

Poboljšanje aromatskog profila brazilskog pića cachaça

Grgić, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:757390>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Josipa Grgić

POBOLJŠANJE AROMATSKOG PROFILA BRAZILSKOG PIĆA CACHAÇA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Proces u prehrambenoj industriji

Tema rada je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018. održanoj 16. travnja 2018.

Mentor: izv.prof.dr.sc. Anita Pichler

Poboljšanje aromatskog profila brazilskog pića cachaça

Josipa Grgić, 449-DI, 2016.

Sažetak:

Cachaça je jako alkoholno piće dobiveno fermentacijom i destilacijom soka šećerne trske. Postupak proizvodnje cachaça je unazad nekoliko godina unaprijeđen, no aromatski profil ovoga pića se i dalje može poboljšati. Kao i kod vina, dio aromatskih komponenti se nalazi u samoj sirovini, a drugi dio nastaje alkoholnom fermentacijom, odležavanjem i njegovanjem. Također, na nastanak mnogih aromatskih spojeva utječe i vrsta i soj kvasca koji se koristi prilikom fermentacije. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi može li se korištenjem različitih sojeva kvasaca vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* i *Saccharomyces kudriavzevii* pozitivno utjecati na aromatski profil cachaça. *Saccharomyces cerevisiae* sojevi, inače korišteni za fermentaciju soka šećerne trske, ne omogućavaju stvaranje željene arome radi čega su se, prilikom istraživanja, koristili sojevi *Saccharomyces uvarum* i *Saccharomyces kudriavzevii* koji doprinose stvaranju aromatskih komponenti. Utvrđeno je da prilikom korištenja *Saccharomyces uvarum* i *Saccharomyces kudriavzevii* sojeva možemo poboljšati aromatski profil cachaça, ali da ovi sojevi nisu sposobni provesti fermentaciju u potpunosti. Nasuprot tome, *Saccharomyces cerevisiae* sojevi u potpunosti su završili fermentaciju, ali su dali manje koncentracije određenih aromatskih spojeva.

Ključne riječi: Cachaça, aromatski profil, fermentacija, kvasac

Rad sadrži:	49	stranica
	11	slika
	11	tablica
	51	literaturna referenca

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1.	prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. Anita Pichler	član-mentor
3.	prof. dr. sc. Jurislav Babić	član
4.	prof. dr. sc. Mirela Kopjar	zamjena člana

Datum obrane: 10.10.2018

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR- 31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title:

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its regular session no. VIII. held on April 16th, 2018.

Mentor: Anita Pichler, PhD associate prof.

Improvement of Aromatic Profile of Brazilian Drink Cachaça

Josipa Grgić, 449-DI, 2016.

Summary:

Cachaça is a alcoholic beverage obtained by fermentation and distillation of sugar cane juice. The cachaça production process has been improved for a few years, but the aromatic profile of this drink can still be improved. As with wine, some of the aromatic components are found in the raw material and the other part is formed by alcoholic fermentation, aging and nourishment. Also, the appearance of many aromatic compounds is influenced by the yeast specie and strain used during fermentation. The aim of this study was to determine whether the different strains of species *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces kudriavzevii* could positively affect the aromatic profile of cachaca. *Saccharomyces cerevisiae* strains, otherwise used for the fermentation of sugar cane juice, do not allow the formation of the desired aroma, for which, during the study, *Saccharomyces uvarum* strains and *Saccharomyces kudriavzevii* were used. It was found that when using *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces kudriavzevii* strains the aromatic profile of cachaca can improve but that these strains are not able to complete the fermentation. On the other hand, *Saccharomyces cerevisiae* strains have completely fermented but have given less concentration of certain aromatic compounds.

Key words: cachaca, aromatic profile, fermentation, yeast

Thesis contains:	49	pages
	11	figures
	11	tables
	51	references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Nela Nedić Tiban, PhD, full prof.	chair person
2. Anita Pichler, PhD, associate prof.	supervisor
3. Jurislav Babić, PhD full prof.	member
4. Mirela Kopjar, PhD, full prof.	stand-in

Defense date: October 10, 2017

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology
Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek

Prije svega, zahvalila bih se svojoj obitelji koja mi je tijekom ovih godina bila velika podrška i nekada satima, ne svojom voljom, slušala o raznim kemijskim spojevima, konzervama, vinima i ostalom. Zahvaljujem se mentoricama Amparo Mercedes Querol Simon i Lauri Pérez Través bez kojih ovaj rad ne bi postojao. Također, veliko hvala svim prijateljima koji su mi, uz obitelj, pružali ogromnu potporu i bodrili me u ostvarenju mojeg uspjeha.

I za kraj, od srca se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Aniti Pichler na uloženom trudu, vremenu i podršci.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	4
2.1. ŠEĆERNA TRSKA.....	5
Podrijetlo i uzgoj šećerne trske	5
Proizvodi od šećerne trske	6
2.2. CACHAÇA.....	6
Definicija.....	6
Proizvodnja.....	8
2.3. KEMIJSKI SASTAV.....	11
Etanol	12
Hlapljive kiseline.....	12
Aldehidi	12
Esteri.....	12
Viši alkoholi	13
Senzorska svojstva.....	13
2.4. KROMATOGRFSKE METODE.....	14
Plinska kromatografija (GC).....	14
Masena spektrometrija	16
SPME analiza	16
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. ZADATAK	20
3.2. MATERIJALI I METODE.....	20
Sojevi kvasaca i porijeklo kultura	20
Provedba fermentacije.....	21
HPLC analiza	24
GC analiza	25
Statistička analiza	26
4. REZULTATI	27
5. RASPRAVA	32
6. ZAKLJUČCI.....	36
7. LITERATURA.....	38

Popis oznaka, kratica i simbola

SPME	Solid Phase Microextraction (mikroekstrakcija na čvrstoj fazi)
GC	Plinska kromatografija
GC/MS	Plinska kromatografija s maseno-selektivnim detektorom
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

1. UVOD

Šećerna trska je biljka koja pripada u biljke porodice *Saccharum* i uobičajena je za područje jugoistočne Azije. Širenje islamske kulture značilo je uvođenje ove biljke na područja gdje još nije bila uzgajana. Tako je došla i na područja Europe, točnije na obalna područja između gradova Malaga i Motril, čineći to područje jedinim dijelom Europe u kojem je šećerna trska uspjela pustiti korijene. Kasnije, Španjolci su šećernu trsku odnijeli, najprije na Kanarsko otočje, a zatim i u Ameriku. Uzgojno područje ove kulture tada se proširilo na razne zemlje poput El Salvadora, Kube, Brazila, Meksika, Argentine, Perua i drugih zemalja Južne Amerike koje su među najvećim proizvođačima šećera u svijetu.

Šećerna trska je od velike ekonomske važnosti jer sok šećerne trske ima raznoliku primjenu u industriji. Sok stabilnije je glavni izvor šećera i također se može koristiti u proizvodnji etanola i alkoholnih pića kao što je cachaça, putem fermentacije; dok se vlakna, glavni sastojci bagase, mogu koristiti kao sirovi materijal za proizvodnju energije.

Cachaça je alkoholno piće slično rumu, proizvedeno fermentacijom i destilacijom šećerne trske te sadrži od 38 do 48 %vol. alkohola pri 20°C. Ovo piće je drugo najkorištenije alkoholno piće u Brazilu i treće u svijetu. Osim što sadrži visoke koncentracije alkohola također sadrži i velike količine etil estera, aldehida i organskih kiselina koji su odgovorni za različite okuse finalnog proizvoda (Cardoso i sur., 2004.). Esteri nastali iz organskih kiselina i alkohola tijekom fermentacije i sekundarne fermentacije imaju važnu ulogu u stvaranju senzorskih karakteristika koje dalje sudjeluju u formiranju bouqeta karakterističnog za alkoholna pića (Kłosowski i Czuprynski, 2006.).

Kemijski sastav šećerne trske može varirati zbog mnogih faktora, kao što su klimatski, fizikalni, kemijski i mikrobiološki uvjeti tla, vrsta i starost usjeva, faza zrelosti i mnogi drugi (Stupiello, 1987.).

Među faktorima koji utječu na fermentaciju su prehrambene potrebe kvasaca koji u najvećim količinama trebaju mineralne i organske tvari koje su uobičajeno prisutne u šećernoj trsci u nedovoljnim količinama (Cardoso, 2006.). Količina i dostupnost dušika kvascima je izravno povezana s proizvodnjom etanola i sekundarnih produkata koji definiraju aromatske karakteristike pića dobivenih fermentacijom. Upravo zbog ovoga, proizvođači uobičajeno koriste dodatke koji sadrže dušik, kako bi mošt bolje fermentirao. Alkoholna fermentacija u tradicionalnoj proizvodnji cachaçe je kompleksni mikrobni proces koji je

1. Uvod

karakteriziran pojavom različitih vrsta kvasaca sa velikom učestalošću pojave vrsta *Saccharomyces cerevisiae* (Pataro i sur., 2000.; Guerra i sur., 2001.; Schwan i sur., 2001.). *Saccharomyces cerevisiae* je dominantan kvasac tijekom alkoholne fermentacije zbog dobre tolerancije na osmotski stres i sadržaj alkohola. Prelaskom mnogih proizvođača cachaça s tradicionalnog postupka proizvodnje na industrijski postupak poboljšana je kvaliteta postupka proizvodnje, ali i konačnog pića. Jedino svojstvo koje se može poboljšati je aroma. Kao što je već prije objašnjeno, cachaça se proizvodi spontanom fermentacijom ili korištenjem pekarskog kvasca *S. cerevisiae* koji nije najbolji izbor ukoliko želimo poboljšati aromu nekog proizvoda.

Aromatične komponente, većinom, sintetiziraju *Saccharomyces cerevisiae* sojevi tijekom fermentacije. Unatoč tome, druge vrste koje pripadaju rodu *Saccharomyces*, poput *Saccharomyces kudriavzevii* i *Saccharomyces uvarum*, mogu biti od velikog interesa u proizvodnji arome. Neka istraživanja opisuju značajne razlike u utjecaju ovih dviju vrsta na kvalitetu arome alkoholnih pića u odnosu na *Saccharomyces cerevisiae* (Arroyo-Lopez i sur., 2010.; Combina i sur., 2012.; Gonzalez i sur., 2006.; Lopez-Malo i sur., 2013.; Naumov i sur., 2000., 2001.; Oliveira i sur., 2014.; Sampaio and Goncalves, 2008.; Tronchoni i sur., 2014.).

