

# Karakterizacija hlapljivih spojeva brandya

---

**Divić, Josipa**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:472842>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-02**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KARAKTERIZACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA *BRANDYA***

**DIPLOMSKI RAD**

**JOSIPA DIVIĆ**

**Matični broj: 21**

**Split, listopad 2022.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**KARAKTERIZACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA *BRANDYA***

**DIPLOMSKI RAD**

**JOSIPA DIVIĆ**

**Matični broj: 21**

**Split, listopad 2022.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

**CHARACTERIZATION OF VOLATILE COMPOUNDS OF  
BRANDY**

**DIPLOMA THESIS**

**JOSIPA DIVIĆ**

**Parent number: 21**

**Split, October 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij prehrambene tehnologije

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Tema rada** je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

### KARAKTERIZACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA *BRANDYA*

Josipa Divić, 21

**Sažetak:** *Brandy* je jako alkoholno piće alkoholne jakosti najmanje 36% vol. dobiveno iz rakije od vina s ili bez dodatka vinskog destilata koje dozrijeva u drvenim bačvama. Tijekom cijelog tehnološkog procesa proizvodnje sintetiziraju se razni hlapljivi spojevi čiji kemijski sastav i zastupljenost utječu na finalnu aromu i kvalitetu konačnog proizvoda. Cilj ovog rada je identificirati i usporediti profil hlapljivih spojeva 3 uzorka *brandy*. Izolacija hlapljivih spojeva izvedena je pomoću dvije metode izolacije: ekstrakcija tekuće-tekuće i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) s dva različita vlakna. Primjenom vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) izvedena je analiza izoliranih spojeva. Kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće identificirano je 11 spojeva, dok je mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi identificirano 9 spojeva. Najzastupljenije kemijske skupine su esteri i alkoholi, a najzastupljenije spojevi su 3-metilbutan-1-ol, 3-metilbutil-etanoat, etil-oktanoat, etil-dekanoat i etil-dodekanoat.

**Ključne riječi:** *brandy*, hlapljivi spojevi, ekstrakcija tekuće-tekuće, HS-SPME, GC-MS

**Rad sadrži:** 63 stranica, 19 slika, 3 tablice, 57 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |  |             |
|--|-------------|
| 1. Doc. dr. sc. Marina Zekić                 | predsjednik |
| 2. Dr. sc. Sanja Radman, znanstveni suradnik | član        |
| 3. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović         | član-mentor |

**Datum obrane:** 19. listopada 2022.

**Rad je u tiskanom i elektroničnom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Graduate study of Food Technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 6

**Mentor:** PhD Zvonimir Marijanović, Assistant Professor

### CHARACTERIZATION OF VOLATILE COMPOUNDS OF BRANDY

Josipa Divić, 21

**Abstract:** Brandy is strong alcoholic drink with an alcohol strength of at least 36% vol. obtained from wine schnapps with or without the addition of wine distillate, which matures in wooden barrels. During the entire technological process of production, various volatile compounds are synthesized whose chemical composition and representation influence the final aroma and quality of the final product. The aim of this work was to identify and compare the profile of volatile compounds of 3 brandy samples. Isolation of volatile compounds was performed using two isolation methods: liquid-liquid extraction and headspace solid phase microextraction (HS-SPME) with two different fibres. The analysis of the isolated compounds was performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. 11 Compounds were identified by continuous liquid-liquid extraction, while 9 compounds were identified by headspace solid phase microextraction. The most common chemical group were esters and alcohols, and the most common compounds were 3-methyl-butan-1-ol, 3-methylbutyl acetate, ethyl octanoate, ethyl decanoate and ethyl dodecanoate.

**Keywords:** brandy, volatile compounds, liquid-liquid extraction, HS-SPME, GC-MS

**Thesis contains:** 63 pages, 19 figures, 3 tables, 57 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

- |   |                   |
|---|-------------------|
| 1. Marina Zekić, PhD, Assistant Professor         | chair person      |
| 2. Sanja Radman, PhD, research associate          | member            |
| 3. Zvonimir Marijanović, PhD, Assistant Professor | member-supervisor |

**Defence date:** October 19<sup>th</sup>, 2022.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od veljače do rujna 2022. godine.*



## **ZAHVALA**

*Iskreno i od srca se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na datoj mogućnosti da odradim diplomski rad na željenu temu, te na ukazanom povjerenju, pomoći, vremenu i svim savjetima kako tijekom izrade rada tako i tijekom studija.*

*Veliko hvala svim mojim prijateljima zbog kojih će mi studiranje uvijek ostati u najljepšem sjećanju.*

*Posebnu i najveću zahvalnost iskazujem svojoj obitelji bez čije podrške, razumijevanja i beskonačne vjere u mene i moj uspjeh ne bi bila ovdje gdje jesam. Hvala Vam!*

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Odrediti profil hlapljivih spojeva tri različita uzorka *brandy* pomoću dvije metode izolacije i to ekstrakcije tekuće-tekuće i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)
- Identificirati izolirane hlapljive spojeve koristeći vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)
- Analizirati i usporediti dobivene rezultate ispitivanih uzoraka i odrediti sličnosti i razlike u analizi uzoraka primjenom dviju različitih metoda izolacije

## SAŽETAK

*Brandy* je jako alkoholno piće alkoholne jakosti najmanje 36% vol. dobiveno iz rakije od vina s ili bez dodatka vinskog destilata koje dozrijeva u drvenim bačvama. Tijekom cijelog tehnološkog procesa proizvodnje sintetiziraju se razni hlapljivi spojevi čiji kemijski sastav i zastupljenost utječu na finalnu aromu i kvalitetu konačnog proizvoda. Cilj ovog rada je identificirati i usporediti profil hlapljivih spojeva 3 uzorka *brandya*. Izolacija hlapljivih spojeva izvedena je pomoću dvije metode izolacije: ekstrakcija tekuće-tekuće i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) s dva različita vlakna. Primjenom vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) izvedena je analiza izoliranih spojeva. Kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće identificirano je 11 spojeva, dok je mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi identificirano 9 spojeva. Najzastupljenije kemijske skupine su esteri i alkoholi, a najzastupljenije spojevi su 3-metilbutan-1-ol, 3-metilbutil-etanoat, etil-oktanoat, etil-dekanoat i etil-dodekanoat.

**Ključne riječi:** *brandy*, hlapljivi spojevi, ekstrakcija tekuće-tekuće, HS-SPME, GC-MS

## **SUMMARY**

Brandy is strong alcoholic drink with an alcohol strength of at least 36% vol. obtained from wine schnapps with or without the addition of wine distillate, which matures in wooden barrels. During the entire technological process of production, various volatile compounds are synthesized whose chemical composition and representation influence the final aroma and quality of the final product. The aim of this work is to identify and compare the profile of volatile compounds of 3 brandy samples. Isolation of volatile compounds was performed using two isolation methods: liquid-liquid extraction and headspace solid phase microextraction (HS-SPME) with two different fibres. The analysis of the isolated compounds was performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. 11 compounds were identified by continuous liquid-liquid extraction, while 9 compounds were identified by headspace solid phase microextraction. The most common chemical group are esters and alcohols, and the most common compounds are 3-methyl-butan-1-ol, 3-methylbutyl acetate, ethyl octanoate, ethyl decanoate and ethyl dodecanoate.

**Keywords:** brandy, volatile compounds, liquid-liquid extraction, HS-SPME, GC-MS

## SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	1
<b>1. OPĆI DIO</b> .....	2
1.1 JAKA ALKOHOLNA PIĆA .....	2
1.1.1 RAKIJE .....	5
1.2. <i>BRANDY</i> .....	7
1.2.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE <i>BRANDYA</i> .....	10
1.2.2. SORTE GROŽĐA .....	11
1.2.3. BERBA I PRERADA GROŽĐA .....	12
1.2.4. ALKOHOLNA FERMENTACIJA .....	13
1.2.5. DESTILACIJA .....	15
1.2.6. DOZRIJEVANJE .....	23
1.2.7. FINALIZACIJA .....	27
1.3. KEMIJSKI SASTAV <i>BRANDYA</i> .....	28
1.4. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	34
1.4.1. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE .....	34
1.4.2. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI .....	35
1.5. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	36
1.5.1. PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA.....	36
1.5.2. SPEKTROMETRIJA MASA .....	38
1.5.3. SPREGNUTA TEHNIKA PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA- SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS).....	39
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	42
2.1. ANALIZIRANI UZORCI.....	42
2.2. APARATURA I KEMIKALIJE .....	42
2.3 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	43
2.3.1 EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE .....	44
2.3.2 MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI .....	45
2.4 GC-MS ANALIZA IZOLIRANIH SPOJEVA .....	46
<b>3. REZULTATI</b> .....	48
<b>4. RASPRAVA</b> .....	53
4.1 EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE .....	53

4.2 MIROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI.....	55
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>58</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>59</b>

## UVOD

Alkoholna pića su poznata od davnina te su se kroz povijest koristila u narodnoj medicini, u religijsko magijske svrhe i kao opojna sredstva za uživanje. Pretpostavlja se da je alkohol otkriven slučajno, a pivo i vino su bili poznati već nekoliko tisuća godina prije Krista. Drevni narodi su vino nazivali „svetim pićem“ ili „vodom života“. Prvo spominjanje destilacije kao procesa dobivanja alkohola je u knjizi „*Liber de arte distillandi*“ 1500 godina prije Krista, ali sam proces ostaje nepoznat u Europi sve do 11. stoljeća kada se spominje prva destilacija viskija u Irskoj. Nakon toga proizvodnja alkohola destilacijom se širi na Škotsku i dalje te dolazi do usavršavanja uređaja za destilaciju, ali nagli razvoj i poboljšanje destilacije dolazi poslije Prvog, a osobito Drugog svjetskog rata. (1)

Zahvaljujući destilaciji danas u svijetu imamo mnoga poznata i kulturna jaka alkoholna pića. Jedno od takvih je *Brandy*, jako alkoholno piće proizvedeno od rakije od vina sa ili bez dodatka vinskog destilata koje je najmanje jednu godinu dozrijevalo u hrastovim spremnicima ili najmanje šest mjeseci u hrastovim bačvama sa zapreminom manjom od 1000 litara.

Kvaliteta i senzorska svojstva *brandya* ovise o mnogim parametrima kao što su kvaliteta korištenih sirovina (kvaliteta i sorta grožđa), način prerade grožđa, način provedbe fermentacije i destilacije te odležavanje i dozrijevanje u kontaktu s hrastovim drvom. Svaki od provedenih proces u proizvodnji *brandya* pridonosi stvaranju brojnih hlapljivih spojeva koji svojim sastavom i udjelom itekako utječu na kvalitetu konačnog proizvoda. Upravo identifikacijom tih nastalih spojeva možemo pravilno ocijeniti kvalitetu proizvoda.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1 JAKA ALKOHOLNA PIĆA

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima, jaka alkoholna pića su definirana kao pića namijenjena za ljudsku potrošnju s minimalno 15% vol. alkohola i posebnim senzorskim svojstvima. Dobivena su od poljoprivrednih sirovina bogatih šećerom ili škrobom i to procesima alkoholne fermentacije i destilacije te su proizvedena ili:

- Izravnim postupkom i to:
  - destilacijom, s ili bez dodavanja aroma, prirodno prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla, i/ili
  - maceracijom ili sličnom preradom bilja u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i /ili u destilatima poljoprivrednog podrijetla, i/ili u jakim alkoholnim pićima, i/ili
  - dodavanjem aroma, šećera ili drugih sladila i/ili drugih poljoprivrednih proizvoda i/ili prehrambenih proizvoda etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i/ili destilatima poljoprivrednog podrijetla i/ili jakim alkoholnim pićima,
- Miješanjem jakog alkoholnog pića s jednim ili više:
  - drugih jakih alkoholnih pića i/ili;
  - etilnim alkoholom poljoprivrednog podrijetla ili destilatima poljoprivrednog podrijetla, i/ili
  - drugih alkoholnih pića, i/ili
  - pića.

Etilni alkohol korišten u proizvodnji jakih alkoholnih pića mora biti poljoprivrednog podrijetla, minimalne alkoholne jakosti od 96,0% vol. i mirisa i okusa karakterističnog za upotrijebljenu sirovinu. Uz senzorska obilježja moraju biti zadovoljeni maksimalni udjeli ostataka poput aldehida, estera, viših alkohola, ukupne kiselosti, metanola, suhog ekstrakta, hlapljivih spojeva na bazi dušika i furfurala. (2)



Danas postoje mnogobrojne različite podjele jakih alkoholnih pića ovisno o korištenoj sirovini, postupku dobivanja i udjelu alkohola. Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima postoji čak 46 kategorija jakih alkoholnih pića. (2)

Obzirom na vrstu sirovine, tehnološkom postupku proizvodnje, količini alkohola i šećera jaka alkoholna pića dijelimo na:

- prirodna jaka alkoholna pića,
- umjetna jaka alkoholna pića i
- aromatizirana vina

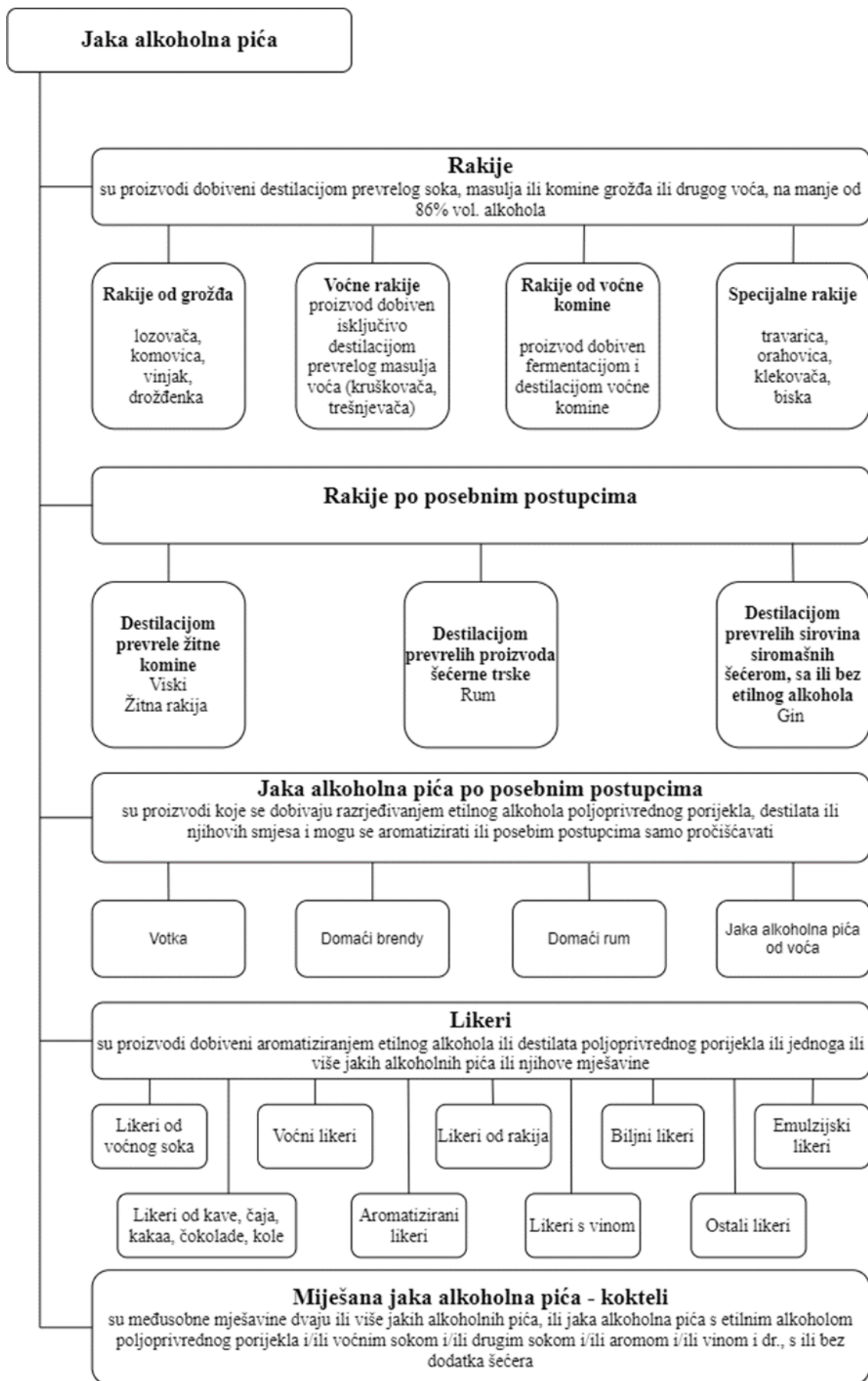
Prirodna jaka alkoholna pića se dobivaju destilacijom prefermentiranih komina i obilježava ih specifična aroma te okusne i mirisne karakteristike koje dolaze od upotrijebljene sirovine za proizvodnju. Upravo zbog toga spadaju među najkvalitetnije proizvode jakih alkoholnih pića. Tijekom proizvodnje nije dozvoljena upotreba šećera, čistog škrobnog sirupa ili sirovina na bazi škroba, umjetnih boja i aroma i rafiniranog etilnog alkohola. Prema vrsti sirovine dijele se na voćne rakije, šećerne rakije i žitne rakije.

Umjetna jaka alkoholna pića se proizvode maceracijom sirovina u alkoholu, destilacijom voćnih sokova i/ili dodatkom rafiniranog alkohola i aromatskih tvari te imaju sve karakteristike upotrijebljene sirovine za proizvodnju i to u oplemenjenom obliku.

Aromatizirana vina se proizvode procesom maceracije aroma i osušenih dijelova neke biljke u prefermentiranim voćnim sokovima (vinima) gdje se tijekom proizvodnje može, ali ne mora nužno dodati šećer i/ili rafinirani alkohol. (3)

Podjela koja ovisi o podrijetlu sirovine, načinu i uvjetima proizvodnje dijeli jaka alkoholna pića na:

- rakije,
- rakije po posebnim postupcima,
- jaka alkoholna pića po posebnim postupcima te
- likeri i kokteli. (1)



**Slika 1.** Podjela jakih alkoholnih pića (1)

### 1.1.1 RAKIJE

Rakije su proizvodi dobiveni destilacijom prefermentiranog soka, masulja ili komine grožđa i drugog voća na manje od 86% vol. alkohola. Prirodnim rakijama nazivamo pića dobivena destilacijom prefermentirane komine grožđa, voća i šumskih plodova. Rakije se dijele na:

- rakiju od grožđa – *brandy*, vinjak, lozovača, komovica, vinovica, droždenka
- voćne rakije – od koštuničavog voća (šljiva, trešnja, višnja), od jezgričavog voća (dunja, jabuka, smokva) i bobičastog voća (ribiz, kupina, borovnica)
- rakije od voćne komine i
- specijalne rakije – travarica, klekovača, orahovica, biska i dr. (4)

Destilacijom alkoholno prevrelih proizvoda od grožđa dobivamo:

- vinski destilat,
- vinski alkohol
- rakije i
- vinjak.

**Vinski destilat** se proizvodi destilacijom vina ili vina za preradu koja nemaju više od 2 g/L hlapljivih kiselina, izraženih kao octena kiselina. Za destilaciju se može koristiti bijelo, crno i rose vino, a krajnji vinski destilat mora zadovoljavati uvjete kao što je sadržaj:

- stvarnog alkohola od 54 do 72 volumna %,
- ekstrakta od 0,2 do 5,0 g/L,
- estera, kao etil estera octene kiseline, od 500 do 2.500 mg/L apsolutnog alkohola,
- ukupne kiseline, kao octene kiseline, od 50 do 1.000 mg/L apsolutnog alkohola,
- viših alkohola od 1.500 do 5.000 mg/L apsolutnog alkohola,
- metil alkohola do 0,25 volumnih % računato na apsolutni alkohol,
- furfurala do 20 mg/L apsolutnog alkohola,
- aldehida od 40 do 400 mg/L apsolutnog alkohola,

- sumpornog dioksida do 50 mg/L
- permanganatni indeks nula i
- izdašnost najmanje 1:300.

