

Politechnika Łódzka

ZESZYTY NAUKOWE Nr 1180

MARIA BALCEREK

KARBAMINIAN ETYLU I JEGO PREKURSORY
W SPIRYTUSACH OWOCOWYCH

ŁÓDŹ 2013

POLITECHNIKA ŁÓDZKA

ZESZYTY NAUKOWE Nr 1180

ROZPRAWY NAUKOWE, Z. 478

MARIA BALCEREK

KARBAMINIAN ETYLU I JEGO PREKURSORY
W SPIRYTUSACH OWOCOWYCH

ŁÓDŹ 2013

ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ
SCIENTIFIC BULLETIN
OF THE LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
BULLETIN SCIENTIFIQUE
DE L'UNIVERSITÉ POLYTECHNIQUE DE LODZ
НАУЧНЫЕ ЗАПИСКИ
ЛОДЗИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
WISSENSCHAFTLICHE HEFTE
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT IN LODZ

Redaktor Naukowy Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności:
dr hab. inż. Danuta Kalemba, prof. PŁ

Recenzenci: **prof. dr hab. Józef Kula**
prof. dr hab. inż. Tadeusz Tuszyński

© Copyright by Politechnika Łódzka 2013

Adres Redakcji – Адрес Редакции – Editor's Office
Adresse de Redaction – Schriftleitungsadresse:

WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ
90-924 Łódź, ul. Wólczańska 223
tel./fax 42-684-07-93
e-mail: zamowienia@info.p.lodz.pl
www.wydawnictwa.p.lodz.pl

ISSN 0137-4834

Nakład 140 egz. Ark. druk. 9. Papier offset. 80 g, 70 x 100
Druk ukończono we wrześniu 2013 r.
Wykonano w Drukarni Quick-Druk, 90-562 Łódź, ul. Łąkowa 11

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI	5
STRESZCZENIE.....	6
1. WSTĘP	9
2. PRZEGLĄD LITERATURY	10
2.1. Karbaminian etylu – charakterystyka fizykochemiczna, działanie toksykologiczne	10
2.2. Karbaminian etylu w produktach spożywczych i napojach alkoholowych	11
2.3. Prekursory karbaminianu etylu	14
2.3.1. Cyjanowodór.....	14
2.3.2. Mocznik i inne związki azotowe	17
2.3.3. Środki konserwujące, dodatki do żywności	17
2.3.4. Środki ochrony roślin	18
2.4. Wpływ drożdży na tworzenie karbaminianu etylu	18
2.5. Wpływ warunków destylacji, maturacji i przechowywania spirytusów owocowych na zawartość karbaminianu etylu	21
2.6. Metody ograniczania zawartości karbaminianu etylu w napojach alkoholowych	24
3. GENEZA I CEL PRACY	28
4. MATERIAŁY I METODY BADAŃ	30
4.1. Surowce i materiały pomocnicze.....	30
4.2. Materiał biologiczny.....	30
4.2.1. Drożdże	30
4.2.2. Bakterie	31
4.3. Pożywki hodowlane	31
4.4. Modelowe podłoża fermentacyjne.....	31
4.5. Metody badań.....	32
4.5.1. Analiza owoców.....	32
4.5.1.1. Glikozydy cyjanogenne.....	32
4.5.1.2. Arginina	33
4.5.2. Analiza zacierów	33
4.5.2.1. Cyjanowodór	33
4.5.2.2. Mocznik	33
4.5.3. Analiza spirytusów	33
4.5.3.1. Cyjanowodór	34
4.5.3.2. Zawartość diacetylu	34
4.5.3.3. Zawartość karbaminianu etylu	34
4.5.3.4. Zawartość miedzi.....	35
4.5.4. Ocena aktywności wybranych enzymów drożdży i bakterii	35
4.5.4.1. Przygotowanie ekstraktów bezkomórkowych.....	35
4.5.4.2. Białko ogółem.....	36
4.5.4.3. Oznaczanie aktywności arginazy	36
4.5.4.4. Oznaczanie aktywności syntaz karbamylofosforanu	36
4.5.4.5. Oznaczanie aktywności ureazy	37
4.5.5. Obliczenia.....	38
4.5.6. Analiza statystyczna	38
4.6. Przebieg doświadczeń.....	39

4.6.1. Badania wpływu obróbki wstępnej owoców, dodatku pożywek azotowych, ras drożdży i warunków fermentacji na powstawanie karbaminianu etylu	39
4.6.2. Ocena skuteczności chemicznych i biologicznych metod ograniczania syntezy karbaminianu etylu w zacierach owocowych	40
4.6.3. Wpływ produktów ubocznych fermentacji na powstawanie karbaminianu etylu	41
4.6.4. Wpływ cyjanoków na syntezę uretanu	41
4.6.5. Wpływ warunków destylacji pierwotnej (procesu odpędu) i korekcyjnej na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w spirytusach owocowych	41
4.6.6. Wpływ warunków maturacji spirytusów owocowych na zmiany zawartości karbaminianu etylu i jego prekursorów	42
5. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA	43
5.1. Charakterystyka chemiczna owoców wykorzystywanych w badaniach	43
5.2. Wpływ modyfikacji technologicznych oraz warunków fermentacji na uwalnianie cyjanowodoru i syntezę karbaminianu etylu	45
5.2.1. Kinetyka hydrolizy glikozydów cyjanogennych i syntezy karbaminianu etylu podczas fermentacji alkoholowej zacierów owocowych	45
5.2.2. Zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w spirytusach owocowych....	50
5.2.2.1. Wpływ obróbki wstępnej owoców	50
5.2.2.2. Wpływ dodatku związków azotowych do zacierów owocowych	53
5.2.2.3. Wpływ warunków fermentacji i leżakowania zacierów	56
5.3. Uzdolnienia drożdży winiarskich do biosyntezy enzymów katalizujących syntezę lub rozkład prekursorów karbaminianu etylu	59
5.3.1. Wpływ drożdży winiarskich na zawartość karbaminian etylu w spirytusach owocowych	63
5.4. Przydatność chemicznych metod obniżania zawartości cyjanowodoru i karbaminianu etylu w spirytusach owocowych	66
5.5. Zastosowanie bakterii <i>Lactobacillus fermentum</i> do obniżenia stężenia mocznika w zacierach owocowych	70
5.5.1. Aktywność ureolityczna bakterii <i>L. fermentum</i>	70
5.5.2. Efektywność hydrolizy mocznika przez bakterie <i>L. fermentum</i>	71
5.6. Wpływ produktów ubocznych fermentacji na powstawanie karbaminianu etylu	76
5.7. Wpływ soli kwasu cyjanowodorowego na syntezę karbaminianu etylu (badania modelowe)	81
5.8. Wpływ warunków destylacji pierwotnej (procesu odpędu) i korekcyjnej na zawartość cyjanowodoru oraz karbaminianu etylu w spirytusach owocowych	83
5.9. Wpływ maturacji spirytusów owocowych na zawartość karbaminianu etylu i jego prekursorów	95
5.10. Identyfikacja uretanów w spirytusach owocowych	101
6. WNIOSKI	104
7. LITERATURA	107
8. SUMMARY	125
CHARAKTERYSTYKA ZAWODOWA AUTORKI	128

