da i mikroorganizmima prirodno prisutnim na grožđu kao i selekcioniranom kvascu *S. cerevisiae* za brže provođenje fermentacije bolje pogoduje viša temperatura.

Utjecaj temperature na brzinu odvijanja fermentacije pratili su Molina i suradnici (2007) te su njihovi rezultati pokazali da je fermentacija vođena pri višim temperaturama (28°C) dva puta brža u odnosu na fermentaciju vođenu pri nižoj temperaturi (15°C). Fermentaciju su provodili uz inokulaciju komercijalnim kvascem *S. cerevisiae*. Uzimajući u obzir rezultate trajanja dirigiranih fermentacija pri različitim temperaturama dobiveni rezultati ovog rada su u skladu s rezultatima Molina i suradnika (2007) jer je dirigirana fermentacija pri 30°C (slika 10) oko dva puta brža od dirigirane pri 20°C (slika 8). Kako bi upotreba selekcioniranog kvasca dala željene rezultate vrlo je važna količina, održivost i pravilna upotreba inokuluma. Osim toga potrebno je poznavati fiziološke i metaboličke karakteristike odabranog kvasca te odabrati pravilne uvjete fermentacije za korišteni kvasac (Ciani i sur., 2010).

Dobiveni rezultati pokazuju najsporiju potrošnju šećera kod spontane fermentacije pri 20°C (slika 7) gdje je do utroška polovice početne koncentracije šećera došlo tek između četvrtog i petog dana fermentacije za razliku od spontane fermentacije pri višoj temperaturi koja je završila već trećeg dana. Takvi rezultati upućuju na to da je pri nižoj temperaturi prirodno prisutnim mikroorganizmima potrebno nešto duže vrijeme prilagodbe kako bi pri počeli aktivno djelovati. Isto tako se može zaključiti da selekcioniranom kvascu korištenom u ovom radu za aktivnije djelovanje pogoduje viša temperatura.

Prinos produkta odnosno volumni udio alkohola na kraju sve četiri fermentacije je približno jednak i iznosio je 7,1-7,4% (slike 7-10) što je očekivano s obzirom na približno istu koncentraciju supstrata (šećera). Takvi rezultati upućuju na to da su i epifitna mikroflora i korišten selekcionirani kvasac pokazali jednako iskorištenje supstrata iz početne sirovine neovisno o temperaturi vođenja procesa. Razlika je vidljiva smo u vremenu potrebnom za postizanje približno jednakog prinosa produkta. Kod fermentacija pri višoj temperaturi potrebno je značajno kraće vrijeme, tri dana (slika 9 i 10) za razliku od fermentacija vođenih pri 20°C gdje je za to bilo potrebno sedam dana (slika 7) odnosno pet dana (slika 8).

Uspoređujući dobivene rezultate za prinos alkohola kod dirigiranih fermentacija uz pomoć *S. cerevisiae* (slika 8 i 10) vidljiva je razlika u odnosu na rezultate Molina i suradnika (2007) gdje su se također uspoređivale dvije dirigirane fermentacije pomoću *S. cerevisiae* na dvije različite temperature. Za obje fermentacije se koristila sirovina s istim početnim udjelom šećera (240 g L⁻¹). Rezultati njihova rada su pokazali da je prinos alkohola (etanola) manji (13,4%) pri višoj temperaturi (28°C) u odnosu na nižu temperaturu (15°C) gdje je iznosio 14,8%. Razlog tome je što viša temperatura pogoduje nastanku veće koncentracije glicerola

pa je zbog toga zabilježena nešto manja koncentracija etanola. Također, moguće je da pri višim temperaturama dođe do isparavanja određene količine etanola.

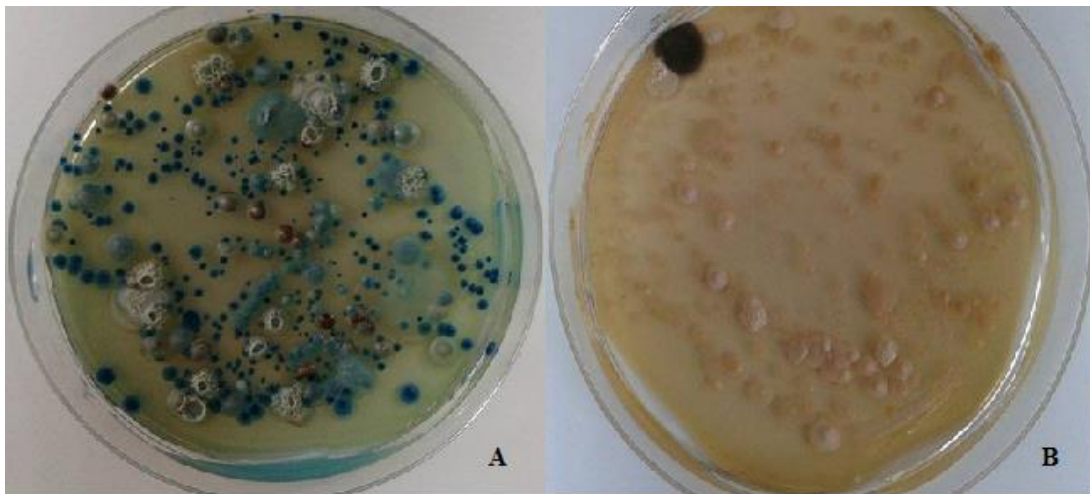
Na temelju usporedbe dobivenih rezultata prikazanih slikama 7-10 može se zaključiti da je u ovom radu značajni utjecaj na brzinu odvijanja fermentacije imala temperatura, fermentacije pri višoj temperaturi završavaju ranije u odnosu na fermentacije pri nižoj temperaturi. Primjena selekcioniranog kvasca skraćuje vrijeme trajanja fermentacije pri nižoj temperaturi dok pri višoj temperaturi primjena selekcioniranog kvasca nije došla do izražaja. Iskorištenje šećera odnosno volumni udio nastalog produkta približno je jednak pri svim primijenjenim uvjetima fermentacija.

4.2. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA EPIFITNE MIKROFLORE GROŽĐA

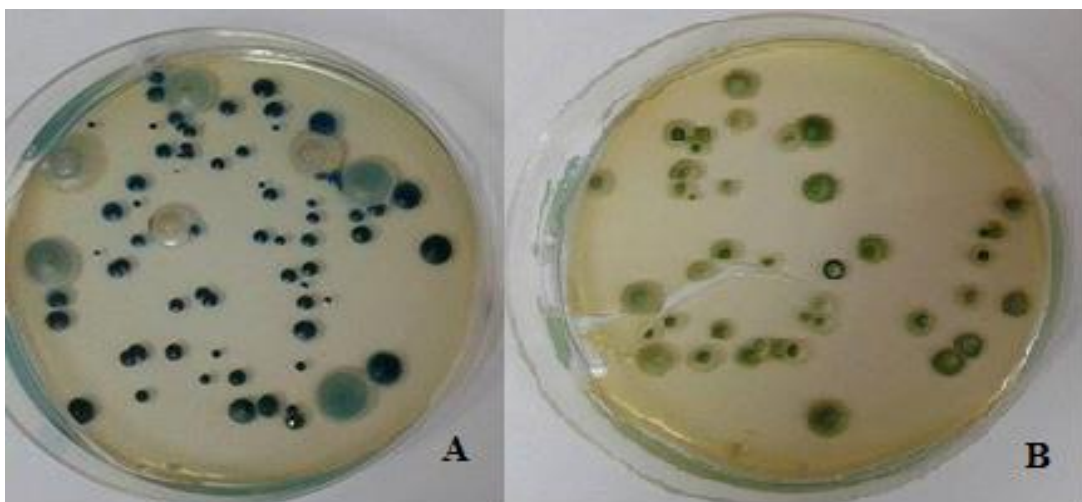
Poznavanje mikroflore grožđa od izuzetne je važnosti kako bi se od njega dobio kvalitetan proizvod (vino, rakija i sl.). Na površini grožđa može se pronaći veliki broj mikroorganizama uključujući plijesni, kvasce, bakterije. Broj tih mikroorganizama ovisi o stupnju zrelosti grožđa i o dostupnosti hranjivih tvari. Na mikrofloru grožđa veliki utjecaj imaju klima, vremenske pogodnosti te oštećenje površine bobice od strane ptica i kukaca (Barata i sur., 2012). Kvasci prisutni na površini grožđa imaju vrlo važnu ulogu u kreiranju završne arome proizvoda. Tijekom fermentacije metabolička aktivnost kvasca djeluje dvojako; proizvodi nove spojeve arome i metabolizira prekursore spojeva aroma prirodno prisutnih u grožđu. Iako je sve veći trend upotreba starter kulture *S. cerevisiae* u procesu vođenja fermentacija, kako bi se dobio ujednačen proizvod, ne smiju se zanemariti ni autohtoni kvasci grožđa (*ne-Saccharomyces* vrste). Sudjelovanje tih kvasaca u procesu fermentacije daje proizvod složenijeg aromatičnog sastava (Romano i sur., 2003). Stoga je cilj ovog dijela rada bio izolirati i identificirati kvasce prisutne na grožđu odgovorne za vođenje spontane fermentacije pri nižoj temperaturi (20°C).

Na osnovu morfoloških razlika, od poraslih kolonija nakon naciepljivanja uzoraka mošta i komine na hranjive podloge, odabrane su različite kolonije (označene slovima C-O) koje su izolirane i identificirane. Kolonije su identificirane proteomički s pomoću uređaja MALDI-TOF Biotyper.

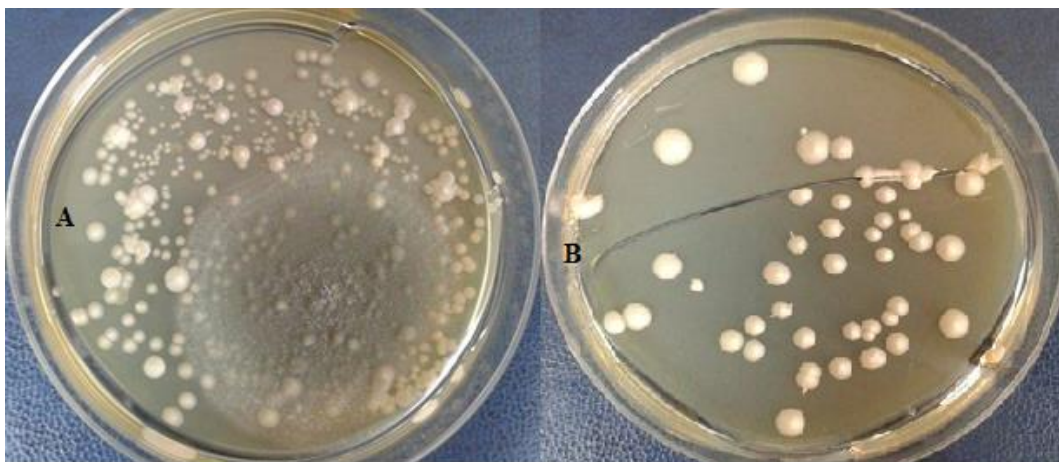
Porast mikroorganizama prikazan je slikama 11-13, a rezultati identifikacije dani su u tablici 9.



Slika 11. Porast mikroorganizama iz uzorka mošta namijenjenog spontanoj fermentaciji na 20°C, A- WL podloga, B-YPD podloga; uzorci naciepljeni u volumenu 100 μL i 10^{-3} razrjeđenju



Slika 12. Porast mikroorganizama na WL podlozi: A- uzorak prvog dana spontane fermentacije na 20°C, naciepljen u volumenu 100 μL i razrjeđenju 10^{-4} , B- uzorak sedmog dana spontane fermentacije na 20°C, naciepljen u volumenu 10 μL i razrjeđenju 10^{-4}



Slika 13. Porast mikroorganizama na YPD podlozi: A- uzoraka prvog dana spontane fermentacije na 20°C, naci jepljen u volumenu 100 μ L i razrjeđenju 10^{-3} , B- uzorak sedmog dana spontane fermentacije na 20°C, naci jepljen u volumenu 10 μ L i razrjeđenju 10^{-4}

Tablica 9. Rezultati identifikacije s pomoću uređaja MALDI-TOF Biotyper

OZNAKA IZOLIRANE KOLONIJE	REZULTATI IDENTIFIKACIJE
C	<i>Kloeckera apiculata</i>
D	n.d.*
E	n.d.*
F	<i>Pichia kluyveri</i>
G	n.d.*
H	n.d.*
I	n.d.*
K	<i>Kloeckera apiculata</i>
L	n.d.*
M	n.d.*
N	<i>Kloeckera apiculata</i>
O	<i>Pichia kluyveri</i>

***n.d.**-nije identificirano

Kako kvasci imaju najveći utjecaj na kemijski sastav konačnog proizvoda fermentacije, važno je poznavati vrstu i dinamiku rasta tih kvasaca tijekom procesa fermentacije. Na WL podlozi (slika 11 A), selektivnoj podlozi za kvasce vidljiv je porast mješovite kulture pri čemu dominiraju tamnozeleno kolonije (C) za koje je identifikacijom potvrđeno da se radi o kvascu *Kloeckera apiculata*. Uz ovu vrstu, vidljiv je i porast kremastih kolonija (F) koje su identificirane kao kvasac *Pichia kluyveri* te bijelih kolonija s krunom (D), tamnocrvenih (E), svijetlo plave kolonije (G) kao i bijelo-plave kolonije (H) koje nisu identificirane.

Kao i na WL podlozi i na YPD podlozi (slika 11 B) došlo je do porasta mješovite kulture s dominacijom bijelih kolonija s vrhom za koje se identifikacijom pokazalo da se radi o kvascu *Kloeckera apiculata*. Time se može zaključiti da su tamnozeleno kolonije na WL podlozi i bijele kolonije s vrhom na YPD podlozi zapravo ista vrsta kvasca. Također su još prisutne kremaste kolonije (F) identificirane kao *Pichia kluyveri* i ružičaste kolonije (L). Radi se o uzorcima 0. dana fermentacije, odnosno uzorka dobivenog nakon usitnjavanja (muljanja) grožđa što upućuje na raznolikost epifitne mikroflore grožđa. Udio tih mikroorganizama značajno ovisi o stupnju zrelosti grožđa i dostupnosti hranjivih tvari za njihov rast. Kvasac *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) identificiran je i u istraživanju Li i suradnika (2010) kod svih analiziranih uzoraka grožđa neposredno nakon usitnjavanja, ubranih u različitim vinogradima. U istraživanju Combina i suradnika (2005) tijekom proizvodnje triju različitih vina spontanom fermentacijom najčešće pronađena ne-*Saccharomyces* vrsta u uzorcima svježeg usitnjenog grožđa također bilo je kvasac *Kloeckera apiculata* uz *Metschnikowia pulcherrima*, dok je *Saccharomyces cerevisiae* kod takvih uzoraka pronađen u jako malom postotku (2%).

Slika 12 A prikazuje porast mikroorganizama na WL podlozi na koju je nacijepljen uzorak komine prvog dana fermentacije gdje su od prisutnih kolonija identificirani *Kloeckera apiculata* i *Pichia kluyveri* (kremaste kolonije). Na slici 12 B prikazan je porast svijetlozelenih kolonija na istoj podlozi, ali iz uzorka zadnjeg dana fermentacije gdje se može zaključiti da prevladava kvasac iz roda *Saccharomyces*. Karakteristika rasta kvasca iz tog roda na WL podlozi je da iz nje izvlači zeleno bojilo (bromkrezol) i poprima svijetlozelenu boju, a podloga postaje prozirna. Najznačajnija vrsta kvasca iz roda *Saccharomyces* u alkoholnoj fermentaciji je *S. cerevisiae* koji je odgovoran i za njen završetak (Grba, 2010). Stoga se može zaključiti da je na WL podlozi upravo došlo do porasta kvasca *S. cerevisiae* te da on

dominira na kraju fermentacije. Rezultati istraživanja Combina i suradnika (2005) također su pokazali da je *S. cerevisiae* dominantan kvasac na kraju fermentacije.

Slika 13 A prikazuje porast mikroorganizama na YPD podlozi pri čemu prevladavaju kolonije identificirane kao *Kloeckera apiculata* uz pojavu ružičastih kolonija i sive plijesni. Najčešći uzročnik sive truleži, a ujedno i najznačajniji predstavnik plijesni na grožđu je *Botrytis cinerera*. Do pojave takve plijesni na grožđu često dolazi uslijed jakih oborina prije i tijekom berbe, a kao posljedica se može javiti negativan utjecaj na organoleptička svojstva vina (Barata i sur., 2012). U istraživanju La Guerche i suradnika (2006) također je izolirana *B. cinerera* koja je bila odgovorna za sintezu spojeva koji uzrokuju nepoželjan („off“) miris mošta.