**Vinski alkohol** se proizvodi destilacijom vina ili čak nekih drugih alkoholno prevrelih proizvoda od grožđa gdje stvarni sadržaj alkohola iznosi najmanje 90 volumna %, te taj proizvod nazivamo rafinirani alkohol dok je kod nerafiniranog stvarni sadržaj alkohola u rasponu od 72 do 90 volumnih %.

Starenjem to jest odležavanjem vinskog destilata u kontaktu s hrastovim drvom dobivamo proizvod nazvan **vinjak**. Tijekom proizvodnje vinjaka dopušten je dodatak tvari koje će pridonijeti poboljšanju kakvoće, mirisa, okusa, boje i ekstrakta, te smanjenju alkohola ako je to potrebno. Za povećavanje ekstrakta može se dodati saharoza do 10 g/L, za povećavanje boje karamel do 1 g/L i za smanjenje sadržaja alkohola dodaje se destilirana ili omekšana voda. Vinjak je proizvod koji sadrži:

- stvarnog alkohola od 38 do 45 volumnih %,
- ekstrakta od 1,5 do 16 g/L,
- estera, kao etil estera octene kiseline, od 500 do 3.000 mg/L apsolutnog alkohola,
- ukupne kiseline, kao octene kiseline, od 100 do 1.000 mg/L apsolutnog alkohola,
- viših alkohola od 1.500 do 5.000 mg/L apsolutnog alkohola,
- metil alkohola do 0,25 volumnih % računato na apsolutni alkohol,
- furfurala do 30 mg/L apsolutnog alkohola,
- aldehida od 40 do 500 mg/L apsolutnog alkohola,
- sumpornog dioksida do 25 mg/L
- permanganatni indeks od 3,0 do 24 i
- izdašnost najmanje 1:400.

Da bi se vinjak mogao staviti na tržište mora zadovoljavati sljedeće uvjete:

- da je bistre, bezbojne ili boje svojstvene vrsti vinjaka,
- mirisa i okusa karakterističnog odgovarajućoj vrsti vinjaka,
- bez neprijatnog okusa i mirisa,
- ispravno dorađen, te
- bez nedozvoljenih stranih tijela (dijelovi čepa, zatvarača i sl.). (5)

Jako alkoholno piće dobiveno isključivo iz vinskog destilata koji je proizveden postupkom destilacije vina ili vina pojačanog za destilaciju na manje od 86% vol. alkohola ili redestilacijom vinskog destilata također na manje od 86% vol. alkohola je **rakija od vina**. Kod proizvodnje nije dopušteno dodavanje razrijeđenog ili nerazrijeđenog alkohola, također se ne smije aromatizirati, izuzevši tradicionalne metode proizvodnje. Dopušteno je dodavanje karamela kao sredstva za prilagodbu boje. Kao gotov proizvod na tržištu mora imati alkoholnu jakost najmanje 37,5% vol. U Republici Hrvatskoj rakija od vina se može označiti kao vinjak ukoliko je dozrijevala najmanje jednu godinu u hrastovim spremnicima ili najmanje šest mjeseci u hrastovim bačvama zapremnine manje od 1000 litara. (2)

## 1.2. BRANDY

Povijest proizvodnje *brandya* seže u 16. stoljeće kada je u Europi najpopularnije piće za trgovanje bilo vino. Priča uključuje Nizozemskog broskog zapovjednika koji je bio zadužen za prijevoz vina iz Francuske u Nizozemsku. Pokušavajući zaraditi što više novca shvatio je da bi uklanjajući što je više moguće vode iz vina mogao koncentrirati vino i tako poslati veće količine u Nizozemsku gdje bi se po dolasku u tako koncentrirano vino dodala voda. Ipak nije mislilo da će njegova posada početi piti koncentrirano vino, vjerujući da je grijeh dodavati vodu u takvo piće. Koncentrirano vino je nazvano „Brandewijn“ što u izravnom prijevodu znači „izgorjelo vino“. S vremenom se taj naziv skratio na *Brandy*. Iako su Nizozemci osigurali veliki dio originalnog kapitala zajedno s destilacijskim aparatima i tehnologijom potrebnom za destilaciju, lokalni proizvođači su također uložili u proizvodnju *brandya* i stoga su bili prisiljeni tražiti nova tržišta za svoje proizvode. Svugdje drugdje u Francuskoj, ali posebno u Armagnacu, proizvođači su počeli destilirati svoje vino, posebno ona vina lošije kvalitete. (6)

Do sredine 1600-ih godina francuski vinari su prihvatili osnove tehnologije destilacije i uveli neka poboljšanja otkrivši da druga destilacija još više pročisti *eau-de-vie* to jest „vodu života“ kako su nazivali *brandy*. Uz to došli su do još jednog značajnog otkrića: svrhovito sazrijevanje u drvenim bačvama. Duljim odmaranjem u okvirima hrastovih bačvi izgrađenih od obližnjega hrasta, *eau-de-vie* poprima žutu boju polja pšenice, i još važnije, okus i tekstura postaju puniji i zreliji. Biokemijska interakcija

između svježih alkoholnih pića i svojstvenih spojeva hrasta je znatno poboljšala djevičanski *eau-de-vie*. Ustvari dužim odmaranjem u drvenim bačvama okus *eau-de-vie* bi postao profinjeniji i glađi. (7)

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima *brandy* je jako alkoholno piće dobiveno iz rakije od vina sa ili bez dodatka vinskog destilata, destiliranog na manje od 94,8% vol. alkohola pod uvjetom da udio alkohola iz tog vinskog destilata ne prelazi više od 50% od ukupne količine alkohola u gotovom proizvodu; koje je najmanje jednu godinu dozrijevalo u hrastovim spremnicima ili najmanje šest mjeseci u hrastovim bačvama sa zapremninom manjom od 1000 litara. *Brandy* je piće koje sadržava maksimalno 200 grama po hektolitr preračunato na 100% vol. alkohola metanola i najmanje 125 grama po hektolitr preračunato na 100% vol. alkohola hlapivih tvari koje nastaju isključivo destilacijom ili redestilacijom upotrijebljene sirovine. Kod proizvodnje nije dopuštena upotreba razrijeđenog ili nerazrijeđenog alkohola niti aromatiziranje izuzevši tradicionalne metode proizvodnje. Dopušteno je dodavanje karamela kao sredstva za prilagodbu boje pića. Ukoliko se stavlja na tržište kao gotov proizvod *brandy* mora sadržavati najmanje 36% vol. alkohola. (2)

Neki od najpoznatijih *brandya* su francuski *Armagnac* i *Cognac*. *Armagnac* je najstarija vrsta *brandya* u Francuskoj i proizvodi se u ograničenom području na jugozapadu Francuske posebno u okruzima Gers. Regija *Armagnac* nalazi se u srcu drevne pokrajine Gascony u jugozapadnom kraju Francuske. Kod *Armagnaca* destilacija se odvija u alambic destilatoru s kolonom od 5 do 15 tavana. U Francuskoj javnosti on se smatra *brandyem* Francuske iako se nažalost ponekad doživljava kao vrsta *Cognaca* što nije. Najcjenjeniji od najvećih svjetskih *brandya* je *Cognac* koji se smatra mjerilom za ocjenjivanje drugih *brandya*. Dominirao je koncept *brandya* do te mjere da se riječ *Cognac* široko koristi u drugim zemljama kao sinonim- „*Conac*“ u Španjolskoj, „*Cohnac*“ u Portugalu, „*Konyak*“ u Centralnoj Europi. *Cognac* je zaštićeno ime dobiveno po istoimenom povijesnom gradu i proizvodi se samo u regiji *Cognac* u departmanima Charente i Charente-Maritime. Tehnologija proizvodnje je propisana i zaštićena te sadrži tradicionalni destilacijski postupak - dvokratnu destilaciju pomoću jednostavnog destilacijskog uređaja *alambic Charentais*, te dozrijevanje najmanje dvije godine u bačvama od francuskog hrasta. (6,7)

U poznate europske *brandye* se ubraja i španjolski *brandy* podrijetlom iz regije Jeres koji je specifičan po odležavanju u rabljenim bačvama od *sherrya*. Metoda miješanja koja se koristi kod proizvodnje *sherry* vina se primjenjuje kod proizvodnje *Brandy de Jerej* gdje se miješaju destilati različite starosti. Italija ima dugu povijest proizvodnje *brandya* i za razliku od Francuske nema ograničeno područje proizvodnje te koristi regionalno grožđe. Većina se proizvodi u uređajima za destilaciju s tavanima iako postoji niz manjih proizvođača koji upotrebljavaju alambic destilatore. U znatnim količinama se proizvodi *Grappa*, piće dobiveno destilacijom komine grožđa. U Njemačkoj se proizvode i konzumiraju znatne količine *brandya* nazvanog „*weinbrand*“ koji se proizvodi od uvezenog vina većinom iz Francuske i Italije. Najpoznatiji južnoamerički *brandy* je *Pisco*, bistar i sirov *brandy* iz Perua i Čilea dobiven uglavnom od muškarnog grožđa dvostrukom destilacijom u kotlovima. U Čileu se u proizvodnji koriste različite sorte vinove loze te se destilacija vrši u loncima. (6)



**Slika 2.** Cognac (8)

### 1.2.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE *BRANDYA*

Tehnološki postupak proizvodnje *brandy* uključuje određene operacije koje je potrebno pravilno izvršiti da bi se dobio proizvod vrhunske kvalitete, a te operacije su:

- odabir sorte grožđa,
- berba i prerada grožđa,
- alkoholna fermentacija,
- destilacija,
- odležavanje,
- finalizacija i punjenje u boce.

Na kvalitetu i okus *brandy* utječe dosta čimbenika. Osim klimatskih uvjeta svi ostali čimbenici se mogu kontrolirati kako bi se zadržala ili čak poboljšala kvaliteta i senzorska svojstva *brandy*. Najvažniji čimbenici su prikazani na slici 3. (9)

Stage	Input and variation
Grapes	Climatological conditions Grape variety Ripeness of grapes Sanitary state of grapes Method of harvesting
Vinification	Fermentation Yeast variety Storage conditions
Distillation	Method of distillation Presence of yeast Processing
Maturation	Barrel Wood extracts

**Slika 3.** Čimbenici koji utječu na kvalitetu i senzorska svojstva *brandy* (9)



### 1.2.2. SORTE GROŽĐA

Osnovna sirovina za proizvodnju *brandya* je grožđe, potom vino, pa sama kvaliteta grožđa znatno utječe na aromu i kvalitetu samog *brandya*. Važna je sorta grožđa kao i uvjeti uzgoja, klimatske prilike i zemljišna regija u kojoj se grožđe uzgaja. Nije nužno da visoko kvalitetne sorte daju kvalitetan *brandy*. Glavne karakteristike sorti grožđa za *brandy* su niski sadržaj alkohola i viši sadržaj ukupnih kiselina. Jednako važan je i dobar omjer šećera i kiselina. Poželjno je da sorte imaju sadržaj ukupnih kiselina od 6 do 10 g jer veći sadržaj kiselina omogućava uspješno provođenje alkoholne fermentacije bez dodatka sumpornog dioksida. Prisutnost većeg sadržaja kiselina snižava pH vrijednost što povoljno utječe na proces fermentacije i destilacije jer tako dobiveno vino, odnosno destilat, sadrži manje aldehida. Kao i izbor sorte važno je i vrijeme berbe grožđa. Nužno je da grožđe sazrije, da ne bude prezrelo da bi se održao povoljan omjer šećera i kiselina. Pogodne su sorte koje dopijevaju kasnije jer daju grožđe sa smanjenim udjelom šećera (ne više od 0,22%) i povećanim udjelom kiselina. (1,4)

Budući da se od 4,5 L vina dobije 1 L *brandya* važan je i prinos. Pošto većina aromatičnih komponenti nastaje prilikom proces destilacije favorizirana je uporaba grožđa neutralnih karakteristika kao što je to Ugni Blanc u proizvodnji *Cognaca* koja osigurava zadovoljavajući prinos proizvodnje. Ne preporučuju se muškatne sorte kao ni sorte sa snažnim i postojanim okusom kao što je Sauvignon blanc koje daju aromatična vina te zbog izražene arome nisu pogodna za proizvodnju *brandya*. (10)

Sorte koje su pogodne za proizvodnju *brandya* su obično bijele sorte kao graševina, kraljevina, pinot bijeli, rajnski rizling i šipon, žuti plavac. Za proizvodnju francuskog *Cognaca* se koriste sorte Ugni Blanc, Colombrad, Folle Blanche. (11)

Klimatski uvjeti imaju veliku ulogu u dozrijevanju grožđa. Topla klima nije pogodna za uzgoj grožđa za *brandy* jer takvo grožđe prezrije i dobiveno vino sadrži više alkohola i manje kiselina što nije poželjno. Kod hladnije i vlažnije klime problem je što grožđe ne sazrijeva dovoljno te dolazi do truljenja. Prema tome najbolje grožđe dobiva se u umjerenim klimatskim uvjetima. (4)

Još jedan čimbenik koji utječe na kvalitetu grožđa je i tlo. Iako nije znanstveno ispitano generalno je prihvaćeno da tlo s viskom sadržajem kalcijevog karbonata daje bolje grožđe. (12)

Važno je da je korišteno grožđe zdravo. Jedno od najčešćih mikrobnih kontaminacija grožđa je infekcija botritisom. *Botrytis cinerea* je plijesan koja proizvodi supstance kao okt-1-en-3-ol (miris gljiva) koje imaju negativan učinak na aromu destilata jer se miris plijesni može otkriti čak i nakon destilacije i odležavanja. (10)

### 1.2.3. BERBA I PRERADA GROŽĐA

Berba grožđa se obavlja kada je grožđe tehnološki zrelo. Kod manjih proizvođača berba se najčešće obavlja ručno gdje imamo bolje očuvanje ploda, ali oduzima dosta vremena za razliku od mehaničkog načina. Grožđe se mora što prije transportirati u vinariju da bi se uklonilo trulo grožđe i počelo s preradom grožđa. (13)

Prerada grožđa uključuje muljanje, runjenje i prešanje grožđa. Muljanje je postupak mehaničkog drobljenja grožđa gdje se izdvaja sok i meso od kožice grožđa. Runjenje je proces uklanjanja peteljkovine grožđa prvenstveno radi smanjenja ekstrakcije neželjenih fenola, posebno tanina, koji daju trpak i gorak okus. Potom se događa maceracija, odnosno ekstrakcija, gdje se oslobađaju enzimi iz stanica grožđa koji osiguravaju lakše otapanje i oslobađanje tvari vezanih unutar stanica mesa, sjemenki i pokožice. Vrijeme maceracije je obično u prvim fazama fermentacije. (14)

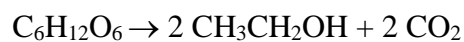
Prešanje grožđa je zapravo stiskanje masulja pri čemu se odvaja sok (mošt) od krutih dijelova (kožice, mesa i sjemenke). Prešanje je važno provest odmah nakon berbe jer grožđe s započetom fermentacijom na koži nije poželjno. Preša s kontinuiranim radom se ne koristi jer uzrokuje povećavanje vinskog taloga i oslobađanje neželjenih spojeva zbog čega se upotrebljavaju preše s diskontinuiranim radom. Također postoje mehaničke ili pneumatske preše koje su pogodne za korištenje jer ne uzrokuju veliko oštećenje na kožici. Da se izbjegne ekstrakcija fenola prešanje se provodi umjerenim pritiskom. (12) Mora se ograničiti aeracija i oksidacija mošta tijekom prerade grožđa. Grožđe se prerađuje po tipu bijelog vina bez obzira je li korišteno grožđe bijelo ili crno. Vrijeme između prešanja grožđa i fermentacije treba biti što kraće jer se kod prerade grožđa za

*brandy* ne koristi sumporov dioksid čija je uloga zaštita mošta od oksidacije i mikrobnog kvarenja. Sumporov dioksid se ne koristi kod prerade grožđa ni u moštu jer se njegovom uporabom povećava količina aldehida koji za vrijeme destilacije grade tioestere (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-S-H<sub>5</sub>-C<sub>2</sub>) koji daju neugodan i oštar miris destilata. U kontaktu s bakrom stvara bakrov sulfid (CuS) koji uzrokuje korodiranje bakrenih dijelova kazana. Nije poželjan ni u vinu za destilaciju jer tijekom destilacije nastaje etil-merkaptan (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-SH) koji ima neugodan miris osjetan čak i u malim koncentracijama. Sumporov dioksid otežava i proces odležavanja odnosno starenja vinskih destilata. (4,10)

U određenim slučajevima gdje higijensko stanje grožđa nije zadovoljavajuće, moštu se smije dodati sumporov dioksid u koncentraciji od 0,01 g/L da bi se izbjegla pojava etil-laktata i etil-acetata. (10)

#### 1.2.4. ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Alkoholna fermentacija ili alkoholno vrenje, kako se često naziva, je biokemijski proces mikrobiološke pretvorbe monosaharida (glukoza, fruktoza) u alkohol etanol i ugljikov dioksid. Mikroorganizmi zaslužni za tu pretvorbu su kvasci. Prvu formulu alkoholne fermentacije je dao Gay-Lussac 1815. godine:



Vina korištena za dobivanje destilata za proizvodnju *brandy*a se rade po tehnologiji proizvodnje bijelih vina gdje se u fermentaciji koristi mošt. Mošt sadrži vodu, šećer i kiseline te je dobar medij za kvasce jer sadrži sve tvari potrebne za razvoj mikroorganizama. Najznačajniji kvasci za proizvodnju vina su iz rodova *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulasporea*, *Kloeckera*, *Schizosaccharomyces*, *Metschnikowia* i drugi. (14) Najveći broj kvasaca važnih za alkoholnu fermentaciju dolazi upravo iz roda *Saccharomyces*. Za neke vrste iz toga roda se smatra da su glavni nositelji procesa alkoholne fermentacije. Prisutne su i druge manje zastupljene vrste kvasaca koje također utječu na kvalitetu vina i destilata vina svojim metabolizmom. (15)

Kvasci obično potječu s površine grožđa, površine opreme vinarije i različitih starter kultura koje se koriste u kontroliranoj provedbi alkoholne fermentacije. Ukupna

populacija kvasaca i odnos među vrstama na grožđu određuju mnogi faktori kao što su klimatski faktori (temperatura, oborine i drugi), upotreba fungicida, fizikalna oštećenja uzrokovana mikroorganizmima, insektima i pticama kao i kultivar vinove loze, stupanj zrelosti grožđa te samo vrijeme berbe grožđa. (14)

Na aromu i okus vina i destilata od vina snažno utječe vrsta upotrijebljenog kvasca. Cavazza i sur. su ispitali utjecaj šest vrsta kvasaca iz roda *Saccharomyces* na stvaranje hlapljivih spojeva. Svaki mošt od četiri kultivara vinove loze je fermentiran sa šest različitih sojeva *Saccharomyces* te je u svakom fermentiranom proizvodu kvantificirano 38 hlapljivih tvari. Statistička analiza podataka je pokazala da se koncentracija važnih spojeva okusa kao što je 2-fenetil-laktata, etil-butanoata, butanske kiseline, heksanske kiseline koja daje voćnu aromu, etil-hidroksibutanoata koji daje vinsku aromu, heksanola koji daje aromu nalik zelenom lišću i 2-feniletanola koji daje ružičast miris, značajno razlikovala od serije do serije ovisno o soju korištenog kvasca. (16)

Soj koji proizvodi povišene razine 2-feniletanola (cvjetni miris) i niske razine acetaldehida ("Sherry miris") ima prednost jer ti spojevi pozitivno utječu na destilat. Također talog kvasaca ima učinak na koncentraciju viših alkohola i estera u destilatu jer u sebi sadrži visoke koncentracije masnih kiselina i estera masnih kiselina koje daju važne kvalitete proizvodu. Povišena razina estera i umjerena koncentracija viših alkohola pozitivno utječe na kvalitetu proizvoda dok su visoke koncentracije etil-acetata i izomil-acetata nepoželjne. (12)

