

Miličević, B.¹, Lukić I.², Babić, J.³, Šubarić, D.³, Miličević, R.⁴, Đurđica Ačkar³
znanstveni rad

Utjecaj procesa fermentacije s imobiliziranim stanicama kvasca na kvalitetu destilata mandarine

Sažetak

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj procesa fermentacije s imobiliziranim stanicama kvasca na kvalitetu destilata mandarine. Za određivanje spojeva arome i kvalitete destilata mandarine primijenjena je plinska kromatografija i senzorska analiza.

Dobiveni rezultati pokazali su da fermentacija s imobiliziranim stanicama kvasca pokazuje pozitivne učinke u proizvodnji destilata (dobivenih iz mandarine), odnosno povoljno utječe na kvalitetu i aromu destilata.

Tako su niže koncentracije hlapljivih spojeva, kao što su esteri i viši alkohola, bile prisutne u destilatu proizvedenom pomoću imobiliziranih stanica kvasca. Osim toga, način fermentacije imao je značajan utjecaj na kvalitetu destilata mandarine.

Glavne riječi: mandarina, imobilizirane stanice kvasca, fermentacija, aroma, destilat

Uvod

Ukupna svjetska proizvodnja agruma značajno je porasla tijekom posljednja četiri desetljeća. Naranče predstavljaju najveći pojedinačni dio proizvedenih citrusa, a trenutno zauzimaju više od 60% ukupne svjetske proizvodnje (Miyazaki i sur. 2011.). Mandarine su neklimatekterijsko voće koje se može čuvati duže vrijeme bez značajnih biokemijskih promjena. Osim toga, zbog njihove anatomije, lako se gule i odvajaju u kriške, pri čemu praktički ne dolazi do oštećenja (Pretel i sur., 1998.; Restuccia i sur., 2006.).

Rano sezonsko voće bere se prije nego dosegne tehnološku zrelost te se izlaže utjecaju etilena kroz nekoliko dana kako bi dozreli tijekom skladištenja (Porat i sur., 1999.). Smatralo se da je optimalna temperatura za proces dozrijevanja oko 25°C (Eaks, 1977.; Cohen, 1978.), ali u posljednjih nekoliko godina postalo je uobičajeno u Španjolskoj i drugim mediteranskim zemljama da se navedeni proces za mandarine sorte Satsuma i za neke druge rane sorte provodi na nešto nižim temperaturama, odnosno na 18 do 22°C.

Alkoholna su pića dio ljudskog društva i tradicije od početka povijesti i razvijala su se u različitim dijelovima svijeta (Room i sur., 2005.). Na kvalitetu alkoholnih pića utječu brojni

¹ Borislav Miličević, Zvečevo d.d., Prehrambena industrija, Kralja Zvonimira 1, Požega
² Igor Lukić, Veleučilište u Rijeci, Trpimirova 2, Rijeka
³ Jurislav Babić, Drago Šubarić, Đurđica Ačkar, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, F. Kuhača 18, Osijek
⁴ Radoslav Miličević, Fakultet sigurnosti na radu Zagreb, I. Lučića 5, Zagreb

čimbenici među kojima su najvažnije tvari arome. Mnoge su studije (Vila i sur., 1998.; Lilly i sur., 2000.; Yajima i Yokotsuka, 2001.) pokušale dokazati kako su sekundarne tvari arome, koje nastaju tijekom procesa fermentacije, one koje utječu na ukupnu aromu i kvalitetu alkoholnih pića.

Tehnologija upotrebe imobiliziranih stanica kvasca predmet su mnogih istraživanja i primjene u industriji alkoholnih pića, posebno u posljednjih nekoliko godina. Razlozi su brojni: fermentacija se odvija brže uz povećanu volumetrijsku produktivnost, mogućnost kontinuiranog rada i drugo. Najnovije spoznaje u proizvodnji alkoholnih pića s imobiliziranim stanicama kvasca jasno pokazuju da različiti reaktori i dizajn sustava ima veliki utjecaj na kvalitetu finalnog proizvoda (Virkarjari i Kronolof, 1998., Poncelet i sur., 2001.).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj procesa fermentacije s imobiliziranim stanicama kvasca na kvalitetu destilata mandarine.