Slika 13 B prikazuje porast kolonija na YPD podlozi nacijepjenih iz uzorka zadnjeg dana fermentacije gdje se može vidjeti porast bijelih kolonija identificiranih kao *Kloeckera apiculata*. Veća koncentracija etanola inhibira rast kvasca *Kloeckera apiculata* pa se njegova prisutnost u zadnjoj fazi fermentacije očekuje u manjoj mjeri u odnosu na *S. cerevisiae*. Bezerra-Bussoli i suradnici (2013) koji su proveli istraživanje spontane fermentacije tri različite sorte grožđa. Za istu sortu grožđa kao i u ovom radu (Izabela) dobili su rezultate da u početnoj fazi fermentacije prevladavaju kvasci *H. uvarum* (*Kloeckera apiculata*) i *Pichia kluyveri* dok u srednjoj i završnoj fazi prevladavaju *H. uvarum* (*Kloeckera apiculata*) i *S. cerevisiae* pri čemu je *S. cerevisiae* u zadnjoj fazi fermentacije prisutan u značajno većem postotku u odnosu na *H. uvarum* (*Kloeckera apiculata*).

Nakon provedene identifikacije, od 12 morfološki različitih izoliranih kolonija koje su činile mješovitu kulturu identificirano je samo pet (tablica 9). U dva slučaja potvrđen je kvasac *Pichia kluyveri* dok je u druga tri identifikacijom utvrđeno da se radi o kvascu *Kloeckera apiculata*. Može se zaključiti da odabrana metoda nije pogodna za identifikaciju kvasaca koji se koriste u prehrambenoj industriji. Naime, identifikacija se zasniva na usporedbi proteoma nepoznatog mikroorganizma s proteomima mikroorganizama dostupnim u bazi podataka. Međutim, baza podataka bogata je mikroorganizmima koji čine mikrofloru čovjeka, značajnu s medicinskog stajališta, dok su mikroorganizmi prehrambeno-poljoprivredne industrije manje zastupljeni. Stoga je veći broj izoliranih kolonija ostao neidentificiran.

4.3. ODREĐIVANJE HLAPIVIH SPOJEVA PRISUTNIH U PREFERMENTIRANIM KOMINAMA I U DESTILATIMA

Kontrola kvalitete jakih alkoholnih pića i alkoholnih pića izrazito je važna zbog njihova utjecaja na zdravlje potrošača, posebno zbog toksičnog djelovanja određenih spojeva kao što je metanol. Kemijski spojevi koji tvore njihovu aromu u prosječnim koncentracijama imaju pozitivan učinak, dok u povišenim koncentracijama zbog prodornog mirisa mogu imati negativan utjecaj.

Kako bi se proizvela što kvalitetnija i aromatičnija rakija, osim kvalitete početne sirovine, izrazito je važna i kvaliteta prefermentirane komine koja se destilira. Destilacija slijedi nakon fermentacije, a o usklađenosti tih dvaju procesa ovisit će i kvaliteta destilata (Banić, 2006). Važno je da se nakon završene fermentacije pa sve do destilacije u komini zadrži što više nastalih spojeva arome. Kako bi se odredila koncentracija spojeva arome nastalih tijekom fermentacije i destilacije potrebno je provesti analizu destilata i prefermentirane komine. Kemijska analiza spojeva arome daje podatke o kvaliteti dobivenog proizvoda te se na temelju tih podataka mogu poboljšati određeni postupci u proizvodnji koji će osigurati ujednačenu kvalitetu proizvoda.

U zadnjem dijelu ovog rada cilj je bio analizirati hlapive spojeve u prefermentiranim kominama i proizvedenim destilatima te na temelju dobivenih rezultata odrediti razliku u njihovoj kvaliteti s obzirom na različite uvjete vođenja fermentacija, a uz to utvrditi da li je primijenjena metoda destilacije u šaržnom laboratorijskom kotlu dala dobro razdvojene tokove.

Analiza hlapivih spojeva prisutnih u prefermentiranim kominama i dobivenim destilatima provodila se na plinskom kromatografu (GC) s plamenoionizacijskim detektorom (FID)-Hewlett-Packard HP 5890. Kvantifikacija hlapivih spojeva arome provedena je računalnom analizom podataka dobivenih programom HP-chem pomoću metode internog standarda.

Uzorci su analizirani u dvije paralele te je nakon toga izračunata srednja vrijednost i provedena statistička obrada podataka. Rezultati koncentracija hlapivih spojeva prisutni u prefermentiranim kominama i destilatima prikazani su na slikama 14-31.

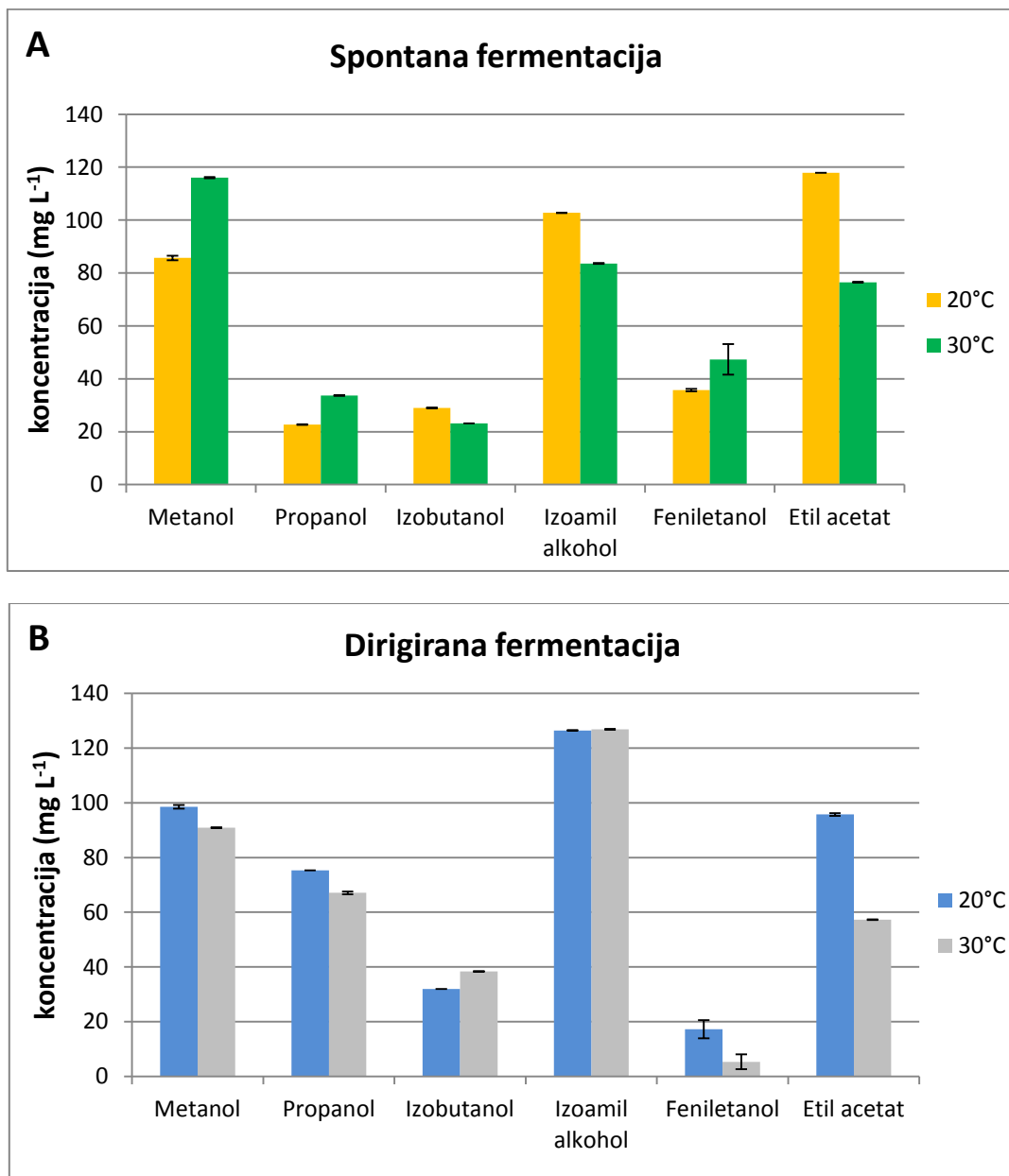
U radu su korištena trivijalna imena analiziranih hlapivih spojeva arome zbog češće upotrebe tih naziva u literaturi, a njihovi nazivi prema IUPAC nomenklaturi navedeni su u tablici 10.

Tablica 10. Popis trivijalnih imena analiziranih hlapivih spojeva arome, njihova pripadajuća IUPAC nomenklatura i pripadajući miris pojedinih spojeva

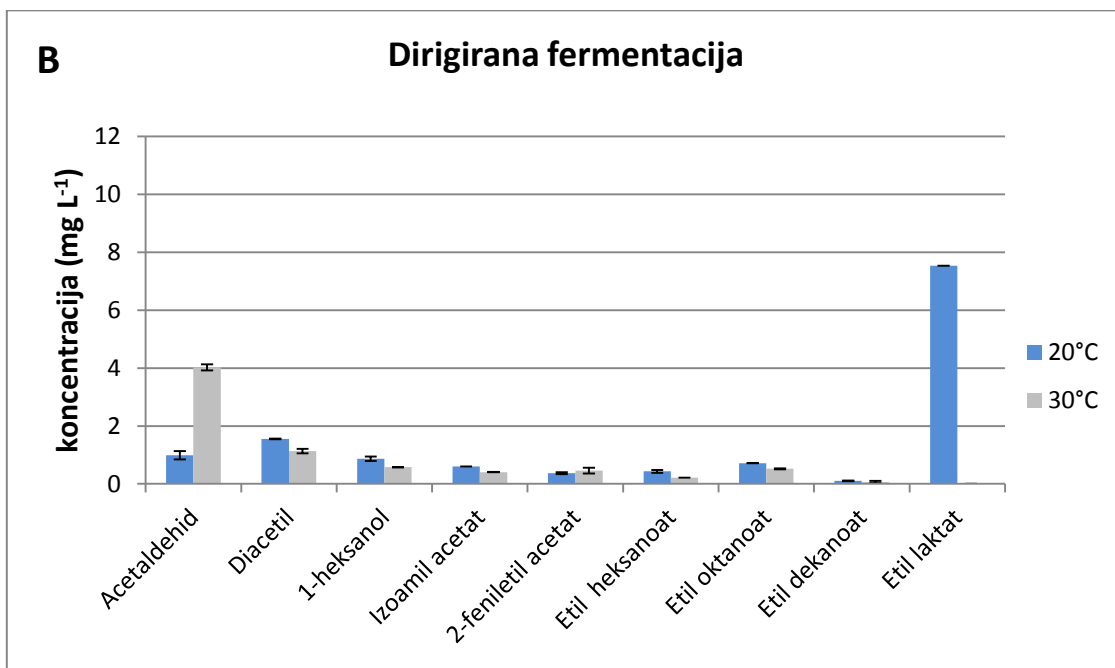
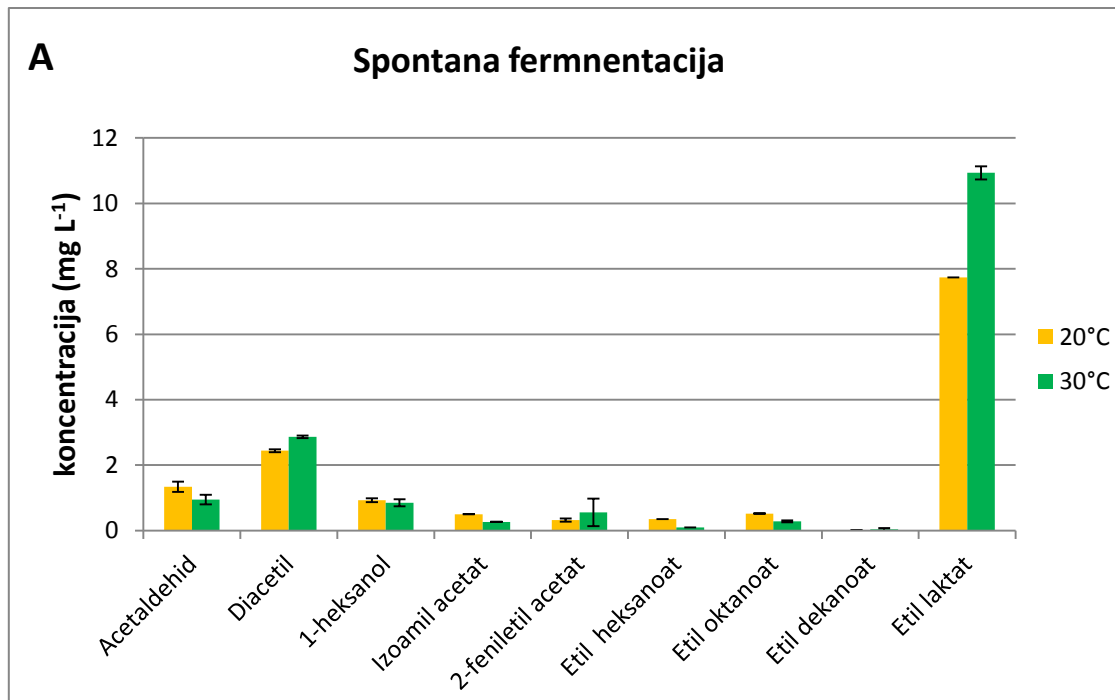
Trivijalno ime	IUPAC nomenklatura	Miris (Christoph i Bauer-Christoph, 2007)
Acetaldehid	Etanal	opor miris
Diacetil	2,3-butandion	miris na maslac
Metanol	Metanol	alkoholni miris
Propanol	Propan-1-ol	alkoholni miris
Izobutanol	2-metilpropan-1-ol	alkoholni miris
Izoamil alkohol	3-metil-1-butanol	sladni 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	-
2-feniletil acetat	2-feniletil acetat	miris na ružu, na med, voćni
Dietil sukcinat	Dietil ester butandionske kiseline	-
Etil laktat	etil-2-hidroksiopropanoat	-
Etil heksanoat	Etil heksanoat	miris na jabuku, bananu
Etil oktanoat	Etil oktanoat	miris na ananas, krušku
Etil dekanooat	Etil dekanooat	cvjetni miris

4.3.1. Hlapivi spojevi prisutni u prefermentiranim kominama grožđa

U procesu alkoholne fermentacije dolazi do sinteze brojnih hlapivih spojeva kao što su viši alkoholi, esteri te karbonilni spojevi koji sudjeluju u formiranju ukupne arome rakije. Bez dobro vođene alkoholne fermentacije nema niti kvalitetnog destilata (Banić, 2006). Dobiveni rezultati analize hlapivih spojeva arome prisutnih u spontano i dirigirano prefermentiranim kominama grožđa pri različitim temperaturama prikazani su na slikama 14 i 15. Na temelju tih podataka moguće je procijeniti koja od četiri tipa različitih prefermentiranih komina će dati kvalitetniju rakiju.



Slika 14. Usporedba koncentracija prve skupine analiziranih spojeva arome u: A- spontano i B- dirigirano prefermentiranim kominama pri različitim temperaturama fermentacije



Slika 15. Usporedba koncentracija druge skupine analiziranih spojeva arome u: A- spontano i B- dirigirano prefermentiranim kominama pri različitim temperaturama fermentacije

4.3.1.1. Alkoholi

a) Metanol

Metanol nastaje djelovanjem enzima pektinmetilesteraze te nema nikakav utjecaj na senzorska svojstva konačnog proizvoda fermentacije niti stupa u reakciju s drugim spojevima koji se u njemu nalaze (Grba, 2010). Iz priloženih rezultata (slika 14 A) može se vidjeti da je u spontano prefermentiranoj komini pri 30°C izmjerena najviša koncentracija metanola (116,1 mg L⁻¹), dok su pri nižoj temperaturi (slika 14 A) i dirigiranoj fermentaciji (slika 14 B) vrijednosti metanola bile niže (85,6-98,5 mg L⁻¹). Iacumin i suradnici (2012) su veću koncentraciju metanola zabilježili i kod spontane i kod dirigirane fermentacije komine grožđa pri višoj temperaturi (36°C) u odnosu na nižu temperaturu (15°C), a razlog tome može biti to što je maksimalna aktivnost pektolitičkih enzima izražena pri temperaturama 35°C-50°C dok je pri nižim temperaturama ta aktivnost manje izražena. Iacumin i suradnici (2012) navode da je za proizvodnju kvalitetnije rakije s manjim udjelom metanola pogodnije fermentaciju voditi pri nižim temperaturama neovisno radi li se o spontanom ili dirigiranom vođenju fermentacije.

b) Viši alkoholi

Viši alkoholi su produkti alkoholne fermentacije, a sintetiziraju ih kvasci izravno iz šećera ili aminokiselina (Tsakiris i sur, 2014). Uspoređujući koncentracije viših alkohola: izoamil alkohola, propanola te izobutanola, veće koncentracije su zabilježene kod dirigirano prefermentiranih komina (slika 14 B), neovisno o temperaturi. To je posebice vidljivo kod propanola i izobutanola gdje su koncentracije pri dirigiranoj fermentaciji iznosile 67,1-75,2 mg L⁻¹ za propanol te 31,9-38,3 mg L⁻¹ za izobutanol, dok su pri spontanoj fermentaciji iznosile svega 22,6-33,6 mg L⁻¹ za propanol te 23,1-28,9 mg L⁻¹ za izobutanol. Romano i suradnici (2003) istraživali su utjecaj pojedine vrste kvasaca na formiranje spojeva koji doprinose ukupnoj aromi vina te su njihovi rezultati pokazali da se više izoamil alkohola sintetizira kada se fermentacija vodi pomoću kvasca *S. cerevisiae* što odgovara rezultatima ovog eksperimenta jer je veća koncentracija tog spoja nastala upravo kod fermentacija vođenih uz dodatak kvasca *S.cerevisiae*.