Alkoholna fermentacija je anaeroban proces zbog brze potrošnje kisika iz mošta te nastanka ugljikov dioksida koji osigurava anaerobne uvjete. Nastali ugljikov dioksid se nakuplja na površini komine te onemogućava razvoj aerobnih bakterija i plijesni. Alkohol koji nastaje u fermentaciji inhibitorno djeluje na većinu bakterijskih vrsta te tako smanjuje njihov broj. U takvim uvjetima omogućen je razvoj jedino kvasaca koji jedini i zaostaju na kraju fermentacije. U ranijim fazama fermentacije odnosno tijekom spontane fermentacije prisutni su kvasci iz ne-*Saccharomyces* skupine kao što su *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Metschnikowia pulcherrima* dok u kasnijim fazama njihov rast inhibira nastali alkohol. Fermentaciju potom nastavlja i završava *Saccharomyces cerevisiae* koji je otporan na visoku koncentraciju sintetiziranog etanola. (17)

Iako se sumporov dioksid tradicionalno koristi kao konzervans protiv oksidacije u proizvodnji vina njegova uporaba u proizvodnji vina temeljnih za *brandy* nije dopuštena zbog korozivnog učinka na destilatore te zbog opasnosti nastanka sumporne kiseline tijekom sazrijevanja u hrastovim bačvama. (18)

Proces fermentacije se odvija u spremnicima, bačvama različitih veličina, ali u velikim proizvodnjama obično se koriste betonski tankovi. Proces vrenja se odvija na temperaturi od 25 °C i traje 3 tjedna. Povišena temperatura osigurava da proces fermentacije napreduje, da ne zaostaje niti proizvodi nepoželjne i neugodne mirise. Dobiveno vino je kiselo i zamućeno, te mora imati boju karakterističnu za bijelo vino, zelenkasto-žutu ili svijetlo crvenu ukoliko potječe od crnih sorata. Vino za destilaciju mora imati sadržaj alkohola od 8 do 10% vol., ukupnih kiselina iznad 8 g/L te ne smije sadržavati više od 0,2% neprevrelog šećera jer on utječe na teže odvajanje soli vinske kiseline iz komine nakon destilacije. Na kvalitetu *brandya* utječe i sadržaj dušičnih tvari vina te ukoliko je potrebno u procesu fermentacije se može dodati diamonijev fosfat koji povećava stvaranje estera, a inhibira nastanak viših alkohola. Mlada vina s ponešto više vinskog kvasca se smatraju poželjna za proces destilacije jer destilacijom kvasca dolazi do izdvajanja estera koji daju ugodnu aromu. Vino koje ide na destilaciju ne mora biti bistro, ali mora biti zdravo, bez stranih mirisa i okusa te imati izražene sortne karakteristike arome. (3,12)

### **1.2.5. DESTILACIJA**

Nakon provedene alkoholne fermentacije slijedi destilacija. Destilacija je fizičko kemijski separacijski proces temeljen na različitoj točki hlapljivosti gdje se isparavanjem, zatim kondenziranjem nastalih para pročišćavaju kapljevine. Načelo destilacije je spoznaja da je koncentracija komponenti različita u plinovitoj i tekućoj fazi. Fermentirani proizvodi grožđa i vina, komine i razne druge sirovine bogate alkoholom se zagrijavaju u destilacijskom uređaju, te se tako hlapljivi spojevi prevode u plinovito stanje potom kondenziranjem tih para nastaje destilat. Glavni i najzastupljeniji sastojak destilata je etilni alkohol potom voda, te u manjoj količini primjese. Uz koncentriranje etanola dolazi i do prijenosa niza drugih hlapljivih spojeva koji potječu iz sirovine ili su nastali u procesu

fermentacije i destilacije. Upravo zbog toga destilacija se smatra jednim od najvažnijih koraka u proizvodnji jakih alkoholnih pića. (3,19)

Period između alkoholne fermentacije i destilacije može trajati do 5 mjeseci iako je poželjno da se destilacija provede u što kraćem roku nakon fermentacije. Upravljanje kisikom je ključno jer su mnogi poželjni hlapljivi spojevi nastali tijekom fermentacije osjetljivi na oksidaciju. U periodu između ta dva procesa događaju se kemijske reakcije koje mijenjaju sastav vina. Tih promjena nema kod sadržaja viših alkohola u vinu, ali se sadržaj estera može značajno smanjiti. Najviše pogođeni su upravo esteri s poželjnim aromatskim svojstvima kao što su heksil-acetat, fenetil-acetat, etil-kaprilat, etil-heksanoat, etil-kaprat, etil-laurat. Istovremeno se događa nepoželjno povećanje etil-laktata, etil-acetata, dietil-sukcinata, octene kiseline i acetaldehida. (10)

Tijekom destilacije uz ekstrakciju hlapljivih spojeva događaju se brojne kemijske reakcije kao što su acetalizacija, esterifikacija, Maillardove reakcije i Streckerove degradacije koje uveliko utječu na kvalitetu pića. Razlog zašto se ove reakcije događaju su niz povoljnih reakcijskih uvjeta kao što su pogodna temperatura, sadržaj otopljenog kisika i antioksidansa i drugi. Zbog visoke temperature događaju se kemijske reakcije poput reakcija između šećera i aminokiselina koje tvore heterocikle kao što su furani, pirazini i piridini, te hidrolizirajuće nehlapljive terpeneske glikozide i slobodne hlapljive terpene. (6) Zbog tih procesa specifičan miris grožđa i sastojci mirisa bi mogli ostati u optimalnom omjeru tijekom destilacije i tako opskrbiti proces starenja s poželjnim mirisnim spojevima. (10, 20)

Glavni cilj destilacije je izdvajanje etilnog alkohola u povoljnom odnosu s primjesama, stoga velika količina vode i primjesa u destilatu nije poželjna. Upravo zbog toga se sirovi destilat (meka rakija) ne koristi u pripremi gotovih proizvoda nego se podvrgava smanjenju neželjene vode i primjesa. Postupci kojima se to postiže su redestilacija, deflegmacija i rektifikacija. (21)

**Redestilacija** je najstariji oblik pojačavanja i pročišćavanja sirovog destilata. To je ponovljena destilacija kojom se koncentrira alkohol etanol na račun smanjenja vode i primjesa. Najčešće se obavlja na običnim, domaćim kotlovima i nekada se destilacija mora ponoviti par puta kako bi se postigla visoka koncentracija alkohola. Samo koncentriranje je jače ukoliko je količina alkohola u sirovom destilatu manja. (21)

**Deflegmacija** je također proces pojačavanja i pročišćavanja sirovog destilata, ali se izvodi na složenim uređajima za destilaciju. Ti uređaji za destilaciju pored običnog hladnjaka sadrže posebni hladnjak nazvan deflegmator. Proces destilacije se odvija tako da alkoholne pare prvo odlaze u deflegmator gdje se djelomično hlade i kondenzira se dio alkohola, vode i primjesa koji se naziva flegma. Flegma se automatski vraća natrag u uređaj za destilaciju, a pojačane i pročišćene alkoholno vodene pare se kondenziraju u glavnom hladnjaku, te tako daju destilat s većim sadržajem alkohola i manjim sadržajem vode i primjesa bez ponovne destilacije. Prednosti ovog procesa su ušteda vremena, energije i radne snage, te činjenica da se prvom destilacijom dobiva destilat veće čistoće i jačine. (21)

**Rektifikacijom** se hlapljivi spojevi uklanjaju iz kapljevine više puta ponovljenom frakcijskom destilacijom i kondenzacijom. Provodi se na složenim uređajima za destilaciju koji uz rektifikacijsku kolonu imaju i deflegmator. Proces se temelji na principu da nastala para sadrži više lako hlapljivih spojeva u odnosu na kapljevinu iz koje je proizašla i djelomičnim hlađenjem odnosno kondenzacijom ta para se može i dalje obogaćivati lakše hlapljivim spojevima jer je kondenzat nastao iz te pare bogatiji teže hlapljivim spojevima. Tako od prve destilacije nastaje pročišćen i jak destilat nazvan rektificirani destilat. (22)

Kod proizvodnje kvalitetnog *brandy* nužna je dvostruka destilacija koja destilat obogaćuje poželjnim karakteristikama i uklanja nepoželjne primjese. Prva destilacija je u biti proces koncentriranja gdje se zagrijavanjem odnosno destiliranjem vina temeljnog za *brandy* uklanja voda i dobiva se tako-zvani sirovi *brandy* ili *brouillis*. Proces obično traje između 6 i 9 sati te je nužno da se destilacija odvija mirno, kap po kap odnosno bez „udara“. Prvi dio destilata ima alkoholnu jakost oko 83% vol. i obično se odstranjuje jer sadrži nepoželjne spojeve poput acetaldehida i etil-acetata. Sirovi *brandy* ili „duša vina“, kako se naziva sadrži sve poželjne hlapljive spojeve iz vina, sadržaj alkohola između 26 i 32% vol. i dosta je oštar. Kada se skupi dovoljna količina sirovog destilata slijedi redestilacija uz izdvajanje frakcija s ciljem uklanjanja viška nepoželjnih primjesa. (12)

U kazanu zaostaje patočna voda bogata vrijednim komponentama vina koje se mogu iskoristiti ukoliko se u patočnu vodu bez alkohola doda do 10% sirovog vinskog destilata i takva smjesa podvrgne odležavanju u hrastovim spremnicima u trajanju od 3

do 5 tjedana. Nakon toga se destilira i dobiven destilat nazvan „aromatična voda“ koji se može koristiti za finaliziranje *brandya*. (4)

Druga destilacija ili redestilacija se provodi s ciljem intenziviranja i pročišćavanja alkohola te se mora izvoditi mnogo pažljivije od prve destilacije. Trajanje je obično oko 10 do 12 sati. U svrhu odstranjivanja neželjenih primjesa i komponenti vrši se redestilacija uz izdvajanje frakcija. Vrijeme reza određenih frakcija određuju destilatori ovisno o koncentraciji alkohola i sastavu određenih hlapljivih spojeva i uvelike je važno iskustvo osobe koja provodi proces destilacije. (23)

Razlikuju se tri frakcije:

- prvi tok (prvijenac),
- drugi tok (srce, *brouilius*) i
- treći tok (patoka).

#### **Prvi tok (prvijenac)**

Komponente koje čine najveći sadržaj prvog toka su etil-acetat, metanol, acetaldehid, i viši alkoholi. To su komponente niskog vrelišta koje daju nepoželjan miris i замуćenje, čak i bijelu boju prvom toku. Kako destilacija napreduje dolazi do bistrenja i povećavanja etanola te se radi fracioniranja prvog toka obično na temperaturi od 74 do 76 °C kada i nestaje „bockajući“ miris aldehida. Prvi tok sadrži oko 70 do 75% vol. alkohola i zbog loših svojstava se odbacuje. (24)

#### **Drugi tok (srce, *brouilius*)**

Srce redestilacije je najkvalitetniji dio destilata, uz dovoljnu količinu etanola i drugih hlapljivih spojeva važnih za kvalitetu *brandya*. Za razliku od prvog toka koji obično traje 15 min, drugi tok traje dosta duže. Sadržaj alkohola ostaje od 68 do 70% vol. i kada krene padati ukazuje na kraj srednjeg toka. Kod jakosti od 50% vol. alkohola i uz prisustvo reskog mirisa srednji tok je završen. (4)

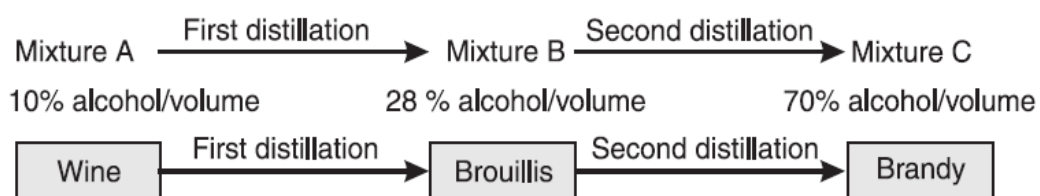
#### **Treći tok (patoka)**

Zadnji tok se hvata sve dok koncentracija alkohola ne padne na 0% i u kotlu zaostaje samo patočna voda. Kao i prvi tok, patoka sadrži dosta viših alkohola, aldehida, hlapljivih kiselina. Patoka se može miješati s prvim tokom i ta smjesa se podvrgava



redestilaciji uz frakcioniranje. Srednji tok te redestilacije se koristi u proizvodnji *brandy* lošije kvalitete. (4)

Ovakvim postupkom dobiva se 1 do 2% prvog toka, 30 do 35% drugog toka i 15 do 25% zadnjeg toka. Destilat koji se dalje podvrgava odležavanju je drugi tok odnosno srce redestilacije i sadrži 62 do 70% alkohola i metanola do 0,1%. Ostale komponente su dane u mg/100ml i iznose: viši alkoholi od 150 do 600, esteri do 250, aldehidi 50 te u dosta manjim količinama su sumporna kiselina 10, bakar 8, furfural 5, olovo 5. (4)



**Slika 4.** Tehnika dvostruke destilacije. (6)

Uz pomoć koeficijenata isparavanja alkohola, primjesa i rektifikacije može se odrediti dinamika prelaženja spojeva u destilat. Glavni sastojak etanol ravnomjerno opada kako napreduje proces destilacije. Isto tako se ponaša i metanol. Aldehidi i etil-formijat najintenzivnije prelaze u prvu frakciju potom im se koncentracija naglo smanjuje. Etil-acetat se također destilira u prvoj frakciji uz nagli pad koncentracije iako ga se može pronaći i u trećoj frakciji. Butanol, izo-butanol i amilni alkohol prelaze u prvoj frakciji, te im koncentracija opada. Propan-1-ol u cijelosti prelazi u prvi tok, a hlapljive kiseline najviše u treći tok. Furfural se pojavljuje početkom glavnog toka i do samog kraja glavnog toka se povećava i zatim se u trećoj frakciji smanjuje. (4)

Tijekom destilacije dolazi do stvaranja i nestajanja nekih komponenti, te do njihovih promjena u odnosu na izvorno stanje. Događaju se i brojne reakcije kao esterifikacija, hidroliza, acetalizacija i povremeno piroliza. Reakcije tijekom prve destilacije su važne u određivanju karakteristika *brandy* i na njih utječu različiti čimbenici kao što je i sastav vina, veličina i stanje kotla, trajanje destilacije i temperatura unutar kotla. Ukoliko se vrši destilacija s talogom destilat će imati visoke razine masnih kiselina, estera srednjelančanih i dugolančanih masnih kiselina i dušikovih spojeva. Masne kiseline su poželjne jer se ponašaju kao „fiksatori“ za brojne druge aromatske spojeve. Aminokiseline i reducirajući šećeri mogu sudjelovati u Maillardovim reakcijama

koje daju složeni niz heterocikličkih spojeva u koje ubrajamo hlapljive spojeve okusa i smeđe melanoidine veće molekularne težine. (12)

Destilacijski uređaj korišten za proizvodnju *brandya* je *alambic* uređaj izrađen od bakra i bronce. Oblik, materijal uređaja, kapacitet i metode grijanja su faktori koji utječu na kvalitetu destilata i definirani su od 1936. g. Neki dijelovi kao što su ventil i kondenzator mogu biti izrađeni od nehrđajućeg čelika iako se smatra da je najbolji i najučinkovitiji materijal za izradu bakar. Dobar je vodič topline, te visoke temperature bakrenog kotla kataliziraju mnoge kemijske reakcije koje doprinose kvaliteti *brandya*, reaktivan je sa spojevima iz vina kao što su masne kiseline i spojevi sa sumporom i otporan je na koroziju. (23,25)



**Slika 5.** Uređaji za destilaciju: (A) Charentais alembic (francuski stil) i (B) uređaj s kolonama (njemački stil) (26)

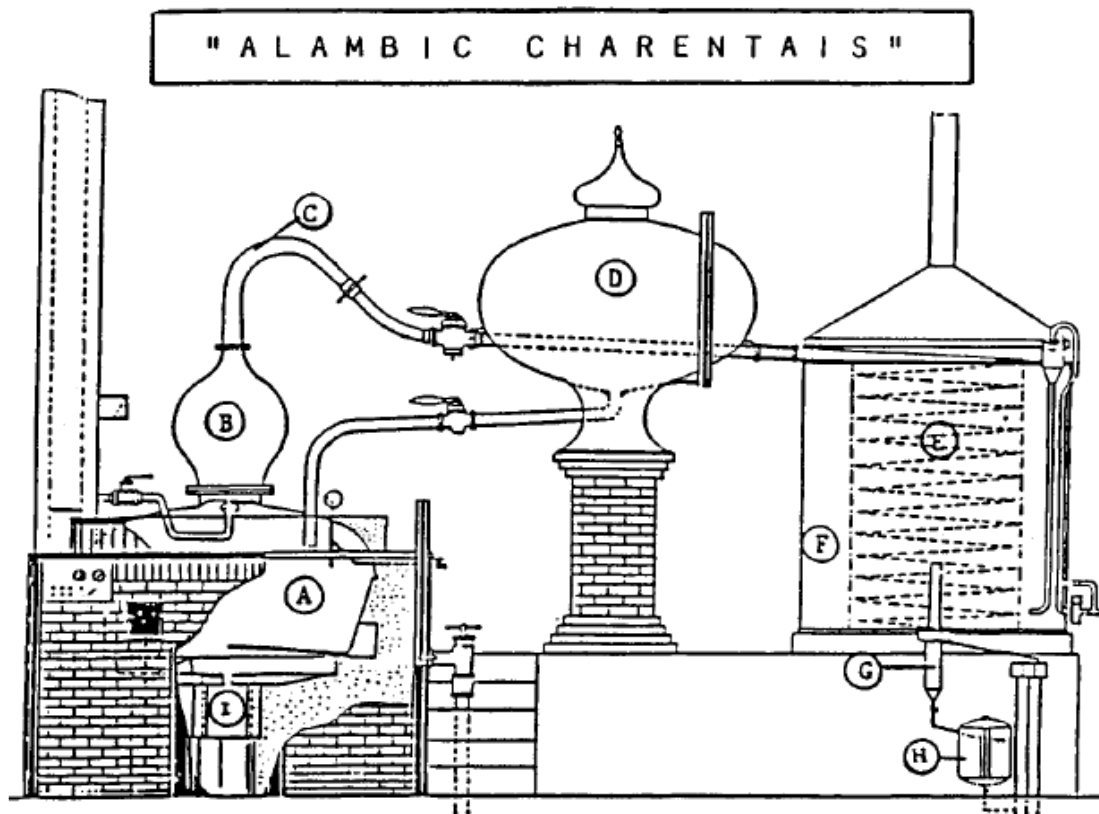
Najvažniji dijelovi tipičnog *alambic* uređaja prikazanog na slici 6. su: bakreni kotao, kapa, labuđi vrat, predgrijač, zavojnica, kondenzator, hidrometar, tank za prvi tok i grijač.

- **(A) Bakreni kotao** (*chaudiere*) je glavni dio *alambica*. Posebno je napravljen da izdrži direktan plamen i temperaturu oko 815 °C. Unutrašnjost je glatka i dobro polirana kako bi se olakšalo čišćenje i održavanje. Pomoćna oprema kotla uključuje cijev za punjenje, bočni prozor i otvor za odzračivanje, prskalicu za pranje kotla i ventil za pražnjenje.
- **(B) Kapa** (*chapeau, chapiteau*) se nalazi poviše kotla i ovisno o zahtjevima destilera iznosi od 10 do 12% kapaciteta kotla. Oblik i volumen kape imaju važan utjecaj, određuju odabir koncentracija i odvajanje različitih hlapljivih komponenti. Proces selekcije se događa kada se hlapljivi spojevi kondenziraju u kapi i vraćaju natrag u kotao. Tu se događa proces deflegmacije, a ovaj fenomen se naziva refluks.
- **(C) Labuđi vrat** (*col de eygne*) je cijev savinuta kao labuđi vrat i povezuje kapu s kondenzatorom odnosno ima ulogu usmjeravanja alkoholno vodene pare u spiralnu cijev kondenzatora. Visina i oblik cijevi imaju važnu ulogu u procesu vraćanja refluksa.
- **(D) Predgrijač** (*chaufee-vin*) se nalazi oko labuđeg vrata odnosno labuđi vrat prolazi kroz njega. Tijekom prvih sati destilacije predgrijač se puni za sljedeću seriju destilacije. Ovdje se vino podgrijava za iduću destilaciju usmjeravanjem vrućih para trenutne destilacije iz kotla preko labuđeg vrata u kondenzator. Kada je postignuta odgovarajuća temperatura vina, otvori se odvodna cijev predgrijača kako bi se izbjeglo nepoželjno pregrijavanje vina.
- **(E) Zavojnica** (*serpentin*) je završni dio destilacijskog uređaja također izrađena od bakra. Bakar reagira s komponentama destilata kao što su masne kiseline i sumpor i tijekom kondenzacije tvore se netopljivi spojevi. Kada dođu do otvora hidrometra filtracijom se uklanjaju iz destilata. Dvije su uloge zavojnice. Prva je kondenziranje alkoholno vodenih para, a druga hlađenje destilata na odgovarajuću temperaturu za proces filtracije. Promjer zavojnice je veći u početku kako bi se olakšala kondenzacija zatim se postupno smanjuje dok ne dođe do otvora hidrometra.
- **(F) Kondenzator** (*condenseur*) je cilindrični spremnik izrađen od bakra ili nehrđajućeg čelika, inoxa, koji sadrži bakrenu spiralnu cijev. Kapacitet mu je oko 5000 litara. Za vrijeme destilacije ispunjen je hladnom protočnom vodom. Hladna

voda ulazi na dnu, a topla voda, zagrijana tokom kondenzacije, izlazi na vrhu kondenzatora pomoću odvodne cijevi.