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

EC – karbaminian etylu, *syn.* uretan

MC – karbaminian metylu

PC – karbaminian propylu

HCN – cyjanowodór, *syn.* kwas pruski

NaCN – cyjanek sodu

CuCN – cyjanek miedzi (I)

KCNO – cyjanian potasu

KCNS – tiocyjanian potasu, *syn.* rodanek potasu

Fmoc-Cl – chloroformian 9-fluorenylmetylu

DTT – ditiotreitol

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy, *syn.* kwas wersenowy

ATP – adenzynotryfosforan

AMP – adenzynomonofosforan (adenozyno-5'-monofosforan)

$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ – wodorowęglan sodu znaczone izotopem ^{14}C

$^{14}\text{CO}_2$ – ditlenek węgla znaczone izotopem ^{14}C

STRESZCZENIE

Karbaminian etylu (EC), zwany uretanem, jest związkiem niepożądanym w produktach spożywczych i napojach alkoholowych, ze względu na prawdopodobnie kancerogenny wpływ na zdrowie człowieka (IARC, 2007). Ryzyko występowania nadmiernych ilości tego związku dotyczy zwłaszcza wódek naturalnych (okowita, brandy), produkowanych ze spirytusów otrzymywanych z owoców, zawierających glikozydy cyjanogenne.

Celem badań było ustalenie wpływu rodzaju obróbki wstępnej owoców, uzdolnień enzymatycznych drożdży, rodzaju i ilości pożywek dodawanych do zacierów, warunków fermentacji i powstających metabolitów oraz produktów hydrolizy glikozydów cyjanogennych, jak również techniki, warunków destylacji i maturacji spirytusów na syntezę karbaminianu etylu.

Materiał badawczy stanowiły śliwki (Węgierka Zwykła i Łowicka) oraz owoce aronii czarnoowocowej, uznanej za interesujący surowiec do otrzymywania oryginalnego spirytusu, z przeznaczeniem do zestawiania wódek naturalnych (Balcerek, 2001; Balcerek i Szopa, 2002; 2005a).

Wykazano, że glikozydy cyjanogenne (amygdalina), będące prekursorami karbaminianu etylu, są obecne nie tylko w śliwkach (w największej ilości w pestkach), ale również w owocach aronii.

Stwierdzono, że niezależnie od rodzaju stosowanych zabiegów technologicznych i warunków prowadzenia procesu, największa szybkość hydrolizy glikozydów cyjanogennych przypada na początkowy etap fermentacji, zaś synteza karbaminianu etylu zachodzi najintensywniej w fazie dofermentowania miazgi owocowej. Wysoka zawartość związków polifenolowych w owocach może hamować syntezę karbaminianu etylu w czasie fermentacji zacierów owocowych.

Pasteryzacja miazgi owocowej powoduje częściową inaktywację enzymów, katalizujących hydrolizę glikozydów cyjanogennych i obniżenie zawartości cyjanowodoru w otrzymywanych spirytusach (od 38% w śliwkowych do 47% w aroniowych), bez zmiany ich cech smakowo-zapachowych. Stosowanie, jako pożywek dla drożdży, preparatów zawierających, oprócz związków amonowych, aminokwasy, witaminy oraz składniki mineralne, zapewnia prawidłowy rozwój i aktywność fermentacyjną drożdży oraz otrzymanie wysokiej wydajności spirytusów o relatywnie niskiej zawartości karbaminianu etylu. Odkwaszanie miazgi owocowej, uzasadnione z racji ochrony aparatury i poprawy jakości wywaru, zwiększa ilość uwalnianego cyjanowodoru.

Za wskazane uznano prowadzenie fermentacji zacierów śliwkowych i aroniowych w temperaturze $18 \div 20^{\circ}\text{C}$, z udziałem drożdży wykazujących niskie uzdolnienia do uwalniania mocznika z argininy. Wymagania te spełniała większość, wykorzystywanych w badaniach, drożdży z gatunku *S. cerevisiae* (rasy: *Burgund*, *Bordeaux*, *Syrena*, *Tokay*) oraz *S. bayanus*, których aktywność właściwa arginazy (EC 3.5.3.1) była niska ($1,42 \div 3,00$ U/mg białka).

Najwyższą aktywnością syntazy karbamylofosforanu I (EC 6.3.4.16), zwanej NH_4^+ -zależną, w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, odznaczał się

szczep *Steinberg* ($45,43 \times 10^{-3}$ U/mg białka). Natomiast, maksymalną aktywność syntazy karbamylfosforanu II (EC 6.3.5.5), zwanej glutamino-zależną, oznaczono w drożdżach *S. bayanus* ($92,48 \times 10^{-3}$ U/mg białka). Najślabszym producentem tych enzymów okazały się drożdże rasy *Bordeaux*, w których aktywność syntaz karbamylfosforanu mieściła się w granicach od $3,20 \times 10^{-3}$ do $4,12 \times 10^{-3}$ U/mg białka. Nie zaobserwowano istotnego wpływu aktywności tych enzymów w badanych szczepach drożdży na tworzenie karbaminianu etylu.

Stwierdzono, że zastosowanie chemicznych metod obniżania zawartości cyjanowodoru i karbaminianu etylu poprzez dodatek do zacierów śliwkowych i aroniowych chlorku miedzi (I) lub kwasu askorbinowego, wpływa na skład chemiczny otrzymywanych spirytusów, powodując wzrost stężenia, m.in. aldehydów i wyższych alkoholi. Ponadto, w przypadku spirytusów otrzymanych z aronii czarnoowocowej, odnotowano niekorzystne zmiany ich smaku i zapachu.

Oprócz cyjanowodoru, prekursorem karbaminianu etylu jest mocznik, obecny w zacierach owocowych. Dodatek bakterii *Lactobacillus fermentum* – będących źródłem „kwaśnej” ureazy – do miazgi owocowej, w końcowej fazie fermentacji, umożliwia znaczące obniżenie zawartości mocznika. Jednak w zacierach sporządzonych z owoców zawierających glikozydy cyjanogenne, zabieg ten nie eliminuje karbaminianu etylu. W tym przypadku postępowanie technologiczne powinno zmierzać w kierunku ograniczania ilości uwalnianego cyjanowodoru, który jest główną przyczyną wzrostu zawartości uretanu w spirytusach owocowych.