Iznimka je feniletanol čija je koncentracija bila značajno viša u spontano prefermentiranim kominama (slika 14 A) u odnosu na dirigirano prefermentirane komine (slika 14 B). Pri čemu je najviša koncentracija analiziranog spoja izmjerena kod spontano

prefermentirane komine pri 30°C (47,3 mg L⁻¹), a najniža kod dirigirano prefermentirane komine pri 30°C (5,2 mg L⁻¹).

Koncentracije 1-heksanola su podjednake u spontano prefermentiranim kominama (slika 15 A) i dirigirano prefermentiranoj komini pri nižoj temperaturi (slika 15 B) dok je nešto manja koncentracija tog spoja zabilježena kod dirigirano prefermentirane komine (slika 15 B) pri 30°C. Na koncentraciju ovog spoja u komini utječu postupci koji slijede prije same fermentacije (berba, gnječenje, usitnjavanje grožđa) (Oliveira i sur., 2006).

4.3.1.2. Esteri

Općenito, najznačajniji esteri koji doprinose aromi fermentiranih i destiliranih pića su etil acetat te acetatni esteri viših alkohola i etil esteri viših masnih kiselina.

a) Etil acetat te acetatni esteri viših alkohola

Esteri imaju vrlo značajan utjecaj na aromatična svojstva vina odnosno krajnji proizvod alkoholne fermentacije. Jedan od glavnih predstavnika estera je acetatni ester, etil acetat, koji u većoj mjeri nastaje djelovanjem aerobnih bakterija octene kiseline (Tsakiris i sur., 2014). Uspoređujući koncentracije etil acetata prikazane slikom 14 A i B vidljivo je da je veća koncentracija ovog spoja prisutna u spontano prefermentiranim kominama u odnosu na dirigirano prefermentirane komine. Jedan od razloga veće količine ovog spoja kod spontano prefermentirane komine je prisutnost kvasca *Kloeckera apiculata* koji je identificiran kao prirodno prisutan na korištenoj sorti grožđa. On pokazuje sposobnost za formiranje visokih koncentracija etil acetata (Plata i sur., 2003). Veću koncentraciju ovog spoja kod fermentacija vođenih spontano u odnosu na one vođene uz dodatak kvasca *S. cerevisiae* zabilježili su Regidon Mateos i suradnici (2006). Također se može uočiti da je veća koncentracija tog spoja nastala pri nižoj temperaturi fermentacije u odnosu na višu temperaturu. Dobiveni rezultati odgovaraju rezultatima Molina i suradnika (2007) koji su također dobili veće koncentracije etil acetata pri nižoj (15°C) ispitivanoj temperaturi u odnosu na višu (28°C) temperaturu.

Na slici 15 A i B može se uočiti da su koncentracije nastalih acetatnih estera viših alkohola 2-feniletil acetata i izoamil acetata značajno niže (<0,6 mg L⁻¹) kod prefermentiranih komina obje vrste fermentacija i pri obje temperature u odnosu na etil acetat čije su koncentracije u rasponu 57,2 - 117,8 mg L⁻¹ (slika 14 A i B).

b) Etil laktat i etil esteri viših masnih kiselina

Etil laktat u većim koncentracijama nastaje tijekom malolaktične fermentacije djelovanjem bakterija mliječne kiseline (Louw i Lambreschts, 2012). Kako na aktivnost bakterija mliječne kiseline (BMK) utječu različiti parametri (temperatura, pH, koncentracije etanola, koncentracija hranjivih tvari kao što je jabučna kiselina) tako je moguće u prefermentiranim kominama iste sorte grožđa pronaći navedeni spoj u širokom rasponu. Najveća koncentracija etil laktata zabilježena je kod spontano prefermentirane komine pri 30°C, a iznosila je 10,9 mg L⁻¹ (slika 15 A) kao rezultat metaboličke aktivnosti BMK koje su bile prisutne kod spontane fermentacije i kojima pogoduje viša temperatura fermentacije. Kod dirigirano i spontano prefermentiranih komina pri 20°C koncentracije nastalog etil laktata su bile niže zbog slabije metaboličke aktivnosti BMK pri nižim temperaturama, dok kod dirigirano prefermentirane komine pri 30°C nije zabilježena prisutnost tog spoja (slika 15 B).

Od poželjnih etil estera viših masnih kiselina određivani su etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanat. Oni su, za razliku od dosada navedenih spojeva (viših alkohola, metanola, etil acetata..), prisutni u znatno manjim koncentracijama. Tako je etil dekanat kod svih analiziranih prefermentiranih komina prisutan u koncentracijama <0,1 mg L⁻¹ (slika 15 A i B). Izmjerene koncentracije etil oktanoata bile su <0,7 mg L⁻¹, a etil heksanoata <0,4 mg L⁻¹ (slike 15 A i B). Razlog niske koncentracije navedenih estera viših masnih kiselina u kominama zadnjeg dana fermentacije može biti to što se oni sintetiziraju u početnoj fazi alkoholne fermentacije (Molina i sur., 2007).

4.3.1.3. Karbonilni spojevi

a) Acetaldehid

Acetaldehid je spoj čiji nastanak je uvjetovan aktivnošću enzima piruvat dekarboksilaze tijekom fermentacije. Poželjan je samo u nižim koncentracijama jer više koncentracije ovog spoja imaju negativan utjecaj na aromu proizvoda fermentacije (Grba, 2010). Najveća koncentracija acetaldehida izmjerena je kod dirigirano prefermentirane komine pri 30°C (slika 15 B) i iznosila je 4,1 mg L⁻¹ dok je u ostale tri prefermentirane komine koncentracija analiziranog spoja bila nešto manja (<1,3 mg L⁻¹). Dobiveni rezultati odgovaraju rezultatima Romano i suradnika (1994) gdje je također zabilježen porast koncentracije acetaldehida pri najvišoj temperaturi (30°C) tijekom praćenja dirigiranih fermentacija uz kvasac *S. cerevisiae* pri različitim temperaturama. Autori navode da razlog

tome može biti inaktivacija alkohol dehidrogenaze pri povišenoj temperaturi, nema redukcije acetaldehida u etanol te dolazi do akumulacije acetaldehida.

b) Diacetil

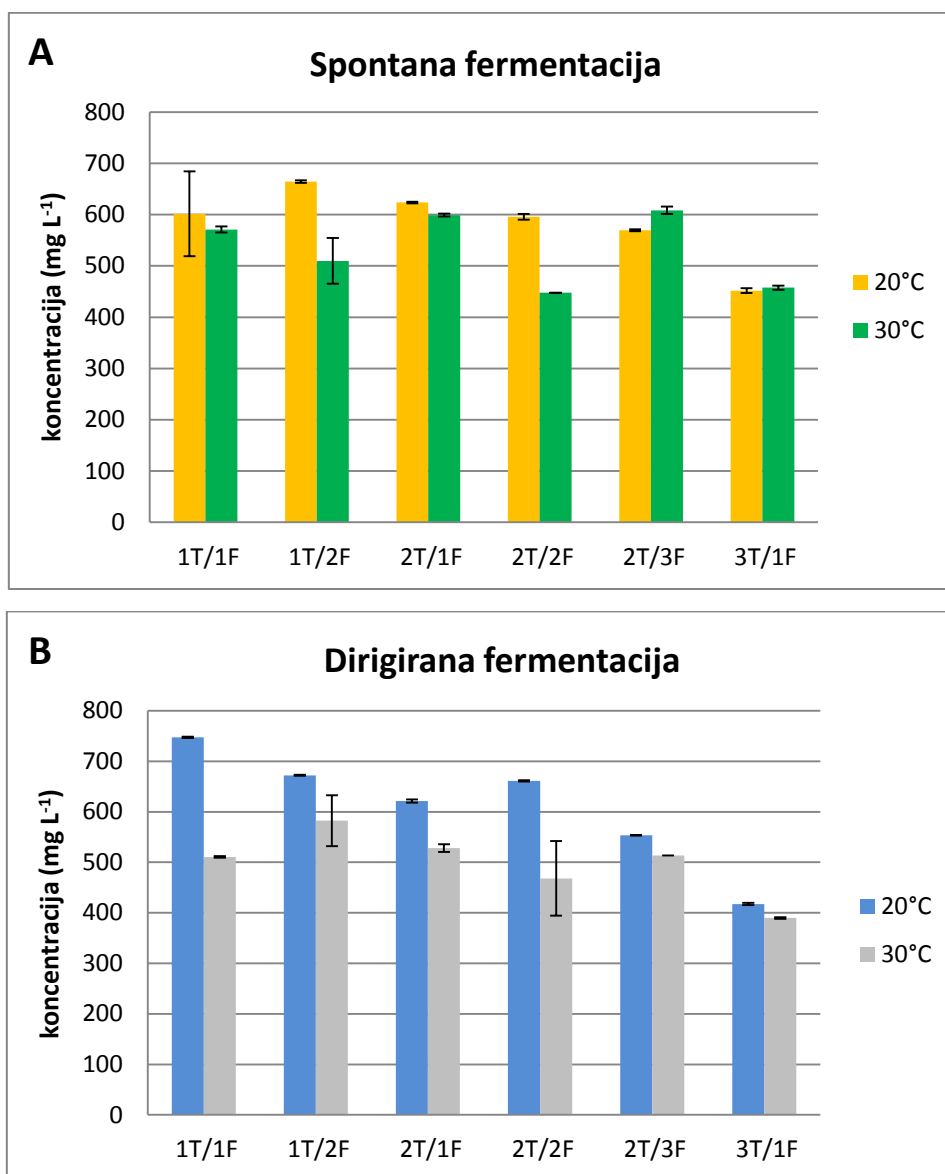
Diacetil nije stabilan produkt malolaktične fermentacije već se lako reducira u 2,3-butandiol, a njegova konačna koncentracija ovisi upravo o odnosu stvorenog i reduciranog diacetila. Važan je aromatični spoj, ali njegov utjecaj na aromu uvelike ovisi o njegovoj koncentraciji (Grba, 2010). Na slici 15 A vidljivo je da je koncentracija diacetila veća kod spontano prefermentiranih komina u odnosu na dirigirano prefermentirane komine (slika 15 B), posebice pri višoj temperaturi. Malolaktična fermentacija najčešće nastupa spontano i nekontrolirano te to može biti razlog povećanoj koncentraciji diacetila upravo kod spontano prefermentiranih komina.

4.3.2. Hlapivi spojevi prisutni u destilatima

Hlapivi 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 (Nikičević i Tešević, 2010). Na kraju destilacije dobiveni destilati sadrže veliki broj različitih spojeva, a ovisno o načinu vođenja destilacije i o pravilnom prekidanju pojedinog toka, koncentracija tih spojeva se mijenja. Primijenjenom analitičkom metodom analize hlapivih spojeva određivano je 16 najznačajnijih spojeva koji sudjeluju u formiranju sekundarne arome destilata, odnosno potječu od alkoholne fermentacije te njome nije bilo moguće odrediti spojeve koji pridonose formiranju sortne arome rakije. Analizom prefermentiranih komina ukupno gledano veće koncentracije poželjnih hlapivih spojeva arome nastale su kod dirigiranih fermentacija. Stoga se očekivalo da će i rakije tih prefermentiranih komina biti aromatičnije. U daljnjem tijeku rada prikazane su koncentracije osnovnih hlapivih spojeva izmjerenih u pojedinim tokovima i frakcijama destilata dobivenih iz prefermentiranih komina. Rezultati su prikazani na slikama 16-31.

4.3.2.1. Alkoholi

a) Metanol



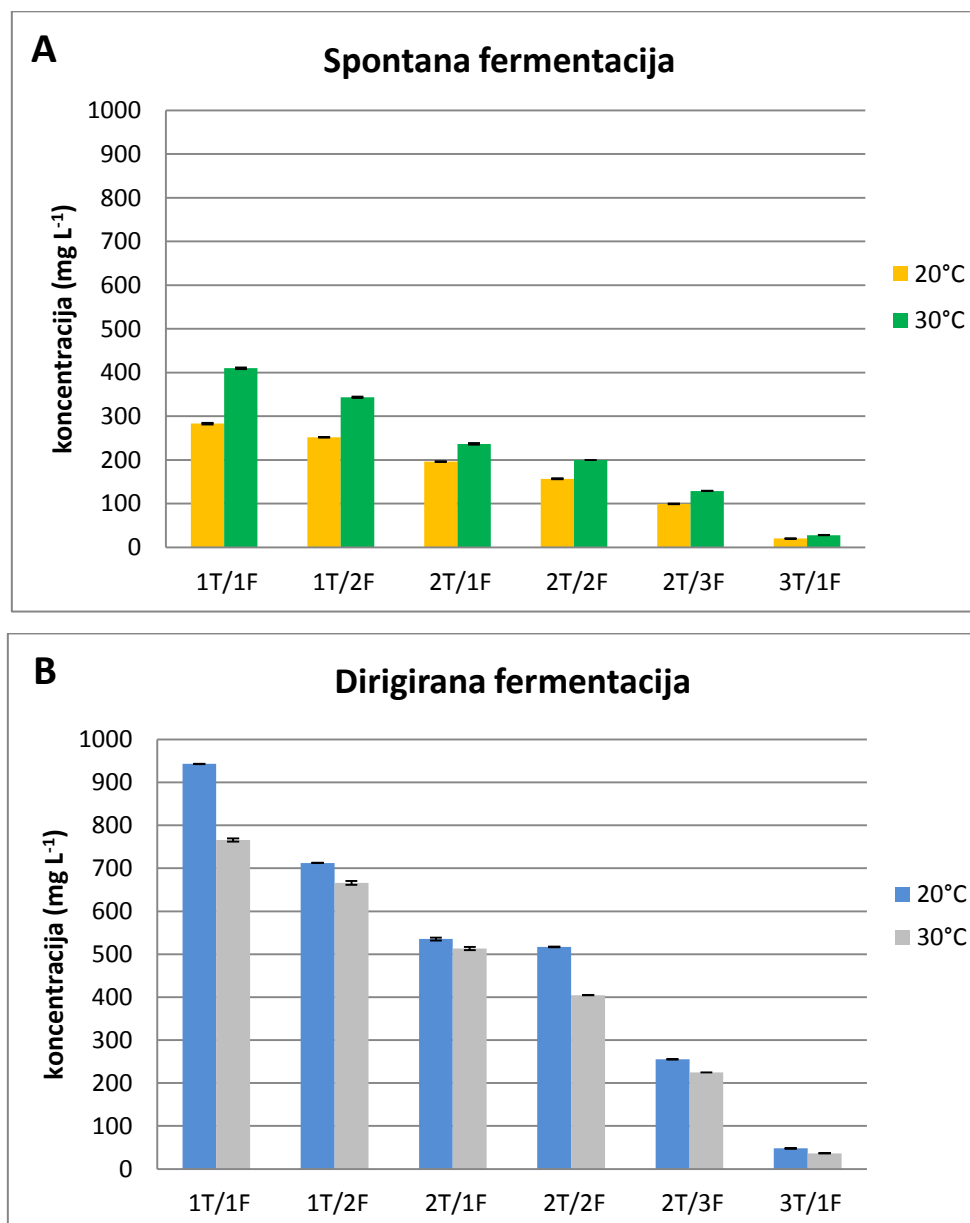
Slika 16. Usporedba koncentracija metanola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

Metanol je redoviti sastojak voćnih rakija. Njegova koncentracija u rakijama mora se pažljivo nadzirati (Silva i Malcata, 1999) te je on jedan od najčešće određivanih parametara pri provjeri kvalitete rakije. Za razliku od ostalih analiziranih hlapivih spojeva, koji su više odnosno manje prisutni u početnim ili krajnjim frakcijama destilata kod metanola to nije uočeno. On je podjednako zastupljen u svim frakcijama destilata (slika 16 A i B). U srednjem, glavnom toku destilata nešto više koncentracije ovog spoja prisutne su kod destilata prefermentiranih komina pri nižoj temperaturi, neovisno radi li se o spontanoj ili dirigranoj fermentaciji. Vukosavljević i suradnici (2015) su također zabilježili nešto veću koncentraciju metanola ($1,65 \text{ g L}^{-1}$ a.a.) kod *loze* dobivene destilacijom prefermentirane komine pri 20°C u odnosu na *lozu* prefermentirane komine pri 30°C ($1,40 \text{ g L}^{-1}$ a.a.). Koncentracija metanola uvelike ovisi o sastavu polazne sirovine, odnosno o količini pektina. U istraživanju Kostik i suradnika (2013) koji su uspoređivali uzorke tri vrste rakija od grožđa i šljiva, najveća koncentracija tog spoja zabilježena je u šljivovici, nešto manja u komovici i *lozi*, a najmanja u vinjaku.