- **(G) Hidrometar** (*porte-alcoometar*) izrađen od bakra sa svrhom filtriranja destilata, praćenja temperature i sadržaja alkohola budućeg *brandy* predstavlja pristupnu točku destilatoru kako bi pratio odvijanje destilacije.
- **(H) Tank za prvi tok** (*cuvon de tetes*) je mali spremnik od nehrđajućeg čelika volumena oko 55 litara i služi za skupljanje prvog toka, „glave“ destilata.
- **(I) Grijač** (*bruleur*) je smješten ispod kotla i opremljen kontrolnom lampicom i pouzdanim sigurnosnim sustavom. Plinska upravljačka ploča se nalazi na prednjoj strani *alambica* za lakšu kontrolu plina. Korištena goriva su propan, butan i prirodni plin. Temperatura ispod kotla doseže od 760 do 870 °C. Tako visoka temperatura je potrebna za zagrijavanje i hlađenje vina radi stvaranja aroma tijekom destilacije. (27)

Zbog specifičnog oblika nalik na tikvicu *alambic* uređaj se dokazao kao jedan od najboljih uređaja tijekom koncentriranja i selekcije hlapljivih spojeva u procesu destilacije. (12)



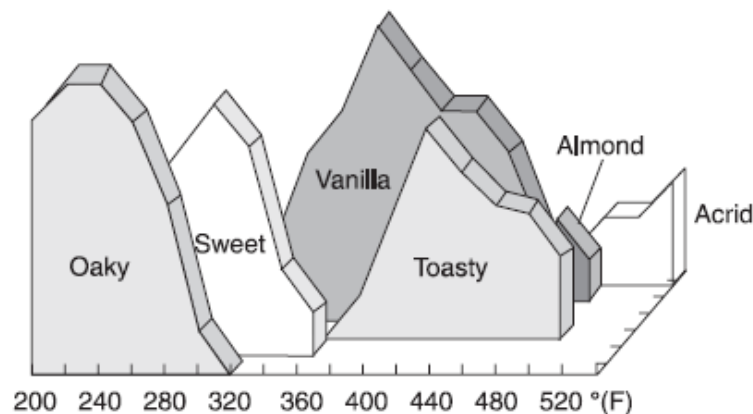
Slika 6. Shematski prikaz građe *alambic* destilacijskog uređaja (27)

### 1.2.6. DOZRIJEVANJE

Nakon destilacije destilat jačine 65 do 70% vol. alkohola je bistar, oštrog mirisa i okusa i nepotpuno aromatičan, te se podvrgava dozrijevanju odnosno starenju da bi se dobilo kvalitetno, aromatično piće. Sazrijevanje se događa u drvenim bačvama. Poznato je da drvo, odnosno otapanje drvenih komponenti, pridodaje vrijednosti kvalitete alkoholnih pića i smatra se da je starenje u drvenim bačvama od primarne važnosti za kvalitetu pića. Hrast se koristi za starenje alkoholnih pića od davnina. Kvalitete hrasta zbog kojih se koristi u procesu starenja su mehanička i radna svojstva kao što su trajnost, tvrdoća, savitljivost, propusnost, ali i spojevi koji se mogu ekstrahirati poput tanina i drugih aromatičnih spojeva. (28)

Svi hrastovi upotrijebljeni za proizvodnju bačvi su bijeli hrastovi pripadnici podskupine *Leucobalanus* ili *Lepidobalanu*, a u Europi se gotovo isključivo koriste dvije vrste; *Quercus rubur* (hrast lužnjak) i *Quercus petraea* (hrast kitnjak). Hrast kitnjak onemogućuje mnoge izmjene između vina, drva i vanjskog okoliša tijekom godina odležavanja, te nije pogodan za proizvodnju. Posebnost kod pravljenja bačvi je da su stabla sječena, ne pilana i dužice ovih bačvi se rade od stabala starih 40 do 50 godina. Središte i vanjski dio stabla nisu pogodni za uporabu, samo 20% debla je uporabljivo. Komadi koji se koriste za pravljenje dužica neko vrijeme ostaju izloženi na zraku kako bi drvo dozrjelo. Taj korak uklanja dio visoko astrigentnih tanina, oksidaciju fenola i tanina, degradaciju lignina i razvoj plijesni koja uzrokuje tamnu boju dužica. Nakon sušenja slijedi cijepanje daske na dužice te formiranje bačvi grijanjem i vlaženjem dužica kako bi se savile u točno određen oblik. Zadnji korak je paljenje bačvi. Razlikujemo tostiranje i pougljenjivanje bačvi ovisno o primijenjenoj temperaturi i vremenu trajanja paljenja. Ovim postupcima povećavamo količinu fenola, laktona, razgradnih spojeva lignina kao što je vanilin i ekstrakciju hemiceluloze. Tostiranje se uglavnom primjenjuje u proizvodnji *Cognaca*. Proces podrazumijeva nižu temperaturu tijekom dužeg perioda vremena. Tada se bačva polagano zagrijava na otvorenom plamenu, te toplina prodire duboko u drvo koje poprima tamnosmeđu boju. Pougljenjivanje traje dosta kraće uz primjenu više temperature. Toplina ne stigne prodrijeti duboko u drvo i površina bačve ostaje crna. Tijekom tostiranja fenoli mogu nestati isparavanjem ili mogu biti produkti priolize. Pougljene bačve većinom sadrže ugljik i produkte pirolize koji djelomično prelaze u destilat dajući mu okus dima koji je nepoželjan u prepoznatljivim razinama.

Visoka temperatura hrasta je povezana sa smanjenim hemicelulozama i povećanim derivatima furfurala. Jako visoka temperatura hrasta uzrokuje polimerizaciju furfurala s ligninom dajući fenol-aldehid netopljive smole. Glavna kiselina nastala sazrijevanjem je octena kiselina i značajna količina može nastati tijekom tostiranja, više tijekom pougljenjivanja. Analizi vanilina su znatno važni za aromu pića i mogu biti u količini iznad osjetilnog praga posebno u novo prženim bačvama s talogom. Tijekom paljenja bačvi dolazi do razgradnje šećera i nastanka maltol i 2-hidroksi-3-metil-ciklopentanon s potencijalno slatkim i karameliziranim mirisom. Na nastajanje spojeva tijekom paljenja bačvi važna je i temperatura kao što je prikazano na slici 7. Povećanje temperature utječe na razinu hlapljivih fenola u destilatu. Potpuna piroliza hemiceluloza se događa oko 220 do 300 °C, dok se celuloza depolimerizira i pirolizira oko 310 do 380 °C s oksidacijom krutog ostatka između 460 i 500 °C. Kondenzacija i cijepanje lanca lignina se događa između 220 i 250 °C, a aktivna piroliza aromatskih prstenova na oko 300 do 400 °C. Tijekom paljenja tanini koji se mogu ekstrahirati su drastično smanjeni. (6)



**Slika 7.** Utjecaj temperature paljenja bačvi na razvoj okusa (6)

Destilat se prvo puni u nove hrastove bačve, te kasnije prebacuje u stare. Važno je bačve ne puniti do vrha nego ostaviti prazan prostor od 5 do 10 litara zapremnine. Nakon što destilat dobije zlatno žutu boju i odgovarajuću količinu ligninskih i taninskih tvari prebacuje se u stare bačve gdje ostaje do kraja procesa odležavanja. Važno je mjesto čuvanja bačvi tijekom starenja. Najidealnije su zamračene, prozračne prostorije umjerene vlažnosti. (4,13)

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima *brandy* je piće koje je minimalno jednu godinu dozrijevalo u hrastovim spremnicima ili najmanje šest mjeseci u hrastovim

bačvama zapremnine manje od 1000 litara. Na vremenski period sazrijevanja utječe i kvaliteta destilata, veličina, podrijetlo i način paljenja bačvi kao i okolina u kojoj se odvija odležavanje. (29)

Promjene u okusu i mirisu destilata nastaju zbog promjena u sastavu i koncentraciji spojeva koji utječu na sami okus i miris. Te promjene mogu uzrokovati izravna ekstrakcija drvenih komponenti, razgradnja makromolekula drva i ekstrakcija produkata u destilat, reakcija između komponenti drva i sastojaka destilata, reakcije koje uključuju samo ekstrakte drva, reakcije koje uključuju samo komponente destilata i isparavanje hlapljivih spojeva. (29)

Tijekom starenja događa se oksidacija etanola u acetaldehid koji s alkoholima može stvarati acetale. Acetali daju destilatu mekan okus i ugodnu aromu. Kod estera se mijenja samo njihov odnos, a ne sadržaj. Tako će se povećati udio etil-acetata, a smanjiti udio estera viših alkohola. Dolazi do povećavanja kiselosti destilata što omogućava olakšanu hidrolizu hemiceluloze tijekom koje se izdvajaju šećeri koji osiguravaju željenu notu arome. (13)

Eugenol je spoj karakterističan za pića koja su odležavala u hrastovim bačvama i daje aromu klinčića. Aromatski aldehidi i furani nastali razgradnjom lignina i polisaharida spadaju među spojeve vezane za okus i aromu pića. Vanilin i drugi aromatski aldehidi nastali u procesu transesterifikacije hemiceluloze se smatraju važnima za „bouquet“ *brandyja*. Hlapljivi fenoli pridonose zadimljenom karakteru iako neki od ovih spojeva mogu potjecati iz drugih izvora osim drva. Reakcije u kojima sudjeluju komponente sirovog destilata i drva su oksidoredukcijske reakcije, esterifikacija, Maillardove reakcije i polimerizacija i polikondenzacija. (29)

Nehlapljivi polifenolni spojevi poput tanina i lignina mogu utjecati na aromu *brandyja* smanjenjem topljivosti hlapljivih spojeva. Tanini svojim otapanjem pridonose stvaranju željene smeđe boje pića. Masne kiseline i steroli dobiveni djelom iz hrastova drva mogu uzrokovati zamućenje ili taloženje. Postupno stečeni okus užeglosti je povezan s hidrolizom estera masnih kiselina i njihovom oksidacijom do ketona. (29)

Oksidacija i isparavanje hlapljivih spojeva imaju važnu ulogu u formiranju arome *brandyja*. Drvo je porozno i dopušta malim količinama kisika da lagano difundiraju u destilat gdje sudjeluje u reakcijama sazrijevanja između kemijskih komponenti. Tvari



ekstrahirane iz drva, poput laktona, derivata vanilina i fenola, furanske komponente, su u korelaciji s različitim mirisnim atributima poput dima, vanilije, tostiranog i sušenog voća koji pozitivno utječu na kvalitetu *brandy*. (10)

Na razinu ekstrakcije i prirodu ekstrahiranih spojeva utječe i status bačve (nova ili prethodno korištena), botaničko podrijetlo drva, struktura. Glavni ekstrahirani spojevi su derivati lignina (vanilin), laktoni (uglavnom metil-oktalakton), furanski derivati (furfural) koji daju drvenaste, začinske note karakteristične za alkoholna pića odležavana u drvenim bačvama. Tijekom starenja sadržaj etanola se smanjuje isparavanjem i povećava se koncentracija tvari manje hlapljivih od etanola poput viših alkohola. Transesterifikacijom se sadržaj viših alkoholnih estera, nastalih tijekom fermentacije, smanjuje kao i utjecaj istih, dok aromatska snaga pića raste. Reakcijom između spojeva destilata i drva, odnosno etanola i spojeva ekstrahiranih iz drva, nastaju esteri (etil-vanilat, etil-siringat) i eteri (vanilin-etil-eter). (23)



**Slika 8.** Hrastove bačve (30)



### 1.2.7. FINALIZACIJA

Zadnji korak u proizvodnji *brandya* je njegova finalizacija. Finalizaciju čine procesi miješanja odležanih destilata različite starosti, korištenje aromatske vode, šećernog sirupa, šećerne boje odnosno karamela i drugih ekstraktnih tvari. (4)

Nakon odležavanja *brandy* se pumpa iz bačvi u tankove i hladno stabilizira kako bi se istaložile nestabilne otopljene tvari poput spojeva s kalcijem i željezom. Poslije filtracije okus *brandya* je i dalje poprilično oštar, ali se ocjenjuje i razvrstava prema punoći, uravnoteženosti, mekoći i intenzitetu okusa. Kada su sve komponente iskombinirane prema recepturi dodaje se čista destilirana voda kako bi se prilagodila alkoholna jakost od 40 do 45% vol. (12)

Šećer se dodaje u jako malim količinama tako da mu koncentracija iznosi oko 1,5 g/L. Okus šećera se ne osjeti u piću, ali pospješuje zaokruživanje pića. Preporučuje se koristiti šećer iz šećerne repe pošto je neutralnijeg okusa od šećera iz šećerne trske. Karamel se koristi u korigiranju boje, obično se dodaje bljeđim *brandyma* kako bi se postigla željena tamna boja. (12)

Ekstrakti voća posebno suhih šljiva osiguravaju glatkoću i mogu se dodati u svrhu popravljjanja okusa *brandya*. Tako korišteni ekstrakti se nazivaju bonifikatori i u nekim zemljama to mogu biti biljni ekstrakti od osušenih cvjetova, ekstrakt badema, muškarnog oraha, suhog grožđa i drugi. (4,12)

Miješanje različitih destilata se smatra korisnim za ujednačenje kvalitete *brandya*. U nekim slučajevima, miješanje je dopušteno pod specifičnim uvjetima. Svrha miješanja je održavanje preciznog standarda okusa i kvalitete od serije do serije. Glavna osoba zadužena za ovaj proces je tzv. „Master Blender“. Ta osoba mora imati veliko znanje stečeno tijekom dugogodišnjeg rada s profesionalcima. Njegov zadatak je osiguravanje ustaljene kvalitete i karakterističnog stila u konačnom proizvodu. (23)

### 1.3. KEMIJSKI SASTAV *BRANDYA*

Pravilnim odabirom sirovine odnosno grožđa dobrih svojstava, njegovom berbom i preradom, dobrim provođenjem alkoholne fermentacije, pravilnim vođenjem destilacije i kvalitetnim odležavanjem nastaje finalni proizvod visoke kvalitete, vrhunskog kemijskog sastava i senzorskih svojstava. Tijekom svakog koraka u proizvodnji *brandy*a nastaju arome odgovorne za konačan okus i miris proizvoda, te tako imamo komponente primarne, sekundarne, tercijarne i kvarterne arome. Komponente primarne arome su spojevi prirodno prisutni u grožđu, a fermentacijom grožđa dobivamo vino bogato spojevima sekundarne arome. Procesom destilacije nastaju spojevi tercijarne arome, odležavanjem destilat se obogaćuje spojevima kvarterne arome nastalih sazrijevanjem destilata. (31)

Budući da je *brandy* proizvod destilacije ne sadrži organske i anorganske spojeve vina koji se ne mogu destilirati. Uz vodu i etanol kao glavne i najzastupljenije komponente sadrži i druge hlapljive komponente poput metanola, viših alkohola, hlapljivih estera, hlapljivih kiselina i aldehida koji utječu na kvalitetu i aromu. (10)

#### ALKOHOLI

Nakon vode najzastupljeniji sastojak *brandy*a je **etilni alkohol (etanol)**. Nastaje iz šećera procesom alkoholne fermentacije u vinu. Na završetku fermentacije može ga se nakupiti do 14% vol./vol.. Destilacijom se taj sadržaj povećava na oko 70% vol./vol., a nakon dodatka destilirane vode smanjuje na oko 40% vol./vol.. Nastajanje i količina nastalog etanola ovisi o sadržaju šećera u sirovini, vrsti korištenog kvasca, temperaturi provođenja fermentacije, prisutnosti zraka i mnogim drugim faktorima. Temperatura vrelišta etanola je 78,3 °C, a vode 100 °C tako će se etanol destilirati na početku destilacije u najvećoj koncentraciji a potom će mu koncentracija ravnomjerno opadati s napretkom destilacije. (10)

**Metanol** je alkohol koji nije nusprodukt alkoholne fermentacije već se tijekom vrenja intenzivno oslobađa. Nastaje enzimskom hidrolizom metoksilnih skupina pektina tijekom fermentacije. (10) Karakterističan je za voćne rakije, znatno više nego za rakije od grožđa i dokaz je prirodnog podrijetla voćnih rakija budući da je pektin prirodni

sastojak voća. Koncentracija mu ovisi o načinu prerade sirovine, provođenju destilacije, ali i o vrsti i sorti voća. (24) Ribéreau-Gayon i sur. (2000.) smatraju da metanol s pragom od 1200 mg/L daje miris kuhanog kupusa, Claus i Berglund (2005.) smatraju da metanol daje pozitivnu aromu alkoholnim pićima. (32,33) Ipak većina istraživača se složila da su okus i fizička svojstva metanola slična etanolu te ne utječu na organoleptičku kvalitetu pića, ali je zbog toksičnosti njegova koncentracija u alkoholnim pićima zakonski propisana. Nakon gutanja, metanol oksidira u formaldehid i mravlju kiselinu koji su toksični za središnji živčani sustav. Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima najveća dopuštena koncentracija metanola u destilatima od vina iznosi 2 g/L a.a. U vinu je prisutan u manjim koncentracijama od 40 do 60 mg/L, a u destilatima se kreće od 0,3 do 0,7 g/L a.a. Odležavanjem u bačvama se reducira. (10)

**Viši ili fuzelni alkoholi** su fermentacijski alkoholi s više od dva ugljikova atoma. Nazivaju se fuzelna ulja, iako nisu ulja, zbog stvaranja uljnih mrlja u piću s niskim udjelom alkohola. Topljivi su u alkoholu i djelomično topljivi u vodi, te zbog toga tijekom destiliranja tekućine niske koncentracije alkohola, kao što je vino, destilat će se kad je para bogata alkoholom (prva frakcija destilata) bez obzira na visoku točku vrelišta. Tvore ih kvasci tijekom alkoholne fermentacije, izravno iz šećera ili aminokiselina grožđa putem Ehrlichove reakcije. Količinski su najveća skupina hlapljivih spojeva arome u destilatima i najvažniji viši alkoholi su ravnolančani propan-1-ol, izoamilni alkoholi (2-metilbutan-1-ol i 3-metilbutan-1-ol), izobutilni alkoholi (2-metilpropan-1-ol) i aromatski 2-feniletanol. Ostali viši alkoholi poput heksan-1-ola, butan-1-ola, butan-2-ola, pentan-1-ola čine manje od 5% ukupne količine viših alkohola. (10,24) Čimbenici koji utječu na razinu viših alkohola su sastav sirovine, temperatura fermentacije, soj kvasaca, prozračivanje i suspendirane tvari. (25) Način destilacije i frakcioniranje destilata također utječu na koncentraciju viših alkohola u destilatu. (34) Prekomjerne koncentracije rezultiraju jakim opornim mirisom i okusom, te mogu dati neugodne arome koje uništavaju aromatsku finesu. U optimalnim koncentracijama daju voćni karakter i doprinose aromatskoj složenosti. (35) Prema Tsakirisu i sur. (2013.) u destilatima dostižu od 2,5 do 5,0 g/L a.a., dok prema Léautéu (1990.) iznose 1014 do 1750 mg/L što je blizu rezultatu istraživanja Dhiman i Attru (2011.) koji iznosi 1544 mg/L. (6,10,27) Biljni miris *brandyja* daju karbonilni spojevi sa šest atoma ugljika dobiveni iz grožđa. Nezrelo grožđe i kontinuirana preša oslobađaju spojeve poput heksanola i heksenola koji daju biljne

okuse. (10) Globalno viši alkoholi su poželjni u destilatu jer tijekom sazrijevanja dolazi do sinteze raznih estera koji imaju pozitivan učinak na aromu *brandy*. (18)