Obecność diacetylu w podłożu fermentacyjnym intensyfikuje syntezę uretanu z cyjanowodoru, zarówno na etapie fermentacji, jak i destylacji. Wpływ aldehydów (octowego i benzoowego) na powstawanie EC obserwowano bardziej na etapie destylacji, niż w czasie fermentacji. Wykazano, że spośród soli kwasu cyjanowodorowego, wysoką podatnością na przemiany prowadzące do syntezy karbaminianu etylu w roztworach spirytusowych, odznaczają się cyjanek miedzi i cyjanian potasu. Zarówno obecność aldehydu benzoowego, jak i obniżanie pH roztworu spirytusu oraz zwiększanie w nim zawartości etanolu, powoduje wzrost stężenia karbaminianu etylu.

Synteza głównej ilości karbaminianu etylu, obecnego w spirytusach śliwkowych i aroniowych, zachodzi w czasie procesu destylacji odfermentowanej miazgi ($82 \div 91\%$ w aparacie miedzianym, $64 \div 67\%$ w zestawie szklanym).

Jakość otrzymywanych spirytusów jest zależna od sposobu i warunków destylacji korekcyjnej. Prowadzenie jej w aparaturze pracującej na zasadzie przeciwpądu (kolumna z wypełnieniem i deflegmatorem), przy zastosowaniu wstępnej cyrkulacji oparów (30 min) pozwala na wydzielenie znaczących ilości cyjanowodoru w przedgonach. Karbaminian etylu gromadzi się głównie we frakcjach pogonowych. Destylacja korekcyjna z powolnym wydzieleniem 3% przedgonów i odbiorem frakcji właściwej o mocy ok. 75% obj., zapewnia otrzymanie spirytusu owocowego o pożądanych cechach smakowo-zapachowych oraz niskiej zawartości HCN (< 3 mg/L) i EC ($< 0,4$ mg/L).

Wykazano, że karbaminian etylu powstaje również w czasie maturacji spirytusów owocowych, z intensywnością uzależnioną od ich mocy i warunków prowadzenia procesu. Przyspieszone dojrzewanie w temperaturze 40°C nasila syntezę karbaminianu etylu.

W grupie uretanów, wykrytych w otrzymanych spirytusach, karbaminian etylu jest związkiem dominującym. Jego średnie stężenia w spirytusach śliwkowych ($0,52 \pm 0,38$ mg/L 100% obj.) i aroniowych ($0,63 \pm 0,55$ mg/L 100% obj.) nie różniły się, przy założonym poziomie istotności ($\alpha = 0,05$).

Przeprowadzone badania w zakresie technologii otrzymywania spirytusów owocowych (śliwki, aronia), ukierunkowane na ograniczenie syntezy karbaminianu etylu dowodzą, że możliwe jest otrzymanie spirytusów o niskiej zawartości tego związku ($< 0,4$ mg/L) i jego prekursorów (m.in. cyjanowodoru), z zachowaniem ich oryginalności surowcowej, bez stosowania dodatkowych zabiegów chemicznych lub biologicznych, które mogą powodować zmiany cech organoleptycznych produktu, jak również wzrost kosztów produkcji.

Przedstawione w pracy sposoby ograniczania powstawania karbaminianu etylu mogą stanowić wskazania przy opracowywaniu warunków otrzymywania spirytusów owocowych, o pożądanej jakości sensorycznej i „bezpiecznych” pod względem zawartości związków szkodliwych, takich jak cyjanowodor i karbaminian etylu.

1. WSTĘP

Narastające zagrożenia, spowodowane rozwojem przemysłu i zanieczyszczeniem środowiska oraz uprzemysłowieniem przetwarzania surowców spożywczych we współczesnym świecie, sprawiają, że bezpieczeństwo żywności i napojów należy do podstawowych problemów wszystkich krajów. Dlatego tak ważna jest międzynarodowa współpraca w ochronie zdrowia konsumentów, a ustanawiane wymagania i zalecenia jakościowe powinny temu celowi służyć. Szczególnie istotna jest ocena ryzyka, wynikającego z obecności substancji dodatkowych i zanieczyszczeń w żywności. Wymagania odnośnie do jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego dotyczą również napojów alkoholowych, w tym cenionych przez określoną grupę konsumentów, wódek naturalnych owocowych (koniak, śliwowica, calvados, kirsch) i innych, znanych jako brandy owocowe.

W krajach europejskich, takich jak Francja, Szwajcaria, Austria, Niemcy, gorzelnictwo owocowe stanowi ważną część gospodarki, zaś ich wyroby, sporządzane ze spirytusów owocowych są znane i cenione na całym świecie. Tradycja produkcji wódek owocowych w Niemczech sięga końca XVI wieku (Albrecht, 1998). Za najbardziej uznawany wyrób niemiecki uchodzi wódka pod nazwą *Kirschwasser*, otrzymywana ze spirytusu wiśniowego.

Polskie gorzelnictwo owocowe jest słabo rozwinięte i sprowadza się do produkcji niewielkich ilości spirytusu śliwkowego. Spośród krajowych wódek owocowych, do najbardziej znanych należy *Śliwowica Paschalna*, wytwarzana według rytualnych przepisów obowiązujących dla produktów koszernych. Sława Łąckiej śliwowicy sprawiła, że w 1990 roku Wojewódzki Konserwator Zabytków w Nowym Sączu uznał pędzenie śliwowicy domowym sposobem za „niematerialne dobro kultury” i wpisał ją do rejestru zabytków (Nowicki, 1999).

Badania dotyczące wykorzystania polskich jabłek, prowadzone w Zakładzie Technologii Spirytusu i Drożdży Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej, pod kierunkiem prof. Bolesława Bachmana, uwiecznione zostały wdrożeniem produkcji spirytusu jabłkowego, wykorzystywanego do zestawiania wyrobów pn. *Złota jesień* i *Ognisty ptak*.

Ze względu na relatywnie wysokie koszty produkcji spirytusów owocowych, na co składa się również wyższa cena owoców, w porównaniu z tradycyjnymi surowcami gorzelnicznymi (Krell, 1999), istotne jest stosowanie właściwej technologii przerobu, gwarantującej odpowiednie walory smakowo-zapachowe, z zachowaniem cech oryginalności surowcowej i możliwie najniższą zawartość związków, które mogą wpływać szkodliwie na zdrowie konsumenta.

Już w latach 70. ubiegłego wieku sygnalizowano o obecności karbaminianu etylu (uretanu) w napojach alkoholowych, bezalkoholowych i innych produktach spożywczych wytwarzanych z udziałem drobnoustrojów (Ough, 1976).