Izmjerene koncentracije metanola u svim frakcijama srednjeg toka koje čine proizvod za konzumaciju odgovaraju dozvoljenoj koncentraciji tog spoja u *lozi* danoj pravilnikom o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09). Ona iznosi $320\text{-}1600 \text{ mg L}^{-1}$ računato na 40% vol. alkohola dok se u ovom radu metanol u frakcijama srednjeg toka nalazi u rasponu $447,5\text{-}661,1 \text{ mg L}^{-1}$. Sve četiri proizvedene rakije su sigurne za konzumaciju te nema opasnosti od štetnog utjecaja metanola na zdravlje.

b) viši alkoholi

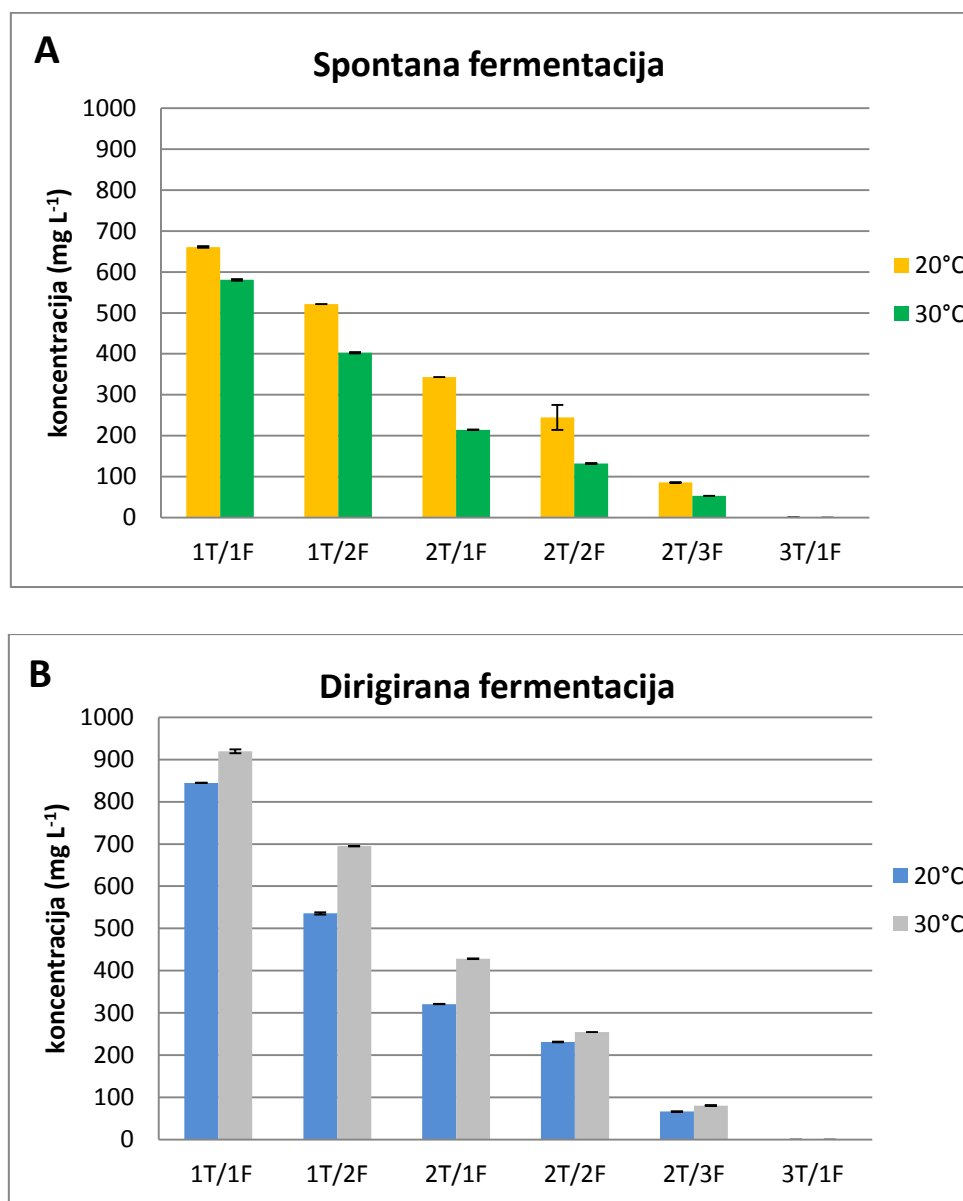
Propanol



Slika 17. Usporedba koncentracija propanola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

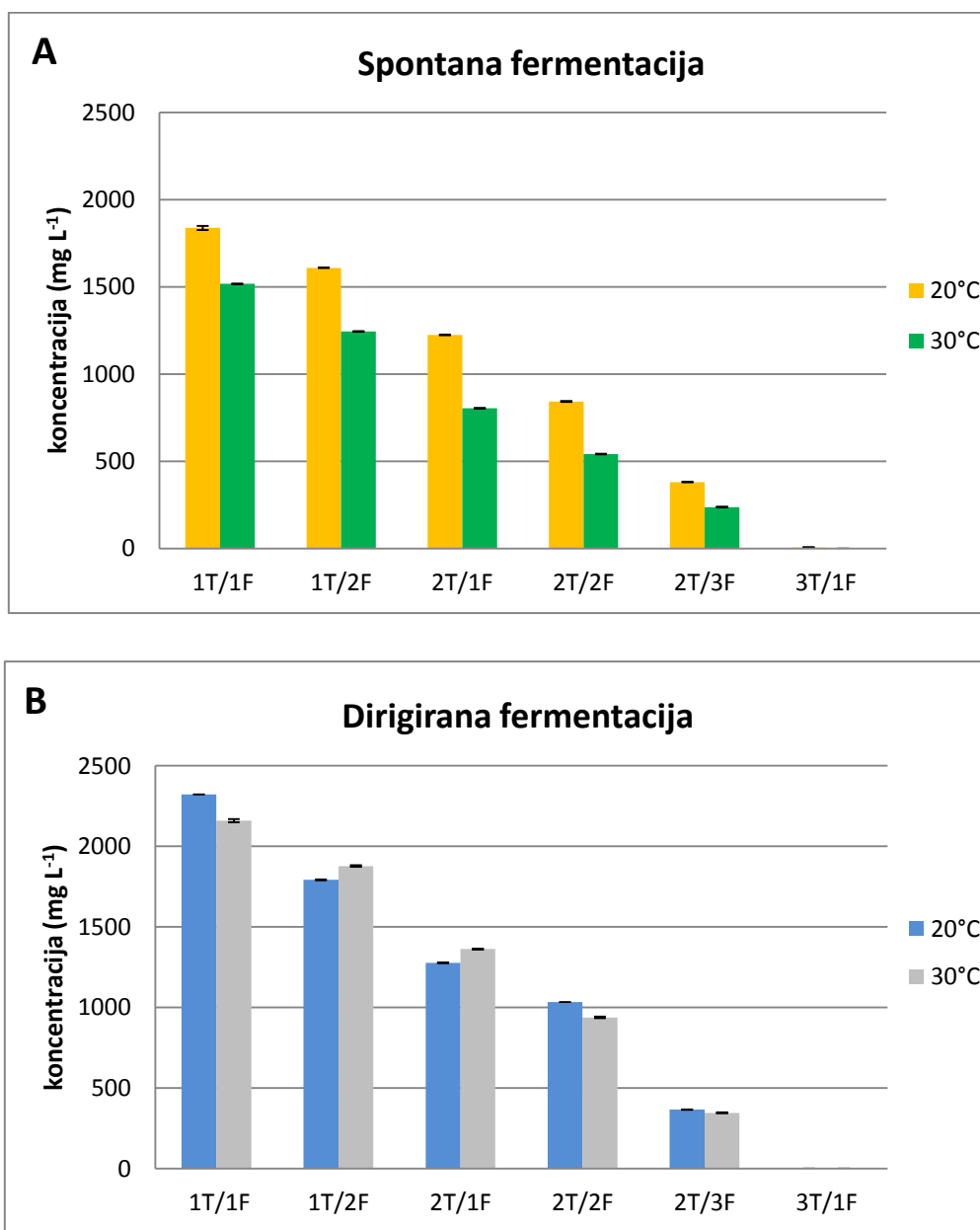
Propanol ulazi u skupinu alifatskih alkohola, a njegova koncentracija u destilatima ponajviše ovisi o primijenjenom postupku razdvajanja tokova destilata (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Propanol je u destilatima nositelj oštrog, ali ugodnog mirisa (Nikičević i Tešević, 2010). Na slici 17 B može se vidjeti da je značajno veća koncentracija propanola prisutna u destilatima dirigitano prefermentiranih komina u odnosu na destilate spontano prefermentiranih komina (slika 17 A), neovisno o temperaturi. Koncentracija propanola postepeno se smanjuje prema kraju destilacije (slika 17 A i B) što je u skladu s rezultatima Lukić i suradnika (2011a) dobivenim u komovici dirigitano prefermentirane komine grožđa sorte Muškat ruža porečki gdje je najveća koncentracija ovog spoja izmjerena u prvom toku destilata ($461,97 \text{ mg L}^{-1}$ a.a.), a najmanja u zadnjem ($281,93 \text{ mg L}^{-1}$ a.a.). Prema Christoph i Bauer-Christoph (2007) prosječna koncentracija propanola u voćnim rakijama je $40\text{-}800 \text{ mg L}^{-1}$. Dobivene koncentracije ovog spoja u srednjem toku destilata, odnosno u proizvodu namijenjenom za konzumaciju, odgovaraju prosječnoj koncentraciji tog spoja u voćnim rakijama. One se u slučaju destilata srednjeg toka dirigitano prefermentiranih komina kreću se u rasponu $224,5\text{-}535,3 \text{ mg L}^{-1}$, dok su kod destilata spontano prefermentiranih komina u rasponu od $99,2\text{-}236,6 \text{ mg L}^{-1}$.

Izobutanol



Slika 18. Usporedba koncentracija izobutanola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

Izoamil alkohol



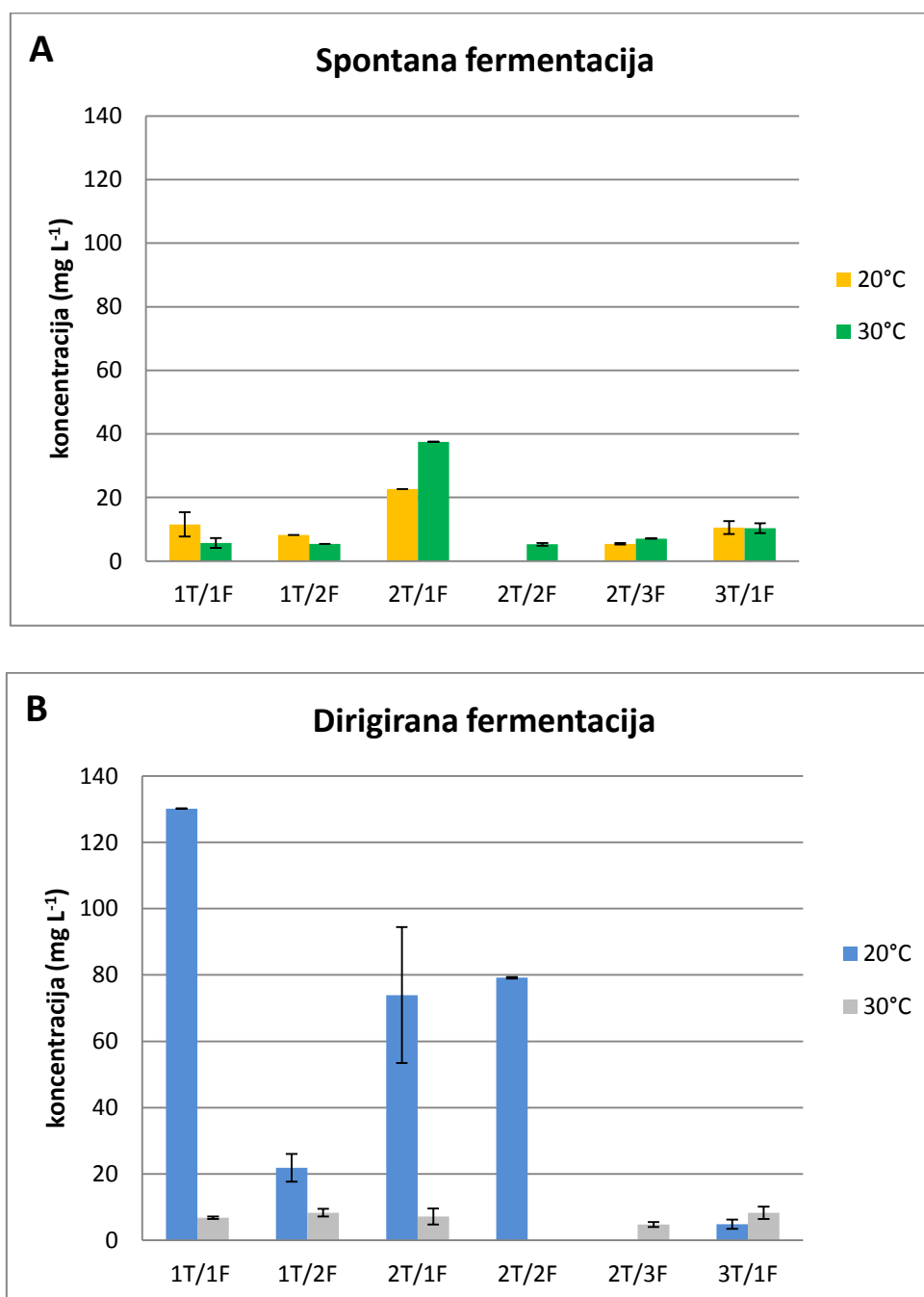
Slika 19. Usporedba koncentracija izoamil alkohola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

Uz propanol u rakiji su značajni i viši alkoholi izobutanol te izoamil alkohol koji upotpunjuju destilat. Voćnim rakijama daju karakterističan alkoholni miris (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Veća koncentracija oba spoja prisutna je u destilatima dirigirano prefermentirane komine (slika 18 B i 19 B), u odnosu na destilate spontano prefermentiranih komina (slika 18 A i 19 A).

U slučaju izobutanola, kod destilata spontano prefermentirane komine (slika 18 A) veća koncentracija tog spoja izmjerena je u destilatima spontano prefermentirane komine pri 20°C što je u suprotnosti sa rezultatima Vukosavljević i suradnika (2015). U njihovom radu veća koncentracija izobutanola zabilježena je u *lozi* spontano prefermentirane komine pri 30°C (628,89 mg L⁻¹ a.a.) u odnosu na *lozu* spontano prefermentirane komine pri 20°C (453,31 mg L⁻¹ a.a.). Autori Christoph i Bauer-Christoph (2007) navode da prosječna koncentracija izobutanola u voćnim rakijama iznosi 4-400 mg L⁻¹ što je u skladu s rezultatima postignutim u ovom radu. Koncentracije izobutanola u srednjem toku iznosile su 53,1-428,2 mg L⁻¹. Kako sve tri frakcije srednjeg toka mogu smatrati konačnim proizvodom njihovim spajanjem prosječna koncentracija za sve destilate bila bi u granicama očekivanih vrijednosti. Rezultati upućuju da se veće koncentracije ovog spoja izdvajaju u prvom toku čime je upravo omogućeno postizanje očekivanih vrijednosti izobutanola u srednjem, najkvalitetnijem toku.

Uspoređujući međusobno koncentracije izoamil alkohola kod destilata spontano prefermentiranih komina (slika 19 A), veće koncentracije zabilježene su pri nižoj temperaturi. Takav trend je konstantan tijekom cijele destilacije, dok se isto ne može reći za destilate dirigiranih fermentacija. Kod njih taj odnos varira tijekom destilacije. U srednjem toku destilata nešto veće koncentracije ovog spoja izmjerene su kod destilata dirigirano prefermentiranih komina. Zajedničko svim destilatima je smanjenje koncentracije izoamil alkohola tijekom destilacije što su zabilježili i Lukić i suradnici (2011a) u destilatima komovice dirigirano prefermentirane komine grožđa Muškat ruža porečki. Kao i u slučaju rezultata dobivenih u ovom radu i u njihovom istraživanju najveća koncentracija ispitivanog spoja prisutna je u prvom toku destilata.