## ESTERI

Jedna od najvažnijih skupina aromatskih spojeva u destilatima su esteri. Sintetiziraju se tijekom fermentacije putem metabolizma kvasaca i povezani su s ugodnom, cvjetnom i voćnom aromom. (24) Etil-acetat i etil-laktat su najzastupljeniji esteri u destilatima. Uz njih ostali esteri koji pridonose aromi su etil 2-metilbutanoat, etil-oktanoat, etil-heksanoat, etil-sukcinat, 3-metilbutil-etanoat, izobutil-acetat, heksil-acetat i 2-fenetil acetat. Njihove količine i međusobni omjeri imaju značajnu ulogu u percepciji okusa pića budući da su njihove koncentracije obično iznad vrijednosti senzorskog praga. (35) Većinom svi esteri su niskog vrelišta i dobro topivi u alkoholu, te se destiliraju na početku, stoga frakcioniranje prvog toka treba voditi oprezno da ne bi imali visoke koncentracije estera. Isto tako treći tok se ne smije prerano rezati da se ne uklone poželjni esteri. Destiliranjem vina s talogom od kvasaca količina mirisnih estera se može značajno povećati i tako poboljša cvjetni, voćni buket *brandy*. Dolazi do većeg stvaranja estera masnih kiselina poput etil-oktanoata (voćni, cvjetni, ananas, kruška, jabuka miris), etil-dekanoata (kruška, vino, voćni miris), etil-laurata, te aromatska sinergija između tih estera pojačava njihov mirisni učinak. (10,23) Prisustvo malolaktične fermentacije može utjecati na sastav estera. Tako dolazi do povećavanja etil-laktata i dietil-sukcinata i smanjenja etil-acetata, izoamil-acetata, etil-heksanoata i 2-fenetil-acetata. (18) Tijekom starenja se povećava udio estera zbog spore esterifikacije različitih organskih kiselina etanolom. Ali kako *brandy* sazrijeva esteri gube utjecaj na okus i aromu zbog povećane topljivosti u etanolu razvodnjenom s ekstrahiranim spojevima iz drva. Tsakiris i sur. u svom istraživanju navode da destilati sadrže hlapljivih estera u rasponu od 400 do 800 mg/L. (10)

**Etil-acetat** je najvažniji ester u destiliranim alkoholnim pićima i nastaje esterifikacijom octene kiseline i etanola tijekom fermentacije ili destilacije. (34) U malim koncentracijama osigurava ugodnu aromu i voćni karakter destilata, dok u većim daje oštar miris i miris ljepila. Kao pokazatelj kvalitete alkoholnih pića koristi se omjer ukupnih estera i etil-acetata. Što je omjer veći tako je i bolja kvaliteta finalnog proizvoda. Njegovo vrelište je na 77,1 °C te se uglavnom destilira u srednjoj frakciji odnosno glavnoj. Zapažena je veća količina etila-acetata u destilatima proizvedenim u *alambic*

kotlovima nego u destilatima nastalih u destilacijskom koloni. (24) Destilati i *brandy* obično imaju sadržaj etila-acetata od 0,4 do 0,8 g/L a.a. (10)

**Etil-laktat** ima negativan učinak na kvalitetu *brandy*a. Njegova koncentracija može biti povećana ukoliko je vino za destilaciju prošlo malolaktičnu fermentaciju. Većinom se nalazi u zadnjem toku destilacije i prag osjetljivosti mu je 250 mg/L. Destilatima daje neugodan miris užeglog maslaca i maslačne note. U koncentracijama do 154 mg/L je povoljan jer stabilizira miris i uglađuje čvrst karakter drugih spojeva. Često je popraćen dietil-sukcinatom koji se smatra nepoželjnim zbog karaktera poput fuzela i kamfora, te se može ukloniti odvajanjem zadnjeg toka. (14,18) Prema Léautéu (1990.) je poželjan u koncentracijama od 27,1 do 73,6 mg/L. (27)

Esteri octene kiseline i viših alkohola poput izoamil-acetata, izobutil-acetata i 2-fenetil-acetata su zaslužni za voćnu i cvjetnu aromu destilata. Izoamil-acetat koji ima karakterističan miris banane i izobutil-acetat koji se povezuje s okusom i mirisom maline. Prisutni su u značajnijoj količini u svim voćnim destilatima. Njihovom nastanku pogoduju niske temperature fermentacije kao i odsutnost kisika tijekom fermentacije. (10,24)

Etilni esteri masnih kiselina srednjeg lanca doprinose cvjetnim i voćnim aromama destilata i nastaju tijekom fermentacije. Najzastupljeniji je etil-heksanoat, poznat kao i etil-kaproat. Etil-kaproat ima aromu voća poput zelene jabuke, banane te je zbog toga poželjan. Etil-oktanoat, poznat kao i etil-kaprilat, je manje mirisan i oštar, a etil-dekanoat, poznat kao etil-kaprat, manje intenzivan i pridonosi masne tonove destilatu. Esteri masnih kiselina dugog lanca pridonose voštane note ukoliko su prisutni u većoj koncentraciji. Ali zbog slabe topivosti u vodi, povećana koncentracija može uzrokovati zamućenje i flokulacije. (24)

## ALDEHIDI

Aldehidi nastaju oksidacijom etanola pod utjecajem visokih temperatura tijekom destilacije uz bakar kao katalizator. Uglavnom su nositelji negativnih aroma i imaju nizak senzorni prag. Aromatični aldehidi doprinose drvenastom okusu. (9) Reakcijom etanola i aldehida nastaju acetali koji su ugodnog mirisa i smanjuju oštar miris alkohola i aldehida. Glavni karbonilni spoj u destilatima je **acetaldehid (etanal)** i čini 90% ukupne koncentracije aldehida. Sintetizira se kao nusprodukt u ranim počecima fermentacije,

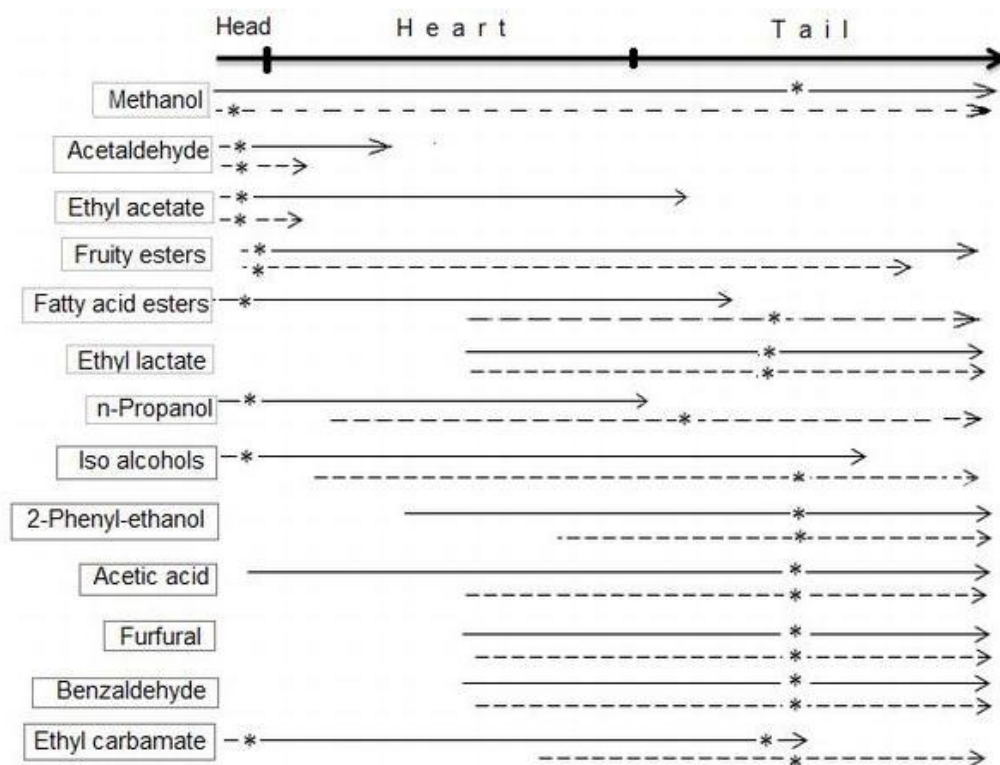
kasnije nastaje oksidacijom etanola pomoću bakterija octene kiseline u prisutnosti kisika. Zbog toga je važno destilaciju provesti što prije nakon završene alkoholne fermentacije. Zbog niskog vrelišta najveća koncentracija se destilira u glavnom toku. Topiv je i u vodi i etanolu. Veće količine mogu biti povezane s uporabom SO<sub>2</sub> tijekom proizvodnje osnovnog vina. Potencijalno je toksičan u većim koncentracijama i u alkoholnim pićima je povezan s mučninom i povraćanjem. Na sadržaj acetaldehida utječe soj kvasca, provođenje fermentacije i način rezanja kod destilacije. Kad je prisutan u većoj koncentraciji negativno utječe na senzorska svojstva zbog oštrog, iritirajućeg mirisa. U niskim koncentracijama je poželjan i podsjeća na trešnje, lješnjake i prezrele jabuke. U vinima i destilatima od vina je pronađen u koncentracijama od 0,20 do 0,25 g/L a.a.. (10,24) Prema Dhiman i Attri (2011.) nalazi se do 60,8 mg/L, dok je prema Léautéu (1990.) između 41,3 i 56,2 mg/L. (6,27) Ostali aldehidi bitni za aromu su izobutiraldehid, butan-2,3-dion (diacetil), propen-2-al (akrolein), 3-hidroksibutan-2-on (acetoin). Acetaldehid i ostali kratkolančani alifatski aldehidi poput propanala, butanala, pentanala, 2-metilbutan-1-ala, 3-metilbutan-1-ala imaju oštar, mastan i užegao miris. Aldehidi do osam ugljikovih atoma (acetaldehid, formaldehid, benzaldehid i furfural) imaju nepoželjne, prodorne mirise. (24)

Furfural je aldehid nastao dehidracijom neprevrelih šećera, odnosno zaostalih pentoza, tijekom destilacije što je uzrokovano zagrijavanjem sirovine u kiselim uvjetima. Također može nastati oksidacijom askorbinske kiseline. Normalni je sastojak voćnih destilata i može se koristiti kao pokazatelj prirodnosti destilata. Daje miris gorkog badema, a povećane koncentracije nisu poželjne i mogu dati ljutinu alkoholnim pićima. Topiv je u vodi i zbog toga se uglavnom destilira u zadnjoj frakciji. Na njegov sadržaj utječe način destilacije. Dužom destilacijom nastaju veće količine. Također dvostrukom destilacijom povećavaju se količine svih furanskih vrsta. Tako će *Cognac* imati više derivata furana od *Armangaca*. Derivati furfurala i sam furfural mogu dolaziti iz bačvi ili iz dodatka karamela. (10,24)

## KISELINE

**Octena kiselina** je glavni predstavnik hlapljivih kiselina i najzastupljeniji. Čini 90% ukupnih kiselina. Ona je nusprodukt alkoholne fermentacije. Nepravilnom fermentacijom dolazi do oksidacije etanola bakterijskim djelovanjem i nastaje octena kiselina. Može nastati oksidacijom acetaldehida. Njezin sadržaj u alkoholnim pićima

ovisi o soju primijenjenog kvasca. Koncentracija joj raste odležavanjem, odnosno starenjem i može biti ekstrahirana iz hemiceluloze drveta. Kako joj i ime kaže ima miris poput octa, kiselkast i oštar. Niska koncentracija octene kiseline je poželjna jer niska ukupna kiselost pića je indikator dobre kvalitete. Uglavnom je prisutna u zadnjoj frakciji destilacije. Prema Tsakirisu i sur. (2013.) koncentracija octene kiseline je od 0,2 do 1,0 g/L a.a., dok je Spaho (2017.) navela da u destilatima proizvedenih dvostrukom destilacijom ta koncentracija iznosi 0,36 g/L a.a.. (10,24) Druge hlapljive kiseline su prisutne u znatno manjim količinama. To su ostale karboksilne ili masne kiseline poput propionske, maslačne, mravlje kiseline. Imaju važnu ulogu u senzorskoj kvaliteti pića jer su prekursori hlapljivi spojeva. Maslačna kiselina pridonosi neugodnoj aromi maslaca i sira, a koncentracija joj raste starenjem. Više masne kiseline koje sadrže od 6 do 18 atoma ugljika nastaju radom kvasaca. Slobodne masne kiseline su prisutne u destilatima, ali u dosta nižoj koncentraciji zbog esterifikacije. Tako *Cognac* sadrži približno 50 mg/L a.a. Najzastupljenije slobodne masne kiseline su kaprilna, kaprinska i laurinska. (35)



**Slika 9.** Raspodjela glavnih hlapljivih spojeva korištenjem različitih destilacijskih uređaja (puna crta *alambic* uređaj, isprekidana crta destilacija u koloni, \* rez gdje se nakuplja viša komponenta) (24)

## **1.4. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA**

Cilj korištenja određenih metoda izolacije je izolirati spojeve odgovorne za okus i aromu proizvoda u izvornom obliku. Danas postoje brojne metode za koncentriranje i/ili ekstrahiranje hlapljivih spojeva, no kod svake postoji problem potencijalnog uništenja komponenti arome i/ili stvaranje artefakata arome. Upravo zbog toga je važno da uvjeti izolacije budu što blaži da se izolira izvorna aroma s minimalnim gubitcima i izbjegne nepoželjna oksidacija, pH promjena, termička degradacija i ostale kemijske i biokemijske promjene. Važno je poznavanje uzorka i hlapljivih spojeva koji se mogu očekivati, osobito ako imaju značajan utjecaj na aromu, da bi se mogla odabrati optimalna metoda izolacije. Općenito je koncentracija hlapljivih spojeva u hrani niska, pa se često koristi više metoda izolacije u svrhu dobivanja cjelovitog profila aroma. Laboratorijske metode izolacije se mogu podijeliti na destilacijske metode, metode ekstrakcije otapalima, sorpcijske tehnike i tehnike „vršnih para“. (36,37)

### **1.4.1. EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE**

Ekstrakcija je jedna od jednostavnijih i učinkovitijih metoda korištena za pročišćavanje i izolaciju željene tvari iz otopine, emulzije, suspenzije ili krute smjese pomoću otapala. Odabir otapala ima važnu ulogu bilo da se radi o ekstrakciji iz čvrste faze ili tekuće faze. Otapalo mora biti kemijski inertno prema tvarima u uzorku i niskog vrelišta kako bi ga se što lakše uklonilo nakon ekstrakcije. U obzir treba uzeti topljivost tvari koju ekstrahiramo u otapalu, te da razlika gustoća otapala i otopine iz koje ekstrahiramo bude što veća. U organskom laboratoriju kao otapala se najčešće koriste dietil-eter, petroleter, diklormetan, kloroform, etanol i drugi. (37,38)

Princip ekstrakcije tekuće-tekuće se temelji na različitoj topljivosti tvari koja se želi izolirati iz otopine i primjesa koje je prate, u dva otapala koja se ne miješaju. Procesom difuzije dolazi do razdjeljivanja tvari između dva otapala. Uglavnom su to vodena otopina tvari i organsko otapalo koje se ne miješa s vodom. Najjednostavnija izvedba ove ekstrakcije je u lijevku za odijeljivanje (diskontinuirano). Ekstrakcija se može provesti kontinuirano u komercijalno dostupnim ekstraktorima čija se izvedba razlikuje ovisno o tome je li korišteno otapalo lakše ili teže od vode. Izmućkivanjem



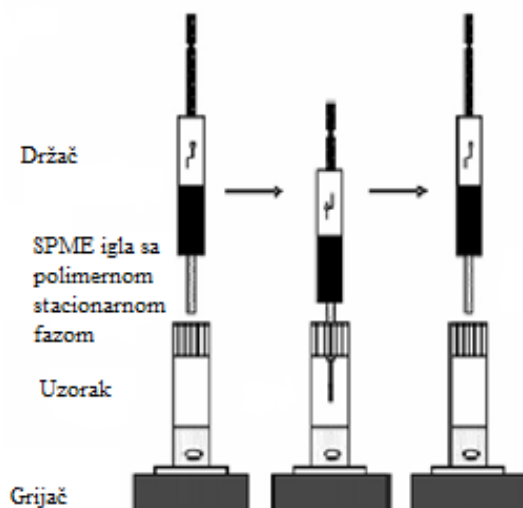
otopine s otapalom, s kojim se ona ne miješa, nastaje velika dodirna površina između dvije faze koja poboljšava uspješnost ekstrakcije. Učinak je bolji ukoliko se postupak provede više puta s manjom količinom otapala, nego jedanput upotrebom cijele količine otapala. Prilikom ekstrakcije organskih tvari iz vodene otopine dogodi se otapanje određene količine vode u organskom otapalu, a dio se i emulgira. Uklanjanje vode iz ekstrakta se provodi dodatkom sredstva za sušenje koja ne smiju biti topljiva u organskom otapalu niti reagirati s otapalom i otopljenom tvari. Najčešće su to natrijev sulfat, bezvodni kalcijev klorid, magnezijev sulfat i drugi. Prednosti ove ekstrakcije su jednostavnost izvedbe i dobra ekstrakcija aromatičnih spojeva, ali zbog mana kao što su nastajanje emulzija, gubitka najisparljivijih spojeva tijekom uklanjanja otapala, potrebe za velikim količinama uzorka da bi se dobio koncentrirani ekstrakt, sve se više zamjenjuje raznim suvremenim tehnikama izolacije poput mikrovalne ekstrakcije, ultrazvučne ekstrakcije, mikroekstrakcije na krutoj fazi. (37,38)

#### 1.4.2. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

Početakom 1990-ih Pawliszyn i sur. su otkrili jednostavnu, brzu i učinkovitu metodu ekstrakcije spojeva iz plinovitih, tekućih i čvrstih uzoraka. To je mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) koja spada u soprcijske tehnike i uspješno se koristi za ekstrakciju hlapljivih i poluhlapljivih spojeva. (39) Često se koristi u kombinaciji sa spregnutim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Prednost i jednostavnost ove tehnike je integriranje koraka ekstrakcije, koncentriranja i prijenosa do plinskog kromatografa u jedan korak. (40) HS-SPME se sastoji od dva koraka. Prvi je raspodjela spojeva između matrice uzorka i faze ekstrakcije, a drugi desorpcija koncentriranih ekstrakata u analitički instrument. (39) Aparatura je jednostavna i izgleda kao modificirana šprica i sastoji se od nosača, igle i SPME vlakna kao što je prikazano na slici 10. SPME je tanko optičko vlakno, obavijeno tankim polimernim filmom čija je uloga adsorpcija i koncentriranje organskih spojeva. Vrsta vlakna utječe na selektivnost ekstrakcije, te se za izolaciju polarnih spojeva koriste polarna vlakna, a za nepolarne spojeve nepolarno vlakno. Uz vrstu vlakna na količinu ekstrahiranih spojeva utječe i vrijeme ekstrakcije i zasićenost

uzorka hlapljivim spojevima. Prije korištenja vlakno je potrebno kondicionirati stavljanjem na visoku temperaturu u vremenskom rasponu od 0,5 do 4 sata. (41)