Prowadzone od kilkunastu lat badania nad uretanami dowiodły ich rakotwórczego działania na zwierzęta doświadczalne (Stoewsand i in., 1991). Najbardziej poznanym jest karbaminian etylu (EC). W oparciu o zgromadzone

wyniki badań, związek ten został sklasyfikowany przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) jako „możliwie kancerogeny” dla człowieka (grupa 2B) (FAO/WHO, 2005). W 2007 roku IARC uaktualniła klasyfikację i został on przypisany do grupy 2A – „prawdopodobnie kancerogeny” dla człowieka (IARC, 2007).

2. PRZEGLĄD LITERATURY

2.1. Karbaminian etylu – charakterystyka fizykochemiczna, działanie toksykologiczne

Karbaminian etylu (EC), nazywany również uretanem (CAS nr 51-79-6), jest estrem etylowym kwasu karbaminowego ($\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$) (Haynes, 2012). Jest to bezbarwna, krystaliczna substancja, dobrze rozpuszczalna w wodzie, o masie cząsteczkowej 89,09 g/mol, temperaturze wrzenia od 182 do 185°C oraz temperaturze zamarzania od -48 do -50°C.

Związek ten, jak i inne estry kwasu karbaminowego, znajduje zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, m.in. w produkcji mas plastycznych, insektycydów i herbicydów oraz jako intermediat chemiczny w przemyśle tekstylnym (IARC, 1974). Uretan był również wykorzystywany w przemyśle farmaceutycznym jako składnik preparatów przeciwnowotworowych oraz do produkcji środków nasennych, uspokajających, rozluźniających mięśnie szkieletowe, znieczulających (Guidelines, 2003; Paterson i in., 1946). W latach 40. XX wieku karbaminian etylu był używany w terapii nowotworowej, jednak ze względu na własności kancerogenne, które wykazano podczas badań na zwierzętach doświadczalnych, jego stosowanie zostało zabronione.

Genotoksyczność i kancerogenność uretanu w odniesieniu do zwierząt doświadczalnych, wskazuje na jego potencjalnie rakotwórcze działanie na człowieka (Beland i in., 2005). Jest on bardzo szybko i prawie całkowicie wchłaniany, zarówno z przewodu pokarmowego, jak i ze skóry (Cha i in., 2000; EFSA, 2007). Obecnie karbaminiany metylu, etylu, butylu i fenylu znajdują zastosowanie jedynie do prowadzenia badań naukowych (Gotor, 1999).

Metabolizm karbaminianu etylu zachodzi głównie na drodze hydrolizy, katalizowanej przez mikrosomalną esterazę wątrobową, w wyniku której uwalniany jest: etanol, amoniak i ditlenek węgla. Około 5% uretanu jest wydzielane w postaci niezmienionej. Inne kierunki przemian to N-hydroksylacja lub C-hydroksylacja z udziałem cytochromu P-450, których produktami są: karbaminian N-hydroksyetylu (ok. 0,1%), karbaminian α -hydroksyetylu i karbaminian winylu (ok. 0,5%). Ostatni związek wykazuje znacznie wyższą kancerogenność niż karbaminian etylu i podlega dalszej konwersji (katalizowanej przez hydrolazę epoksydową) do epoksydu karbaminianu winylu – adduktu DNA, RNA i białek komórkowych (Park i in., 1993; Hoffler i Ghanayem, 2005; FAO/WHO, 2006). Cytochrom P-450, zawarty w płucach, limfie, wątrobie i skórze, katalizuje metabolizm uretanu do N-hydroksyuretanu,

który może ulegać dalszej konwersji do hydroksyloaminy. Związek ten wykazuje kancerogenne działanie na wiele organów, poprzez uwalnianie O₂ i NO, co powoduje uszkodzenie DNA (Sakano i in., 2002). Badania Hernandez i Forkerta (2007a, 2007b) wykazały zdolność karbaminianów etylu i winylu do indukowania mutacji genów w płucach. Karbaminian winylu wykazywał działanie mutagenne na komórki nabłonka jelitowego oraz płuc, w dawkach od 45 do 75 mg/kg, podczas gdy karbaminian etylu powodował zmiany przy dawkach znacznie wyższych, tj. od 500 do 1000 mg/kg. Autorzy (Hernandez i Forket, 2009) wykazali, że czynnikiem hamującym mutacje, wywoływane przez karbaminiany, może być zastosowanie sulfonu diallylu, związku występującego w czosnku.

Do organizmu człowieka uretan przedostaje się poprzez spożycie napojów alkoholowych i żywności fermentowanej. Zbyt wysoka dawka karbaminianu etylu może spowodować uszkodzenie wątroby, nerek oraz wywołać wymioty, śpiączkę lub krwotoki, natomiast u mężczyzn może powodować zaburzenia potencji (Stoewsand i in., 1991). Wskaźnik BMDL 10 (*Benchmark Dose Lower Limit*), szacowany na podstawie przeciętnego spożycia produktów spożywczych, (chleb, fermentowane napoje mleczne oraz sosy sojowe), wynosi dla EC 0,3 mg/kg masy ciała na dzień, przy średnim przyswojeniu z żywności na poziomie ok. 15 ng/kg masy ciała dziennie. W badaniach nie uwzględniano napojów alkoholowych. Włączenie tej grupy produktów może zwiększać ilość uretanu dostarczanego do organizmu, do ok. 80 ng/kg masy ciała na dzień (Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 2007).

2.2. Karbaminian etylu w produktach spożywczych i napojach alkoholowych

Obecność karbaminianu etylu stwierdzono w produktach spożywczych, otrzymywanych z udziałem drobnoustrojów, takich jak: chleb, sery, jogurty, kiszona kapusta, sosy sojowe oraz w napojach alkoholowych (wino, piwo, spirytusy i wyroby spirytusowe). Najwyższe stężenia EC stwierdzono w brandy owocowych, bourbonach, sherry, likierach oraz spirytusach i wódkach z owoców pestkowych z rodzaju *Prunus* L. (*Rosaceae*), tj. z wiśni, śliwek, mirabelek i moreli (do 13 mg/L), (Conacher i Page, 1986; Mildau i in., 1987; Wucherpfenning i in., 1987; Dennis i in., 1989; Battaglia i in., 1990; Zimmerli i Schlatter, 1991; Kim i in., 2000; Weltring i in., 2006; Lachenmeier i in., 2005; Lachenmeier, 2007; Lee, 2013). W produktach spożywczych, wytwarzanych bez udziału mikroorganizmów, nie stwierdzono obecności tego związku (Ough, 1976).

W 1985 roku w Kanadzie wykryto względnie wysokie zawartości uretanu w napojach alkoholowych (Conacher i Page, 1986). W konsekwencji, Kanada jako pierwsza wprowadziła normy, określające dopuszczalny poziom zawartości uretanu w niektórych napojach alkoholowych. Mieści się on w granicach, od 30 µg/L dla win białych i czerwonych do 400 µg/L dla wódek owocowych i likierów (EFSA, 2007).