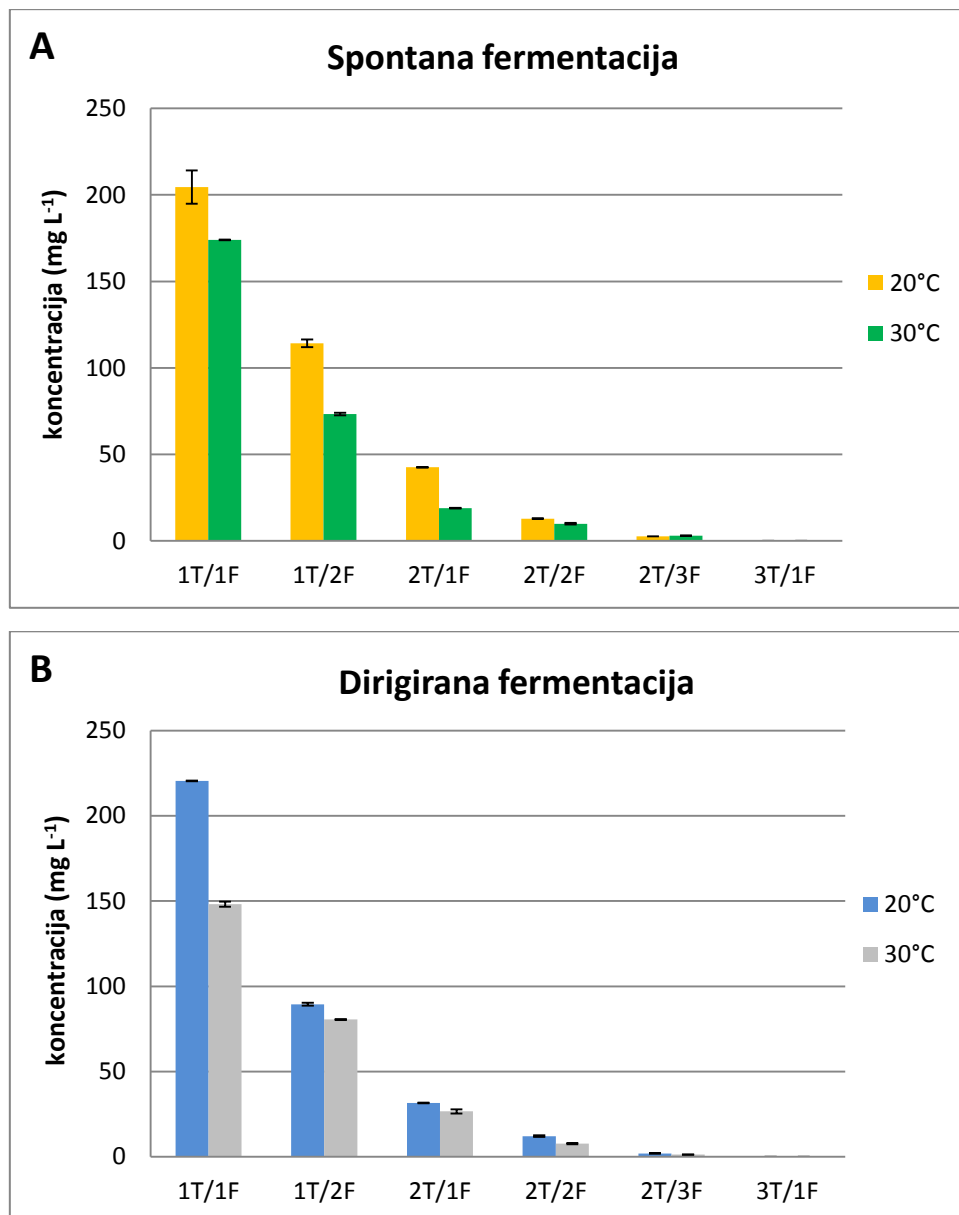
Feniletanol



Slika 20. Usporedba koncentracija feniletanola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

Feniletanol je spoj koji nastaje metabolizmom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Nositelj je karakterističnog mirisa na ružu, a njegova prosječna koncentracija u voćnim rakijama iznosi 4-35 mg L⁻¹ (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Najviše koncentracije ovog spoja izmjerene su u srednjem toku destilata dirigrano prefermentirane komine pri 20°C i iznosile su 73,9 i 79,2 mg L⁻¹ dok su u ostalim destilatima srednjeg toka koncentracije feniletanola bile značajno niže (<40 mg L⁻¹). Gerogiannaki-Christopoulou i suradnici (2006) su u destilatima srednjeg toka komovice spontano prefermentirane komine izmjerili nešto niže koncentracije ovog spoja (<10 mg L⁻¹). Također se može uočiti (slika 20 A i B) prisutnost ovog spoja tijekom cijele destilacije. Koncentracija i prisutnost ovog spoja u destilatima ovisi o primijenjenoj tehnici razdvajanja destilata (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Za razliku od rezultata dobivenih u ovom radu Lukić i suradnici (2011a) te Apostolopoulou i suradnici (2005) u svojim radovima zabilježili su porast koncentracije ovog spoja u destilatima komovice prema kraju destilacije.

1-heksanol

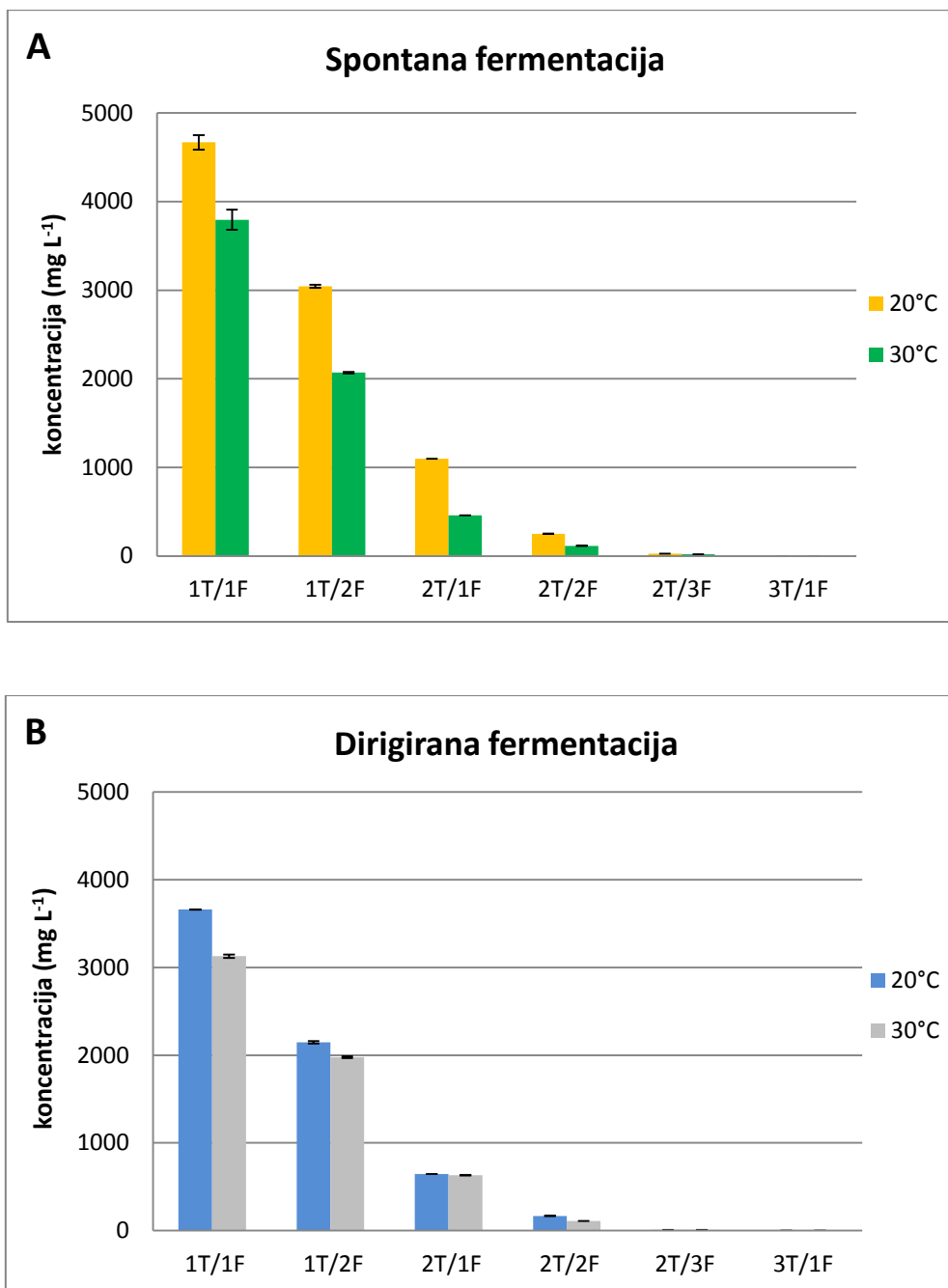


Slika 21 . Usporedba koncentracija 1-heksanola u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

1-heksanol je alkohol iz skupine C₆ alkohola za kojeg se smatra da ima pozitivan utjecaj na aromu rakije kada je prisutan u koncentraciji do 20 mg L⁻¹ (Apostolopoulou i sur., 2005). Iz prikazanih rezultata (slika 21 A i B) vidljivo je da su koncentracije ovog spoja nešto više u destilatima prefermentiranih komina pri 20°C u odnosu na 30°C, neovisno radi li se o spontanom ili dirigiranim fermentacijama. Također se može uočiti da se primijenjenom tehnikom destilacije ovaj spoj u najvećoj koncentraciji izdvojio u prvom toku destilata. Nakon presijecanja prvog toka, u drugom toku koncentracija ovog spoja značajno se smanjila dok ga u trećem toku nema niti u jednom analiziranom destilatu. U prvoj frakciji srednjeg, najkvalitetnijeg toka još uvijek je prisutan u nešto malo većim koncentracijama od 20 mg L⁻¹, osim kod spontane fermentacije na 30°C gdje njegova koncentracija iznosila 18,8 mg L⁻¹. U druge dvije frakcije toga toka zabilježena je značajno manja koncentracija (<15 mg L⁻¹). Međutim, kako sve se tri frakcije srednjeg toka mogu smatrati konačnim proizvodom, nakon njihovog spajanja, prosječna koncentracija ovog spoja bila bi u okviru očekivanih koncentracija. Količina ovog spoja vezana je uz sirovinu koja se koristi za destilaciju. Upravo zbog toga može doći do razlike u koncentraciji ovog spoja ovisno o korištenim sortama grožđa pri proizvodnji rakije. Veća koncentracija tog spoja zabilježena je u komovici sorte grožđa Malvazija istarska (59,75 mg L⁻¹) u odnosu na komovicu sorte grožđa Cabernet Sauvignon (19,57 mg L⁻¹) (Lukić i sur., 2011b).

4.3.2.2. Esteri

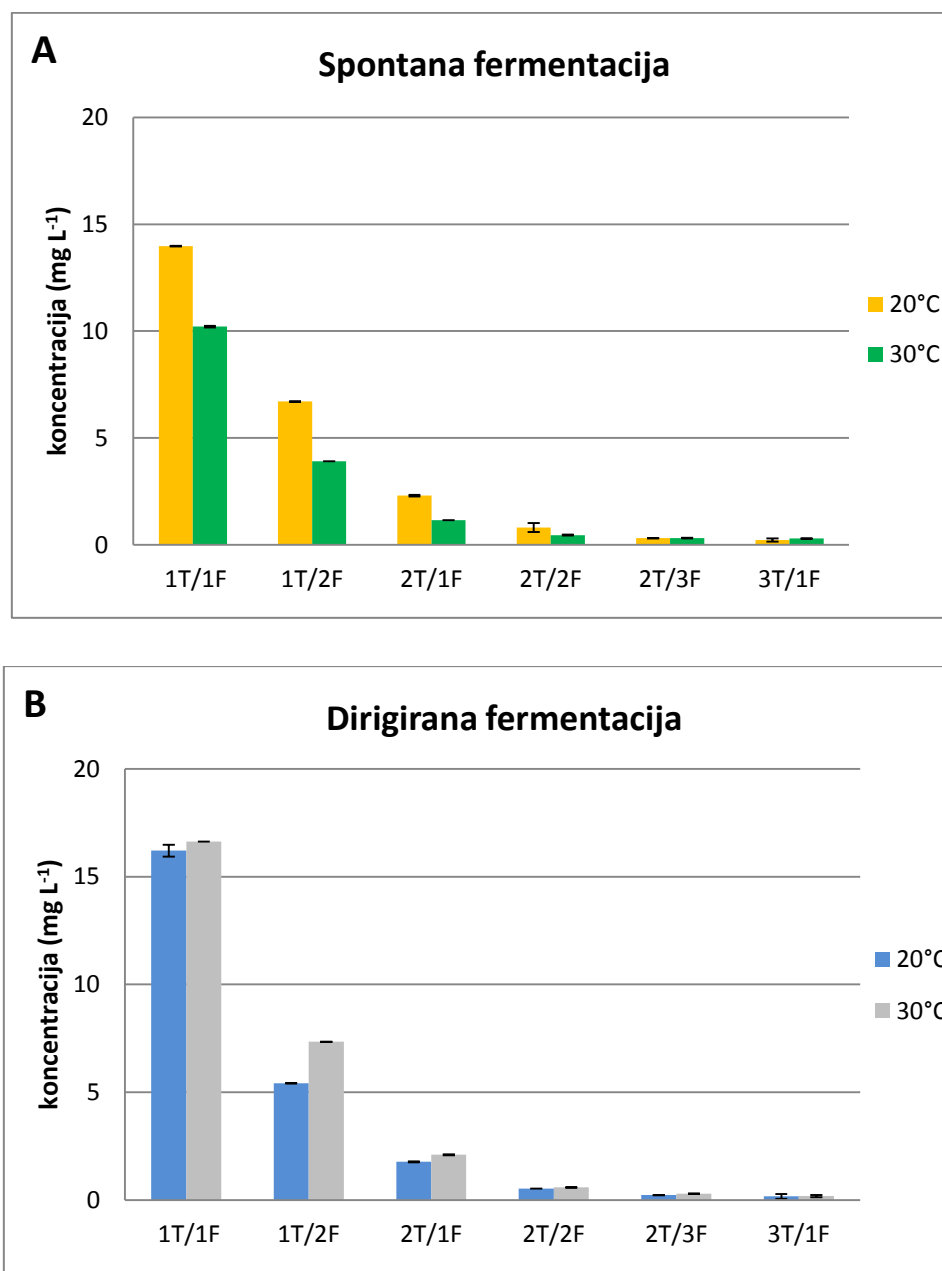
a) Etil acetat



Slika 22. Usporedba koncentracija etil acetata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