Prednosti ove metode ekstrakcije su jednostavnost i brzina izvedbe, nema korištenja otapala, ponovljivost, visoka osjetljivost, stabilnost vlakana, zahtijeva mali volumen uzorka. Nedostatak je ovisnost količine hlapljivih spojeva o vrsti, debljini i dužini vlakana kao i o vremenu uzorkovanja i temperaturi. (42)



**Slika 10.** Prikaz uređaja za HS-SPME (43)

## 1.5. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

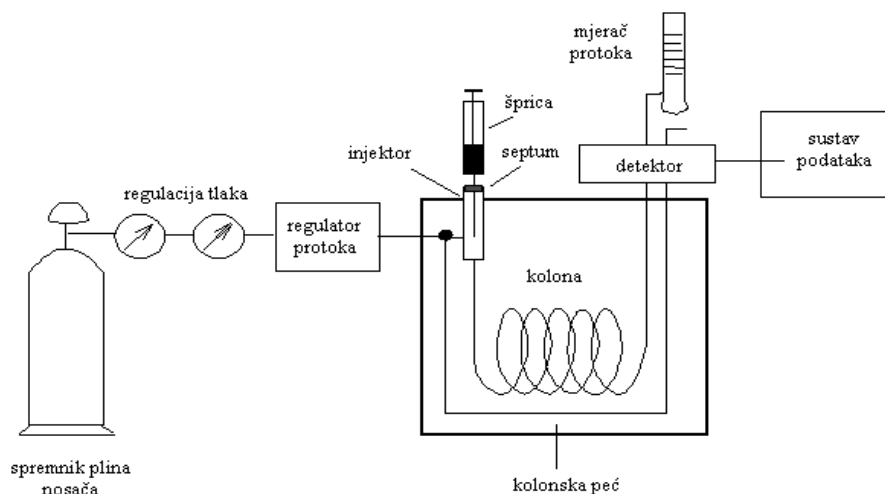
Nakon izolacije hlapljivih spojeva provodi se analiza i identifikacija hlapljivih spojeva uporabom kromatografskih (plinska i tekućinska) i spektrometrijskih tehnika. Najčešće se koristi vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

### 1.5.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je zajednički naziv za sve tehnike temeljene na adsorpciji i/ili raspodjeli spojeva koje treba odvojiti između pokretne, odnosno mobilne i stacionarne faze. Razdvajanje je rezultat različite jakosti adsorpcije različitih dijelova molekule između dvije faze. Kromatografske metode se dijele na plošnu kromatografiju i

kromatografiju na stupcu. Razlika je što je kod plošne kromatografije stacionarna faza nanescna na ravnu plohu ili u porama papira, dok je kod kromatografije na stupcu stacionarna faza unutar uske cijevi gdje pod utjecajem tlaka ili gravitacije prolazi mobilna faza. Dalje se plošna kromatografija dijeli na tankoslojnu, papirnu i elektromatografiju. Kromatografija na stupcu se dijeli ovisno o agregatnom stanju mobilne i stacionarne faze. Tako imamo plinsku kromatografiju gdje je mobilna faza u plinovitom stanju i tekućinsku, gdje je mobilna faza u tekućem stanju. Stacionarne faze su većinom u krutom stanju (organske ili anorganske) ili tekućem. (44)

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešće korištena metoda za odjeljivanje hlapljivih komponenti. Prednost joj je visoka osjetljivost koja omogućava odjeljivanje vrlo malih koncentracija smjese. (44) Međutim postoje ograničenja koja se tiču vrsta spojeva prikladnih za GC analizu. Spojevi moraju imati primjetan tlak pare na temperaturama ispod 350 do 400 °C, te moraju lako ispariti bez raspadanja ili reagiranja s komponentama stacionarne i mobilne faze. (45) Izvodi se u plinskom kromatografu koji se sastoji od šest osnovnih dijelova: rezervoar s plinom nosačem, regulator protoka i tlaka, injekcijski blok, kromatografska kolona, detektor i računalo. Uzorak za analizu mora biti hlapljiv i stabilan na temperaturi zagrijavanja. Plin nosač mora biti velik čistoće (99,995% ili više) jer nečistoće mogu utjecati na kvalitetu analize i uzrokovati uništenje stacionarne faze. Korišteni plin mora biti inertan i ne smije stupati u kemijske reakcije s komponentama uzorka. Najčešće je to helij (He), dušik (N<sub>2</sub>), argon (Ar) i vodik (H). Kromatografske kolone sadrže stacionarnu fazu i mjesto su gdje se događa proces razdvajanja. Mogu biti punjene i kapilarne kolone različitih dimenzija. Detektori se mogu klasificirati kao detektori osjetljivi na masu ili koncentraciju, a najčešći su plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID), plamenofotometrijski (engl. *Flame Photometric Detector*, FPD), fotoionizacijski (engl. *Photo-ionization Detector*, PID), detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, FPD) i detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD). (46)

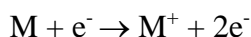


**Slika 11.** Shematski prikaz plinskog kromatografa (47)

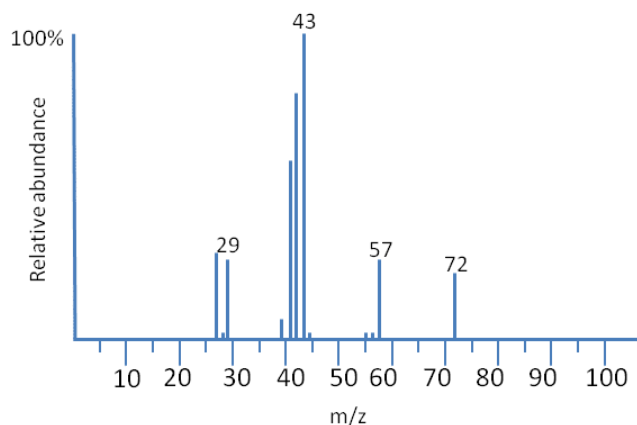
Proces započinje automatskim ili ručnim ubacivanjem male količine uzorka u injektor. Injektor se zagrijava i temperatura mu mora biti iznad temperature vrelišta najmanje hlapljive komponente. Upravo zbog toga uneseni uzorak brzo i potpuno ispari. Plin nositelj nosi dalje pare uzorka kroz kolonu u kojoj se nalazi stacionarna faza gdje se događa odjeljivanje komponenti smjese. Na izlazu iz kolone plin nositelj i analit odlaze na detekciju preko detektora. Detektor reagira na određena fizikalno-kemijska svojstva i stvara elektronički signal kojeg računalo prihvaća, te nastaje kromatogram- grafički prikaz ovisnosti intenziteta signala o retencijskom vremenu. Retencijsko vrijeme ili vrijeme zadržavanja je vrijeme proteklo od ubrizgavanja uzorka do izlaska iz kolone. (48)

### 1.5.2. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa (engl. *Mass spectrometry*, MS) je instrumentalna analitička tehnika kojom se može odrediti relativna molekulska masa spoja, identitet nepoznatog spoja i u dosta slučajeva kemijska struktura spoja. Provodi se u spektrometru masa. Glavni dijelovi spektrometra masa su ionizator, analizator i detektor. Postupak se izvodi u dva koraka. Prvi korak je ionizacija uzorka gdje primjenom visokoenergetskih elektrona dolazi do nastajanja pozitivnog iona  $M^+$  koji se fragmentira na manje ione prema formuli:



Tako nastaju razni fragmenti, te je analizom moguće odrediti kemijsku strukturu i molekulsku masu spoja što čini drugi korak, odnosno razdvajanje i određivanje iona. Nastali ioni se ubrzavaju u analizator mase koji ih razdvaja prema omjeru mase i naboja,  $m/z$ . Djelovanjem magnetnog ili električnog polja dolazi do boljeg odvajanja iona. Prolaskom kroz magnetno polje ioni su otklonjeni razmjerno njihovoj masi, naboju i brzini. Fragmenti manje mase su više otklonjeni, a fragmenti veće mase manje. Za električno polje često se koristi kvadrupolni analizator masa gdje četiri štapića stvaraju oscilirajuće električno polje. Tu samo ioni određenog omjera mase i naboja rezoniraju s kvadrupolnom frekvencijom. (44) Ioni određene vrijednosti omjera  $m/z$  se skupljaju i pretvaraju u električni signal pomoću ionskog pretvarača. Potom sustav za obradu podataka obrađuje rezultate kako bi proizveo spektar masa koji prikazuje odnos intenziteta i omjera mase te naboja ( $m/z$ ) nastalih fragmenata. (49)

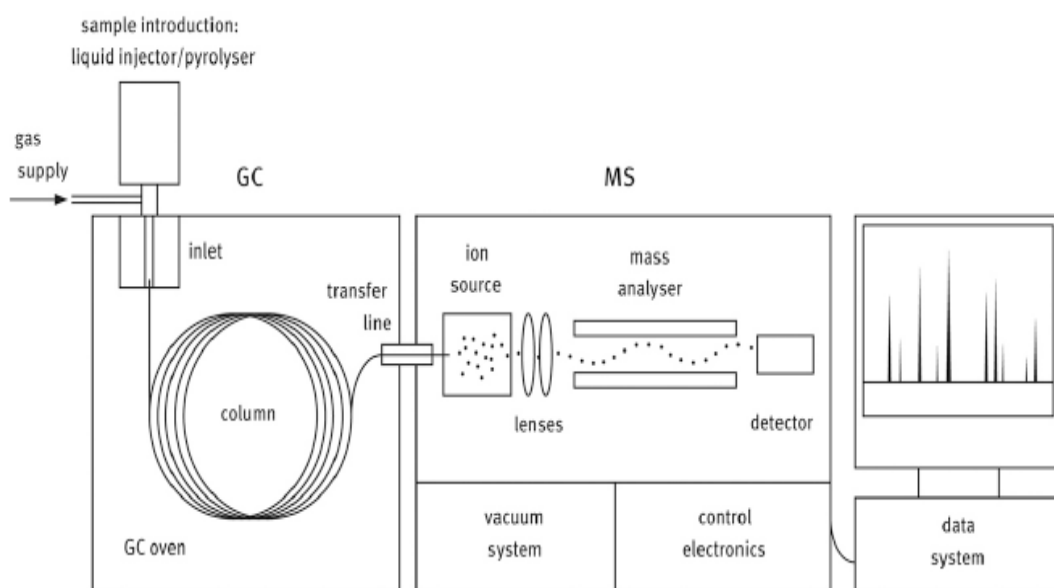


**Slika 12.** Spektar masa (50)

### **1.5.3. SPREGNUTA TEHNIKA PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)**

Iako specifičnosti same plinske kromatografije i spektrometrije masa nisu velike, kombinacija tih dviju metoda dovodi do velikog povećavanja specifičnosti. Od 1957. godine otkad je prvi put postignut, GC-MS se razvio u jednu od najosjetljivijih i najselektivnijih analitičkih metoda za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenti složenih organskih smjesa. Plinska kromatografija ima moć odvajanja spojeva iz složenih smjesa, odnosno odlično vrši separaciju i kvantizaciju, ali detektori u

GC obično daju samo broj analita i njegovu koncentraciju, odnosno retencijsko vrijeme i koncentraciju. Moguće je da više analita ima isto vrijeme zadržavanja i u tom slučaju nije moguće sa sigurnošću identificirati spoj. To nadopunjuje spektrometrija masa koja ne otkriva samo prisutnost spoja već daje i strukturne informacije o spoju, često dovodeći do identifikacije spoja. Spektrometrija masa zapravo služi za kvalitativno određivanje gdje plinska kromatografija nije pouzdana. Obje metode koriste uzorak u plinovitom stanju. GC-MS daje dvodimenzionalnu identifikaciju koja se sastoji od GC vremena zadržavanja (retencijsko vrijeme) i spektra masa za svaku komponentu smjese. Instrumentacija se uglavnom sastoji od tri komponente: plinski kromatograf, spektrometar masa i podatkovni sustav kao što je prikazano na slici 13. Gotovo svaki plinski kromatograf se može povezati sa spektrometrom masa, ali postoje određene značajke. Ukoliko se koriste punjene kromatografske kolone, dimenzije kolona i protok plina su slični onima koji se obično koriste za samostalne plinske kromatografe. Međutim, kod kapilarnih kolona protok mora biti prilično nizak. Tipični stupci, odnosno kolone duge su od 5 do 30 m s unutarnjim promjerom od 0,25 ili 0,32 mm. Povezivanje dviju tehnika se najčešće izvodi izravnim uvođenjem kapilarnog stupca u ionski izvor spektrometra masa. Većina vrsta spektrometra masa se može prilagoditi za uzimanje eluenta iz GC kolone pod uvjetom da je pumpanje izvora iona dovoljno za uklanjanje plina nositelja. Najčešće se koristi kvadrupolni analizator masa zbog brzog skeniranja. Princip rada injektora i kolone je isti kao kod samostalne plinske kromatografije, uzorak se ubrizgava u kromatografsku kolonu, te se odvaja kroz kolonu i zatim prolazi kroz prijenosnu liniju i analizira u spektrometru masa. Nakon izvršene analize, računalo vrši usporedbu dobivenih spektara masa na temelju podudaranja u postotku i obavlja identifikaciju spojeva uz pomoć baze podataka. (51,52)



**Slika 13.** Shematski prikaz GC-MS uređaja (53)

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu korištena su tri različita uzorka pića *brandy* različitih proizvođača u svrhu izoliranja i identificiranja hlapljivih spojeva. Izolacija hlapljivih spojeva je obavljena metodom ekstrakcije tekuće-tekuće i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi. Kod mikroekstrakcije vršnih para korištena su dva vlakna različite polarnosti – sivo vlakno s ovojnicom (divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan) i plavo vlakno s ovojnicom (polidimetilsiloksan/karboksen). Nakon izolacije, hlapljivi spojevi su identificirani pomoću GC-MS uređaja.

### 2.1. ANALIZIRANI UZORCI

Osnovni podatci o 3 različita uzorka su:

❖ *Brandy 1.*

- Alkoholna jakost – 35% vol.
- Sastojci – voda, etilni alkohol, vinski destilat, prirodne aromatske tvari, macerat orašastih plodova, bojilo/boja karamel obični

❖ *Brandy 2.*

- Alkoholna jakost – 38% vol.
- Sastojci – voda, etilni alkohol, vinski destilat, prirodne arome, šećer, bojilo/boja karamel obični

❖ *Brandy 3.*

- Alkoholna jakost – 35% vol.
- Sastojci – voda, etilni alkohol, vinski destilat, prirodna aroma, bojilo/boja karamel obični

### 2.2. APARATURA I KEMIČALIJE

Prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada korištena je sljedeća aparatura:

❖ Aparatura za ekstrakciju tekuće-tekuće

- kontinuirani ekstraktor za tekuće-tekuće ekstrakciju za otapala lakša od vode,
- aparatura za frakcijsku destilaciju,



- magnetska miješalica,
  - vodena kupelj s termostatom.
- ❖ Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)
- vodena kupelj s termostatom – Heidolph EKT 3001, Njemačka,
  - držač za mikroekstrakciju vršnih para – Supelco Co., SAD,
  - sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5cm (Supelco Co., SAD),
  - plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/karboksen (PDMS/Carboxen) dužine 5cm (Supelco Co., SAD).
- ❖ Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)
- GC model 7820A – Agilent Technologies, SAD,
  - MSD model 5977E – Agilent Technologies, SAD,
  - GC kapilarna kolona HP-5MS (stacionarna faza 5% difenil, 95% dimetilpolisilksan, debljina sloja faze 0,20  $\mu\text{m}$ ; 30 m x 0,25 mm, J&W, SAD).

Korištene kemikalije su sljedeće:

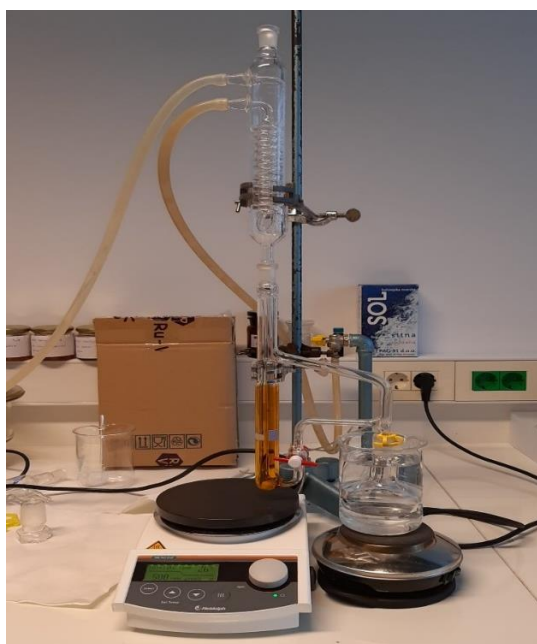
- destilirana voda,
- NaCl (kuhinjska sol), Solana Pag, Hrvatska,
- dietil-eter, Panerac, Španjolska,
- pentan, Kemika, Zagreb, Hrvatska,
- bezvodni natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska.

### **2.3 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

U eksperimentalnom dijelu ovog rada izolacija hlapljivih spojeva je obavljena pomoću dvije metode: ekstrakcija tekuće-tekuće i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi.

### 2.3.1 EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE

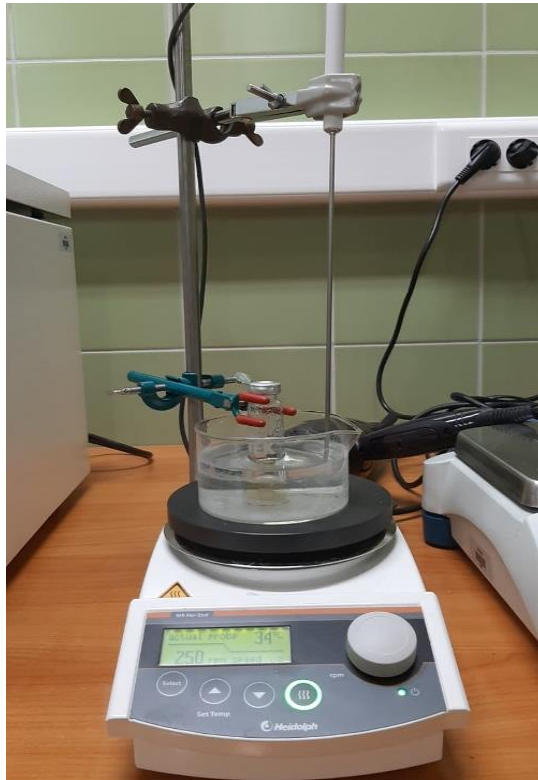
Ekstrakcija hlapljivih spojeva je provedena u kontinuiranom ekstraktoru za tekuće-tekuće ekstrakciju za otapala lakša od vode. Kao otapalo korištena je smjesa dva organska otapala (dietil-eter i pentan, 1:1 v/v). Uzorak se ulijeva u spremnik ekstraktora, te se prilikom ulijevanja mora paziti da ne dođe do prelijevanja uzorka u bočnu cijev. U spremnik ekstraktora s uzorkom stavljen je magnetički za miješanje. Nakon toga se u ekstraktor uroni adapter za difuziju otapala lakšeg od vode. Adapter služi da bi otapalo moglo difundirati s dna ekstraktora, te se zatim izdiže iznad sloja vode (uzorka) zbog manje gustoće. U okruglu tikvicu, gdje će se skupljati ekstrakt, dodaje se otapalo za ekstrakciju, približno 1/3 volumena tikvice. Aparatura se učvrsti na stalak, te postavi spremnik s uzorkom na magnetsku miješalicu koja je podešena na 500 okr/min, a okruglu tikvicu s otapalom u vodenu kupelj. Kad je aparatura sastavljena preko lijevka se kroz adapter doda otapalo. Dodavanje otapala ne smije biti prebrzo jer može uzrokovati prelijevanje dijela vodene faze u tikvicu za skupljanje ekstrakta. Na ekstraktor se spoji vodeno hladilo i uključi magnetska miješalica. Temperatura zagrijavanja okrugle tikvice mora biti malo iznad temperature vrenja otapala. Otapalo iznad uzorka se udružuje s ekstraktom u tikvici potom koncentrira uporabom Vigreuxove kolone. Nakon završene ekstrakcije, ekstrakt se filtrira preko pamučne vate na koju je stavljen sloj bezvodnog natrijevog sulfata (sredstvo za sušenje) u svrhu uklanjanja viška otapala.