U prijašnjim istraživanjima promatrano je korištenje *S. uvarum* i *S. kudriavzevii* vrsta kako bi se poboljšao aromatski profil tijekom fermentacije vina (Gamero i sur., 2013.; Gamero i sur., 2014.). Međutim, podaci o korištenju drugih vrsta kvasaca tijekom fermentacije i proizvodnje cachaça nisu dostupni. Stoga je namjera ovoga rada karakterizacija fermentacijskih i senzorskih svojstava različitih sojeva *Saccharomyces cerevisiae*, kao i drugih vrsta poput *Saccharomyces uvarum* i *Saccharomyces kudriavzevii* tijekom fermentacije mošta šećerne trske kako bi se utvrdilo je li moguće poboljšanje aromatskog profila cachaça.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ŠEĆERNA TRSKA

Podrijetlo i uzgoj šećerne trske

Saccharum officinarum, odnosno šećerna trska (**Slika 1**) je biljka koja pripada porodici trava *Poaceae*. Šećerna trska je iz područja sjeveroistočne Azije došla do područja Europe i kasnije zemalja Južne Amerike. Tri najveća proizvođača šećerne trske su Brazil (25%), Indija (10%) i Kina (10%), koje zajedno predstavljaju skoro polovinu svjetske proizvodnje (FAO, 2009.). Iako je u prošlosti u zemljama jugoistočne Azije i Pacifika korištena isključivo za žvakanje, danas je to sirovina iz koje se dobiva oko 80% svjetske proizvodnje šećera (Sharpe, 1998.; FAO, 2009.).



Slika 1 Šećerna trska

<https://www.shutterstock.com/search/sugar%2Bcane>

Šećerna trska se najčešće uzgaja iz prethodno odsječenog dijela stabljike, a rjeđe iz sjemena (Babić, 2014.). Moguće ju je uzgojiti na raznim vrstama tla, ali idealno tlo koje pogoduje dobrom razvoju šećerne trske je mješavina pijeska, mulja i glinenih čestica obogaćenih s dovoljno organskih komponenti. Da bi se postigao dobar prinos, šećerna trska zahtjeva 2000 do 2300 mm oborina tijekom vegetacijskog razdoblja. Vegetacijsko razdoblje može trajati od 8 do 22 mjeseca ovisno o zemlji uzgoja (Pursegllove, 1979.). Još jedan od važnih faktora za uzgoj šećerne trske je i temperatura. Najniža temperatura za dobar rast šećerne trske je 20 °C, ali stalne niže temperature povoljno utječu na sazrijevanje stabljike i zadržavanje vode. Žetva šećerne trske može se provoditi ručno ili mehanički, a nakon žetve slijedi obrada (Yamana, 1998.).

Osim visokog udjela saharoze šećerna trska sadrži i različite minerale između ostalog željezo, kalcij, kalij, natrij, fosfor, magnezij, klor te vitamine D, B, C i A. U njenom sastavu može se pronaći glukoza, fruktoza, proteini, škrob, vosak, masne kiseline, tvari boje i antioksidansi (Furtado, 2014.).

Proizvodi od šećerne trske

Proizvodnja šećera kuhanjem šećerne trske otkrivena je u Indiji, najvjerojatnije u prvom tisućljeću prije Krista (Purseglove, 1979.). Osim šećera, od šećerne trske se dobiva melasa, slatki sirup ili falarnum, alkoholna pića rum i cachaça, bagasa (otpaci u preradi šećerne trske) i bioetanol (FAO, 2009.).

Melasa je nusprodukt proizvodnje šećera, odnosno preostali sirup iz kojeg se jednostavnim tehnikama ne može više dobiti kristalizirana saharoza. Postoje razne daljnje moguće primjene melase, a jedna od njih je u proizvodnji fermentiranih i destiliranih proizvoda. Melasa se, zajedno sa sokom šećerne trske i drugim nusproduktima, može fermentirati i destilirati kako bi se proizvelo alkoholno piće, rum. Etanol je još jedan proizvod dobiven od melase koji ima široku uporabu. Glavne namjene etanola su u proizvodnji octa, farmaceutskoj industriji, kozmetici, otapalima i sličnim proizvodima (Paturau, 1982.).

Drugi koristan nusprodukt proizvodnje šećera je bagasa. Bagasa je vlaknasti ostatak koji ostaje nakon što su sokovi iscjeđeni iz trske. To je glavni izvor goriva u tvornicama šećera, a također se može koristiti za izradu papira, kartona, ploča od vlakana i zidne ploče (Purseglove, 1979.).

2.2. CACHAÇA

Definicija

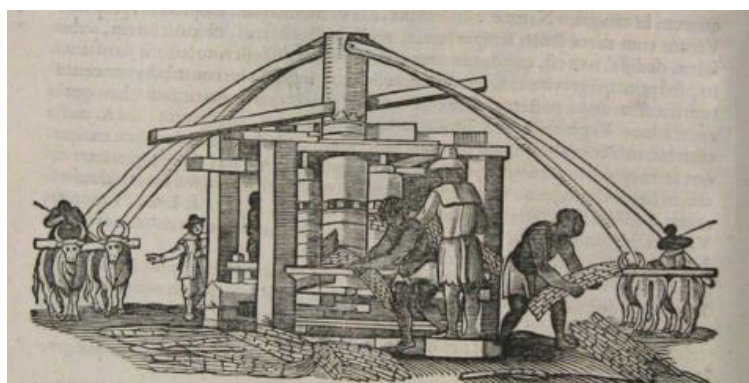
Cachaça je destilirano alkoholno piće koje ima 38 do 48% alkohola na 20°C, dobiveno destilacijom fermentiranog soka šećerne trske i može imati najviše 6 g dodanog šećera po litri, za korekciju okusa. Kada je dodana količina šećera od 6 g do 30 g po litri, piće se naziva "zaslađenom cachaçom" (Brazil, 1999.).

Povijest cachaçe započinje u 16. stoljeću kada su, zbog povećane potrošnje za šećerom u Europi, Portugalci kultivirali šećernu trsku u Brazilu, svojoj koloniji. Selo Saint Vincet se

2. Teorijski dio

smatra mjestom rođenja cachaça gdje se 1532. godine prvi put pojavljuju mlinovi za obradu šećerne trske (**Slika 2**). Robovi, koji su radili u proizvodnji, su otkrili da sok šećerne trske fermentiranjem poprima ugodnu voćnu aromu te su je nazvali "cachaza" ili "cagaça". Bistra, jaka i aromatična cachaça je zbog jednostavne proizvodnje i izobilja sirovine, privukla mnoge potrošače tadašnje brazilske populacije (de Souza i sur., 2013.). Najveći proizvođač ovog pića je Brazil. Brazilska proizvodnja cachaça se procjenjuje na $1,3 \cdot 10^9$ L godišnje.

Postoji nekoliko faktora koji utječu na kvalitetu destiliranih alkoholnih pića, kao što su početna sirovina, fermentacija i metoda provođenja fermentacije, destilacija i dozrijevanje. Unatoč tome, kvasci i uvjeti fermentacije pokazali su se najvažnijim čimbenicima koji utječu na okus ovog alkoholnog pića (Suomalainen, 1979.; Lehtonen i Jounela-Eriksson, 1983.).



Slika 2 Mlin za šećer (Historia Naturalis Brasiliae, 1648.)

Cachaça se često zamjenjuje s rumom, iako između ove dvije šećerne rakije postoje znatne razlike u proizvodnji i senzorskim svojstvima. Dok se cachaça proizvodi od fermentirane šećerne trske, rum se dobiva iz kuhanog mošta šećerne trske i melase. Također rezultati plinske kromatografije i deskriptivne senzorne analize pokazuju znatnu razliku u mirisu. Cachaça sadrži veću količinu eugenola, 2- feniletanola, etil-fenilacetata, 2,4-nonadienala i 4-guajakola, spojeva zbog kojih ima intenzivniji, začinski miris, miris po žitaricama, u odnosu na rum. Intenzivniji miris cachaça je posljedica načina proizvodnje i potječe od fermentiranog sirovog materijala (de Souza i sur., 2006.).

Proizvodnja

Mljevenje šećerne trske

Kako bismo oslobodili sok šećerne trske koji nam je potreban za fermentaciju, provodimo proces mljevenja. Sok se nalazi u spremišnom parenhimu stabljike, a mljevenjem se oslobađa. Mljevenje se vrši najkasnije 24 sata nakon berbe šećerne trske (Oliveria i sur., 2005.). Šećerna trska mora biti svježa, zrela, očišćena od lišća te isprana čistom vodom. Sok šećerne trske sadrži 75% do 82% vode i 18% do 25% šećera. Od ukupnog udjela šećera, fermentabilne šećere čine saharoza (11-18%), glukoza (0.2%-1%) i fruktoza (0%-0.6%) (Oliveira i sur., 2015.). Tijekom mljevenja potrebno je paziti da ne dođe do zagađenja soka šećerne trske sa uljima prisutnima na opremi mlina inače će tijekom fermentacije etanol razgraditi ulja i mogu nastati neželjeni nusprodukti. Nakon mljevenja dobiveni sok je potrebno filtrirati i dekantirati kako bi se uklonile dodatne nečistoće. Sok se filtrira kroz tanku mrežicu koja zaustavlja velike čestice, zaostale dijelove stabljike i lišće. Dobiveni sok je viskozna tekućina, smeđe ili zelene boje (de Souza i sur, 2013.).

Sok šećerne trske prolazi i kroz proces bistrenja kojim se skoro u potpunosti uklanjaju proteini i dio mineralnih tvari, te sok na kraju procesa sadrži otprilike 180-200 ppm dušika. U prosijeku, sok sadrži 200-600 ppm dušika, gdje se otprilike 60% dušika se nalazi u obliku amonijaka i aminokiselinskih komponenti. Ove komponente uključuju kiselinske amide (glutamin i asparagin), tvari velike molekularne mase (proteini) i aminokiseline (Johary i Sharma, 1984.).

Fermentacija

Nakon bistrenja, sok šećerne trske ide na fermentaciju. Za uspješnu fermentaciju, u dobivenom soku šećerne trske potrebna je koncentracija šećera od 14° do 16° brix. Zrela šećerna trska daje sok koncentracije 20° do 22° brix. Sok visoke koncentracije šećera u konačnici daje visoki postotak alkohola koji uzrokuje sporu ili nepotpunu fermentaciju. Previše razrijeđeni sok uzrokuje brzu fermentaciju, povišenu koncentraciju viših alkohola i veću opasnost od kontaminacije (de Oliveira i sur., 2005.).

2. Teorijski dio

Spremnici u kojima se odvija fermentacija su cilindrični i izrađeni od inoxa te im je visina dvostruko veća od promjera. Također, preporuča se uvođenje unutarnjeg ili vanjskog sistema hlađenja.

Odabir kvasaca temelji se na prethodnoj pripremi mošta, osobinama i stanju šećerne trske koja se koristi i željenim karakteristikama krajnjeg proizvoda. Najbolja je uporaba kvasaca koji su izolirani iz fermentirajućeg mošta soka šećerne trske. Sam proces fermentacije je sličan fermentaciji drugih pića koji zahtijevaju fermentaciju. Fermentacija započinje kada se mošt inokulira kvascima i odvija se u tri faze.

Preliminarna faza traje četiri sata i obilježava ju brzi umnožavanje stanica kvasaca, malo povećanje temperature i niska koncentracija proizvedenog ugljikovog dioksida. U glavnoj ili turbulentnoj fazi, koja može trajati 12 do 16 sati, nastaje najviše ugljikovog dioksida i pojavljuje se viskozna pjena (**Slika 3**). Temperatura, postotak alkohola i kiselost se povećavaju dok se gustoća smanjuje. Tijekom ove faze je najčešće potrebno primijeniti hlađenje uslijed povećanja temperature. Na kraju, tijekom završne faze, u periodu od 4 do 6 sati pad koncentracije šećera uzrokuje pad temperature i sniženje koncentracije ugljikovog dioksida.