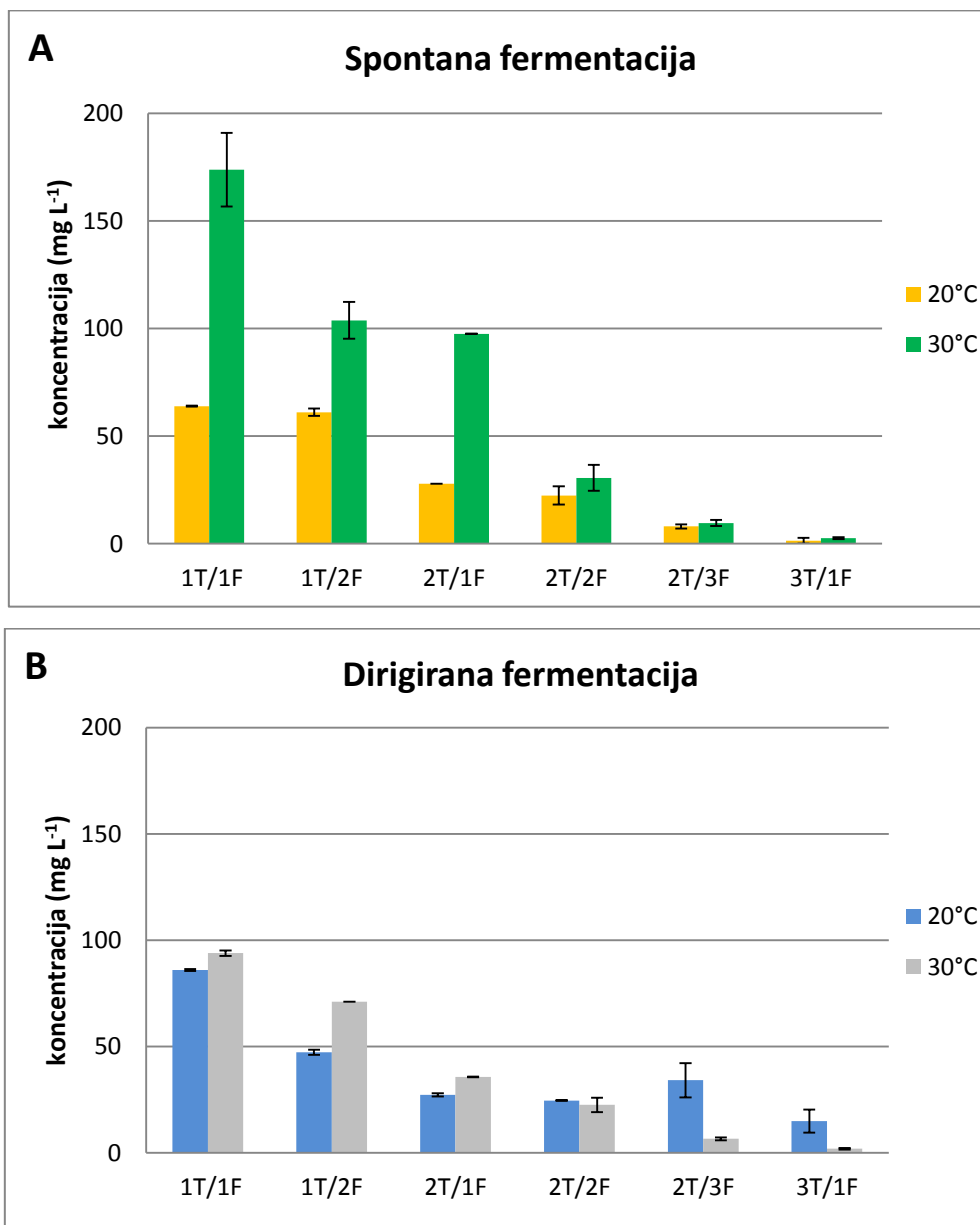
Etil acetat je spoj koji prisutan u visokoj koncentraciji ima karakterističan miris koji podsjeća na ljepilo ili aceton (Christoph i Bauer-Christoph, 2007) dok u nižim koncentracijama pridonosi aromi jakih alkoholnih pića. Iz prikazanih rezultata na slici 22 A i B vidljivo je da je veća koncentracija etil acetata prisutna u destilatima spontano prefermentiranih u odnosu na destilate dirigirano prefermentiranih komina što je i očekivano s obzirom na rezultate dobivene analizom prefermentiranih komina zadnjeg dana fermentacije budući da je koncentracija etila acetata bila veća kod spontano prefermentiranih komina. Kostik i suradnici (2013) navode da je koncentracija etil acetat u rakiji *lozi* 99,2-992,4 mg L⁻¹ što odgovara dobivenim rezultatima u ovom radu uzimajući u obzir destilate srednjeg toka koji zapravo čine proizvod namijenjen konzumaciji. Prosječna vrijednost ovog spoja nakon njihova spajanja bila bi unutar navedenih vrijednosti. Primijenjena tehnika destilacije omogućila je dobro izdvajanje ovog spoja. Koncentriran u najvećoj mjeri u prvom toku. Kod destilata drugog, srednjeg toka, uočeno je značajno smanjenje koncentracije tog spoja te se ona nalazi unutar prosječne koncentracije očekivane za voćne rakije. Prikazani rezultati na slici 22 A i B su u skladu s rezultatima Lukić i suradnika (2011a) kod kojih je također najveća koncentracija etil acetata zabilježena u prvom toku destilata komovice dirigirano prefermentirane komine grožđa (2574,21 mg L⁻¹ a.a.) te se koncentracija tog spoja također smanjiva tijekom destilacije.

b) Izoamil acetat



Slika 23. Usporedba koncentracija izoamil acetata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

c) 2-feniletil acetat

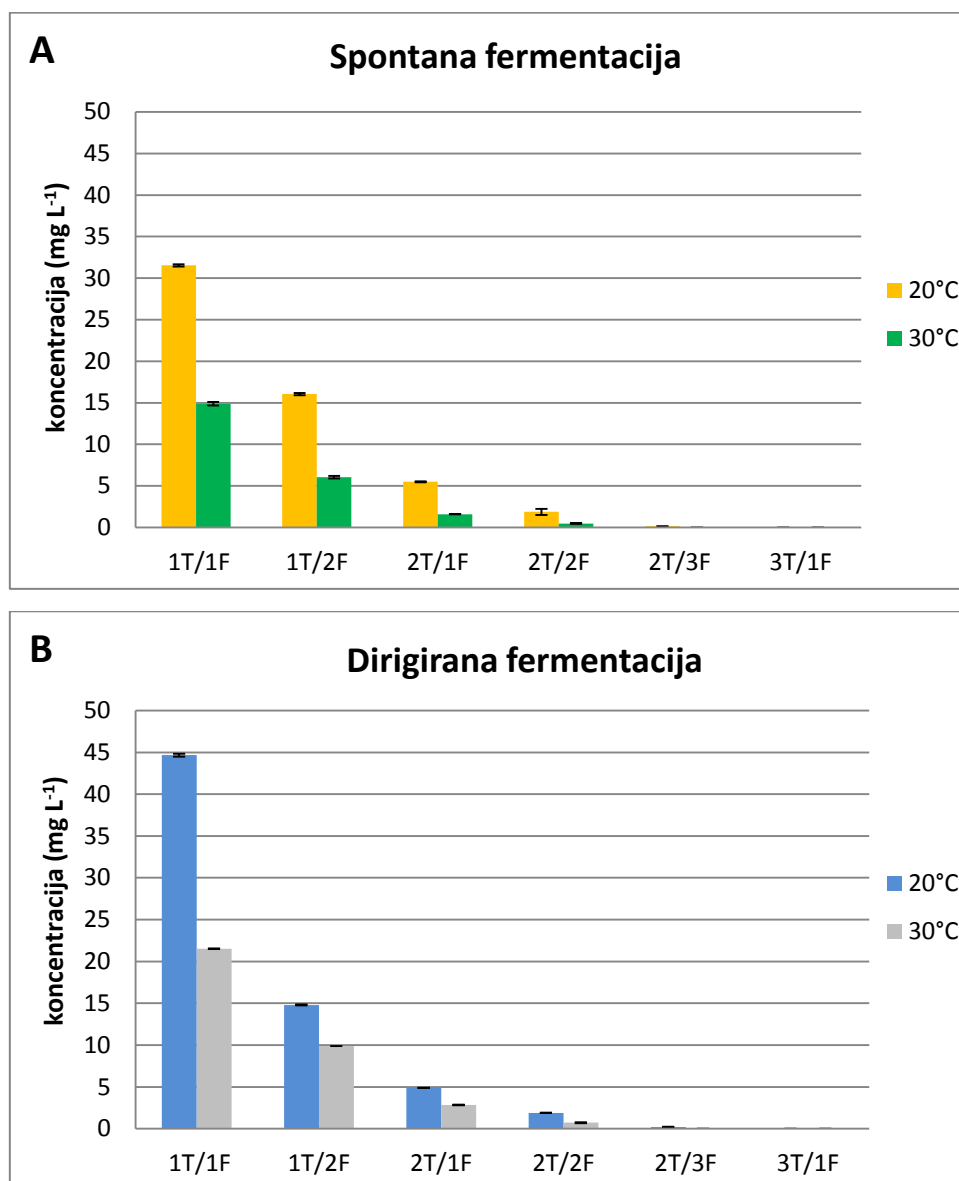


Slika 24. Usporedba koncentracija 2-feniletil acetata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

Izrazito bitni esteri u formiranju voćne arome rakije su izoamil acetat te 2-feniletil acetat (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Iz prikazanih rezultata vidljivo je da nema značajne razlike u koncentraciji izoamil acetata u destilatima spontano prefermentiranih komina (slika 23 A) i destilata dirigitano prefermentiranih komina (slika 23 B). Razlika je vidljiva između destilata spontano prefermentiranih komina gdje je nešto veća koncentracija ovog spoja izmjerena kod destilata prefermentirane komine pri nižoj temperaturi. Zbog niske točke vrelišta ovaj spoj izlazi u prvom toku destilacije što je vidljivo iz prikazanih rezultata (slika 23 A i B). U drugom toku došlo je do značajnog smanjenja koncentracije ovog spoja kod svih analiziranih destilata. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim u komovici dirigitano prefermentirane komine grožđa Muškati ruža porečki (Lukić i sur., 2011a) gdje je također najveća koncentracija tog spoja izdvojena s prvim tokom.

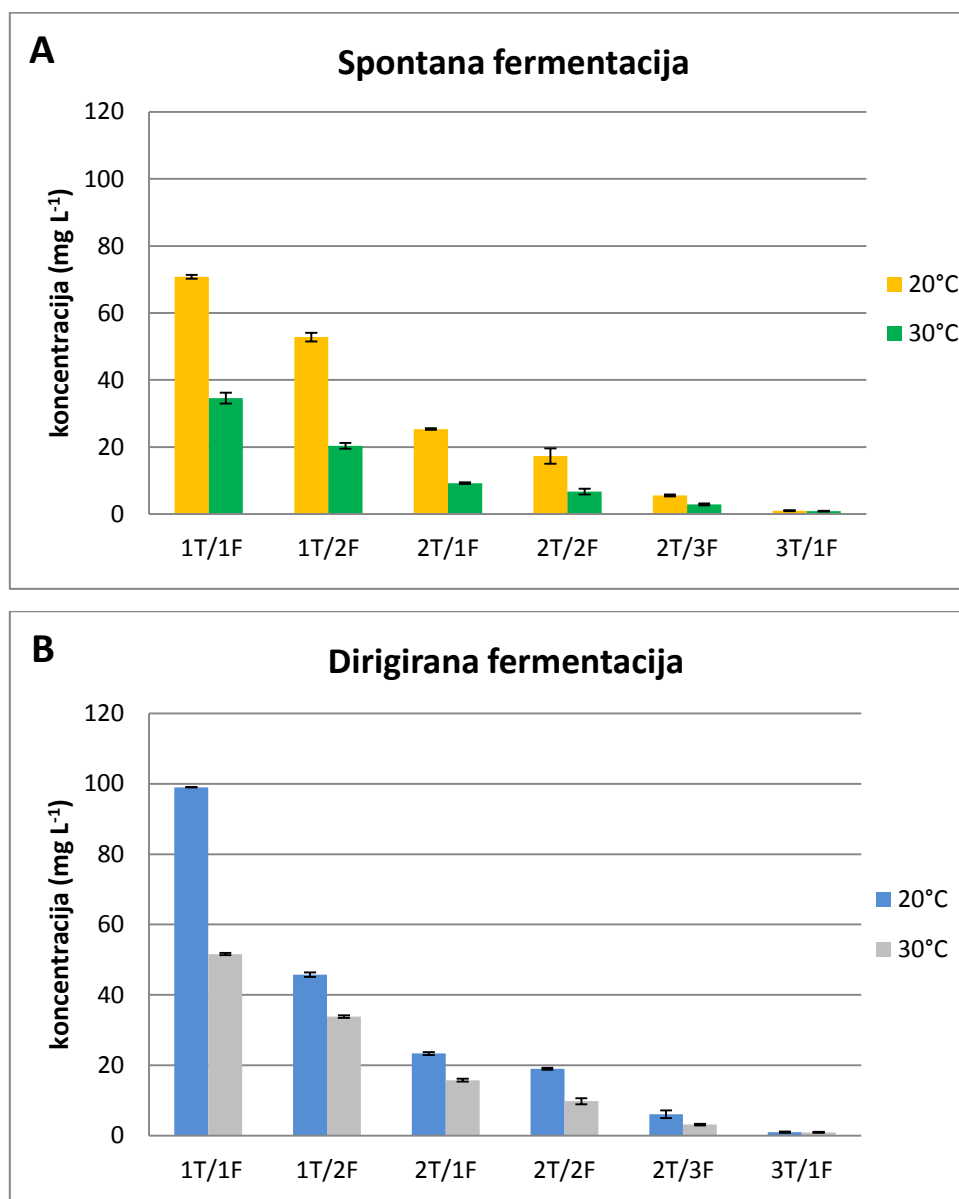
U slučaju prikazanih rezultata za analizirani acetatni ester 2-feniletil acetat može se uočiti značajna razlika između destilata spontano prefermentirane komine na 30°C u odnosu na destilate ostalih fermentacija (slika 24 A i B). U srednjem toku tih destilata izmjerene koncentracije 2-feniletil acetata nalaze se u rasponu od 9,6-97,5 mg L⁻¹ dok su kod destilata spontano prefermentirane komine pri 20°C i dirigitano prefermentiranih komina pri obje temperature koncentracije tog spoja bile 6,6-35,7 mg L⁻¹. Autori Christoph i Bauer-Christoph (2007) navode da je prosječna koncentracija ovog spoja u voćnim rakijama 4-12 mg L⁻¹. Dani rezultati pokazuju nešto veću koncentraciju ovog spoja u destilatima srednjeg toka proizvedenih rakija u odnosu na navedenu prosječnu vrijednost.

d) Etil heksanoat



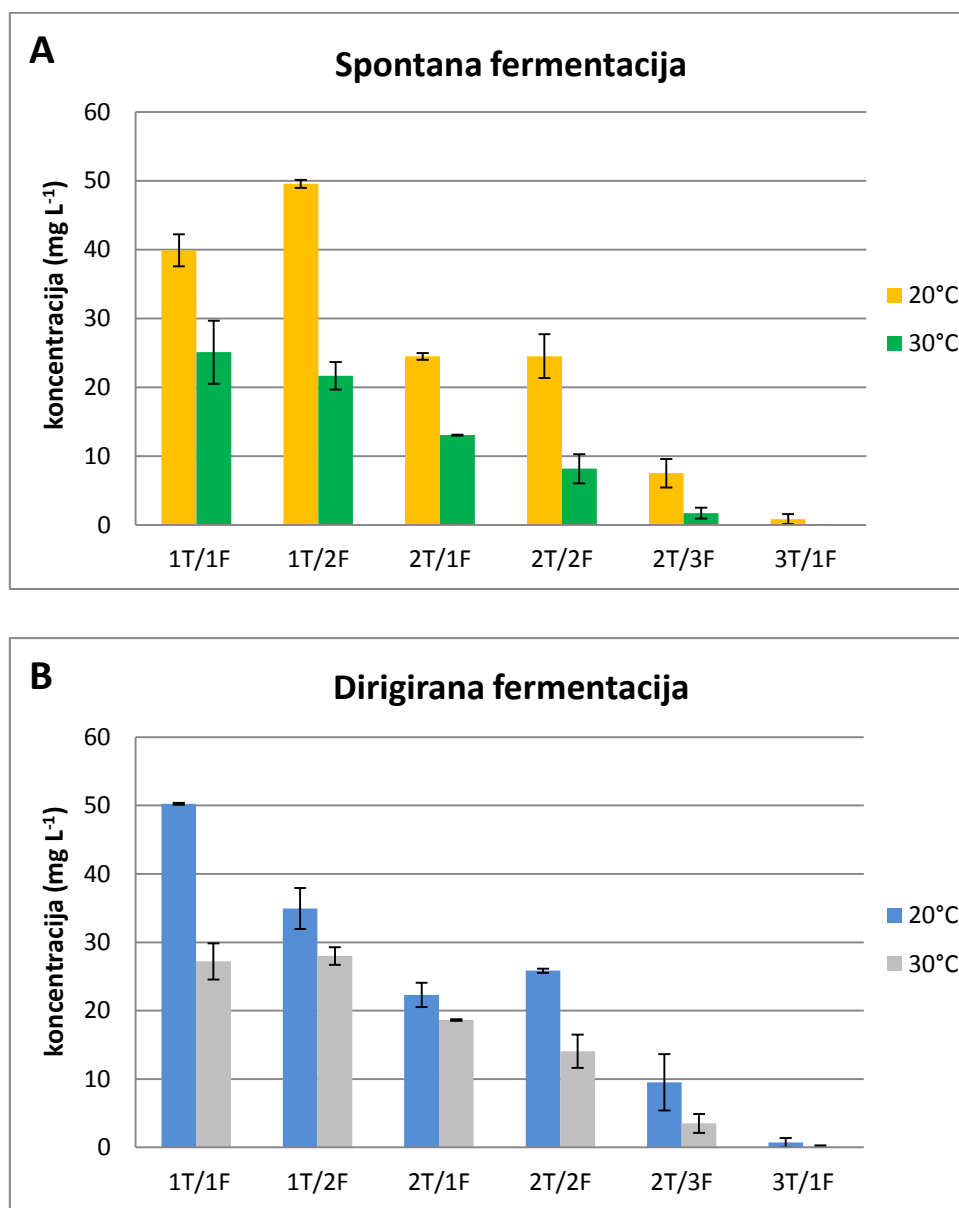
Slika 25. Usporedba koncentracija etil heksanoata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

e) Etil oktanoat



Slika 26. Usporedba koncentracija etil oktanoata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