Materijali i metode

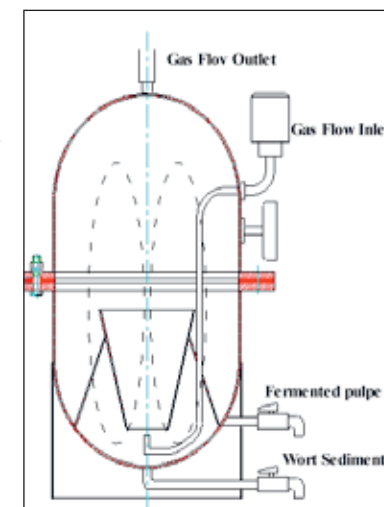
Pulpa

Svaki set uzoraka pulpe mandarina uzet je iz proizvodnog procesa "Zvečevo d.d. Prehrambena industrija", iz berbe 2008. godine. Svi su uzorci zaštićeni sa SO₂ (30 mg/L).

Fermentirana pulpa

Uzorak 1 proizveden je upotrebom klasičnog tehnološkog postupka: fermentacija sa slobodnim stanicama kvasca (*selekcionirane stanice kvasca Feromol-Bouquet 125*) uz kontrolirani temperaturni režim primjenom vanjskog hlađenja fermentora pomoću vode, s ciljem održavanja prosječne temperature u rasponu od 18 do 20°C. Prosječno trajanje fermentacije pod tim uvjetima bilo je 18 dana.

Uzorci 2 i 3 proizvedeni su primjenom tehnološkog postupka prikazanog na Slici 1. fermentacija s imobiliziranim stanicama kvasca (*selekcionirane stanice kvasca Feromol-Bouquet 125*), imobilizirane u gelu Ca-alginata (Poncelet i sur., 2001.). U unutrašnjosti fermentora plin podiže kuglice alginata, koje na sebi nose stanice kvasca, uz kontrolirani temperaturni režim primjenom vanjskog hlađenja fermentora pomoću vode, s ciljem održavanja prosječne temperature u rasponu od 18 do 20°C. Prosječno trajanje fermentacije pod tim uvjetima bilo je 32 sata za svaki set uzoraka. Mogućnost višestruke primjene imobiliziranih stanica kvasca bila je ispitana zamjenom fermentirane pulpe sa svježom svaki drugi dan.



Slika 1. Reaktor za fermentaciju s imobiliziranim stanicama kvasca

Na kraju fermentacije, a prije sedimentacije, svi su uzorci skupljeni. Stoga su uzorci bili nedovoljno čisti i pomalo mutni, što je prikladno za odabrani postupak proizvodnje destilata.

Destilat

Dobiveni su uzorci destilirani na industrijskom bakrenom uređaju za destilaciju, u skladu s postupkom prikazanim na Slici 2.

Senzorska analiza

Senzorska analiza uzoraka provedena je prema metodi pozitivnog ocjenjivanja s koeficijentom po njemačkom DLG modelu (Koch, 1986.).

Taj je model razvijen na četiri osjetilna doživljaja koji se ocjenjuju s ocjenom od 0 do 5, uključujući i 0, dok se prosječna ocjena množi faktorom značajnosti.

Senzorska je procjena provedena u dva ponavljanja. Svaka je skupina imala deset ocjenjivača, izabranih postupkom selekcije (Jellinek, 1985.).