Slika 3 Pojava viskozne pjene tijekom fermentacije

<http://www.gramadocanela.com.br/alambique-flor-do-vale/>

Proces fermentacije može se provoditi kontinuirano ili diskontinuirano iako većina proizvođača daje prednost diskontinuiranoj fermentaciji radi mogućnosti ponovne uporabe kvašćevih stanica koje se istalože iz mošta djelovanjem gravitacije (Lea i Piggott, 2003.). Melle-

2. Teorijski dio

Boinot je posebna vrsta diskontinuirane fermentacije gdje se stanice kvasca odvajaju centrifugiranjem te se tretiraju vodom i sumpornom kiselinom. Na taj način se uklanjaju stare stanice, a zadržavaju aktivne stanice spremne za novi ciklus fermentacije. Melle-Boinot fermentacijom povećava se prinos, skraćuje vrijeme procesa i smanjuje se bakterijska aktivnost (Furtado, 2014.). Nakon fermentacije treba odmah početi proces destilacije kako bi se izbjegli gubitci nastali uslijed isparavanja alkohola.

Destilacija

Destilacija je tehnološka operacija kojom se pomoću topline iz biotehnološki promijenjene podloge izdvajaju pojedinačni ili skupni hlapivi sastojci u obliku pare. Para se prolazom kroz hladilo kondenzira u destilat (Marić i Šantek, 2009.). Proizvod dobiven nakon fermentacije naziva se vino šećerne trske te sadrži male količine plinovitog ugljikovog dioksida i krute stanice poput ostataka kvašćevih stanica, minerala, soli, nefermentiranog šećera i druge nečistoće. Ovakvo vino šećerne trske se zatim podliježe procesu destilacije u bakrenim kotlovima (**Slika 4**). Destilacijom će se odvojiti sve nečistoće i dobit ćemo destilirani i koncentrirani proizvod. Proizvođači najčešće koriste diskontinuiranu i polu-kontinuiranu destilaciju (Lea i Piggott, 2003.).



Slika 4 Kotlovi za destilaciju

<http://tellura.com.br/en/history/>

Dozrijevanje

Cachaçu je nakon destilacije potrebno čuvati u bačvama od materijala koje neće negativno utjecati na dobiveni proizvod ili koji će ga dodatno oplemeniti. Najčešće se za čuvanje i

2. Teorijski dio

dozrijevanje koriste bačve od inoxa ili od drveta. Proces dozrijevanja je jedan od najbitnijih čimbenika tijekom proizvodnje koji utječu na kvalitetu proizvoda. Tijekom dozrijevanja dolazi do promjene boje i arome te smanjenja volumena i sadržaja alkohola. Vrijeme dozrijevanja ovisi o samom destilatu, podrijetlu i veličini drveta, njezi bačvi i prostoru u kojemu se nalaze. Dozrijevanjem se mijenja aroma pića zbog promjene u sastavu i koncentraciji određenih tvari. Do tih promjena dolazi zbog ekstrakcije tvari iz drveta, cijepanja makromolekula prisutnih u drvetu i ekstrakcije tih produkata u destilat, reakcija ekstrakta iz drveta, reakcija komponenata destilata, hlapljenjem određenih tvari (Capobiango i sur., 2012.). Tijekom dozrijevanja uočen je gubitak grubog okusa te pojava slatkastog okusa koji ublažava oštri okus alkohola (Canaway, 1983.; Cardello i Faria, 1999.). Dozrijevanje nije obavezan korak tijekom proizvodnje cachaça, ali značajno obogaćuje aromu pića.

Na tržištu se vrste cachaça razlikuju prema vremenu dozrijevanja. Prema Pravilniku dozrela cachaça sadrži minimalno 50% cachaça koja je dozrijevala u spremnicima od prikladnog drveta, maksimalnog kapaciteta od 700 litara, tijekom perioda ne manjeg od godine dana. Premium cachaça sadrži 100% cachaça koja je dozrijevala u spremnicima od prikladnog drveta, maksimalnog kapaciteta od 700 litara, tijekom perioda ne manjeg od godine dana. Ekstra premium cachaça je premium cachaça koja je dozrijevala tijekom perioda ne manjeg od tri godine.

Cachaça najčešće dozrijeva u hrastovim bačvama, iako to povećava troškove jer se moraju uvoziti. Bačve treba skladištiti u prostoru gdje se temperatura održava na 20°C, a udio vlage od 70% do 90%.

2.3. KEMIJSKI SASTAV

U kemijskom sastavu cachaça dominiraju voda i etanol, no tu su i druge tvari koje potječu od same sirovine te nusproizvodi procesa fermentacije, destilacije i dozrijevanja. Ukupno je prisutno više od stotinu tvari arome koje čine aromatski i alifatski alkoholi, etilni esteri, aldehidi i niz aromatskih komponenti uključujući terpene (Capobiango i sur., 2012.). Cachaça koja doprije na tržište sastavom mora odgovarati propisima koje je propisalo brazilsko ministarstvo poljoprivrede (MAPA) čime se osigurava kvaliteta pića, ali i ograničava količina štetnih tvari poput etil-karbamata. Mjerenjem koncentracije određenih spojeva nastalih tijekom dozrijevanja može se utvrditi autentičnost pića i provedenost procesa.

Etanol

Etanol je organska molekula male molekulske mase koja sadrži hidroksilnu skupinu. Poznat je i upotrebljavan još u pradavna vremena kao produkt anaerobnog vrenja ugljikohidrata (Pine i sur., 1984.). Završetkom destilacije cachaça sadrži između 38% i 54% v/v etanola, a tijekom dozrijevanja udio etanola se smanjuje uslijed isparavanja. Koliko će etanola ispariti ovisi o konstrukciji bačve i prostoru u kojemu se nalazi. Udio etanola se na početku smanjuje jer je etanol hlapljiviji od vode i drvo ga upije više. Kasnije će se udio ponovno povećati no i dalje će etanol isparavati uslijed utjecaja okolišnih čimbenika (Bortoletto i sur., 2016.).

Hlapljive kiseline

Hlapljive kiseline izražavaju se kao udio octene kiseline na 100 ml bezvodnog alkohola. Maksimalna dozvoljena količina je 150 mg octene kiseline na 100 ml alkohola. Octena kiselina je slaba organska kiselina koja je čest sastojak hrane. Nastaje tijekom fermentacije oksidacijom etanola uz prisutnost bakterija octene kiseline, a tijekom dozrijevanja povećava se udio organskih kiselina uslijed ekstrakcije iz drveta, hlapljenja etanola i vode, oksidacije etanola. Veća količina octene kiseline će dati finalnom proizvodu kiseli okus. Uz octenu kiselinu, pojavljuju se mliječna, propionska, valerijanska kiselina. One su u većim količinama također nepoželjne jer negativno utječu na aromu (Bortoletto i sur., 2016.).

Aldehidi

Aldehidi su organski spojevi koji sadrže karbonilnu skupinu i nastaju dehidrogenacijom alkohola. Maksimalna dozvoljena količina aldehida, izražena kao udio acetaldehida, iznosi 30 mg na 100 ml bezvodnog alkohola. Acetaldehid je intermedijer koji nastaje procesom razgradnje piruvata te je vrlo hlapljiva molekula i moguće ga je odvojiti na početku destilacije jer daje oporu notu. Aldehidi su normalni sastojci pića, ali često od njih potječe nepoželjna aroma. Količina i vrsta nastalih aldehida direktno je povezana sa sojem kvasca, uvjetima destilacije i dozrijevanja (Capobiango i sur., 2012.).

Esteri

Esteri su derivati karboksilnih kiselina i alkohola. Zaslužni su za veliki dio arome finalnog proizvoda. Maksimalna dopuštena količina ukupnih estera, izraženih kao udio etilacetata,

iznosi 200 mg na 100 ml bezvodnog alkohola. Nusprodukt su fermentacije, esterifikacije masnih kiselina i octene kiseline etanolom. Ove reakcije pospješuju oksidativni proces dozrijevanja i nastajanja aromatičnih estera (Capobiango i sur., 2012.).

Viši alkoholi

Viši alkoholi sadrže više od dva ugljikova atoma i nastaju od komponenti koje sadrže dušik koje kvasac koristi za rast. Maksimalna dozvoljena količina viših alkohola iznosi 360 mg na 100 ml bezvodnog alkohola. Ukupna količina viših alkohola je zbroj prisutnog propan-1-ola, izobutanola i izoamilnog alkohola. Proizvodnja viših alkohola povezana je s korištenim sojem kvasca. Viši alkoholi smanjuju u većim količinama kvalitetu cachaça jer uzrokuju povišenu vrijednost pH (Bortoletto i sur., 2016.).

Senzorska svojstva

Cachaça se nakon završenih procesa destilacije i dozrijevanja mora filtrirati. Nečistoće se uklanjaju centrifugiranjem, filtracijom pomoću aktivnog ugljena ili filtracijom pod tlakom. Finalni proizvod mora biti bistar, bez suspendiranih čestica i nečistoća. Zaostale nečistoće ukazuju došlo je do nepravilnog rukovanja tijekom destilacije, filtracije i skladištenja.

Viskoznost cachaça ocijenjuje se prema sposobnosti prijanjanja pića uz stijenke čaše. Svaka kvalitetna cachaça mora biti izrazito viskozna. Viskoznost potječe od glicerola, nusprodukta metabolizma kvasca. Viskoznost neće odgovarati standardima ako postoji prevelika količina sekundarnih komponenata, viših alkohola ili nije dobro provedena fermentacija i odijeljivanje frakcija.

Boja cachaça (**Slika 5**) može varirati i ovisi o procesu dozrijevanja, vrsti drveta, stanju bačvi i okoliša u kojemu su se skladištile. Cachaça koja nije dozrijevala bistra je i prozirna i često ju nazivaju bijela ili srebrna cachaça (prata, branca). Cachaça koja je dozrijevala u drvenim bačvama poznata je kao zlatna cachaça (ouro). Boja može biti manje ili više intenzivna i poprima nijanse od svijetlo smeđe, tamno smeđe, crvenkaste, svijetlo žute, zlatno žute i narančaste. Željena boja cachaça može se promijeniti dodatkom karamela.



Slika 5 Raspon boja cachace

<https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-734992447-cachaca-mineira-pinga-branca-amarela-jatoba-ouro-prata-coco- JM>

2.4. KROMATOGRAFSKE METODE

Kromatografske metode služe za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka u složenim smjesama. Svim kromatografskim tehnikama zajedničko je postojanje nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Plinovita ili tekuća mobilna faza nosi komponente uzorka kroz stacionarnu fazu, a odjeljivanje se temelji na razlikama u brzini kretanja komponenti kroz stacionarnu fazu (Primorac, 2007.).