f) Etil dekanooat

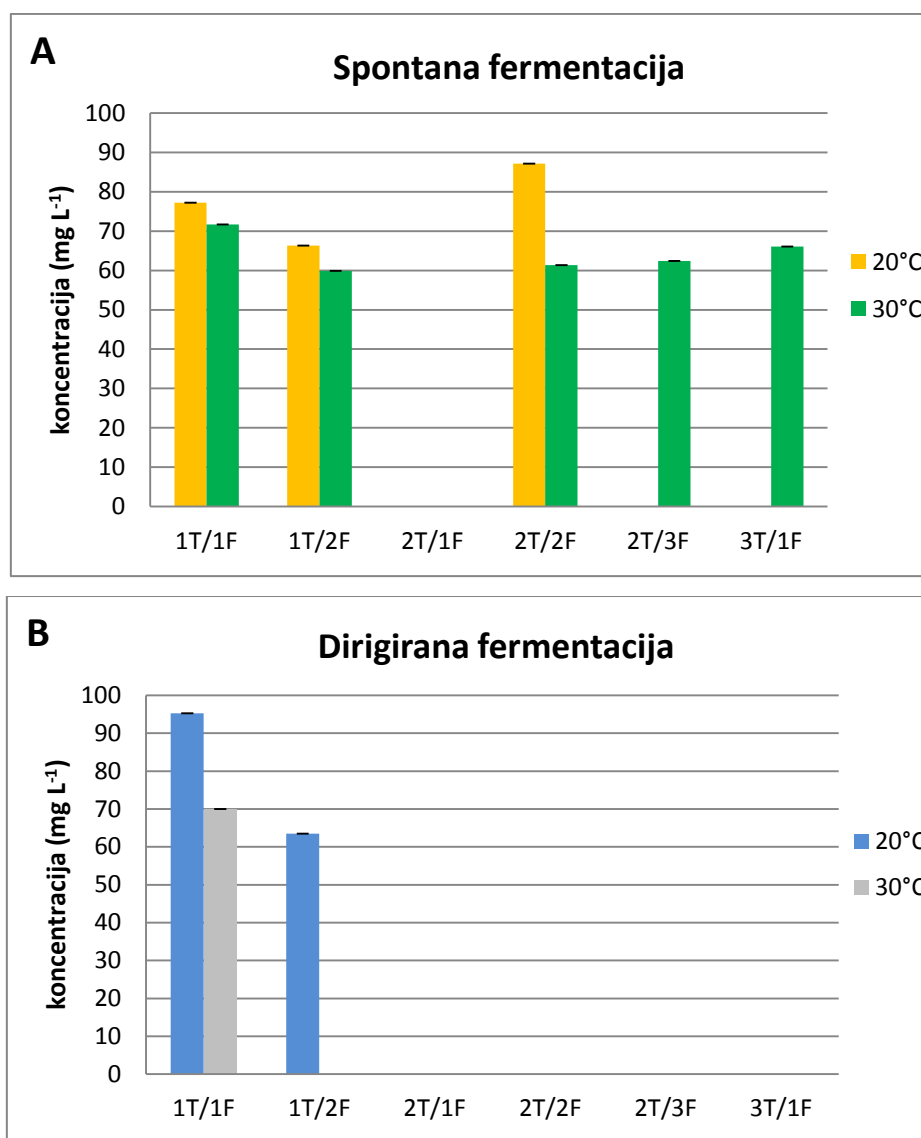


Slika 27. Usporedba koncentracija etil dekanooata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

Etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanoat ulaze u skupinu etil estera srednjelančanih masnih kiselina. Ta skupina estera doprinosi aromi rakije dajući joj ugodne voćne mirise na jabuku, bananu (etil heksanoat), ananas, krušku (etil oktanoat) dok etil dekanoat daje cvjetni miris (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

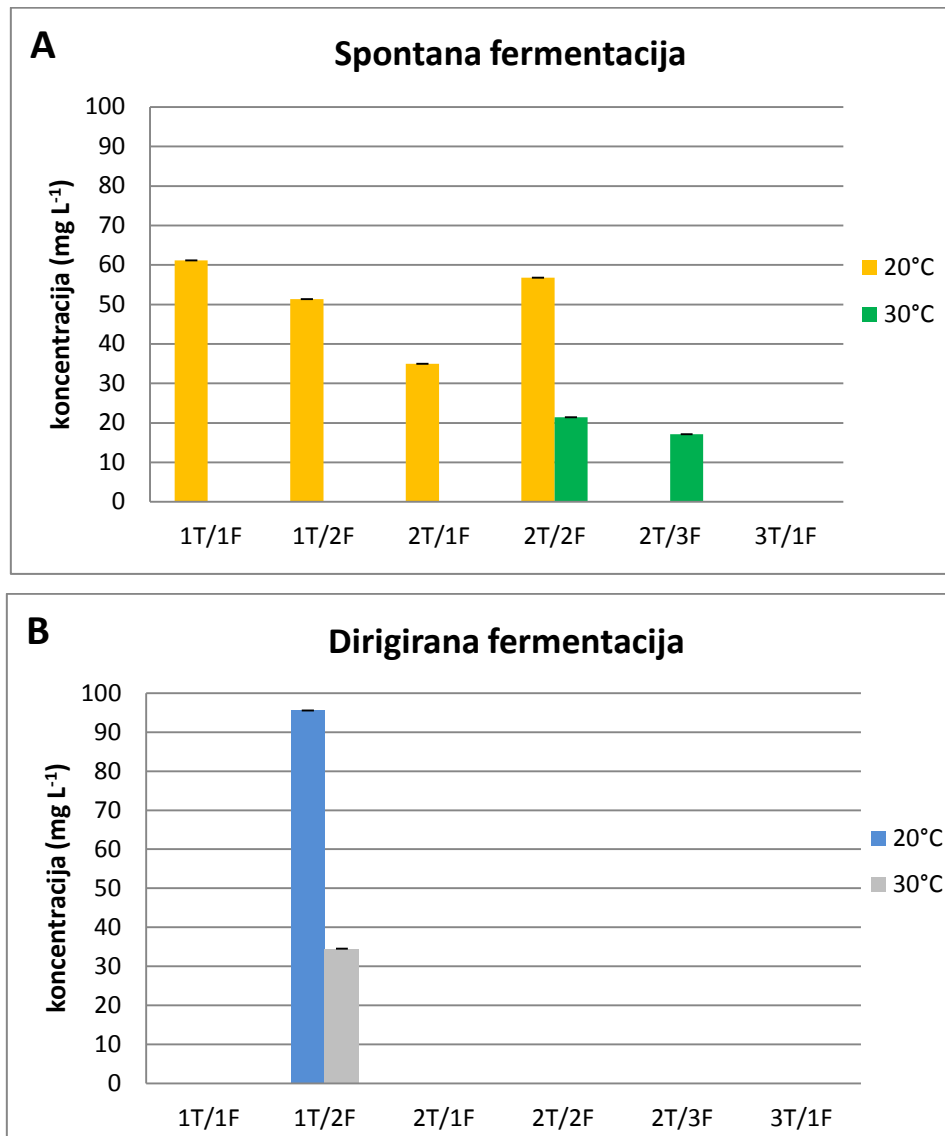
Uspoređujući dobivene rezultate za sva tri spoja (slike 25-27 A i B) prema temperaturi fermentacije vidljivo je da su veće količine ovih spojeva prisutne u destilatima prefermentiranih komina pri 20°C. Prema tome se može zaključiti da će se veća koncentracija ovih poželjnih spojeva arome u rakiji osigurati uz vođenje fermentacije pri nižoj temperaturi. Vidljivo je smanjenje koncentracija analiziranih estera s napretkom destilacije. Prikazani rezultati (slike 25-27 B) su u skladu s rezultatima Lukić i suradnika (2011a) gdje je također došlo do smanjenja koncentracije sva tri ispitivana spoja tijekom destilacije. Radi se o destilatima komovice pri čemu je vođena dirigitirana fermentacija. Značajnije smanjenje koncentracije spoja tijekom destilacije može se uočiti kod etil heksanoata zatim etil oktanoata dok je najmanji kod etil dekanoata. Takvu pojavu zabilježili su i Lukić i suradnici (2011a) te ju objašnjavaju kao razliku između točki vrenja srednjelančanih estera koja je proporcionalna njihovoj molekularnoj težini. Rezultati prikazani na slikama 25 i 26 A odgovaraju rezultatima Silva i Malcata (1999). Kod njih je također uočeno smanjenje koncentracije etil heksanoata i etil oktanoata tijekom destilacije spontano prefermentirane komine grožđa sorte Loureiro. Autori Christoph i Bauer-Christoph (2007) navode da je prosječna koncentracija etil heksanoata u voćnim rakijama 0,4-3,2 mg L⁻¹, etil oktanoata 4-20 mg L⁻¹ i etil dekanoata 4-36 mg L⁻¹. Kako sve tri frakcije srednjeg toka zapravo u cjelini čine konačni proizvod nakon njihovog spajanja prosječna vrijednost za sva tri analizirana spoja u svim destilatima bila bi unutar vrijednosti navedenih od strane autora Christoph i Bauer-Christoph (2007). Prema tome se može zaključiti da je primijenjena tehnika destilacije osigurala izdvajanje sva tri etil estera u koncentracijama očekivanim za voćne rakije pri kojima oni destilatima daju ugodnu, voćnu aromu.

g) Etil laktat



Slika 28. Usporedba koncentracija etil laktata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

h) Dietil sukcinat



Slika 29. Usporedba koncentracija dietil sukcinata u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

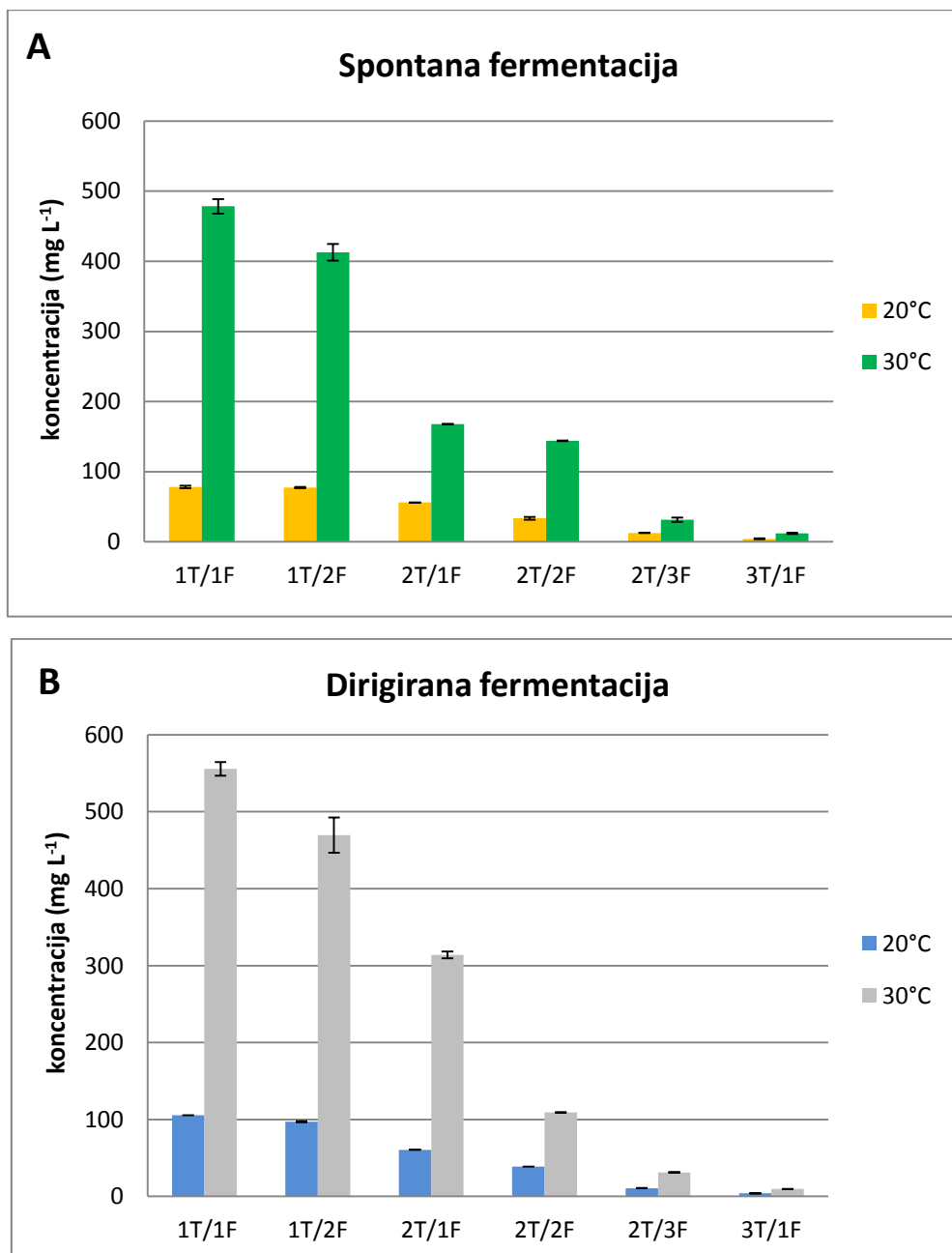
Povećana koncentracija etil laktata i dietil sukcinata dovodi do smanjenja voćnih aroma rakije (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Prisutnost ovih spojeva u destilatima u visokim koncentracijama ukazuje na moguće kvarenje prefermentirane komine u periodu od završetka fermentacije do destilacije (López-Vázquez i sur., 2010)

Iz priloženih rezultata može se vidjeti da je etil laktat u većem broju tokova i frakcija zastupljen u slučaju destilata spontano prefermentiranih komina (slika 28 A) što može biti rezultat bakterijske aktivnosti tijekom fermentacije. Kod destilata dirigirano prefermentiranih komina ovaj spoj je detektiran u znatno manjoj koncentraciji budući da je zbog dodatka kvasca bakterijska aktivnost svedena na minimum. Izdvajanje etil laktata s prvim tokom destilata zabilježili su Apostilopoulou i suradnici (2005) u svom radu u komovici proizvedenoj na tradicionalan način. Poželjno je da se etil laktat izdvoji iz srednjeg, najkvalitetnijeg toka destilata zbog negativnog utjecaja na aromu rakije te da je njegova koncentracija u voćnim rakijama $<400 \text{ mg L}^{-1}$ (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Iako je kod destilata dirigirano prefermentiranih komina uspješno izdvojen iz srednjeg toka i kod destilata spontano prefermentiranih komina nalazi se unutar navedene granice ($<87,1 \text{ mg L}^{-1}$).

Slični rezultati dobiveni su i za dietil sukcinat koji također prisutan u većem broju destilata spontano prefermentiranih komina (slika 29 A). U slučaju destilata dirigirano prefermentiranih komina (slika 29 B), ovaj spoj je prisutan samo u jednoj frakciji te je uspješno izdvojen odmah na početku destilacije. Prosječna koncentracija ovog spoja u voćnim rakijama je $2\text{-}12 \text{ mg L}^{-1}$ (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Iz danih rezultata može se vidjeti da je ovaj spoj u srednjem toku destilata spontano prefermentiranih komina prisutan u nešto većim koncentracijama ($>21,4 \text{ mg L}^{-1}$). Dietil sukcinat je jedini spoj koji nije detektiran niti kod jednog uzorka prefermentiranih komina zadnjeg dana fermentacije, a detektiran je u svim destilatima. 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. Rezultati prikazani na slikama 28 i 29 B ne odgovaraju rezultatima Lukić i suradnika (2011a) dobivenim u komovici dirigirano prefermentirane komine grožđa sorte Muškat ruža porečki. U njihovom radu je zabilježeno postepeno povećanje koncentracija oba spoja tijekom destilacije. Najveća koncentracija izmjerena je u destilatima zadnjeg toka odnosno izdvajanje tih spojeva postignuto je sa zadnjim tokom.