W Unii Europejskiej brak przepisów określających dopuszczalne stężenia uretanu w napojach alkoholowych, dlatego limity jego zawartości zostały wprowadzone przez nieliczne kraje i nie są one dotychczas ujednolicone. W Czechach przyjęto dopuszczalne stężenia karbaminianu w napojach alkoholowych na poziomie analogicznym jak w Kanadzie. Ustawodawstwo francuskie określa jedynie limit obecności uretanu w spirytusach rektyfikowanych i wódkach owocowych, natomiast w Szwajcarii i Niemczech regulacje prawne w tym zakresie dotyczą wódek naturalnych (brandy) owocowych (tab. 1) (EFSA, 2007). Zalecenia Komisji Europejskiej (European Commission, 2010) określają akceptowalną zawartość uretanu w wyrobach spirytusowych z owoców pestkowych na poziomie 1 mg/L.

Tabela 1. Dozwolone stężenie karbaminianu etylu w napojach alkoholowych w wybranych krajach (EFSA, 2007)

Kraj	Wina	Wina alkoholizowane	Spirytusy rektyfikowane	Sake	Wódki (brandy) owocowe
	karbaminian etylu [$\mu\text{g/L}$]				
Kanada	30	100	150	200	400
USA	15	60	-	-	-
Czechy	30	100 ^{a)}	150	200	400 ^{b)}
Francja	-	-	150	-	1000
Szwajcaria	-	-	-	-	1000
Niemcy	-	-	-	-	800

^{a)} wina owocowe i likiery

^{b)} wódki, destylaty i spirytusy owocowe

Badania zagrożeń dla zdrowia człowieka, wynikających z obecności karbaminianu etylu i jego prekursora – cyjanowodoru w żywności i napojach (ze szczególnym uwzględnieniem wyrobów alkoholowych), prowadzone były przez Panel Naukowy ds. Zanieczyszczeń w Łańcuchu Żywności (CONTAM Panel) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, 2007). W opracowywaniu opinii wykorzystano wyniki przedstawione przez siedem krajów członkowskich Unii Europejskiej (Austria, Belgia, Republika Czeska, Francja, Niemcy, Holandia, Wielka Brytania) z okresu 1998-2006 oraz dane udostępnione przez Liquor Control Board of Ontario (LCBO) (Kanada) i Wine Institute of Kalifornia (USA), dotyczące analiz napojów alkoholowych, produkowanych bądź eksportowanych z krajów Unii Europejskiej w latach 2002-2006 do Ameryki Północnej. Najwyższe stężenia uretanu rejestrowano w naturalnych wódkach z owoców pestkowych oraz w mieszanych wódkach owocowych. W napojach alkoholowych, takich jak piwo, wino oraz w produktach żywnościowych, stężenie karbaminianu etylu było relatywnie niskie (0-29 $\mu\text{g/kg}$), jedynie część prób win alkoholizowanych wykazywała wyższą zawartość EC (do 60 $\mu\text{g/kg}$) (tab. 2).

Tabela 2. Zawartość karbaminianu etylu w żywności i napojach alkoholowych dystrybuowanych w krajach członkowskich Unii Europejskiej, w latach 1998-2006 (EFSA, 2007)

Rodzaj produktu	Liczba próbek	Karbaminian etylu [µg/kg]		
		Mediana	Średnia	Zakres
Napoje alkoholowe				
Piwo	13(1) ^a	-	-	0 ^b -1
Cydr	1(0)	-	-	0
Wino	17(11)	11	10-11	0-24
Wino alkoholizowane	15(15)	29	32	14-60
Sake	2(2)	-	123	81-164
Wódki naturalne (brandy) owocowe	42(19)	0-30	123-129	0-2100
Cachaca	19(19)	110	229	40-730
Spirytusy surowe	13(8)	1210	1425-1435	0-4500
Gin	1(1)	-	-	580
Likiery	4(2)	6-7	45-47	0-170
Spirytusy różnego pochodzenia surowcowego	86(64)	290	590	0-6000
Mieszane wódki owocowe	328(281)	215	663-667	0-7920
Rum	11(10)	280	325-328	0-1020
Wódki naturalne (brandy) z owoców pestkowych	3244(2912)	330	848-851	0-22000
Tequila	84(84)	800	1233	70-6730
Wódka	60(57)	365	386-387	0-2140
Whisky	210(196)	22	41	0-1000
Produkty żywnościowe				
Pieczыwo	50(49)	5	6	0-20
Produkty mleczne	22(0)	-	-	0
Fermentowane oliwki	3(0)	-	-	0
Fermentowane sosy	44(28)	2-3	3-4	0-18
Kapusta kiszona	1(1)	-	-	29
Ocet	10(1)	-	-	41

^{a)} liczba w nawiasach wskazuje ilość prób wykazujących obecność karbaminianu etylu

^{b)} 0 określa stężenie bliskie lub poniżej poziomu wykrywalności

Maksymalne stężenia uretanu cytowane przez EFSA (2007) były ponad trzykrotnie wyższe od opublikowanych przez Wspólny Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. dodatków do żywności (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (JECFA, 2006). Jest to jednak konsekwencją różnicy w profilu ocenianych wyrobów. Wyniki zawarte w raporcie JECFA dotyczyły głównie win i niewielu wódek typu brandy (31 prób), podczas gdy raport EFSA obejmował wyniki analiz ponad 3000 wódek naturalnych z owoców pestkowych (tab. 2).

Z informacji pochodzących od Liquor Control Board of Ontario (LCBO, 2006) wynika, że w grupie napojów alkoholowych wyprodukowanych przez kraje Unii Europejskiej i eksportowanych do Ameryki Północnej jedynie w dwóch kategoriach wyrobów (wódki owocowe i spirytusy różnego pochodzenia surowcowego) występowały próby, w których zawartość karbaminianu przekroczyła 1000 µg/kg, przy czym w spirytusach było to przekroczenie o 60 µg/kg, zaś maksymalna zawartość uretanu w wódkach owocowych osiągnęła 3133 µg/kg. Należy jednak zaznaczyć, że 95% prób wódek owocowych typu brandy zawierało ten związek w ilości równej bądź mniejszej niż 284 µg/kg. Najwyższą, średnią zawartość karbaminianu (246 µg/kg) wykazywały próby armanianu (dla porównania wódki owocowe – 100 µg/kg). W koniakach średnie stężenie EC wynosiło 30 µg/kg (zakres 0÷191 µg/kg). Spośród 23000 prób win, wyprodukowanych w Europie i eksportowanych do krajów Ameryki Północnej, ponad połowa nie zawierała karbaminianu etylu. W pozostałych 95% prób, wykazujących jego obecność, średnia zawartość uretanu wynosiła 5÷7 µg/kg.