**Slika 14.** Aparatura za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće

### 2.3.2 MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

Kod HS-SPME metode su korištena dva vlakna – sivo i plavo vlakno. Prije uporabe vlakna je potrebno aktivirati kondicioniranjem. Kondicioniranje se vrši prema uputama proizvođača i provodi se tako da se SPME igla s vlaknom postavi u injektor plinskog kromatografa koji se zagrijava. Sivo vlakno se aktivira zagrijavanjem na 270 °C u vremenskom periodu od 60 min, a plavo vlakno na 250 °C 30 min. Nakon završetka kondicioniranja vlakna su spremna za korištenje. Potom se priprema uzorak. Uzorak volumena 5 mL se prelijeva u staklenu bočicu volumena 15 mL, te se doda žličica soli. Posuda se potom hermetički zatvara teflonskom PTFE/silikon septom i postavi u vodenu kupelj grijanu na 40 °C. Zatvorena staklena bočica skupa s vodenom kupelji se postavlja na magnetsku miješalicu podešenu na 250 okr/min. Uzorak se kondicionira 15 min zatim SPME igla probija septu i ulazi u bočicu s uzorkom. Tada započinje proces ekstrakcije vršnih para koji traje 40 min. Nakon ekstrakcije vlakno se uvlači natrag u iglu, te se SPME igla ručno uvodi u GC-MS injektor na 250 °C u trajanju od 7 min. Tu se provodi toplinska desorpcija ekstrahiranih vršnih para izravno u GC kolonu.



**Slika 15.** Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi

## 2.4 GC-MS ANALIZA IZOLIRANIH SPOJEVA

Nakon izolacije hlapljivih spojeva slijedi kvalitativna i kvantitativna analiza pomoću vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa. Korišten je GC-MS uređaj prikazan na slici 16.



**Slika 16.** Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Odvajanje spojeva se odvijalo u nepolarnoj kapilarnoj koloni plinskog kromatografa HP-5MS. Kolona je duga 30 m, promjera 0,25 mm i sadrži sloj stacionarne faze (5% difenil-95% dimetilpolisilksan) debljine 0,20  $\mu\text{m}$ . Plin nositelj je helij protoka 1 mL/min. Volumen injektiranog uzorka je 1  $\mu\text{L}$ . Temperatura injektora je 250  $^{\circ}\text{C}$ . Temperatura kolone je programirana na 70  $^{\circ}\text{C}$  prve 2 min, potom se brzinom od 3  $^{\circ}\text{C}$  po min zagrijava do 200  $^{\circ}\text{C}$ . Detektor spektrometra masa je podešen na temperaturu od 280  $^{\circ}\text{C}$ . Energija ionizacije iznosi 70 eV, a interval snimanja obuhvaća od 30 do 300 jedinica masa. Uzorak se doda odjednom i potpuno ispari zbog povišene temperature. Za svaki analizirani uzorak pomoću GC-MS dobiju se sljedeći podaci:

- kromatogram ionske snage,
- vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme) koje je predstavljeno pikom na kromatogramu,

- relativni udio pojedinog spoja izražen u postotcima, koji predstavlja udio površine pika u ukupnoj površini,
- naziv spoja ili spojeva čiji se spektar najviše podudara sa spektrom nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske snage.

Identifikacija svih dobivenih pojedinačnih spojeva izvršena je tehnikom usporedbe. Mogu se usporediti njihova vremena zadržavanja s onima iz literature i njihovi spektri s spektrima iz biblioteka spektara masa *Wiley 09* i *NIST14*.

### 3. REZULTATI

Hlapljivi spojevi uzoraka *brandy* su analizirani spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa na koloni HP-5MS. Dobiveni rezultati su prikazani u tablicama 1,2 i 3, te su spojevi podijeljeni prema kemijskim skupinama.

**Tablica 1.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva dobivenih ekstrakcijom tekuće-tekuće u uzorcima *brandy* 1, 2 i 3

Red. broj	Spoj	RI	Površinski udio (%)		
			1	2	3
<b>ALKOHOLI</b>					
1.	3-metilbutan-1-ol	<900	20,56	26,35	3,45
2.	2-feniletanol*	1116	0,29	0,32	5,61
3.	heksanol	<900	9,24	7,59	-
<b>ESTERI</b>					
1.	etil-heksanoat	996	6,94	-	-
2.	dietil-sukcinat	1181	17,99	12,25	-
3.	etil-oktanoat	1198	18,23	6,41	-
4.	etil-dekanoat	1397	18,46	26,67	9,76
5.	etil-dodekanoat	1593	-	8,45	-
6.	etil-heksadekanoat	1992	-	5,37	69,38
7.	3-metilbutil-etanoat (izoamil-acetat)	<900	3,83	4,73	-
<b>KISELINE</b>					
1.	oktadenska kiselina	2164	-	-	9,89
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>95,54%</b>	<b>98,14%</b>	<b>98,09%</b>

RI = retencijski indeks HP-5MS koloni

\* identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva dobivenih HS-SPME metodom pomoću sivog vlakna u uzorcima *brandy* 1, 2 i 3

Red. broj	Spoj	RI	Površinski udio (%)		
			1	2	3
<b>ALKOHOLI</b>					
1.	3-metilbutan-1-ol	<900	32,02	41,23	6,09
2.	butanol	<900	-	0,71	-
<b>ESTERI</b>					
1.	etil-butanoat	<900	0,43	0,72	-
2.	etil-heksanoat	996	1,97	0,85	0,68
3.	etil-oktanoat	1198	17,51	8,01	9,27
4.	etil-dekanoat	1397	35,51	35,71	62,07
5.	etil-dodekanoat	1593	6,40	5,84	14,9
6.	3-metilbutil-etanoat (izoamil-acetat)	<900	-	0,91	-
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b><i>93,84%</i></b>	<b><i>93,98%</i></b>	<b><i>93,01%</i></b>

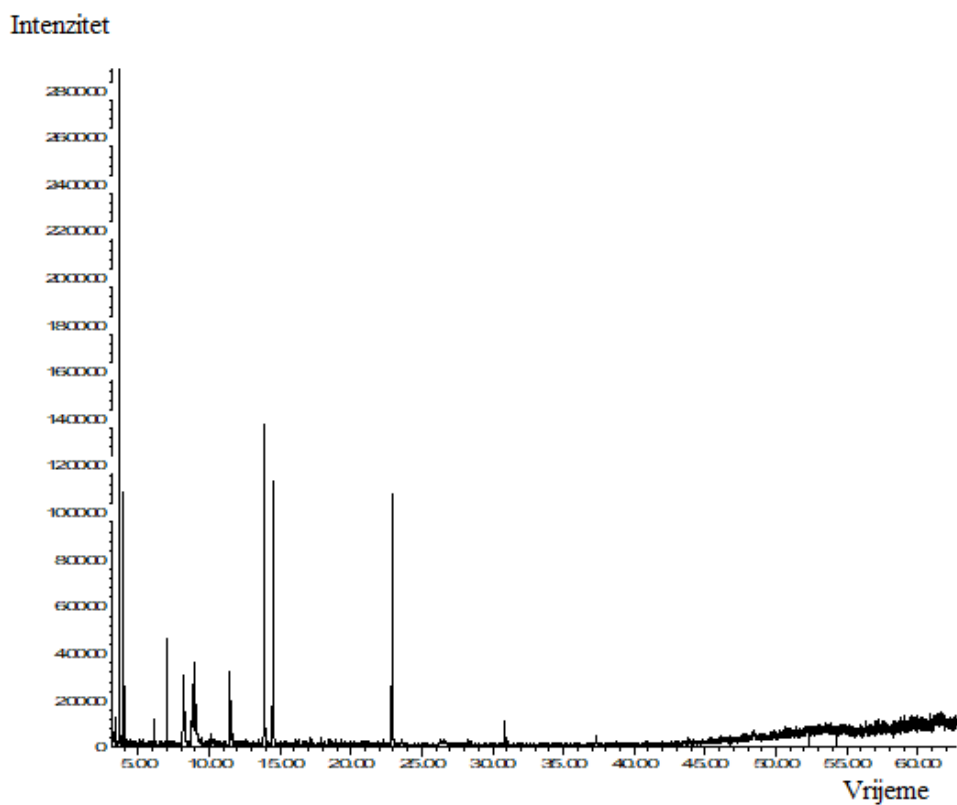
RI = retencijski indeks HP-5MS kolone

**Tablica 3.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva dobivenih HS-SPME metodom pomoću plavog vlakna u uzorcima *brandya* 1, 2 i 3

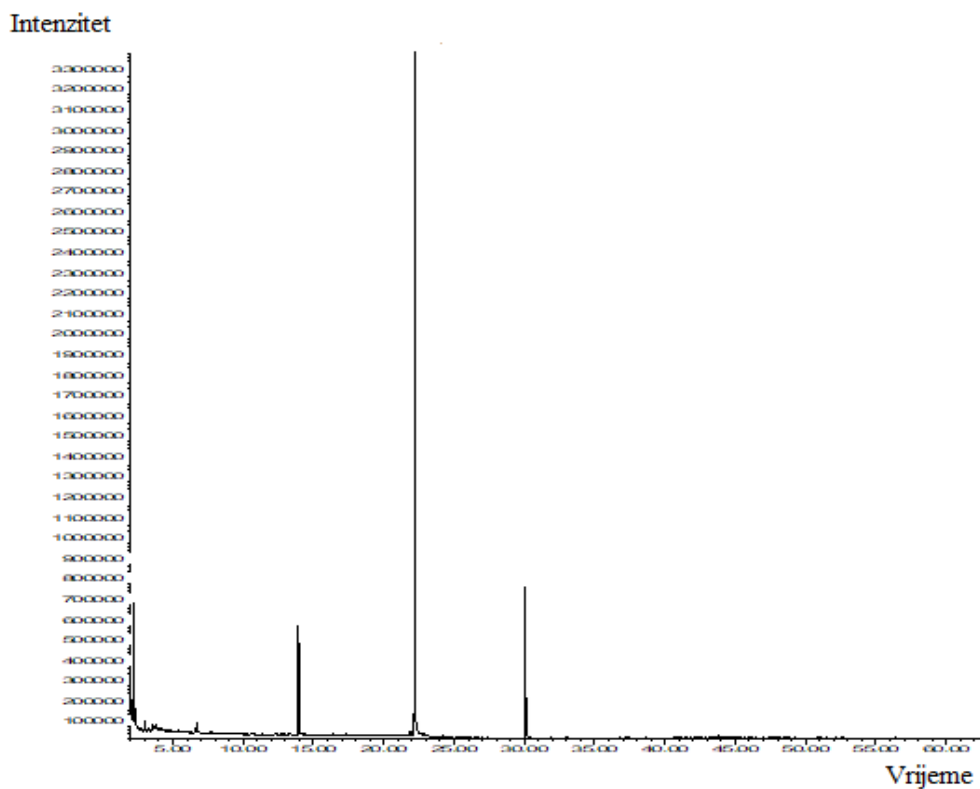
Red. broj	Spoj	RI	Površinski udio (%)		
			1	2	3
<b>ALKOHOLI</b>					
1.	3-metilbutan-1-ol	<900	16,95	46,82	26,04
2.	heksanol	<900	0,65	-	-
<b>ESTERI</b>					
1.	etil-butanoat	<900	-	0,57	-
2.	etil-heksanoat	996	2,03	0,94	-
3.	etil-oktanoat	1198	18,30	4,77	8,11
4.	etil-dekanoat	1397	41,45	23,60	47,11
5.	etil-dodekanoat	1593	8,27	5,03	8,20
6.	3-metilbutil-etanoat (izoamil-acetat)	<900	-	0,56	-
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>85,62%</b>	<b>82,29%</b>	<b>89,46%</b>

RI = retencijski indeks HP-5MS kolone

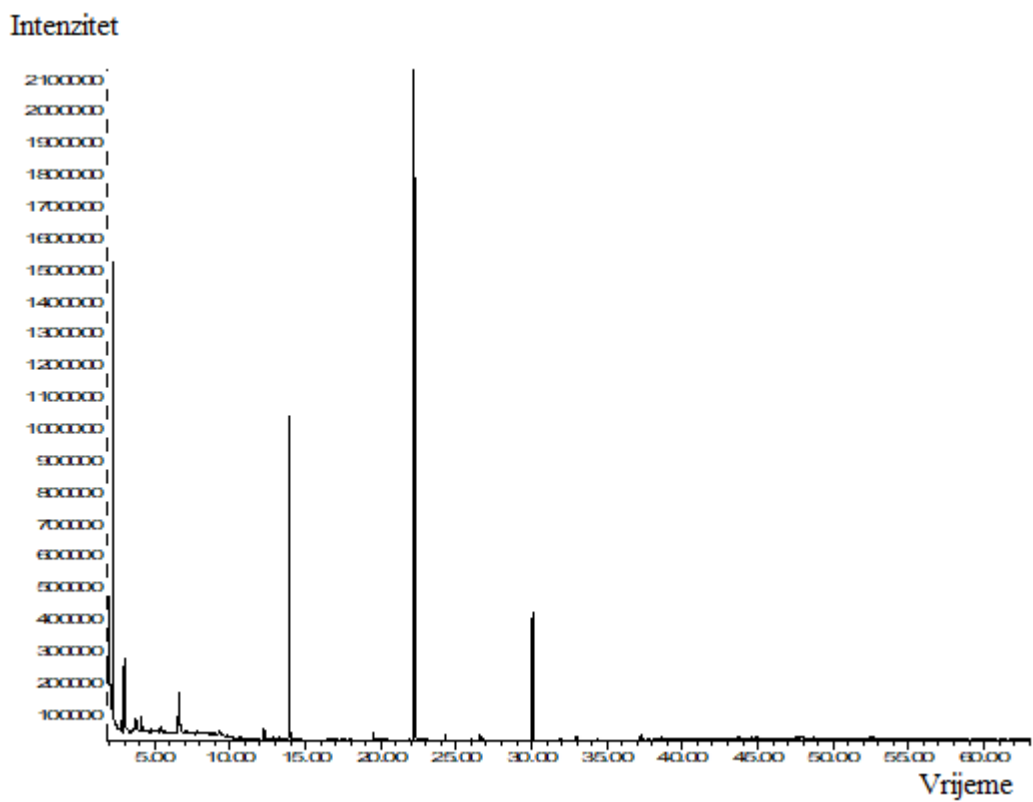




**Slika 17.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva *brandy* izoliran iz uzorka 1 ekstrakcijom tekuće-tekuće



**Slika 18.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva *brandy* izoliran iz uzorka 3 HS-SPME metodom korištenjem sivog vlakna



**Slika 19.** Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva *brandy*a izoliran iz uzorka 1 HS-SPME metodom korištenjem plavog vlakna

## 4. RASPRAVA

Tehnološki proces proizvodnje *brandy*a obuhvaća mnoge korake od odabira sorte grožđa, njegove prerade i fermentacije do destiliranja dobivenog vina i odležavanja u drvenim bačvama. Tijekom svakog procesa se događaju razne kemijske reakcije koje sintetiziraju nove produkte. Dolazi do promjena u već postojećim spojevima i do promjena u odnosima među spojevima. Sve te promjene utječu na formiranje arome. Nastali hlapljivi i aromatični spojevi svojim kemijskim sastavom i udjelom formiraju, odnosno određuju finalnu aromu i kvalitetu proizvoda. Izolacijom profila hlapljivih spojeva odgovornih za aromu *brandy*a, pomoću metoda izolacije ekstrakcija tekuće-tekuće i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i analiziranjem spojeva pomoću GC-MS uređaja određena je njihova zastupljenost i kemijski sastav. Dobiveni rezultati, kao i utvrđivanje sličnosti i razlika dviju korištenih metoda izolacije, su obrazloženi i uspoređeni u ovom dijelu rada.

Ukupno je identificirano 13 hlapljivih spojeva od čega su najzastupljeniji esteri (8) potom alkoholi (4) i kiseline (1). Metodom ekstrakcije tekuće-tekuće identificirano je mnogo više spojeva od HS-SPME metode, odnosno 11 spojeva od kojih 4 nije detektirano HS-SPME metodom izolacije. HS-SPME metodom je identificirano 9 spojeva od kojih 2 nisu izolirana ekstrakcijom tekuće-tekuće. Kod metode ekstrakcije tekuće-tekuće uz identificirane alkohole i estere nalazi se i kiselina. Dok su kod HS-SPME metode i kod sivog i plavog vlakna identificirani alkoholi i esteri.

### 4.1 EKSTRAKCIJA TEKUĆE-TEKUĆE

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva dobivenih metodom ekstrakcije tekuće-tekuće prikazani su u tablici 1. Ukupno je izolirano 11 spojeva: 3 alkohola, 7 estera i 1 kiselina. Od izoliranih i detektiranih alkohola 3-metilbutan-1-ol i heksanol su izolirani i SPME metodom, dok je 2-feniletanol detektiran samo kod ekstrakcije tekuće-tekuće. Veći broj estera je detektiran metodom ekstrakcije tekuće-tekuće nego HS-SPME. Etil-oktanoat, etil-dekanoat, etil-dodekanoat, etil-heksanoat i 3-metilbutil-etanoat su izolirani i ekstrakcijom tekuće-tekuće kao i SPME metodom, dok su dietil-sukcinat i etil-

heksadekanoat izolirani samo kod ekstrakcije tekuće-tekuće. Samo kod ekstrakcije tekuće-tekuće detektirala se jedna kiselina i to oktađenska kiselina.