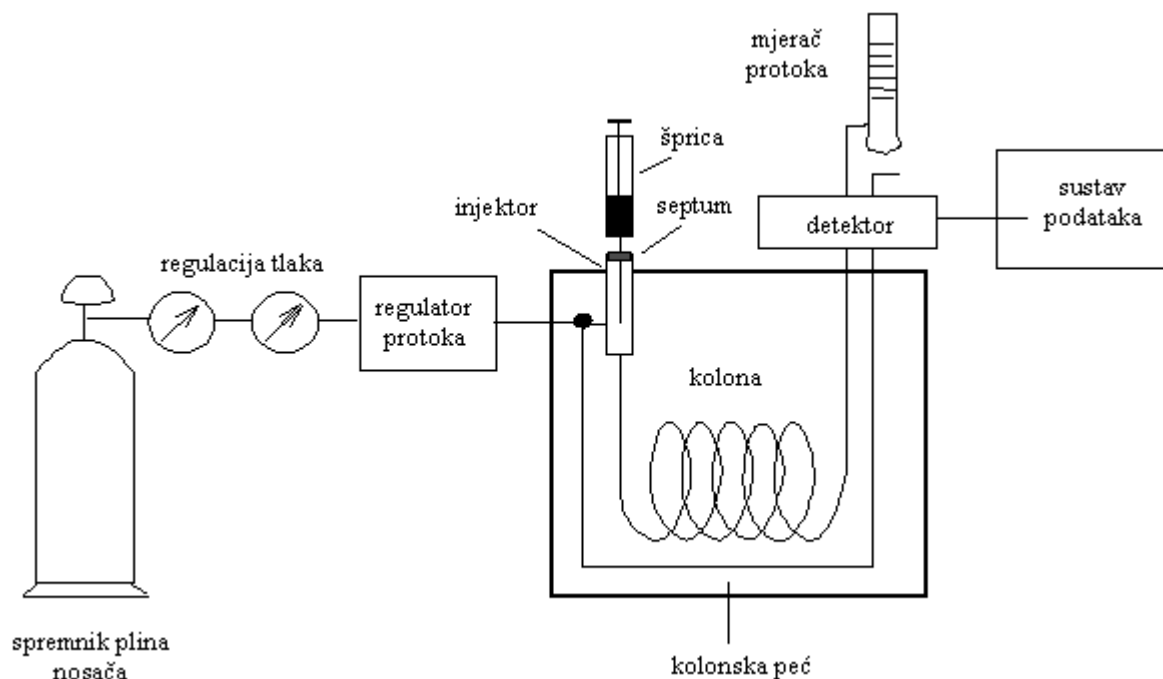
Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija je uobičajeni tip kromatografije korišten u analitičkoj kemiji za odvajanje i analizu spojeva koji se mogu isparavati bez razgradnje. Tipične upotrebe GC uključuju ispitivanje čistoće određene tvari, ili odjeljivanje različitih sastojaka smjese. U nekim situacijama, GC može pomoći u prepoznavanju spoja.

Kromatografska analiza ima dvije faze: mobilnu i stacionarnu. Mobilna faza nosi sastojke uzorka kroz stacionarnu fazu i u plinskom je stanju, dok je stacionarna faza kruti adsorbens ili tekućina nanosena na kruti nosač. Odjeljivanje faza temelji se na njihovim različitim brzinama.

Analit je otopljen na pokretnoj fazi i kreće se uzduž nepokretne faze, koja može biti u koloni ili na ravnoj plohi. Plin nositelj nema interakcija s analiziranim komponentama već služi isključivo kao transportno sredstvo (Primorac, 2007.).

Osnovni dijelovi plinskog kromatografa (**Slika 6**) su: izvor plina nositelja, regulator tlaka i protoka, injektor, kromatografska kolona, detektor i pislač.



Slika 6 Shematski prikaz plinske kromatografije

http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm

Uređaj za unošenje uzorka (injektor) predstavlja ulazni dio kolone. U injektor se uzorci obično unose pomoću injekcijske štrcaljke, kroz gumenu ili silikonsku membranu u zagrijani dio uređaja koji je smješten na vrhu kolone. Temperatura injektora mora biti dovoljno visoka da uzorak potpuno i brzo ispari (Primorac, 2007.).

Kolona je najvažniji dio kromatografa, a može biti staklena, metalna ili plastična, savijena tako da stane u termostimirani dio kromatografa. Osnovni zahtjev kod njenog odabira je dobra selektivnost koja ovisi o izboru krutog nosača, punjenju kolone te vrsti i količini selektivne tekućine. Kako bi razdvajanje uzorka plinskom kromatografijom bilo što bolje, selektivna tekućina mora biti: nehlapiva, termički stabilna, kemijski inertna prema sastojcima uzorka koji se analiziraju, te stabilna i dobro otapalo za sastojke uzorka.

Masena spektrometrija

Spektrometar masa je uređaj u kojem se molekule bombardiraju snopom elektrona bogatih energijom. Dolazi do ionizacije i cijepanja molekula u mnogo fragmenata, od kojih su neki pozitivno nabijeni ioni. Svaka vrsta iona ima određenu masu i naboj, odnosno određeni odnos m/e što je karakteristična veličina za tu vrstu iona. Niz iona se analizira na način da se dobije signal za svaku vrijednost m/e koja je prisutna. Intenzitet svakog signala prikazuje relativnu količinu iona koja daje taj signal. Osnovni signal je najviši signal ili maksimum (engl. peak). Intenzitet osnovnog signala označava se sa 100, te se obzirom na njegov intenzitet izražava intenzitet ostalih signala. Spektar masa je dijagram koji pokazuje relativne intenzitete signala za različite vrijednosti m/e . Za dokazivanje identičnosti dvaju spojeva i kao pomoć pri određivanju strukture novog spoja može poslužiti spektar masa. Dva spoja su identična ako su im jednake fizikalne konstante (talište, vrelište, gustoća).

U kombinaciji plinskog kromatografa i masenog spektrometra, plinskom kromatografijom se razdvajaju sastojci, a maseni spektrometar služi kao detektor.

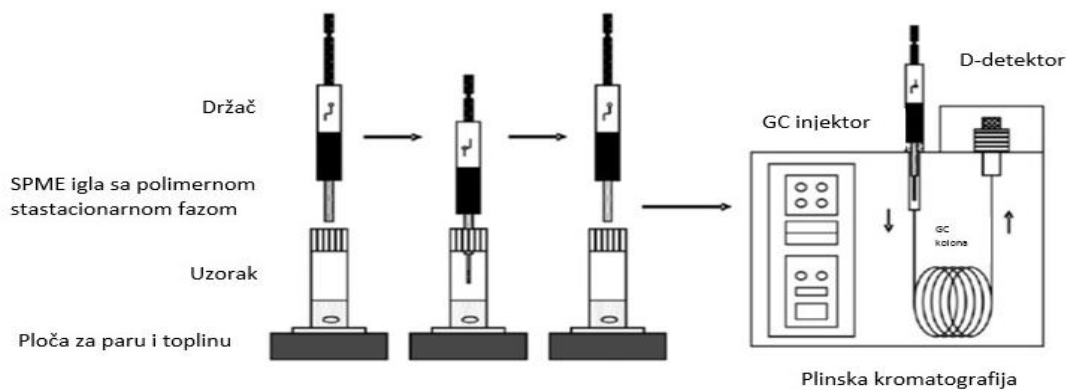
SPME analiza

Dugotrajna priprema uzoraka i upotreba organskih otapala, analitičke tehnike poput ekstrakcije tekuće – tekuće ili ekstrakcije na čvrstoj fazi nisu bile zadovoljavajuće i učinkovite, te su Zhang i Pawliszyn 1993. godine razvili novu tehniku pripreme uzoraka poznatu kao mikroekstrakcija na čvrstoj fazi ili tzv. SPME (engl. solid phase microextraction) tehnika. Ova tehnika se sve više primjenjuje za pripremu čvrstih i tekućih uzoraka poput vina, piva, voća, ulja i meda (**Slika 7**).

SPME se sastoji od dvije odvojene faze:

- apsorpcije - prilikom koje dolazi do zaostajanja analita na stacionarnoj fazi
- desorpcije

Za uspješan postupak obje faze moraju biti optimizirane. Na desorpciju utječu temperatura i vrijeme desorpcije, dok na ekstrakciju utječe tip uzorka, vrijeme ekstrakcije, ionska jakost, pH uzorka, temperatura ekstrakcije i mućkanje uzorka.



Slika 7 Shema provedbe SPME analize

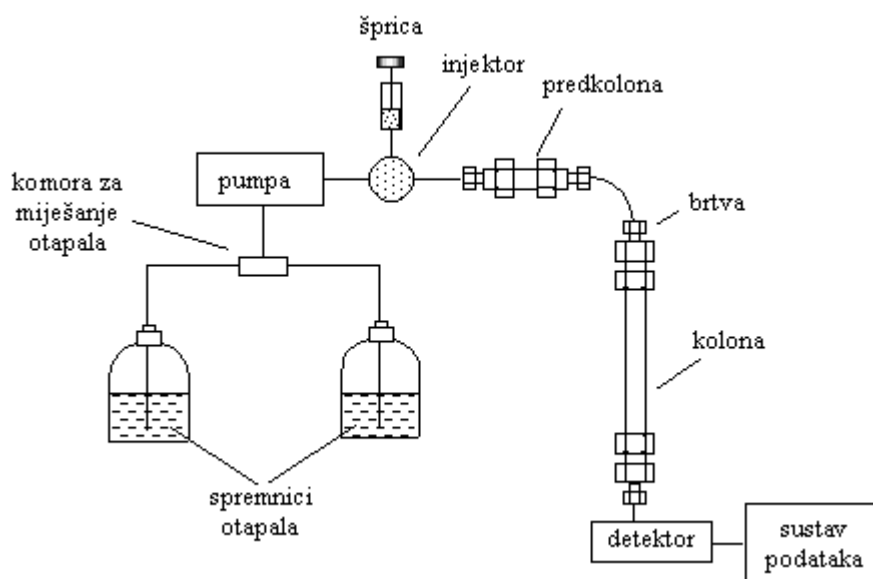
https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/5_AK2_ekstr_krom_elektro.pdf

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Djelotvornost prve metode kromatografije razvijene 1906.godine poboljšana je u ranim 1970-ima smanjenjem čestica punila i uvođenjem crpki za protiskivanje pokretne faze kroz sustav. Ovime je povećana djelotvornost (učinkovitost) razdvajanja komponenata uzorka, ali i tlak unutar samog sustava pa je danas uobičaj naziv za ovu metodu – visoko djelotvorna tekućinska kromatografija ili visoko tlačna tekućinska kromatografija (HPLC).

U području tekućinske kromatografije razlikuju se, obzirom na mehanizam odjeljivanja komponenata mnoge vrste od kojih se najčešće koristi razdjelna kromatografija. Kod razdjelne kromatografije razdvajanje komponenata uzorka ostvaruje se uglavnom na temelju njihove razlike u topivosti u mobilnoj, odnosno stacionarnoj fazi. Odjeljivanje komponenata uzorka postiže se promjenom brzine protoka mobilne faze, te promjenom sastava mobilne faze (Primorac, 2007.).