Podsumowując prowadzone badania obecności karbaminianu etylu w żywności fermentowanej i napojach alkoholowych stwierdzono, że średnia zawartość karbaminianu etylu wynosiła w piwach od 0÷5 µg/L, w winach 5 µg/L, w spirytusach i wódkach innych niż owocowe 22 µg/L oraz 260 µg/L w wódkach naturalnych typu brandy i spirytusach owocowych (EFSA, 2007).

2.3. Prekursory karbaminianu etylu

W żywności fermentowanej, produktach piekarskich i napojach alkoholowych występuje wiele prekursorów uretanu. Należą do nich: glikozydy cyjanogenne, cyjanowodór, mocznik, cytrulina, związki N-karbamylowe (m.in. karbamylfosforan) (Dennis i in., 1986; Vahl 1993; Beland i in., 2005; EFSA, 2007).

2.3.1. Cyjanowodór

Glikozydy cyjanogenne są pochodnymi cyjanohydryn, czyli nitryli hydroksy kwasów, w których do grupy hydroksylowej przyłączony jest cukier, zwykle glukoza. Najczęściej spotykany jest nitryl kwasu migdałowego (w amygdalinie, prunazynie) oraz nitryl kwasu hydroksymetylopropionowego (w linamarynie) (Vetter, 2000). Spośród glikozydów cyjanogennych w owocach pestkowców (migdałów, brzoskwiń, moreli, śliw, wiśni) najliczniej występuje amygdalina, zbudowana z disacharydu gencjobiozy i cyjanohydryny aldehydu benzoesowego. Reakcja powstawania cyjanowodoru polega, w pierwszym etapie, na hydrolizie glikozydu cyjanogennego przy udziale β-glukozydazy (EC 3.2.1.21) do α-hydroksynitryli (cyjanohydryn) i cukru. W kolejnym etapie nitrylaza (EC 3.5.5.1) katalizuje rozkład cyjanohydryn do związków karbonylowych i cyjanowodoru (Siegień, 1998; Wetter, 2000; Haque i Bradbury, 2002; Zagrobelny i in., 2004).

Wyniki analizy produktów hydrolizy glikozydów cyjanogennych wskazują, że aldehyd benzoesowy i kwas pruski (HCN) są uwalniane ze wszystkich części owoców, ale w największej ilości z nasion pestek. Obecność cyjanowodoru stwierdzono również w naturalnych wódkach, wyprodukowanych z owoców pozbawionych pestek. W tym przypadku cyjanowodor powstawał z prunazyny, występującej w miąższu i skórce owoców (Ljekocevič, 1993).

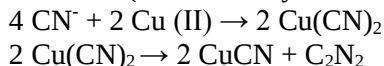
Voldřich i Kyzlink (1992), dokonując analizy glikozydów cyjanogennych w pestkach i miąższu owoców pestkowych oraz zawartości HCN w przetworach owocowych, stwierdzili, że czynnikami decydującymi o ilości uwalnianego cyjanowodoru, była zawartość glikozydów cyjanogennych w surowych owocach oraz warunki obróbki cieplnej.

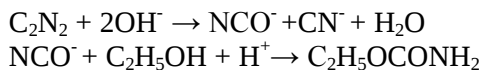
Owoce pestkowe należy poddawać drylowaniu lub rozdrobnieniu bez uszkodzenia pestek (Lachenmeier i in., 2005; Joint FAO/WHO, 2009). Wskazane jest również stosowanie tzw. ochrony kwasowej, w postaci dodatku do zacieru kwasu siarkowego (VI) lub fosforowego (V), w ilości 150–200 g/100 kg zacieru (Christoph i in., 1988).

Wymagania normatywne dla wódek gatunkowych, z uwzględnieniem owocowych (PN-A-79530:2001), obowiązujące w Polsce przed wstąpieniem do Unii Europejskiej, określały dopuszczalne stężenie cyjanowodoru na poziomie 3 mg/L wyrobu. Z kolei, według Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 110/2008 w sprawie definicji, opisu, prezentacji, etykietowania i ochrony oznaczeń geograficznych napojów spirytusowych, zawartość cyjanowodoru w spirytusach (okowitach) z owoców pestkowych, nie powinna przekraczać 7 g/hL spirytusu 100% obj., tj. 70 mg/L 100% obj. (28 mg/L 40% obj.).

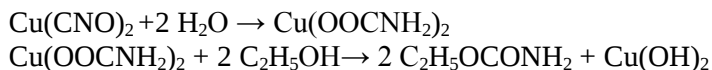
Ograniczenie ilości cyjanowodoru w spirytusach owocowych jest celowe ze względu na możliwość jego utleniania do kwasu cyjanowego, który reaguje z etanolem, tworząc uretan (Battaglia i in., 1990; Aresta i in., 2001). Również reakcja pomiędzy cyjanowodorem a związkami dikarbonyłowymi, takimi jak diacetyl, 2,3-pentanodion, metyloglioksal, może prowadzić do powstania uretanu (Bauman i Zimmerli, 1986). Źródłem karbaminianu etylu mogą być też inne związki cyjanowe (m.in. izocyjaniany), które w reakcji z alkoholem etylowym prowadzą do syntezy EC. Christoph i in. (1988) uważają, że wysokie stężenie karbaminianu etylu spowodowane jest nie tylko uszkodzeniem pestek, zawierających znaczne ilości glikozydów cyjanogennych, ale również długotrwałym przetrzymywaniem odfermentowanych zacierów.

Wykazano, że do czynników, wpływających na dynamikę syntezy uretanu z cyjanowodoru należą: pH, światło, stężenie etanolu, temperatura (Balcerek i Szopa, 2006b) oraz obecność metali katalitycznych (Riffikin i in., 1989; Aresta i in., 2001). Jedną z hipotez powstawania uretanu zakłada utlenianie cyjanów do cyjanianów, przy katalitycznym udziale jonów Cu (II), pochodzących z aparatury destylacyjnej, a następnie reakcji z etanolem według następującego schematu (Beattie i Polyblank, 1995; Aresta i in., 2001):





Dalsze rozważania Aresty i in. (2001) zweryfikowały wcześniejszą hipotezę, podając, że najbardziej prawdopodobny mechanizm syntezy uretanu przebiega poprzez atak wody na cyjaniany i ich izomery, dopiero później zachodzi etanoliza powstałych intermediatów do uretanu.



Źródłem cyjanianów i izocyjanianów może być również mocznik, ulegający rozkładowi w roztworach wodno-alkoholowych, ogrzewanych do 60÷100°C (Boulton, 1993), bądź jego termiczny rozkład (np. podczas pieczenia) do amoniaku i kwasu cyjanowego (Schaber i in., 2004).