Od **alkohola** 3-metilbutan-1-ol i 2-feniletanol su detektirani u sva tri uzorka. Najzastupljeniji je 3-metilbutan-1-ol koji se u prvom uzorku nalazi u postotku od 20,56% i čini najzastupljeniji spoj uzorka 1, u drugom 26,35% dok se u trećem uzorku nalazi u manje udjelu od 3,45%. 3-metilbutan-1-ol ili izoamilni alkohol je viši alkohol, a oni imaju značajan utjecaj na percipirani okus jakih alkoholnih pića; u niskim koncentracijama doprinose aromatskoj složenosti, dok u visokim daju prodoran miris koji prikriva aromatičnu finoću. (54) Sam izoamil alkohol doprinosi medicinskim mirisima (alkohol, otapalo) i važan je za kompleksnost arome i puninu destilata. (55) Alkohol 2-feniletanol koji je detektiran samo ovom metodom je prisutan u sva tri uzorka u manjim udjelima nego 3-metilbutan-1-ol. Najzastupljeniji je u uzorku 3 gdje mu je udio 5,61%, dok je u uzorcima 1 i 2 u dosta manjim količinama, 0,29% i 0,32%. On nastaje metabolizmom kvasaca *S. cerevisiae*. (56) Taj aromatski alkohol pridodaje karakterističan miris ruže koji je većina autora opisala pozitivnim. (55) Treći alkohol, heksanol je detektiran samo u prva dva uzorka, kod uzorka 1 (9,24%) ponešto više nego u uzorku 2 (7,59%). Heksanol pripada skupini zvanj C<sub>6</sub> čiji spojevi pozitivno utječu na aromu. Većinom nastaju tijekom operacija prerade grožđa gdje dolazi do enzimske razgradnje i naknadne redukcije masnih kiselina dugog lanca, a heksanol još može nastati kao produkt metabolizma kvasaca tijekom alkoholnog vrenja. Njihov miris je opisan kao zelena trava i lišće, ali prevelika koncentracija heksanola rezultira odbojnim i oštrim mirisom (sladić, kakao, zubna pasta) što negativno utječe na aromu i kvalitetu. (55)

Esteri nastaju metabolizmom kvasaca tijekom fermentacije ili kemijskom esterifikacijom tijekom destilacije i starenja i identificirani su kao ključni spojevi koji djeluju na miris i aromu svježe destiliranih *brandya*. (54) Od 7 detektiranih **estera** najzastupljeniji je etil-dekanoat i izoliran je iz sva tri uzorka. U uzorku 2 najviše (26,67%) i najzastupljeniji je spoj uzorka 2, te slijedi uzorak 1 s 18,46% i uzorak 3 s 9,76%. Etil-dekanoat, odnosno etil-kaprat s etil-oktanoatom (etil-kaprilat) pridonose voćnoj aromi pića zbog jakog mirisa voća. (56) Etil-oktanoat također ima miris ananasa te kruške. (35) Dietil-sukcinat je izoliran samo ovom metodom i to samo u uzorku 1 i 2 u postocima od 17,99% i 12,25%. Dietil-sukcinat može biti povezan s mogućim kvarenjem prefermentirane komine u periodu između završetka vrenja i početka destilacije. (56) Također u uzorcima 1 i 2 je detektiran etil-oktanoat, kod uzorka 1 u 18,23%, a u uzorku

2 znatno manje, 6,41%. Još jedan spoj koji je izoliran iz uzoraka 1 i 2 je 3-metilbutil-etanoat (izoamil-acetat) i to malo više u uzorku 2 (4,73%) nego u uzorku 1 (3,83%). 3-metilbutil-etanoat ima voćni miris, ali tijekom starenja se smanjuje zbog procesa transesterifikacije. (35) Ester etil-heksadekanoat je izoliran samo metodom tekuće-tekuće i to u znatnom udjelu u uzorku 3 s čak 69,38% od ukupnog udjela hlapljivih spojeva i što ga čini najzastupljenijim spojem u uzorku 3. U uzorku 2 njegov udio je 5,37%. Etil-heksanoat je detektiran samo u uzorku 1 s udjelom od 6,94%, dok je etil-dodekanoat detektiran samo u uzorku 2 s 8,45%, etil-dodekanoat je okarakteriziran voćnim i cvjetnim aromama. Etil-heksanoat je etilni ester masne kiseline dugog lanca, oni imaju miris svijeća i voska, a na aromu utječu samo u visokim koncentracijama. (56)

Jedina **kiselina** koje je detektirana samo metodom ekstrakcije tekuće-tekuće je viša masna zasićena oktadenska (stearinska) kiselina i izolirana je jedino iz uzorka 3 u udjelu od 9,89%. Masne kiseline mogu biti prisutne u destilatu ili mogu nastati kao rezultat hidrolize estera u uvjetima visoke temperature i kiselosti destilacije. Njihovu količinu određuje prisutnost taloga kvasaca u vinu tijekom destilacije. (57) Masne kiseline mogu biti biosintetizirane tijekom alkoholne fermentacije u stanicama kvasca stvaranjem acetil-CoA koji reagira s malonil-CoA i formira uglavnom zasićene masne kiseline ravnog lanca s parnim brojem ugljikovih atoma (4-8), ali koncentracija slobodnih masnih kiselina u destiliranim pićima je niska zbog esterifikacije. (35)

## 4.2 MIROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva dobivenih HS-SPME metodom korištenjem sivog i plavog vlakna prikazani su u tablicama 2 i 3. HS-SPME metodom je detektirano ukupno 9 spojeva: 3 alkohola i 6 estera. Od 3 detektirana alkohola dva su detektirana i ekstrakcijom tekuće-tekuće, a to su heksanol i 3-metilbutan-1-ol. Butanol je detektiran samo HS-SPME metodom uporabom sivog vlakna. Od šest estera pet ih je izolirano i HS-SPME metodom i metodom ekstrakcije tekuće-tekuće kao što je navedeno kod ekstrakcije tekuće-tekuće. Samo jedan ester je detektiran HS-SPME metodom, a ne ekstrakcijom tekuće-tekuće i to je etil-butanoat.

### SIVO VLAJKNO (DVB/CAR/PDMS)

Uporabom sivog vlakna detektirana su 2 alkohola i 6 estera. **Alkohol** koji je detektiran u sva tri uzorka i dosta je zastupljeniji od drugog alkohola je 3-metilbutan-1-ol. Najveći udio je u uzorku 2 i iznosi 41,23% i predstavlja najzastupljeniji spoj uzorka 2, u uzorku 1 iznosi 32,02% dok je u uzorku 3 znatno manji sa 6,09%. Drugi alkohol koji je detektiran samo HS-SPME metodom i to sa sivim vlaknom je butanol. Ali je izoliran samo iz jednog uzorka, uzorka 2 i u znatno malo udjelu od 0,71%. Butanol je viši alkohol visokog praga mirisne detekcije stoga ne utječe značajnije na aromu.

Kvantitativno značajniji **ester** je etil-dekanoat koji je izoliran iz sva tri uzorka i to u znatnim udjelima. Najveći udio ima uzorak 3 s 62,07% i to je najzastupljeniji spoj uzorka 3. Udjeli u uzorku 1 i uzorku 2 se neznatno razlikuju i iznose 35,51% i 35,71%, a u uzorku 1 on je najzastupljeniji spoj. Nakon njega slijedi etil-oktanoat koji je isto detektiran u sva tri uzorka. Međutim najveći udio etil-oktanoata ima uzorak 1 (17,51%) potom uzorak 3 (9,27%) i uzorak 2 (8,01%). Dva estera koja su detektirana u sva tri uzorka su etil-heksanoat i etil-dodekanoat, ali se njihova zastupljenost značajno razlikuju ovisno o uzorku. Etil-dodekanoat je izoliran u većim udjelima od etil-heksanoata. Njegov udio u uzorku 3 iznosi 14,9%, dok kod uzorka 1 je 6,40% i kod uzorka 2 najmanje i to 5,84%. Etil-heksanoat je izoliran u znatno manjim udjelima. U uzorku 1 udio je 1,97%, uzorak 2 ima udio od 0,85% i uzorak 3 s udjelom od 0,68%. Etil-butanoat koji je izoliran samo HS-SPME metodom je detektiran u uzorku 1 i 2, veći udio u uzorku 2 (0,72%) nego u uzorku 1 (0,43%). Etil-butanoat ili etil-butirat je kao i većina estera zaslužan za voćni miris. Ester koji je izoliran samo iz uzorka 2 je 3-metilbutil-etanoat u dosta malom udjelu od 0,91%.

### PLAVO VLAJKNO (PDMS/Carboxen)

Uporabom plavog vlakna su također izolirana 2 alkohola i 6 estera. **Alkohol** koji je izoliran i pomoću sivog vlakna i ekstrakcije tekuće-tekuće je 3-metilbutan-1-ol i ovdje je izoliran iz sva tri uzorka. Najveći udio i ovdje ima uzorak 2 koji iznosi čak 46,82%, više nego kod uporabe sivog vlakna i ekstrakcije tekuće-tekuće i predstavlja najzastupljeniji spoj uzorka 2. Nakon njega u uzorku 3 udio iznosi čak 26,04% što je znatno više nego kod uporabe sivog vlakna i ekstrakcije tekuće-tekuće. I uzorak 1 u kojem

je detektiran u udjelu od 16,95% što je manje nego kod uporabe sivog vlakna i ekstrakcije tekuće-tekuće. Heksanol je ovdje izoliran samo u uzorku 1 (0,65%), dok je kod ekstrakcije tekuće-tekuće izoliran u uzorku 1 i 2 i to u većim udjelima.

Šest istih **estera** je detektirano i uporabom sivog i plavog vlakna. Međutim nisu svi izolirani iz istih uzoraka kao i kod HS-SPME sa sivim vlaknom niti im je zastupljenost ista. Esteri koji su izolirani iz sva tri uzorka i uporabom sivog i plavog vlakna su etil-oktanoat, etil-dekanoat i etil-dodekanoat, ali njihovi udjeli kod uporabe plavog i sivog vlakna su drugačiji. Uzorak 1 ima udio etil-oktanoata 18,30%, etil-dekanoata 41,45% i etil-dodekanoata 8,27%. Svakog estera ima ponešto više nego kod uporabe sivog vlakna, dok je kod ekstrakcije tekuće-tekuće etil-oktanoat je manje, etil-dekanoat više, a etil-dodekanoat nije uopće izoliran. Kod uzorka 2 je obrnuta situacija. Uporabom plavog vlakna udjeli ovih estera su manji nego uporabom sivog vlakna i ekstrakcije tekuće-tekuće i iznose: etil-oktanoat 4,77%, etil-dekanoat 23,60% i etil-dodekanoat 5,03%. Kod uzorka 3 također su zamijećeni manji udjeli. Etil-oktanoat iznosi 8,11%, etil-dekanoat 47,11% i etil-dodekanoat 8,20%, ali kod ekstrakcije tekuće-tekuće izoliran je samo etil-dekanoat i to znatno manje. Etil-butanoat je u ovom slučaju izoliran samo iz uzorka 2 (0,57%) i to manje nego kod uporabe sivog vlakna. 3-metilbutil-etanoat je također izoliran samo iz uzorka 2 što je i slučaj kod uporabe sivog vlakna, ali je ovdje njegov udjel manji i iznosi 0,56%, također je manji nego kod ekstrakcije tekuće-tekuće. Etil-heksanoat je izoliran iz dva uzorka, uzorak 1 i 2, dok je kod uporabe sivog vlakna izoliran iz sva tri uzorka. Udio u uzorku 1 iznosi 2,03% što je više nego kod uporabe sivog vlakna, a manje nego kod ekstrakcije tekuće-tekuće, a isto je kod uzorka 2 gdje udio iznosi 0,94%, ali kod ekstrakcije tekuće-tekuće on nije detektiran.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i rasprave ovog diplomskog rada može se zaključiti:

- Korištene metode izolacije imaju određene sličnosti u izoliranim hlapljivim spojevima iz ispitivanih uzoraka, kao i razlike koje se mogu pripisati različitim recepturama proizvodnje kod proizvođača i razlikama u parametrima tijekom proizvodnog procesa
- Nema značajne razlike u kemijskom sastavu hlapljivih spojeva uporabom sivog i plavog vlakna
- Mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi se izoliraju hlapljivi spojevi malih molekulskih masa, dok ekstrakcijom tekuće-tekuće se izoliraju i hlapljivi i poluhlapljivi spojevi
- Esteri kao najvažnija skupina aromatskih spojeva u destilatima, čine najviše izoliranih i detektiranih spojeva u svim uzorcima
- Najzastupljeniji spojevi u HS-SPME analizi su 3-metilbutan-1-ol, etil-oktanoat, etil-dekanoat i etil-dodekanoat, spoj koji nije izolirani uporabom sivog vlakna je heksanol, a uporabom plavog vlakna butanol
- Metodom ekstrakcije tekuće-tekuće glavni izolirani spojevi su 3-metilbutan-1-ol, heksanol, etil-dekanoat, etil-oktanoat i dietil-sukcinat



## 6. LITERATURA

1. Mujić I. Tehnologija proizvodnje jakih alkoholnih pića. Rijeka, Hrvatska: Veleučilište u Rijeci; 2010.
2. Pravilnik o jakim alkoholnim pićima. Narodne novine 61/09. Zagreb. Hrvatska: Narodne novine Republike Hrvatske; 2009. Dostupno na: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009\\_05\\_61\\_1405.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_05_61_1405.html)
3. Šarolić M. Jaka alkoholna pića. Nerecenzirani materijali za predavanja kolegija Tehnologija alkoholnih pića. Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet Split; 2021.
4. Lučić R., Proizvodnja jakih alkoholnih pića, 1. izdanje, Beograd; Nolit, 1987.
5. Pravilnik o vinu, Narodne novine 96/1996. Zagreb. Hrvatska: Narodne novine Republike Hrvatske, 1996. Dostupno na: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1996\\_11\\_96\\_1912.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1996_11_96_1912.html)
6. Dhiman K. A. i Attri S. Production of Brandy. U: Joshi V. K., ur. Handbook of Enology: Principles, Practices and Recent Innovations Volume 3. New Delhi: Asiatech Publisher Inc. pog. 35, 2011.
7. Paclut P. F. The Brandy Authority. Sjedinjene Američke Države: Spirit Journal, Inc. 2018.
8. URL: <https://www.cognac-experience.com/en/produit/cognac-xo-de-fin-de-siecle/> (pristupljeno: 20.8.2022.)
9. Maarse H., Van Den Berg F., Flavour of distilled beverages, U: Piggott J.R., ur. Paterson A., Understanding Natural Flavors, Springer, Boston, 1994. pp.243-267
10. Tsakiris A., Kallithraka S., Kourkoutas Y.: Grape brandy production, composition and sensory evaluation, J Sci Food Agri. 2014.; 94(3):404-414
11. Prvi hrvatski vinogradski portal, Tehnologija proizvodnje vinjaka, dostupno na: <https://www.vinogradarstvo.com/vocarstvo/jaka-alkoholna-pica/30-tehnologija-proizvodnje-vinjaka> (pristupljeno: 20.8.2022.)
12. Buglass A. J. Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects, 2 Volume set, West Sussex: John Wiley & Sons; 2011.
13. Sahor R., Proizvodnja proizvoda od vinskog destilata, Interna skripta, Zagreb, 1999.

14. Orlić S., Jeromel A. *Proizvodnja vina*. U: *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji* (Grba S., ured.), Pledaja, Zagreb, 2010., pp.141-162
15. Miličević B. *Utjecaj vinske sorte na aromu vinskih destilata*. Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet u Zagreb, Zagreb, 2001.
16. Cavazza A., Versini G., Dalla Serra A., Romano F., *Characterization of Six Saccharomyces cerevisiae Strains on the Basis of Their Volatile Compounds Production, as Found in Wines of Different Aroma Profiles*. Seventh International Symposium on Yeasts, Wiley, Chichester 1989. pp.163-167
17. Combina M., Elia A., Mercado LA., Catania C., Ganga A., Martinez C., *Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argetina*, *Int. J. Food Microbiol.* 99, 2005., pp.237-243.
18. Louw L., Lambrechts M.G., *Grape-based brandies: production, sensory properties and sensory evaluation*. *Alcoholic Beverages*, Woodhead Publishing Limited, Woodhead, 2012., pp.281-298.
19. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2022. dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=14783> (pristupljeno 21.8.2022.)
20. Zhao Y., Tian T., Li J., Zhang B., Yu Y., Wang Y. i Niu H., *Variations in Main Flavor Compounds of Freshly Distilled Brandy during the Second Distillation*, *Int. J. Food Eng.* 2014., 10(4):809-820.
21. Prvi hrvatski vinogradarski portal, *Tehnologija jakih pića*, dostupno na: <https://www.vinogradarstvo.com/vocarstvo/jaka-alkoholna-pica/29-tehnologija-jakih-pica> (pristupljeno 21.8.2022.)
22. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2022. dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=52359> (pristupljeno 21.8.2022.)
23. Lurton L., Ferrari G., Snackers G., *Cognac: production and aromatic characteristics*, U: Piggott J.R., ur. *Alcoholic Beverages: Sensory Evaluation and Consumer Research*, Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2012., pp. 242-266
24. Spaho N., *Distillation Techniques in the Fruit Spirits Production*, ur. Mendes M.F., *Distillation-Innovative Applications and Modeling*, 2017.
25. Guymon J.F., *Chemical Aspects of Distilling Wines into Brandy*, University of California, Davis, Calif. 95616, 2013.

26. URL:[https://www.researchgate.net/figure/Typical-distillation-equipment-used-for-the-production-of-fruit-spirits-A-copper\\_fig1\\_309740735](https://www.researchgate.net/figure/Typical-distillation-equipment-used-for-the-production-of-fruit-spirits-A-copper_fig1_309740735) (pristupljeno 22.8.2022.)
27. Léauté R., Distillation in Alambic, *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 41 (1), 1990., pp. 90-103
28. Delassus J., Schönenberger P., Rébénaque P., Bach B., Chapter 4:9 Method development for brandy ageing based on oak chips use, University of Applied Sciences and Arts Western Switzerland, Route de Duillier 50, 1260 Nyon, Switzerland
29. Mosedale J.R., Puech J-L., Wood maturation of distilled beverages, *Trends Food Sci Tech* 9 (3), 1998. pp.95-101
30. URL:<https://www.sascharudnik.com/used-barrels-cognac-barrels> (pristupljeno 23.8.2022.)
31. Miličević B., Lukić I., Babić J., Šubarić D., Miličević R., Ačkar Đ., Miličević D., Aroma and sensory characteristics of Slavonian plum brandy, *Technologica acta* 5, 1-7, 2012.
32. Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubordieu D., The chemistry of wine, stabilisation and treatments, *Handbook of Enology Vol.2*. U:John Wiley and Sons, NewYork, 2000. pp.41-54
33. Claus MJ., Berglund KA., Fruit brandy production by batch column distillation with reflux, *J. Food Process Eng.*, 2005. 28:53-67
34. Coldea T.E., Socaciu C., Tofana M., Vékony E., Ranta N., Impact of Distillation Process on the Major Volatile Compounds as Determined by GC-FID Analysis in Apple Brandy Originated from Transylvania, Romania, *Bulletion of University of Agricultural Science and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Agriculture*,2012., 69(2) pp.228-235
35. Christoph N., Bauer-Christoph C., Flavour of Spirit Drinks: Raw Materials, Fermentation, Distillation and Ageing, *Flavours and Fragrances*, 2007. pp.219-239
36. Sides A., Robards K., Helliwell S., Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in food, *Trend sin analytical chemistry*, 2000., 19(5):pp.322-329
37. Jerković I., Kemija aroma, Recenzirana interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split 2011.

38. Jerković I, Radonić A., Praktikum iz Organske kemije, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
39. Merkle S., Kleeberg KK., Fritsche J., Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis-A Review. *Chromatography*, 2015. pp.293-381
40. Marijanović Z., Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda, Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Osijeku, Osijek 2014.
41. Pawliszyn J., *Solid Phase Microextraction : Theory and Practice*, Wiley VCH, New York, 1997.,185
42. Pawliszyn J., *Handbook of Solid Phase Microextraction*, Chemical Industry Press, London, 2009.
43. Lovrić A-M., Optimizacija i validacija HS-SPME GC MS metode za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
44. Sedlar A., Izolacija i identifikacija hlapljivih sumporovih spojeva odabranih biljaka porodice Brassicaceae, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2017.
45. Forgács E., Cserháti T., 9:Gas chromatography, *Food Authenticity and Traceability*, Woodhead Publishing Service in Food Science, Technology and Nutrition, 2003. pp.197-217
46. Feng T., Sun M., Song S., Zhuang H., Yao L., 12:Gas chromatography for food quality evaluation, *Evaluation Technologies for Food Quality*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 2019. pp.219-265
47. URL:[http://free-zg.t-com.hr/Svjatlana\\_Luterotti/09/091/0912.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjatlana_Luterotti/09/091/0912.htm) (pristupljeno 2.9.2022.)
48. Radić Nj., Kukoč Modun L., *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2016.
49. Skoog DA., West DM., Holler FJ., Crouch SR., *Fundamentals of Analytical Chemistry 9th Edition*, Cengage Learning, 2013.
50. URL: <https://www.mattlayman.com/tags/mass-spectrometry/> (pristupljeno 3.9.2022.)
51. Stauffer E., *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, *Encyclopedia of Forensic Sciences*, 2013., pp.596-602

52. Harvey DJ., Gas Chromatography | Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition), 2019., pp.169-179
53. Sutherland K., Gas Chromatography/mass spectrometry techniques for the characterization of organic materials in works of art, Physical Sciences Reviews, 2018.:4(6):3
54. Xiang X-F., Lan Y-B., Gao X-T., Xie H., An Z-Y., Lv Z-H., Yin-Shi, Duan C-Q., Wu G-F., Characterization of odor-active compounds in the head, heart, and tail fractions of freshly distilled spirit from Spine grape (*Vitis davidii* Foex) wine by gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry, Food Research International, Volume 137, 2020.
55. Lukić I., Miličević B., Banović M., Tomas S., Radeka S., Peršurić Đ., Aroma compounds in Marc Distillates, Food Technol. Biotechnol. 2011;49 (2):214-227
56. Šarolić M., Bosnić N., Friganović E., Delić Ž., Šuste M., Svalina T. i sur., Kemijska analiza hlapljivih spojeva tradicionalne rakije Anizete s otoka Korčula, Glasilo Future, Hrvatska, 2019.;2(5-6):48-57
57. Watts V.A., Butzke C.E., Analysis of microvolatiles in brandy: relationship between methylketone concentration and Cognac age, J Sci Food Agri, 2003. 83:1143-1149