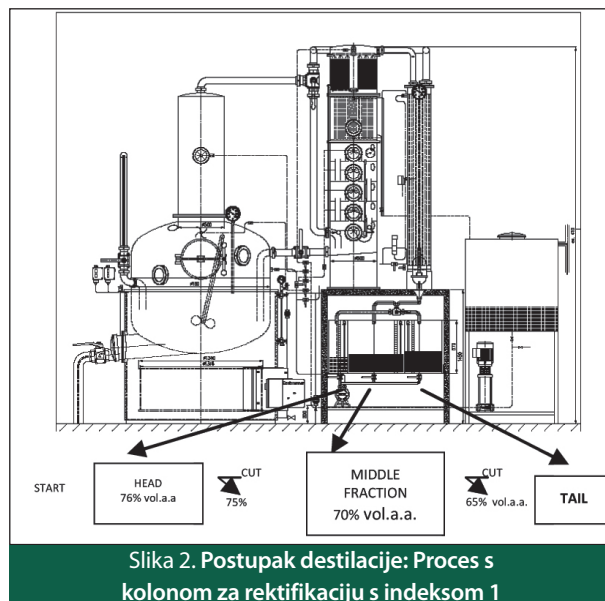
Kemijska analiza destilata

Temeljne analitičke metode primijenjene su za ocjenu kvalitete destilata. U industrijskim laboratorijima te tehnike predstavljaju osnovu za određivanje parametara kvalitete.

Kemijska analiza destilata uključuje određivanje sadržaja etanola, ukupnog ekstrakta, ukupnih kiselina, ukupnog SO₂, ukupnih aldehida, ukupnih estera, viših alkohola, furfurala i sadržaja metanola (AOAC 1995.).

Analiza tvari arome

Plinska kromatografija (GC) provedena je na plinskom kromatografu Chrompack 437A s odvojenim injektorom i FID detektorom. Za analizu destilata korištena je kapilarna kolona Chrompack Poraplot (25 m x 0.25 μm x 0.25 μm). Najprije se održava temperatura od 35°C tijekom 7min, zatim se provodi zagrijavanje brzinom 10°C/min do 80°C, potom brzinom 25°C/min do 180°C, na kojoj se zadržava u trajanju od 4 min. Kvalitativna analiza provedena je usporedbom standardnog vremena zadržavanja (analitički stupanj po Mercku, Njemačka) uz odgovarajuće pikove uzoraka. Kvantifikacija je provedena uspo-



Slika 2. Postupak destilacije: Proces s kolonom za rektifikaciju s indeksom 1

redbom dobivenih pikova s Merck-ovim standardima.

Razultati i rasprava

Senzorska analiza

Tablica 1 prikazuje rezultate dobivene senzorskom analizom destilata. Senzorska ocjena uzoraka provedena je prema metodi pozitivnog ocjenjivanja s vrijednosnim faktorima od 3 do 9, prema njemačkom modelu DLG (Koch, 1986.). Ocjenjivanje je provedeno na skupini od deset profesionalnih ocjenjivača s bogatim iskustvom u senzorskoj analizi destilata. Ukupna senzorska ocjena kretala se u intervalu od 96.10 do 98.50, što ukazuje na značajnu razliku među uzorcima. Nadalje, to može biti rezultat različitog postupka fermentacije jer su drugi čimbenici u proizvodnji destilata bili isti za sve uzorke. U skladu s procijenjenim senzorskim svojstvima, pronađene su statistički značajne razlike (P=0.05) među destilatima (Dawies, 1964.). Uzorci 2 i 3, proizvedeni procesom fermentacije s imobiliziranim stanicama kvasca, bile su s nešto slabijom senzorskom kvalitetom u odnosu na uzorak 1, koji je proizveden primjenom klasičnog tehnološkog procesa sa slobodnim stanicama kvasca. Uzorci 2 i 3 također su imali ugodnu aromu s malo oštrim alkoholnim tonom mirisa, kao i bez karakterističnih stranih tonova arome, koju opisuju mnogi autori (Perez-Lopez i Carbonell-Barrachina 2006.; Nykanen i Nykanen, 1991.; Yajima i Yokotsuka 2001.).