Zdaniem niektórych badaczy (Boulton, 1993; Sarla i in., 2004; Pedraza-Avella i in., 2008) mało prawdopodobne jest niekatalityczne tworzenie cyjanianów bądź izocyjanianów z cyjaników, ponieważ do przeprowadzenia tych reakcji wymagana jest obecność utleniaczy, np. nadtlenu wodoru lub podchlorynu. Według innych autorów (Aresta i in., 2001; Bruno i in., 2007; Fischer i in., 2002) powolne utlenianie cyjanowodoru i cyjaników może zachodzić w środowisku wodnym bądź wodno-alkoholowym przy pH kwaśnym, bez udziału katalizatora.

Dijkstra i in. (2007) przedstawili hipotezę powstawania karbaminianów i kwasu karbaminowego z ditlenku węgla i amin. Autorzy uważają, że taki mechanizm reakcji jest prawdopodobny w warunkach fermentacyjnych, w których źródłem amin są przerabiane surowce, a uwalniany CO₂ jest naturalnym produktem zachodzących przemian.

Badanie tzw. „młodych destylatów” nie zawsze wskazuje na istotną korelację między zawartością cyjanowodoru i karbaminianu etylu, ponieważ część EC powstałego podczas fermentacji i destylacji może nie przechodzić do spirytusu, z uwagi na jego wysoką temperaturę wrzenia, wynoszącą 185°C (Lurton i in., 1993). Ponadto karbaminiany mogą być transportowane do skraplacza w postaci oparów (Carley i in., 2003; Bruno i in., 2007). W tym przypadku istotną rolę odgrywa obecność w fazie gazowej cyjanowodoru, bądź kwasów cyjanowego i izocyjanowego, jako lotnych prekursorów karbaminianu. Z powodu ich wysokiej lotności i niskich temperatur wrzenia (< 30°C) szybko przechodzą w stan pary i wchodząc w reakcję z etanolem, prowadzą do powstania uretanu w fazie gazowej. Katalityczny wpływ na przebieg procesu wywiera miedź, z której zbudowane są aparaty odpędowe typu alembik (Carley i in., 2003). Według autorów utlenianie cyjanowodoru zachodzi na powierzchni miedzi już w temperaturze ok. 27°C, czyli zbliżonej do temperatury wrzenia cyjanowodoru. Powstające kwasy (cyjanowy, izocyjanowy) mogą reagować z parami etanolu i wody, dając takie intermediaty jak cyjanian etylu (H₂NCOOC₂H₅) oraz kwas karbaminowy (H₂NCOOH), prowadzące do syntezy uretanu.

2.3.2. Mocznik i inne związki azotowe

Jedną z możliwych dróg syntezy karbaminianu etylu, zwłaszcza w środowisku kwaśnym, jest reakcja mocznika z etanolem (Zietsman i in., 2000; Delledonne i in., 2001; Wang i in., 2007); z tego względu nie jest wskazana suplementacja moszczów poddawanych fermentacji pożywkami zawierającymi w swoim składzie ten związek. Do uzupełnienia deficytu związków azotowych w podłożach fermentacyjnych zaleca się stosowanie fosforanu diamonu, w dawkach nieprzekraczających 200 mg azotu/L (Butzke i Bisson, 1997).

Obecność mocznika stwierdzono w wielu produktach fermentowanych, takich jak: jogurty, sery, chleb i inne produkty piekarskie, napoje alkoholowe i bezalkoholowe (Francis i in., 2002; Larsen, 2006). W znaczących stężeniach może występować w mleku (kilkaset mg/L) (Eicher i in., 1999) bądź jest wytwarzany w procesach produkcji żywności.

Podczas fermentacji alkoholowej mocznik może powstawać z CO₂ i związków azotowych, a jego głównym źródłem jest arginina, jeden z dominujących aminokwasów, występujących w soku winogronowym. Kataboliczny rozkład argininy do mocznika zachodzi podczas przemian metabolicznych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Sumrada i in., 1984; Arena i in., 1999; Valero i in., 1999). Według Stevensa i Ough'a (1993), celem uniknięcia nadmiernej syntezy karbaminianu, obróbka win powinna być prowadzona w temperaturze poniżej 24°C, ponieważ w tej temperaturze szybkość procesu jest umiarkowana, natomiast gwałtownie wzrasta (zgodnie z równaniem Arrheniusa) podczas obróbki termicznej produktów (Aresta i in., 2001; Matsudo i in., 1993). Znaczącą rolę odgrywa również czas przechowywania, jako że karbaminian etylu w starych winach pochodzi przede wszystkim z mocznika, zawierają one większe ilości uretanu niż wina młode (Uthurry i in., 2004).

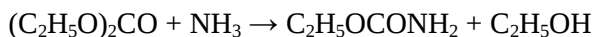
Prekursorem uretanu w winach może być także L-cytrulina, powstająca w wyniku aktywności metabolicznej bakterii mlekowych (*Lactobacillus plantarum*, *Oenococcus oenos*) podczas fermentacji mleczanowo-jabłczanowej jako produkt degradacji argininy, katalizowanej przez deiminazę arginianową (EC 3.5.3.6) (Liu i in., 1994, 1995, 1996; de Orduña i in., 2000).

2.3.3. Środki konserwujące, dodatki do żywności

Prekursorami karbaminianów mogą być środki konserwujące, szczególnie estry kwasu karbaminowego i tiokarbaminowego, które stosowane są w niektórych krajach jako dodatki zwiększające trwałość napojów orzeźwiających. Również estry metylowe (etylowe) kwasu pirowęglowego (węglowego) podczas reakcji z aminokwasami, amoniakiem lub mocznikiem, pod wpływem światła, mogą tworzyć karbaminiany.

Węglan dietylu wykorzystywany jako dodatek, nie tylko do kontroli zanieczyszczeń mikrobiologicznych w żywności i napojach, ale również jako

rozpuszczalnik (Tundo i Selva, 2002; Wang i in., 2007), prowadzi w reakcji z amoniakiem do powstania uretanu, zgodnie z reakcją (Ough, 1976a; Aresta i in., 2001):



Innym przykładem jest azodikarbonamid (ADC) (Hirakawa i in., 2003; Mulder i in., 2007), bardzo popularny chemiczny środek spieniający w procesach przetwórstwa tworzyw sztucznych, dawniej stosowany jako dodatek (polepszacz) do mąki (Canas i in., 1997; Dennis i in., 1997) oraz w browarnictwie (Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 2007). W roztworach wodno-alkoholowych związek ten może prowadzić do powstawania karbaminianu (Dennis i in., 1997; Schaefer i in., 2003). Spośród innych nietlonych produktów przemian azodikarbonamidu, autorzy wymieniają urazole, kwas cyjanurowy $(\text{CNOH})_3$, które mogą być potencjalnym źródłem uretanów.

2.3.4. Środki ochrony roślin

Pestycydy, fungicydy, insektycydy, czyli powszechnie stosowane środki ochrony roślin, mogą być źródłem karbaminianu etylu. Stanowią one różnorodną grupę estrów kwasu karbaminowego i tiokarbaminowego, łatwo ulegających hydrolizie (Tuszyński i Kwiecień, 1993).