HPLC uređaj se sastoji od rezervoara s mobilnom fazom, pumpe, injektora, kolone, detektora i pisača (**Slika 8**).



Slika 8 Shema HPLC uređaja

http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je poboljšati aromatski profil cachaça korištenjem različitih sojeva kvasaca roda *Saccharomyces* tijekom fermentacije mošta šećerne trske. U tu svrhu se u moštu šećerne trske, nakon provedene fermentacije, odredio kvantitativni udio aromatičnih sastojaka primjenom instrumentalne plinske kromatografije i mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME). Osim aromatskog profila, ispitana je i brzina provedbe fermentacije različitih sojeva u svrhu dobivanja finalnog proizvoda koji ima željeni aromatski profil uz optimalnu brzinu fermentacije. Kinetika fermentacije određena je preko konzumacije šećera koja je bila analizirana uz pomoć tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

3.2. MATERIJALI I METODE

Sojevi kvasaca i porijeklo kultura

U svrhu ovog rada korištene su različiti sojevi roda *Saccharomyces* (**Tablica 1**). Navedene vrste su bile čuvane u GPY- agaru (kvašćev ekstrakt 0.5% w/v, pepton 0.5% w/v, glukoza 2% w/v, agar-agar 2% w/v).

Tablica 1 Popis korištenih sojeva

SOJ	VRSTA	PORIJEKLO
CAY 1007	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	šećerna trska - Brazil
CAY 1031	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	šećerna trska - Brazil
BMV 60	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	vino iz vinarije Murviedro - Valencia, Spain
CECT 12600	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Mistela - Alicante-Spain
BMV 58	<i>Saccharomyces uvarum</i>	vino iz vinarije Murviedro - Valencia, Spain
CR 85	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	hrast - Ciudad Real, Spain
Rte 3 A	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	hrast - Teruel, Spain
Rte 3 B	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	hrast - Teruel, Spain

Provedba fermentacije

Priprema mošta šećerne trske

Za pripremu mošta šećerne trske korišten je recept koji je prethodno razvijen u laboratoriju na Institutu za agrokemiju i znanost o hrani i tehnologiju (IATA, Valencia, Španjolska). Sastav mošta se temeljio na sastavu soka šećerne trske (**Tablica 2**) koji su opisali Prati i Camargo (2008.):

Tablica 2 Sastav mošta šećerne trske

SASTAV	KOLIČINA (g/L)
ŠEĆERI	
Glukoza	10
Fruktoza	10
Saharoza	210
KISELINE	
Jabučna	1,8
Limunska	8
MINERALI	
KH_2PO_4	0,75
K_2SO_4	0,5
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,155
NaCl	0,2
DUŠIČNE KOMPONENTE	
Otopina aminokiselina i NH_4Cl	30 ml/L

Sastav otopine aminokiselina (**Tablica 3**) razvijen je na temelju sastava soka šećerne trske koji su opisali Toit i sur. (1986.). Obzirom na to da se sastav aminokiselina i amonijaka ne mijenja značajno nakon postupka bistrenja, mošt mora posjedovati količinu dušika do 140 mg / L ili ppm.

Tablica 3 Sastav otopine aminokiselina i dodanog anorganskog dušika

SASTAV	KOLIČINA (g/1,5 L)
AMINOKISELINE	
Tirozin	1,115
Izoleucin	2,59
Asparaginska kiselina	6,17
Glutaminska kiselina	6,6
Arginin	2,695
Leucin	5,05
Treonin	0,245
Glicin	4,775
Alanin	4,395
Valin	4,265
Metionin	0,545
Fenilalanin	2,6
Serin	3,3
Histidin	0,99
Lizin	1,775
ANORGANSKI DUŠIK	
NH ₄ Cl	4,45

Otopina vitamina (**Tablica 4**) i elemenata u tragovima (**Tablica 5**) pripremljena je prema sastavu koji su opisali Verduyn i sur. (1992.). Smjesa je također sadržavala i željezo inače prirodno prisutno u moštu šećerne trske.

Tablica 4 Otopina vitamina (1000x)

SASTOJCI	KOLIČINA (g/L)
D-biotin	0,5
Ca-D-pantotenska kiselina	1
Nikotinska kiselina	1
Inozitol	25
Tiamin hidroklorid	1
Piridoksin hidroklorid	1
p-aminobenzoatna kiselina	0,20

Tablica 5 Otopina elemenata u tragovima (1000x)

SASTOJCI	KOLIČINA (g/L)
Na ₂ EDTA	15
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	4,5
MnCl ₂ × 2 H ₂ O	1
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,3
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,3
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,4
CaCl ₂ × 2H ₂ O	45
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	3
H ₃ BO ₃	1
KI	0,1

U mošt su dodani i faktori anaerobnosti (**Tablica 6**) koji su prethodno otopljeni u etanolu na temperaturi od 100 °C.

Tablica 6 Sastav anaerobnih faktora (1000x)

SASTOJCI	KOLIČINA (mg/L)
Tween 80	420
Ergosterol	10

Nakon miješanja sastojaka, mošt je doveden do željenog volumena nakon čega smo podesili pH na 5,4 . Zatim je provedena vakuum filtracija, kako bismo sterilizirali mošt, uz pomoć membrane s porama veličine 0,2 μm.

Fermentacija mošta šećerne trske

Fermentacije su provedene u bocama od 100 ml koje su sadržavale 80 ml mošta te su bile zatvorene Müller poklopcima. Mošt u svakoj boci zasebno je bio inokuliran sa određenom vrstom kvasca do željene populacije od $2 \cdot 10^6$ CFU/ml. Fermentacija je provedena u anaerobnim uvjetima na 28°C s miješanjem od 100 rpm. Svaki dan mjerene su mase boca, a fermentaciju smo smatrali završenom kada je masa boce bila konstantna barem tri dana. Za pojedinu korištenu vrstu kvasaca postojale su tri paralele.

3. Eksperimentalni dio

Prije namještanja krivulja, podaci o gubitku na masu su bili pretvoreni u % konzumiranog šećera prema **formuli (1)** (Pérez-Través i sur., 2015.):

$$C = \frac{m \cdot (S-R)}{mf \cdot S} \cdot 100 \quad (1)$$

gdje je: C - postotak konzumiranog šećera pri svakom uzorkovanju [%],
 m - vrijednost gubitka mase prilikom uzorkovanja [g],
 S - koncentracija šećera u moštu na početku eksperimenta [g/L],
 R - konačna koncentracija šećera u fermentiranom moštu [g/L],
 mf - vrijednost ukupnog gubitka na masi na kraju fermentacije [g].

Namještanje krivulja smo napravili koristeći Gompertz jednadžbu uz promjenu parametara koju su predložili Zwietering i suradnici (1990.) u obliku **formule (2)**:

$$y = D \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{\max} \cdot e}{D} \cdot (\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (2)$$

gdje je: y - postotak konzumiranog šećera [%],
 D - maksimalna postignuta vrijednost konzumacije šećera [%],
 μ_{\max} - maksimalna stopa konzumacije šećera (h^{-1}),
 λ - period lag faze prilikom koje nije promatrana konzumacija šećera (h).

Podaci su podešeni koristeći nelinearni regresijski model programa Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), minimizirajući sumu kvadrata razlike između eksperimentalno dobivenih podataka i podešenog modela. Adekvatnost je provjerena omjerom varijance objašnjenim modelom (R^2) u odnosu na eksperimentalne podatke.

HPLC analiza

Postupak pripreme uzorka:

Nakon završene fermentacije, odvojili smo dio uzorka i centrifugirali ga. Supernatant smo zatim koristili za analiziranje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) kako bismo utvrdili količinu preostalih šećera (saharoze, glukoze i fruktoze), glicerola, etanola i organskih kiselina. Odvojeni supernatanti su bili razrijeđeni u omjeru 1:5, filtrirani kroz najlon

3. Eksperimentalni dio

filter veličine pora 0.22 μm (Symta, Madrid, Spain) te injicirani u duplikatima (Pérez-Través i sur., 2015.). Korišteni kromatograf, Thermo chromatograph (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) sadržavao je detektor s indeksom loma (refrakcije), a kolona je imala slijedeća obilježja: HyperREZTM XP Carbohydrate H+ 8 μm (Thermo Fisher Scientific) zaštićena HyperREZTM XP Carbohydrate Guard (Thermo Fisher Scientific).

Uvjeti rada tekućinskog kromatografa:

- pokretna faza: H_2SO_4 1.5 mM
- protok: 0.6 ml/min
- temperatura: 50°C

Za utvrđivanje koncentracije saharoze koristili smo olovnu kolonu (Hi-Plex Pb, 300 x 7.7 mm, Agilent Technologies) u kojoj su vladali slijedeći uvjeti :

- pokretna faza : mQ H_2O
- protok: 0.6 ml/min
- temperatura: 50°C.

GC analiza

Postupak pripreme uzorka:

Po završetku fermentacije, odvojili smo 5 mL svakog uzorka i centrifugirali ga. Odvojeni supernatant koristili smo za daljnje analize. U epruveti smo odvagali 0,35g NaCl-a te dodali 1,5 mL odvojenog supernatanta i 20 μL 2-heptanona (0.05% w/v) koji smo koristili kao standard. U epruvetu smo ubaci magnet, te ju hermetički zatvorili teflonskim čepom i miješali na magnetnoj miješalici 2 sata. Nakon miješanja, iglu smo ispustili u nadprostor uzorka. Adsorpcija se provodila na sobnoj temperaturi 7 minuta. Po završetku adsorpcije igla s adsorbiranim sastojcima odmah se stavlja u injektor plinskog kromatografa te slijedi njihova toplinska desorpcija.

Aromatične komponente bile su odvojene u uređaju za plinsku kromatografiju - Thermo TRACE GC ULTRA kromatograf (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), sa plamen-ionizacijskim detektorom (FID) i HP-INNOWAX 30 m \times 0.25 mm kapilarnom kolonom premazanom sa 0.25 μm debelim slojem umreženog polietilen glikola (Agilent Technologies Inc.). Kromatografski signal sniman je HP Vectra QS/16S detektorom. Vrijeme zadržavanja

3. Eksperimentalni dio

eluiranih pikova su uspoređeni sa komercijalnim standardima za više alkohole i estere. Koncentracije, u $\mu\text{g/ml}$, kvantificirane su grafičkim kalibracijama (R^2 vrijednosti > 0.99) standarda.

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

Parametri ekstrakcije:

- Temperatura ekstrakcije: 28 °C
- Vrijeme ekstrakcije: 7 minuta
- Tip mikroekstrakcijske igle: 65 μm PDMS (Supelco).