Tablica 1. Senzorska analiza destilata - Njemački DLG model

Uzorak	Ocjenjivana karakteristika				Ukupno (max 100 bodova)
	Boja (max 15 bodova)	Bistroća (max 15 bodova)	Miris (max 25 bodova)	Okus (max 45 bodova)	
1	15.00	15.00	24.50	44.00	98.50
2	14.70	14.70	23.50	43.20	96.10
3	14.70	14.70	24.50	42.40	96.30

Kemijske analize

U Tablici 2 prikazana su kemijska i fizikalno-kemijska svojstva. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su dobivene vrijednosti proizvedenih destilata u skladu s referentnim vrijednostima (Nykanen i Suomalainen 1983., Nykanen i Nykanen 1991.).

Dobiveni rezultati pokazuju da je uzorak 1 imao niži sadržaj alkohola, i to 68.51% vol., dok su uzorci 2 i 3 imali veću količinu etanola (70.60 i 71.50% vol.) u odnosu na optimalno količinu od 70,00% vol. (Nykanen i Suomalainen 1983.). Važno je naglasiti da manji udio alkohola može uzrokovati sniženje udjela pojedinih tvari arome u destilatima (Conner i sur. 1998.).

Prisutnost slobodnog SO₂ u destilatima kreće se u rasponu od 3.75 do 4.33 mg/L, što je

rezultat dodatka SO₂ tijekom proizvodnje u svrhu zaštite pulpe od nekontroliranog procesa fermentacije i oksidacije. Slobodni SO₂ može vezati acetaldehid koji nastaje tijekom destilacije, što može dovesti do nastanka intenzivnog neugodnog mirisa (Guan i Pieper, 1998.).

Dobiveni rezultati u Tablici 2 pokazuju da uzorci 2 i 3 imaju veći sadržaj aldehida (305.00 do 307.00 mg/L a.a.) te niži udio viših alkohola (1830.71 do 1880.27 mg/L a.a.) i estera (690.00 do 728.23 mg/L a.a.). Važno je naglasiti da tijekom dozrijevanja destilata udio aldehida i viših alkohola može uzrokovati stvaranje veće količine acetala (Singelton 1995.). Rezultati fizikalno-kemijske analize pokazuju da su destilati sasvim zadovoljavajuće kvalitete. Konkretno, uzorci 2 i 3 mogli bi se koristiti kao potencijalno dobri destilati za proizvodnju kvalitetne rakije od mandarina.

Tablica 2. **Kemijska analiza destilata**

Određivana svojstva	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
Etanol (% vol.)	68.51	70.60	71.50
Ukupni ekstrakt (g/L)	0.044	0.034	0.014
Ukupni SO ₂ (mg/L)	4.33	3.95	3.75
Ukupne kiseline (mg/L)	247.60	185.00	184.20
Aldehidi (mg/L a.a.)	280.00	305.00	307.00
Esteri (mg/L a.a.)	1378.23	728.23	690.00
Viši alkoholi (mg/L a.a.)	1962.14	1830.71	1880.27
Furfural (mg/L a.a.)	0.002	0.001	Tr.
Metanol (mg/L a.a.)	0.02	Tr.	Tr.

*Tr.-tragovi

Analiza arome

Temeljem pretpostavke da hlapive tvari imaju dominantan utjecaj na miris destilata, provedena je analiza plinskom kromatografijom (GC).

Ranijim analizama utvrđeno je da su sastojci soka agruma i eteričnih ulja u koncentraciji većoj od 1%. Odabrane tvari arome pripadaju skupini aromatskih tvari odgovornih za kvalitetu mandarina i destilata proizvedenih od njih.