4.3.2.3. Karbonilni spojevi

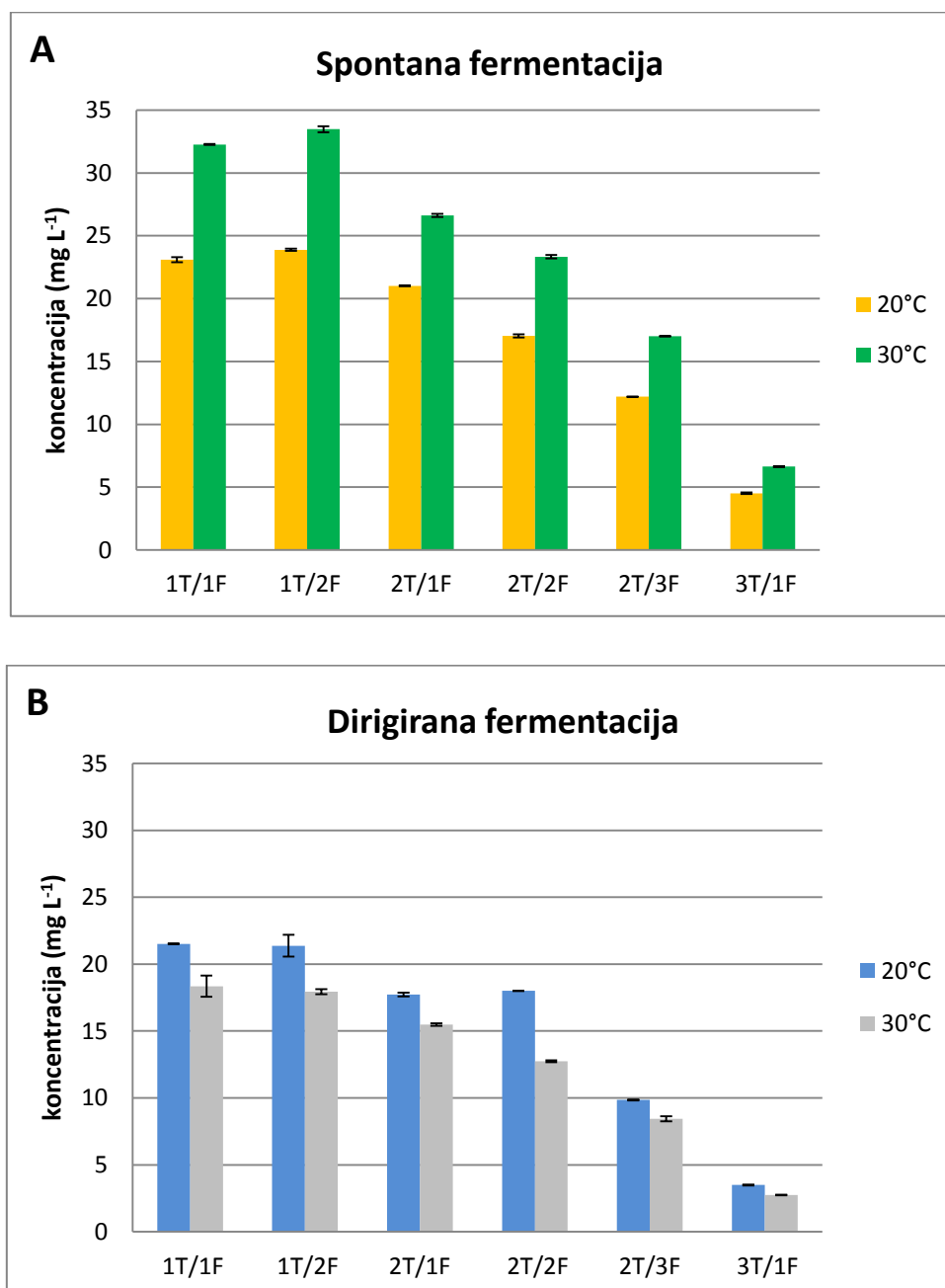
a) Acetaldehid



Slika 30. Usporedba koncentracija acetaldehida u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

Acetaldehid prisutan u destilatima u nižoj koncentraciji doprinosi voćnoj aromi destilata dok u višim koncentracijama daje opor miris. Prosječna koncentracija ovog spoja u voćnim rakijama je 2-160 mg L⁻¹ (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Najviša koncentracija acetaldehida, kao što je i očekivano zbog niske točke vrelišta, izmjerena je u prvom toku destilacije, a nakon toga mu se koncentracija tijekom destilacije smanjuje (slika 30 A i B). U srednjem, drugom toku destilacije znatno veća koncentracija acetaldehida izmjerena je u destilatima dobivenim iz prefermentiranih komina pri višoj temperaturi gdje je kod destilata spontano prefermentirane komine bila u rasponu od 31,4-167,8 mg L⁻¹, a kod dirigirano prefermentirane komine od 31,3-313,9 mg L⁻¹. Stoga se može zaključiti da je bolja kvaliteta onih destilata dobivenih iz prefermentiranih komina pri 20°C. U tim destilatima, u srednjem toku destilacije, koncentracija acetaldehida bila je u granicama 12,7-56,1 mg L⁻¹ kod destilata spontano prefermentirane komine te 10,6-60,6 mg L⁻¹ kod destilata dirigirano prefermentirane komine. Gerogiannaki-Christopoulou i suradnici (2006) zabilježili su nešto veće koncentracije (359,8-431,1 mg L⁻¹) ovog spoja u destilatima srednjeg toka komovice dobivene iz spontano prefermentirane komine u odnosu na ovaj rad. Veća koncentracija acetaldehida kod *loze* dobivene iz spontano prefermentirane komine pri 30°C (258 mg L⁻¹ a.a.) zabilježena je i u radu Vukosavljević i suradnika (2015) u odnosu na *lozu* dobivenu iz spontano prefermentirane komine pri 20°C (107,5 mg L⁻¹ a.a.).

b) Diacetil



Slika 31. Usporedba koncentracija diacetila u pojedinim frakcijama triju glavnih tokova destilata dobivenih destilacijom A- spontano i B- dirigirano prefermentirane komine pri različitim temperaturama fermentacije

Prosječna koncentracija diacetila u voćnim rakijama je 0,1-12 mg L⁻¹, a povećana koncentracija diacetila odgovorna je za maslačnu aromu rakije (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Rezultati prikazani na slici 31 A prikazuju nešto veću koncentraciju diacetila kod destilata spontano prefermentiranih komina u odnosu na destilate dirigirano prefermentiranih komina (slika 31 B). Te koncentracije su u slučaju srednjeg, drugog toka kod destilata spontano prefermentiranih komina iznosile 12,2-26,6 mg L⁻¹ dok su za destilate dirigirano prefermentiranih komina bile 8,4-17,7 mg L⁻¹. Koncentracija diacetila smanjuje se prema kraju destilacije (slika 31 A i B), ali se u srednjem, glavnom toku destilata nalazi u koncentracijama nešto višim od prosječne koncentracije tog spoja u voćnim rakijama. Takvi rezultati upućuju na potrebu kasnijeg presijecanja prvog toka pri čemu bi se mogla smanjiti koncentracija ovog spoja u glavnom toku destilata, kao i na poželjnu manju bakterijsku aktivnost tijekom fermentacije. Prisutnost veće koncentracije metabolita bakterijskog metabolizma u destilatima spontano prefermentiranih komina jedan je od razloga preferiranja dirigiranih fermentacija u industrijskoj proizvodnji.

U svim zemljama EU komercijalna proizvodnja vina iz grožđa sorte Izabela je zabranjena zbog povećane koncentracije metanola. Vino napravljeno od ove sorte ne smije se stavljati u promet, ali se možete koristiti za vlastite potrebe. Stoga su i destilati proizvedeni iz ove sorte rijetki i slabo istraženi. U ovom radu ispitana je mogućnost proizvodnje rakije od ove sorte grožđa alkoholnom fermentacijom pri različitim uvjetima te destilacijom u laboratorijskom kotlu. Rezultati su pokazali da je za dobivanje aromatičnije rakije poželjno fermentaciju voditi pri nižoj temperaturi uz inokulaciju selekcioniranim kvascem *S. cerevisiae*. Kod svih destilata koncentracija metanola bila je u dopuštenim granicama. Stoga ovaj rad ima znanstveni doprinos istraživanju i poticanju proizvodnje destilata iz ove aromatične sorte grožđa koja ne traži velika ulaganja i brigu, a prinosi su obilni.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Korištena sorta grožđa ima bogatu i metabolički aktivnu mikrofloru. Međutim, odabranom metodom izolirane mikrobne vrste nisu uspješno identificirane zbog slabe zastupljenosti ovih mikroorganizama u bazi podataka.
2. Inokulacijom selekcioniranim kvascem *S. cerevisiae* postignute su veće koncentracije viših alkohola propanola, izoamil alkohola i izobutanola u prefermentiranim kominama, neovisno o temperaturi.
3. Etil heksanoat, etil acetat, izoamil acetat i 1-heksanol u odnosu na ostale analizirane sekundarne spojeve arome najvećim dijelom su koncentrirani u prvom toku destilata.
4. Koncentracije etil estera srednjelančanih masnih kiselina u srednjem toku veće su kod destilata prefermentiranih komina pri nižoj temperaturi za razliku od karbonilnog spoja acetaldehida gdje su veće koncentracije prisutne u destilatima prefermentiranih komina pri višoj temperaturi.
5. S obzirom na koncentracije viših alkohola propanola, izobutanola i izoamil alkohola te karbonilnog spoja diacetila, kvalitetnija je rakija dirigitano prefermentiranih komina.
6. Odvajanje 1% volumena prefermentirane komine u prvijenac te presijecanje drugog, glavnog toka destilata pri koncentraciji etanola na izlazu od 40% pokazalo se kao dobra tehnika destilacije koja rezultira optimalnim koncentracijama hlapivih spojeva u destilatu nađenih u literaturi.
7. Koncentracija metanola, spoja koji se u vinu sorte grožđa Izabela nalazi u povišenim koncentracijama, u sve četiri proizvedene loze nalazi se unutar koncentracija propisanih Pravilnikom o jakim alkoholnim pićima (NN 61/09). Stoga nema opasnosti od toksičnog djelovanja ovog spoja na ljudsko zdravlje prilikom konzumacije, ali se predlaže njegova stroža kontrola.

6. LITERATURA

- Anonymus (2011) Grožđe-izabela, <<http://www.gazdarica.com/stranice/kuharica teme/Grozde---izabela>>. Pristupljeno 6. 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 likeri, Gospodarski list, Zagreb.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* **153**, 243-259.
- Bezerra-Bussoli, C., Alves Baffi, M., Gomes, E., Da-Silva, R. (2013) Yeast Diversity Isolated from Grape Musts During Spontaneous Fermentation from a Brazilian Winery. *Curr. Microbiol.* **67**, 356-361.
- Berglund, K. A. (2004) Artisan Distilling A Guide for Small Distilleries [online], Electronic edition <<http://www.artisandistilling.org/ARTISANDISTILLING1.0.0.pdf>> Pristupljeno 6. travnja 2016.
- Christoph, N., Bauer-Christoph, C. (2007) Flavour of Spirit Drinks: Raw Materials, Fermentation, Distillation, and Ageing. U: Flavours and Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability, (Berger, R. G., ured.), Springer, Berlin, str. 219-239.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *Fems Yeast Res.* **10**, 123-133.
- Combina, M., Elia, A., Mercadão, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C. (2005) Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* **99**, 237-243.
- Fleet, G. H. (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 11-22.
- Gerogiannaki-Christopoulou, M., Kyriakidis, N. V., Athanasopoulos, P. E. (2006). The evaluation of grape pomace distillates from selected red grape varieties. *Int. J. Food Sci. Tech.* **41**, 854-860.
- Grba, S. (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Plejada, Zagreb.

Green, S. R., Gray P. P. (1950) Wallerstein Lab. Comm. 13.357

Herrera, J. L., Miño, J. E. (2011) Microvinificación en blanco a 18°C de uva isabella cultivada en misiones (ne argentina). *Rev. Cienc. Tecnol.* **15**, 11-16.

Iacumin, L., Manzano, M., Cecchini, F., Orlic, S., Zironi, R., Comi, G. (2012) Influence of specific fermentation conditions on natural microflora of pomace in “Grappa” production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1747-1759.

Jackson, R. S. (2008) Chemical Constituents of Grapes and Wine. U: Wine Science Principles and Applications, 3. izd., (Jackson, R. S., ured.), Academic Press, London, str. 270-331.

Keršek, E., Savković, D. (2012) Domaće rakije i likeri, Begen, Zagreb.

Kolb, B., Ettre, L. S. (2006) Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice, 2. izd., John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.

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.

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

La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., Darriet, P. (2006) Characterization of Some Mushroom and Earthy Off-Odors Microbially Induced by the Development of Rot on Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9193–9200.

Li., S. S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J. Y., Yan, B., Han, B. Z., Reeves, M. (2010) Yeast species associated with wine grapes in China. *Int. J. Food Microbiol.* **138**, 85-90.

Li, W., Ye, S., Luo, K., Ge, F., Du, L., Wu, K., Ding, C. (2007) Isolation and characterisation of *Candida* sp. mutants enriched in S-adenosylmethionine (SAM). *Ann. Microbiol.* **57**, 383-387.

López-Vázquez, C., Herminia Bollaín, M., Berstsch K., Orriols, I. (2010) Fast determination of principal volatile compounds in distilled spirits. *Food Control* **21**, 1436–1441.

Louw, L., Lambrechts, M. G. (2012) Grape-based brandies: production, sensory properties and sensory evaluation. U: Alcoholic beverages: sensory evaluation and consumer research, (Piggott, J., ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 281-298.

- Lučić, R. (1986) Proizvodnja jakih alkoholnih pića, NOLIT, Beograd.
- Luis, P. M. N. A. C., Mota, D., Anjos, O., Caldeira, I. (2011) Single-laboratory validation of determination of acetaldehyde, ethyl acetate, methanol and fusel alcohols in wine spirits, brandies and grape marc spirits using GC-FID. *Ciência Téc. Vitiv.* **26**, 69-76,
- Lukić, I., Tomas, S., Miličević, B., Radenka, S., Peršurić, Đ. (2011a) Behaviour of Volatile Compounds During Traditional Alembic Distillation of Fermented Muscat Blanc and Muškatac Ruža Porečki Grape Marcs. *J. I. Brewing* **117**, 440-450.
- Lukić, I., Miličević, B., Banović, M., Tomas, S., Radeka, Perušić, Đ. (2011b) Secondary Aroma Compounds in Fresh Grape Marc Distillates as a Result of Variety and Corresponding Production Technology. *Food Technol. Biotechnol.* **49**, 214–227.
- Milanov, G., Beleski, K., Cvetković, J., Nedelovski, D. (2014) Utjecaj sorte grožđa i tehnoloških postupaka na kvalitet groždanih rakija. *Agroznanje* **15**, 425-438.
- 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.
- Mirošević, N., Karoglan Kontić, J. (2008) Vinogradarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb.
- Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., Agosin, E. (2007) Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 675-687.
- Mrvčić, J. (2016) Voćne, žitne i šećerne rakije. <www.pbf.hr>. Pristupljeno 30. ožujka 2016.
- Mujić, I. (2010) Tehnologija proizvodnje jakih alkoholnih pića, Veleučilišni udžbenik, Rijeka.
- Nikićević, N., Tešević, V. (2010) Proizvodnja voćnih rakija vrhunskog kvaliteta, NIK-PRESS, Beograd.
- Oliveira, J. M., Faria, M., Sá, F., Barros, F., Araújo, I. M. (2006) C 6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Anal. Chim. Acta* **563**, 300-309.
- Penavin, K. (2004) VINO A-Ž, Naklada Zadro, Zagreb.
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. C., Ortega, J. M. (2003) Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* **20**, 217-224.

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

Ranković, V., Palić, R., Živković, J., Mošić, I., Stanković, S., Stojanović, G. (2004) Investigation of the impact of grape cultivars on the grape brandies quality. *Physics, Chemistry and Technology* **3**, 61-66.

Regodon Mateos, J. R., Pérez-Navado, F., Fernández, M. R. (2006) Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme Microb. Tech.* **40**, 151-157.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003) Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 169-180.

Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., Polsinelli, M. (1994) Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 213-218.

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

Sabir, A., Kafkas, E., Tangolar, S. (2010) Distribution of major sugars, acids and total phenols in juice of five grapevine (*Vitis* spp.) cultivars at different stages of berry development. *Span. J. Agric. Res.* **8**, 425-433.

Silva, M. L., Malcata, F. X. (1999) Effects of grape pomace fermentation and distillation cuts on chemical composition of grape marcs. *Z. Lebensm. Unters Forsch. A* **208**, 134-143.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., Pretorius, I. S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. G. W. Res.*, **11**, 139-173.

Torija, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Mas, A. (2003) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **80**, 47-53.

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

Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A. (2009) Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 237-243.

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

Vukosavljević, V., Ranković, V., Žunić, D., Matijašević, S. (2015) Effect of alcoholic fermentation on quality of grape brandies. *Acta Agriculturae Serbica* **40**, 117-125.

Zabetakis, I., Gramshaw, J. W., Robinso, D. S. (1999) 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives: analysis, synthesis and biosynthesis-a review. *Food Chem.* **65**, 139-151.

Zakon o vinu (2003) *Narodne novine* **96**, Zagreb.

7. PRILOZI

Prilog I. Sastav WL podloge za uzgoj mikroorganizama (Green i Gray, 1950)

Sastojci	g L⁻¹
Kvašček ekstrakt	4,0
Tripton	5,0
Glukoza	50,0
Kalij dihidrogenfosfat	0,55
Kalijev klorid	0,425
Kalcijev klorid	0,125
Magnezijev sulfat	0,125
Željezov klorid	0,0025
Manganov sulfat	0,0025
Bromokrezol zeleno (bojilo)	0,022
Agar	15,0
Destilirana voda	do 1 L
pH 5.5± 0.2	

Prilog II. Sastav YPD podloge za uzgoj mikroorganizama (Li i sur., 2007)

Sastojci	g L⁻¹
Glukoza	20
Pepton	20
Kvašček ekstrakt	10
Agar	20
Destilirana voda	do 1 L
pH ~ 5	

Prilog III. Popis i priprema otopina korištenih 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 jednu litru.

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 IV. 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 V. 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 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
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