GC-MS analitički uvjeti:

Kolona: HP5; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (Agilent)

- Početna temperatura: 60 °C (5 minuta)
- Temperaturni gradijent: 5 °C/min

Plin nosač: helij s protokom 1 mL/min

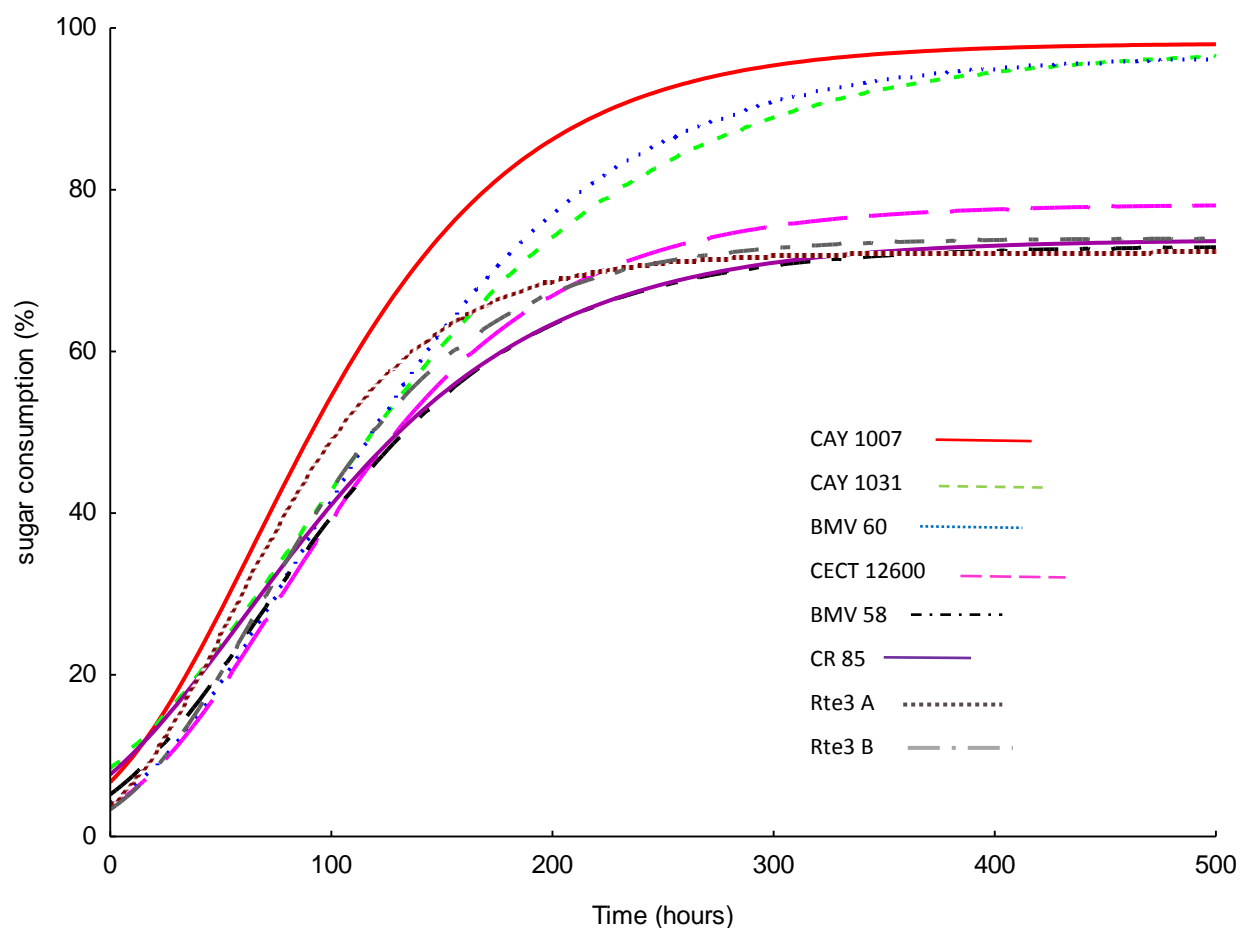
- Konačna temperatura: 230 °C
- Temperatura injektora: 220 °C
- Temperatura detektora: 280 °C
- Desorpcija uzorka u injektor: 4 min

U izradi kromatografske analize korišten je splitless mod.

Statistička analiza

Kinetički parametri te podaci dobiveni tekućinskom i plinskom kromatografijom analizirani su u programu STATISTICA 7.0 software package (Hilbe, 2007), te je provedena jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i Tukey test za usporedbu. Podaci dobiveni plinskom kromatografijom također su obrađeni i PCA analizom u programu STATISTICA 7.0 software package.

4. REZULTATI



Slika 9 Kinetika fermentacije u moštu šećerne trske

Tablica 7 Kinetički parametri tijekom fermentacije mošta šećerne trske

SOJ	V_{max} (%/sat)	t50 (sat)	t95 (sat)
CAY1007	0.55 ± 0.01^e	91.05 ± 1.71^a	291.82 ± 13.85^a
CAY1031	$0.39 \pm 0.01^{a,b}$	118.71 ± 1.22^c	416.7 ± 12.99^b
BMV60	$0.47 \pm 0.01^{c,d}$	118.79 ± 1.67^c	399.26 ± 14.47^b
CECT 12600	$0.43 \pm 0.01^{b,c}$	$129.13 \pm 1.53^{c,d}$	-
BMV58	$0.39 \pm 0.03^{a,b}$	133.4 ± 9.01^d	-
CR85	0.37 ± 0.01^a	130.55 ± 4.05^d	-
RTe3-A	0.54 ± 0.01^e	102.38 ± 0.9^b	-
RTe3-B	0.47 ± 0.02^d	118.96 ± 3.05^c	-

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. One vrijednosti kolone koje ne dijele isto slovo u eksponentu se značajno razlikuju (ANOVA i Tukey HSD test, $\alpha=0.05$, $n=2$).

Tablica 8 Sadržaj neprevrelog šećera na kraju fermentacije šećerne trske

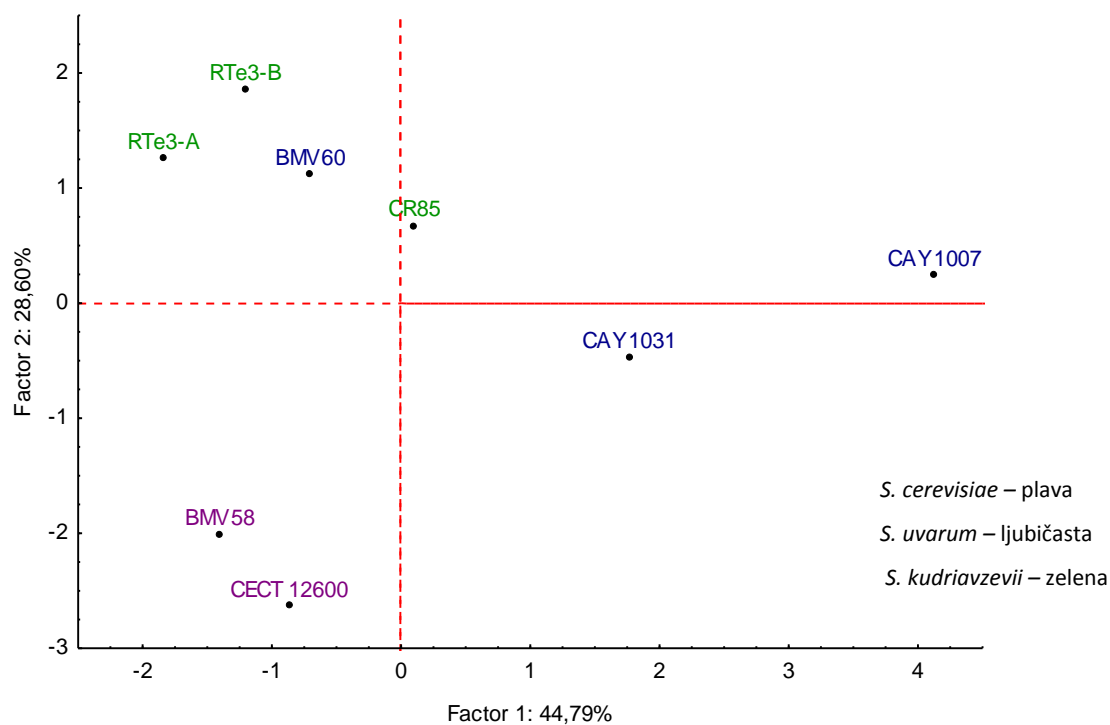
SOJ	Saharoza (g/L)	Glukoza (g/L)	Fruktoza (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (% v/v)
CAY1007	0.62±0.01 ^b	0±0 ^a	0.57±0.04 ^a	9.29±0.08 ^f	14.55±0.05 ^e
CAY1031	0±0 ^a	0.09±0.08 ^a	2.66±0.38 ^{a,b}	9.95±0.1 ^g	13.92±0.11 ^d
BMV60	0.73±0.05 ^c	0.4±0.11 ^a	5.41±1.1 ^b	7.84±0.07 ^{c,d}	14.08±0.14 ^d
CECT 12600	1.2±0.07 ^{e,f}	12.22±1.95 ^b	50.06±2.14 ^c	8.21±0.13 ^e	10.6±0.27 ^c
BMV58	1.12±0.02 ^e	19.13±0.95 ^c	56.95±1.08 ^e	8.13±0.19 ^{d,e}	9.56±0.12 ^{a,b}
CR85	0.86±0.02 ^d	21.64±1.22 ^{c,d}	53±1.09 ^{c,d}	6.45±0.19 ^a	9.93±0.14 ^b
RTe3-A	1.31±0.04 ^g	26.12±0.49 ^e	56.65±0.36 ^e	7.19±0.13 ^b	9.2±0.08 ^a
RTe3-B	1.24±0.01 ^{f,g}	23.13±1.27 ^d	53.29±0.85 ^d	7.69±0.06 ^{a,b}	9.55±0.16 ^{a,b}

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. One vrijednosti kolone koje ne dijele isto slovo u eksponentu se značajno razlikuju (ANOVA i Tukey HSD test, $\alpha=0.05$, $n=2$).