Tablica 3 prikazuje sadržaj određenih aromatskih tvari u uzorcima destilata. Na osnovi kromatografskih rezultata, utvrđene su veće razlike među destilatima. Monoterpeni su dominantna grupa u profilu arome destilata mandarine, pri čemu je sadržaj limonena najveći. To je u skladu s ranijim rezultatima istraživanja (Chisholm i Jell, 2003.; Sawamura i sur. 2004.). Međutim, postoji odstupanje s obzirom na sadržaj limonena i drugih alifatskih monoterpenih aldehida (posebno citrala), kao i u esterima i alkoholima.

U usporedbi s istraživanjima koja su do sada provedena (Elmaci i Altug, 2005.; Perez-Lopez i Carbonell-Barrachina, 2006.) zabilježene su niže koncentracije hlapljivih spojeva u uzorcima proizvedenim postupkom fermentacije s imobiliziranim kulturama.

Hlapljive tvari koje bi mogle naštetiti kvaliteti destilata (Clark i Chamblee, 1992.) nisu utvrđene ni u jednom uzorku proizvedenom fermentacijom s imobiliziranim kulturama, kao ni spoj 4-vinil gvajakol, poznat kao pokazatelj toplinskog oštećenja, te spoj gvajakol, pokazatelj mikrobiloške kontaminacije. Navedene tvari nisu utvrđene, čak ni u tragovima, što ukazuje na kvalitetu procesa.

Tablica 3. **Tvari arome u uzorcima destilata (mg/L)**

Tvari arome (mg/L)	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
acetaldehyde	13.76	13.96	14.11
ethyl acetate	56.57	54.20	44.31
methanol	0,025.	0,038.	n.i.
1-propanol	24.75	24.70	18.20
isobutyl alcohol	23.62	19.39	15.37
ethyl hexanoate	2.47	1.57	n.i.
isoamyl alcohol	148.79	139.9	88.80
ethyl lactate	3.07	1.41	n.i.
ethyl octanoate	5.92	2.69	2.92
ethyl decanoate	1.74	0.91	1.18
2-phenyl ethanol	2.97	3.52	3.45
α-terpineol	4.1	4.78	3.17
linalool	0.63	0.87	1.33
terpinen-4-ol	4.01	4.02	3.45
thymol	3,11	4.17	3.19
limonene	11.14	12.16	13.27
α-pinene	0.01	0.01	0.03
β-pinene	n.i.	tr.	tr.
furaneol	n.i.	n.i.	n.i.
4-vinyl guaiacol	n.i.	n.i.	n.i.
carvacrol	n.i.	n.i.	n.i.
guaiacol	n.i.	n.i.	n.i.
p-cymene,	n.i.	n.i.	n.i.
carvone,	n.i.	n.i.	n.i.
p-menthadiene-8 ol	tr.	tr.	tr.
p-menthen-1,8-diol	tr.	n.i.	n.i.

*n.i. – nije identificiran; *tr.-tragovi

Zaključci

Dobiveni rezultati su pokazali da fermentacija s imobiliziranim stanicama kvasca ima značajan utjecaj na aromu i kvalitetu destilata.

Vrijeme fermentacije je smanjeno, a dobiveni destilati su zadovoljavajuće senzorske i analitičke kvalitete.

Primjena imobiliziranih stanica kvasca nije idealna, ali pokazuje značajan potencijal za primjenu i daljnja istraživanja u proizvodnji destilata mandarine.

Literatura

- AOAC** (1995): Official Methods of Analysis. Association of Official Chemists, Arlington, VA, USA
- Chisholm, M.G., Jell J.A.** (2003): Characterization of the major odorants found in the peel oil of *Citrus reticulata* Blanco cv. Clementine using gas chromatography olfactometry. *Flavour. Fragr. J.* 18:275–281.
- Clark, B.C., Chamblee, T.S.** (1992): Off-Flavors in Foods and Beverages. Developments in Food Science, vol 28. Elsevier, Amsterdam.
- Cohen, E.** (1978): The effect of temperature and relative humidity during degreening on the coloring of Shamouti orange fruit. *J. Hortic. Sci.* 53:143–146.
- Conner, J.M., Birkmyre, L., Paterson, A. and Piggot, J.R.** (1998): Headspace concentrations of ethyl esters at different alcoholic strengths. *J. Sci. Food Agric.* 77:121–126.
- Dawies, O.L.** (1964): Statistical Methods in Research and Production, Oliver and Boyd, London-Edinburgh.
- Eaks, I.L.** (1977): Physiology of degreening—summary and discussion of related topics. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1:223–226.
- Elmaci, Y., Altug, T.** (2005): Flavor characterization of three tangerin cultivars (Satsuma, Bodrum, Clementine) by using GC/MS and flavor profile analysis techniques. *J. Food. Qual.* 28:163–170.
- Guan, S.H., Pieper, H.J.** (1998): Examination of the distillation characteristics of the distillate from numerous fruit mashes using GC analysis. *Deutscht. Lebensm. Rundsch.* 11: 365-374.
- Jellinek, G.** (1985): Sensory Evaluation of Food, Theory and Practice, Ellis Horwood international publishers in science and technology, Chichester p.p. 252-255.
- Koch, J.** (1986): Getränkebeurteilung, Eugen Ulmer GmbH Co., Stuttgart, p.p. 95-96.
- Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S.** (2000): Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. *Apl. Environ. Microbiol.* 2: 744-753.
- Miyazaki, T. Anne Plotto, A., Kevin Goodner, K., Gmitter F.** (2011): Distribution of aroma volatile compounds in tangerine hybrids and proposed Inheritance *J Sci Food Agric* 91:449–460.
- Nykanen, L., Nykanen, I.** (1991): Distilled Beverages, Marcel Dekker Inc., New York p.p. 547-575.
- Nykanen L., Suomalainen H.** (1983): Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages, Akademie verlag, Berlin.
- Perez-Lopez, A.J., Carbonell-Barrachina, A.A.** (2006): Volatile odour components and sensory quality of fresh and processed tangerine juices. *J Sci. Food Agric.* 86:2404–2411.
- Poncelet D., Dulieu C., Jacquot M.** (2001): Description of the immobilization procedures, In: Immobilized Cells, (Wijffels R.), Springer Lab Man., Heidelberg, p.p. 15-30.

Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goren, R., Droby, S. (1999): Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of Shamouti oranges. *Postharvest. Biol. Technol.* 15: 155–163.

Pretel, M.T., Fernández, P.S., Romojaro, F., Martínez, A. (1998): The effect of modified atmosphere packaging on 'ready-to-eat' oranges. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 31:322–328.

Restuccia, C., Randazzo, C., Caggia, C. (2006): Influence of packaging on spoilage yeast population in minimally processed orange slices. *International Journal of Food Microbiology* 109:146–150.

Room, R., Babor, T. Rehm, J. (2005): Alcohol and public health, *Lancet*, 365 pp. 519–530.

Sawamura, M., Thi Minh Tu, N., Onishi, Y., Ogawea, E., Choi H.S. (2004): Characteristic Odor Components of *Citrus reticulata* Cold-pressed Oil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (68):1690-1697.

Singleton, V.L. (1995): Maturation of wines and spirits comparisons, facts, and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* 1:98-112.

Virkajarvi, I., Kronolof, J. (1998): Long -Term Stability of Immobilized Yeast Columns in Primary Fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56:70-75.

Vila, I., Sablayrolles, J.M., Baumes, R., Bayonove, C., Barre, P. (1998): Study of influence of yeast strain on fermentation aroma by sensory and chemical analyses. *Vitic. Enol.* 53:124-130.

Yajima, M., Yokotsuka, K. (2001): Volatile Compound Formation in White Wines Fermented Using Immobilized and Free Yeast. *Am. J. Enol. Vitic.* 52:210-218.

ZVEČEVO
1921