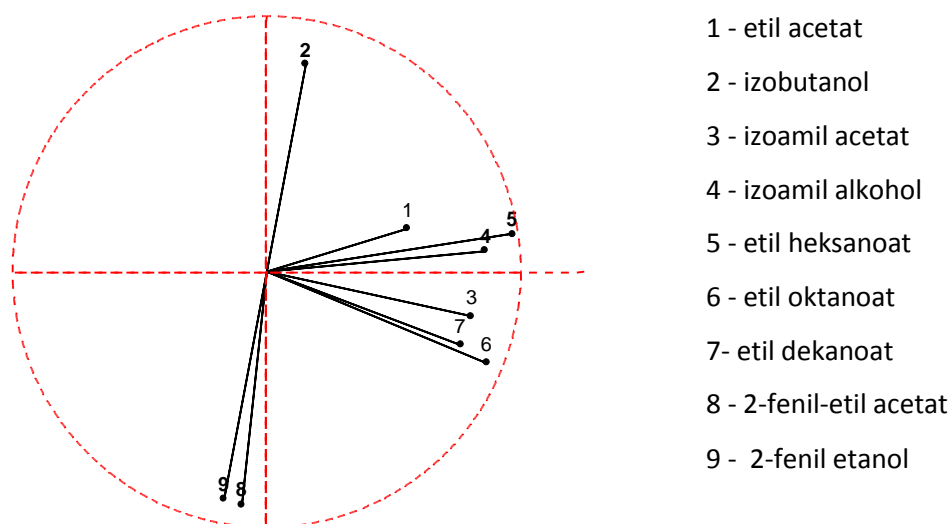
Tablica 9 Sadržaj organskih kiselina na kraju fermentacije šećerne trske

SOJ	L-jabučna kiselina (mg/L)	Jantarna kiselina (mg/L)	Mliječna kiselina (mg/L)	Octena kiselina (mg/L)
CAY1007	4.01±0.04 ^e	1.46±0.1 ^{a,b}	0.11±0.03 ^a	0.58±0.02 ^{c,d}
CAY1031	4.73±0.08 ^f	1.64±0.03 ^{a,b}	0.16±0.01 ^a	0.79±0.01 ^e
BMV60	2.95±0.04 ^{b,c}	0.54±0.03 ^a	0.05±0.05 ^a	0.85±0.02 ^e
CECT 12600	3.52±0.19 ^d	10.09±1.65 ^c	0.36±0.05 ^b	0.17±0.01 ^a
BMV58	3.94±0.13 ^e	12.41±0.56 ^d	0.37±0.03 ^b	0.5±0.03 ^c
CR85	2.36±0.04 ^a	3.13±0.04 ^b	0.93±0.07 ^c	0.39±0.03 ^b
RTe3-A	2.91±0.07 ^b	1.62±0.06 ^{a,b}	0.95±0.03 ^c	0.52±0.03 ^{c,d}
RTe3-B	3.2±0.08 ^c	1.57±0.14 ^{a,b}	1.03±0.03 ^c	0.61±0.08 ^d

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. One vrijednosti kolone koje ne dijele isto slovo u eksponentu se značajno razlikuju (ANOVA i Tukey HSD test, $\alpha=0.05$, $n=2$).



Slika 10 PCA analiza aromatskog profila brazilskog pića cachaça. (Projekcija sojeva na faktorsku ravninu razgraničenu faktorima 1 i 2.).



Slika 11 PCA analiza aromatskog profila brazilskog pića cachaça. (Projekcija varijabli na faktorsku ravninu.)

Tablica 10 Aromatski spojevi nastali alkoholnom fermentacijom u brazilskom piću cachaça

SOJ	Etil acetat (mg/L)	Izoamil acetat (mg/L)	2-fenil-etil acetat (mg/L)	Kaprilna kiselina (mg/L)	Etil oktanoat (mg/L)	Etil dekanoat (mg/L)	Ukupni esteri (mg/L)	Izobutanol (mg/L)	Izoamil alkohol (mg/L)	2-fenil etanol (mg/L)	Ukupni alkoholi (mg/L)
CAY1007	66.48±1.8 ^{b,c}	0.47±0.02 ^d	0±0 ^a	0.14±0.01 ^e	0.1±0.01 ^d	0.52±0.02 ^e	67.71	232.62±8.27 ^{b,c}	598.24±10.65 ^b	129.12±10.67 ^{c,d}	959.98
CAY1031	38.06±5.51 ^a	0.69±0.04 ^e	0.45±0 ^b	0.1±0 ^d	0.05±0 ^c	0.17±0.01 ^{a,b}	39.52	196.09±22.46 ^{a,b}	631.55±42.5 ^b	132.31±25.47 ^{c,d}	959.95
BMV60	73.75±11.67 ^c	0.24±0.03 ^c	0±0 ^a	0.03±0.01 ^{a,b}	0.02±0 ^a	0.16±0.02 ^{a,b}	74.20	173.51±28.91 ^{a,b}	294.36±47.74 ^a	25.16±6.32 ^a	493.03
CECT 12600	39.64±1.12 ^a	0.21±0 ^{b,c}	0.73±0.14 ^c	0.03±0 ^{a,b}	0.05±0.01 ^{b,c}	0.24±0.02 ^{c,d}	40.90	131.05±2.26 ^a	331.31±7.85 ^a	312.35±0.02 ^e	774.71
BMV58	27.58±0.55 ^a	0.14±0.01 ^{a,b}	0.41±0.02 ^b	0.02±0 ^a	0.05±0 ^{b,c}	0.26±0.01 ^d	28.46	161.88±2.9 ^{a,b}	265.87±11.78 ^a	359.61±19.65 ^e	787.36
CR85	44.56±2.85 ^{a,b}	0.19±0.04 ^{b,c}	0±0 ^a	0.07±0.01 ^c	0.04±0 ^{a,b}	0.19±0.01 ^{b,c}	45.05	213.59±2.91 ^{b,c}	530.26±17.47 ^b	180±50.65 ^d	923.85
RTe3-A	24.76±4 ^a	0.06±0.01 ^a	0±0 ^a	0.04±0.01 ^{a,b}	0.02±0 ^a	0.12±0.02 ^a	25.00	224.7±25.49 ^{b,c}	312.48±27.48 ^a	84.41±0.51 ^{a,b}	621.59
RTe3-B	28.98±10.06 ^a	0.1±0 ^a	0±0 ^a	0.05±0.01 ^{b,c}	0.03±0.01 ^a	0.14±0.02 ^{a,b}	29.30	290.82±42.65 ^c	338.33±49.36 ^a	93.49±0.6 ^{a,b}	722.64

5. RASPRAVA

Cachaça je brazilsko alkoholno piće proizvedeno tradicionalnim tehnikama. Danas, proizvođači cachaçe pokušavaju poboljšati ovo piće koristeći industrijski pristup u proizvodnji. Tijekom sedamdesetih godina uvedena je inokulacija vina te je nakon uvođenja ovog procesa primijećeno da je proizvedeno vino ujednačenije kvalitete. Ovakvu ujednačenost krajnjeg proizvoda žele postići i proizvođači cachaçe. Međutim, postoji vrlo malo informacija o cachaçi i uporabi različitih vrsta kvasaca u proizvodnji tog brazilskog pića.

U proizvodnji cachaçe tradicionalno se koriste kvasci *Saccharomyces cerevisiae*. Za ovaj diplomski rad korištena su dva soja *Saccharomyces cerevisiae* koja se koriste u proizvodnji cachaçe, CAY 1007 i CAY 1031, ali je korišten i soj BMV 60 uobičajen u proizvodnji vina. Osim sojeva *S. cerevisiae* korišteni su i sojevi *S. uvarum* i *S. kudriavzevii* zbog mogućnosti tvorbe poželjnih aromatičnih svojstava (Arroyo-Lopez i sur., 2010.; Combina i sur., 2012.; Gonzalez i sur., 2006.; Lopez-Malo i sur., 2013.; Naumov i sur., 2000., 2001.; Oliveira i sur., 2014.; Sampaio i Goncalves, 2008.; Tronchoni i sur., 2014.).

Navedeni sojevi vrste *S. kudriavzevii* i *S. uvarum* nisu dovršili fermentaciju mošta šećerne trske zbog niže tolerancije veće količine etanola (Arroyo-López i sur., 2010.), dok su sojevi *S. cerevisiae* završili fermentaciju upravo zbog karakteristike ove vrste da podnosi veće količine etanola. Usprkos nemogućnosti da dovrši fermentaciju, prema brzini fermentacije, odnosno postotku previranja šećera po satu fermentacije, utvrđeno je podjednako djelovanje kvasaca *S. kudriavzevii* soja RTe3 A i *S. cerevisiae* soja CAY 1007. Oba kvasca pokazala su nisku toleranciju na veće količine etanola te nesposobnost održavanja iste brzine fermentacije tijekom dužeg vremenskog perioda (**Tablica 7**). Kvasci soja *S. cerevisiae* dovršili su fermentaciju, jer su po završetku fermentacije ostavili približno 7 g/L neprevrelog šećera, dok su sojevi kvasaca *S. kudriavzevii* i *S. uvarum* ostavili i više od 50 g/L (**Tablica 8**).

Glicerol je polialkohol blago slatkog okusa koji u alkoholnim pićima pojačava intenzitet okusa (Jones i sur., 2008.; Omori i sur., 1995.), suzbija hrapavost pića (Jones i sur., 2008; Peleg i sur., 1999) te utječe na hlapljivost arome (Jones i sur., 2008.; Perpete i Collin, 1999.; Perpete i Collin, 2000.) što ga čini poželjnim produktom fermentacije. Iz **Tablice 8** vidljivo je da je kvasac soja CR 85 s najnižom proizvodnjom glicerola, dok su sojevi CAY 1031 i CAY 1007 proizveli najviše količine glicerola. Unatoč njihovoj nemogućnosti da završe fermentaciju, *S. uvarum* sojevi proizveli su približno 8, 15 g/L glicerola, od kojih je najveće količine proizveo

soj BMV 60 (~7,8 g/L). Nadalje, iz **Tablice 8** vidljivo je i da su sojevi koji su uspješno završili fermentaciju dosegli koncentracije od 14 do 14,5 % v/v etanola.

Analiza organskih kiselina (**Tablica 9**) pokazala je da je kvasac soja CAY 1031 proizveo najveće količine jabučne kiseline, nakon kojeg slijede kvasci sojeva BMV 58 i CAY 1007 dok je kvasac soja CR 85 proizveo najniže količine jabučne kiseline. *S. cerevisiae* i *S. kudriavzevii* sojevi proizveli su niske količine jantarne kiseline (~ 1,5 mg/L) u usporedbi sa *S. uvarum* sojevima (~ 11 mg/L). Proizvodnja mliječne kiseline ovisna je o vrsti kvasaca, stoga je vidljivo da su sojevi *S. cerevisiae* vrste proizveli najmanje količine, sojevi *S. uvarum* vrste srednje količine i sojevi *S. kudriavzevii* vrste najveće količine mliječne kiseline. Podaci u **Tablici 8** pokazuju da su kvasci sojeva CAY 1031 i BMV 60 proizveli najviše octene kiseline, dok je soj CECT 12600 proizveo najmanje količine iste kiseline.

Esteri, nastali tijekom fermentacije, zaslužni za aromu i okus fermentiranih pića dijele se u dvije skupine. Prvu skupinu čine acetatni esteri čiju kiselinsku grupu čini acetat, a alkoholna grupa je etanol ili neki drugi kompleksni alkohol nastao metabolizmom aminokiselina. Drugu skupinu čine etil esteri masnih kiselina gdje je alkoholna grupa etanol, a kiselinska grupa masna kiselina. Skupini acetatnih estera pripadaju etil acetat, izoamil acetat i 2-fenil-etil acetat, a skupini etil estera pripadaju etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanat (Saerens i sur., 2010.). Iz **Tablice 11** vidljivo je koje arome daje pojedini ester tijekom fermentacije.

Tablica 11 Opis spojeva i pripadajućih aroma (Swiegers i Pretorius, 2005.).

SPOJ	OPIS AROME
Etil acetat	Voćna
Izoamil acetat	Banana, kruška
Fenil-etil acetat	Ruže, cvjetna
Etil heksanoat	Zelena jabuka
Etil oktanoat	Slatki sapun, jabuka
Etil dekanat	Cvjetna, sapun

Etil acetat je glavni ester u alkoholnim pićima i najčešće se nalazi u najvećim količinama, a daje voćnu i slatkastu aromu (Robinson, 2006.). Analizirajući aromatski profil upotrijebljenih kvasaca za fermentaciju mošta šećerne trske (**Tablica 10**) vidljivo je da je najveće količine etil acetata proizveo kvasac soja BMV 60, a najmanje RTe3 A. Sojevi CAY 1007 i CAY 1031 su proizveli najveću količinu izoamil acetata, izoamil alkohola, etil heksanoata i etil oktanoata (**Slika 11**), dok su ostali sojevi proizveli vrlo male količine ovih spojeva. Izobutanol je u najvećoj količini proizveo soj RTe3 B dok je soj CECT 12600 proizveo najmanju količinu navedenog alkohola. Dva soja *S. kudriavzevii* vrste, RTe3 A i RTe3 B, proizvele su najmanje količine izoamil acetata, etil oktanoata i etil dekanata. *S. uvarum* soj CECT 12600 je proizveo najveću količinu 2-fenil-etil acetata, dok su oba soja CECT 12600 i BMV 58 proizveli najveće količine 2-fenil etanola (**Slika 11**).

Ovi podaci mogu se sažeti PCA analizom iz koje je vidljivo da su oba korištena soja *S. uvarum* slična u proizvodnji aromatskih komponenti, dok *S. cerevisiae* soj BMV 60 više nalikuje *S. kudriavzevii* sojevima (**Slika 10**). Također je vidljivo da kvasci sojeva, uobičajeno korišteni u proizvodnji cachaçe, CAY 1007 i CAY 1031 proizvode najviše aromatskih komponenti. Upotrebom soja CAY 1007 nastaje više tvari arome od fermentacije sa sojem CAY 1031.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Sojevi *Saccharomyces kudriavzevii* i *Saccharomyces uvarum* nisu sposobni samostalno dovršiti fermentaciju mošta šećerne trske.
- Primjenom sojeva *Saccharomyces kudriavzevii* i *Saccharomyces uvarum* moguće je modulirati stvaranje aromatskih spojeva i na taj način mijenjati aromatski profil cachaçe.
- Iako sojevi *Saccharomyces kudriavzevii* i *Saccharomyces uvarum* nisu sposobni dovršiti fermentaciju, pogodni su za hibridizaciju sa sojevima *Saccharomyces cerevisiae* koji se koriste u proizvodnji cachaçe ili ko-inokulaciju kako bi se omogućila potpuna provedba fermentacije uz poboljšanje aromatskog profila tog brazilskog pića.

7. LITERATURA

- Arroyo-López FN, Orlic S, Querol A, Barrio E: Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology* 131: 120-127, 2009.
- Arroyo-Lopez FN, Pérez-Torrado R, Querol A, Barrio E: Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from that exhibited by *Saccharomyces cerevisiae* and their hybrid. *Food Microbiology* 27:628–637, 2010
- Bortoletto AM, Correa AC, Alcarde AR: Aging practices influence chemical and sensory quality of cachaça. *Food research international* 86: 46-53, 2015.
- Babić J: *Sirovine biljnog podrijetla (šećerna repa i šećerna trska)*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2014.
- Brasil, Leis, Decretos, etc. Decreto n° 4072 de 3 de janeiro de 2002. *Diário Oficial da União*, 4 de janeiro de 2002.
- Canaway PR: Sensory aspects of whisky maturation. U *Flavour of distilled Beverages*. Origin and Development, Piggott, J.R. (ed), Ellis Horwood, Chichester, UK, 183-189, 1983.
- Capobiango M, Oliveira ES, Cardeal ZL: Evaluation of Methods Used for the Analysis of Volatile Organic Compounds of Sugarcane (Cachaça) and Fruit Spirits. *Food Anal. Methods* 6: 978–988, 2013.
- Cardoso DR, Sobrinho LGA, Lima-Neto BS, Franco DW: A rapid and sensitive method for dimethylsulphide analysis in Brazilian sugar cane sugar spirits and other distilled beverages. *J. Braz. Chem. Soc.* 15:277–281, 2004.
- Cardoso MG: *Produção de aguardente de cana de açúcar*. (eds) UFLA. Lavras, Brazil, 264, 2006.
- Combina M, Pérez-Torrado R, Tronchoni J, Belloch C, Querol A: Genome-wide gene expression of a natural hybrid between *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* under enological conditions. *Int. J. Food Microbiology* 157:340-345, 2012.
- De Souza MDCA, Vásquez P, Del Mastro NL, Acree TE, Lavin EH: Characterization of Cachaça and Rum Aroma. *J. Agric. Food Chem.* 54: 485-488, 2006.
- De Souza LM, Alcarde AR, De Lima FV, Bortoletto AM: *Produção de Cachaça de Qualidade*, Universidade de Sao Paulo, Casa do Produtor Rural, 2013.
- FAO, 2009 *Agribusiness Handbook: Sugar beet white sugar*, Food and Agriculture Organization, United Nations, 2009.
- Furtado RA: *Destilação lenta de cachaça artesanal*, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, 2014.

- Gamero A, Tronchoni J, Querol A, Belloch C: Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 114: 1405–1414, 2013.
- Gamero A, Belloch C, Ibanez C, Querol A: Molecular analysis of the genes involved in aroma synthesis in the species *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and *S. bayanus* var. *uvarum* in winemaking conditions. *PLoS ONE* 9, e97626, 2014.
- Gonzalez SS, Barrio E, Gafner J, Querol A: Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 6: 1221–1234, 2016.
- Guerra JB, Araújo RAC, Pataro C, Franco GR, Moreira ESA, Mendonça-Hagler LC, Rosa CA: Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* during the 24h fermentative cycles for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Lett. Appl. Microbiol.* 33:106-111, 2001.
- Johary PC, Sharma SC: Amino acid removal during cane juice clarification. *International sugar journal* ,1021: 7-11, 1984.
- Jones PR, Gawel R, Francis IL, Waters EJ: The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Qual Prefer.* 19:596–607, 2008.
- Kłosowski G, Czuprynski B: Kinetics of acetals and esters formation during alcoholic fermentation of various starchy raw materials with application of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Food Eng.* 72: 242-246, 2006.
- Lea AGH, Piggott JR: *Fermented Beverage Production*, 2. izd., Kluwen Academic/Plenum Publishers, New York. 337-338, 2013.
- Lehtonen M, Jounela-Eriksson P: Volatile and non-volatile compounds in the flavour of alcoholic beverages. U *Flavour of Distilled Beverages: Origin and Development*, ed. Piggott, J.R. 64–78. Florida: Verlag Chemie International Inc. ISBN 0–89573–131–2. 1983.
- Lopez-Malo M, Querol A, Manuel Guillamon J: Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. *PLoS ONE* 8, 2013.
- Marić V, Šantek B: *Biokemijsko inženjerstvo*, Golden marketing-Tehnička knjiga. str. 354, Zagreb, 2009.
- Naumov GI, Masneuf I, Naumova ES, Aigle M, Dubourdieu D: Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Res. Microbiol.* 151: 683–691, 2000.

- Naumov GI, Nguyen HV, Naumova ES, Michel A, Aigle M, Gaillardin C: Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 65: 163–171, 2001.
- Oliveira BM, Barrio E, Querol A, Pérez-Torrado R: Enhanced enzymatic activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from the cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii*. *PLoS ONE* 9, 2014.
- Oliveira FF, Diniz RHS, Godoy-Santos F, Piló FB, Mezdari H, Castro IM: The Role of Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Production of Fermented Beverages in South America. *U Food Production and Industry*, 108-135, 2015.
- Omori T, Iwata T, Umemoto Y, Shimoda M: Improvement of barley shochu flavor by controlling the glycerol concentration in the mash. *J. Ferment. Bioeng.* 73:633, 1995.
- Pataro C, Guerra JB, Petrilho-Peixoto ML, Mendonça-Hagler LC, Linardi VR, Rosa CA: Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J. Appl. Microbiol. London*, 89:24-31, 2000.
- Paturau JM: *By-products of the cane sugar industry.*, 2.izd., Elsevier scientific Publishing Co., New York. 366, 1982.
- Peleg H, Gacon K, Schlich P, Noble AC: Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agric.* 79:1123–1128, 1999.
- Perez-Traves L, Lopes C.A, Gonzalez R, Barrio E, Querol A: Physiological and genomic characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* hybrids with improved fermentation performance and mannoprotein release capacity. *Int. J. Food Microbiol.* 205:30-40, 2015.
- Perpete P, Collin S: Influence of beer ethanol content on the wort flavour perception. *Food Chem.* 71:379–385, 2000.
- Perpète P, Collin S: Contribution of 3-methylthiopropionaldehyde to the warty flavor of alcohol-free beers. *J. Agric. Food Chem.* 47(6):2374-8, 1999.
- Pine SH, Hendrickson JB, Cram DJ, Hammond GS: *Organska kemija*, Školska knjiga-Zagreb. str. 44, 1984.
- Prati P, Camargo GA: Características do caldo de cana e sua influência na estabilidade da bebida, *BioEng. Campinas*, v.2,n.1, 37-44. 2008.
- Primorac Lj: *Kontrola kakvoće hrane*. Interna skripta. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2007.
- Purseglove JW: *Tropical crops: monocotyledons*. Longman Group Ltd., London. 607, 1979.
- Robinson J: *The Oxford Companion to Wine* (3rd ed.). Oxford University Press. 259, 2006.

- Sampaio JP, Goncalves P: Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2144–2152, 2008.
- Schwan RF, Mendonça AT, Silva Jr, J.J. da, Rodrigues V, Wheals AE: Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79: 89-96, 2001.
- Sharpe Peter: *Sugar Cane: Past and Present* . Southern Illinois University, 1998.
- Saerens SM, Delvaux FR, Verstrepen KJ, Thevelein JM: Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Biotechnol.* 3:165–177, 2010.
- Stupiello JP: The sugarcane as feed material. Fundação Cargill, *Campinas* 2: 761-804, 1987.
- Suomalainen H, Lehtonen M: The production of aroma compounds by yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 85:149-156, 1979.
- Yamane T: Sugarcane The Editors of Encyclopaedia Britannica, *web article*, 2018.
<https://www.britannica.com/plant/sugarcane> [21.7.2018]
- Tronchoni J, Medina V, Guillamon JM, Querol A, Pérez-Torrado R: Transcriptomics of cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii* reveals the key role of gene translation efficiency in cold stress adaptations. *BMC Genomics* 15: 432-432, 2014.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, van Dijken JP : Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast: A continuous-culture study on regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8: 501-517, 1992.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K : Modeling of the bacteria growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1875-1881, 1990.

Web izvori:

Web 1: <https://www.shutterstock.com/search/sugar%2Bcane>, pristupljeno 28.07.2018.

Web 2: <http://www.gramadocanela.com.br/alambique-flor-do-vale/>, pristupljeno 28.07.2018.

Web 3: <http://tellura.com.br/en/history/>, pristupljeno 28.07.2018.

Web 4: <https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-734992447-cachaca-mineira-pinga-branca-amarela-jatoba-ouro-prata-coco- JM>, pristupljeno 28.07.2018.

Web 5: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm, pristupljeno 28.07.2018.

Web 6: https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/5_AK2_ekstr_krom_elektro.pdf pristupljeno 28.07.2018.