2.4. Wpływ drożdży na tworzenie karbaminianu etylu

Do otrzymywania spirytusów owocowych wykorzystywane są szczepy drożdży winiarskich, które charakteryzują się swoistą specyfiką w zakresie tworzenia cech smakowo-zapachowych. Ponadto drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* zawierają enzymy, które mogą w pewnym stopniu wpływać na zawartość uretanu i jego prekursorów w podłożach fermentacyjnych i otrzymywanych spirytusach. Należą do nich: arginaza (EC 3.5.3.1), metabolizująca L-argininę do L-ornityny i mocznika, syntaza karbamylofosforanu (EC 6.3.4.16), katalizująca syntezę karbamylofosforanu przy udziale jonów amonowych, syntaza karbamylofosforanu (EC 6.3.5.5.), katalizującą syntezę karbamylofosforanu z glutaminy oraz ureaza (EC 3.5.1.5.), katalizująca hydrolizę mocznika.

W winogronach głównym źródłem azotu są aminokwasy i amoniak (Millery i in., 1986; Monteiro i Bisson, 1992). Podczas początkowych godzin fermentacji znacząca ilość aminokwasów jest przyswajana przez drożdże (Monteiro i Bisson, 1991). W drożdżach większość aminokwasów jest gromadzona w wakuolach (Wiemken i Durr, 1974), co jest szczególnie istotne w przypadku argininy. Kiedy w podłożu są wystarczające ilości źródła azotu, ok. 93% argininy pozostaje w wakuoli, a enzymy odpowiedzialne za jej degradację podporządkowane są katabolicznej represji azotowej (NCR) (Salomon i Barre, 1998). Jednakże gdy w podłożu zabraknie źródła azotu, duże ilości argininy zostają uwolnione do cytoplazmy, doprowadzając do aktywacji enzymów, odpowiedzialnych za jej degradację (Whitney i Magasanik, 1973).

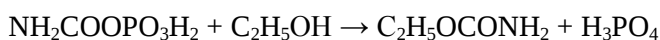
W wyniku rozkładu argininy przez drożdże powstaje L-ornityna i mocznik, który jest prekursorem karbaminianu etylu. Enzymem katalizującym reakcję hydrolizy L-argininy jest arginaza (EC 3.5.3.1), kodowana przez gen CAR1 (Whitney i Magasanik, 1973). Ekspresja genu CAR1 jest regulowana w odpowiedzi na wiele czynników środowiska, włącznie z dostępnością źródła azotu (Sumrada i Cooper, 1984; Messenguy i in., 2000).

Chociaż wszystkie szczepy *S. cerevisiae* wykazują uzdolnienia do sekrecji mocznika, to jednak różnią się pod względem jego reabsorpcji (Ough i in., 1991). Drożdże wydzielają więcej mocznika przy wyższych temperaturach fermentacji, podczas gdy wysokie stężenie jonów amonowych tłumi reabsorpcję mocznika przez drożdże. Zatem istotne jest, aby moszcze gronowe, w których są wysokie stężenia argininy inokulować szczepami drożdży, produkującymi niskie ilości mocznika (Henschke i Jiranek, 1993).

Doświadczenia przeprowadzone przez Kitamoto i in. (1991) wykazały, że możliwa jest produkcja sake niezawierającej karbaminianu etylu. Do jej produkcji użyto szczepów drożdży z zablokowaną ekspresją genu CAR1, niewykazujących aktywności arginazy. W sake wytworzonej z użyciem tych mutantów nie wykryto mocznika oraz uretanu, nawet po 5-miesięcznym przechowywaniu w temperaturze 30°C, co sugeruje, iż jedynym źródłem EC w tym alkoholu jest mocznik.

Sukces w wyeliminowaniu uretanu poprzez zastosowanie przy produkcji sake genetycznie modyfikowanych szczepów, skłonił badaczy do zastosowania drożdży z delecją genu CAR1 do produkcji spirytusu z owoców pestkowych. Podczas prowadzenia badań odnotowano znaczące obniżenie zawartości karbaminianu etylu w finalnym produkcie, w porównaniu z zawartością tego związku w spirytusach wyprodukowanych z użyciem niemodyfikowanych drożdży. Jednakże zastosowanie szczepów z delecją genu CAR1 do fermentacji miazgi z wiśni pozbawionych pestek nie zakłóciło całkowicie tworzenia uretanu, co wskazuje na inne, oprócz mocznika, źródło karbaminianu etylu (Schehl i in., 2007).

Wynikiem katabolicznego rozkładu argininy, oprócz mocznika, jest ornityna. Niektóre szczepy drożdży i pleśni zdolne są do wytwarzania karbamylfosforanu, który w cyklu mocznikowym reaguje z L-ornityną, tworząc L-cytrulinę (Christoph i in., 1987; 1988). Według Ough'a i in. (1988), w przypadku zaburzenia tej reakcji w procesie fermentacji alkoholowej może powstać karbaminian etylu. Wówczas zachodzi reakcja konkurencyjna, w której karbamylfosforan przyłącza grupę etylową, nie odłączając grupy karbonylowej, jak ma to miejsce w przypadku tworzenia L-cytruliny. Jego etanoliza może prowadzić do powstania wysokich zawartości uretanu (Matsudo i in., 1993; Arena i in., 1999; de Orduña i in., 2000; Uthurry i in., 2006).



U Eukariota, w przeciwieństwie do Prokariota, synteza karbamylfosforanu może zachodzić z udziałem dwóch syntaz. Jedna z nich jest specyficzna dla szlaku argininowego (CPS-A), natomiast druga dla szlaku pirymidynowego (CPS-P). Obydwa te enzymy regulowane są niezależnie przez specyficzne geny.

Syntaza karbamylfosforanu (syn. syntetaza karbamylfosforanu I) (EC 6.3.4.16), katalizująca reakcję syntezy karbamylfosforanu, niezbędnego do utworzenia cytruliny w cyklu mocznikowym, zlokalizowana jest w matriks mitochondrialnej. Natomiast syntaza karbamylfosforanu II (EC 6.3.5.5) uczestnicząca w szlaku pirymidynowym występuje w cytozolu. Donorem azotu w syntezie cytozolowej jest glutamina, a w mitochondrialnej jony NH_4^+ (Davis, 1986; Stryer, 2003).

W drożdżach gatunku *S. cerevisiae*, w przeciwieństwie do innych eukariontów, CPS-A jest zlokalizowana w cytozolu (Davis, 1986). Podczas cyklu mocznikowego, w wyniku kondensacji karbamylfosforanu z L-ornityną powstaje L-cytrulina. Reakcja ta jest katalizowana przez karbamoilotransferazę ornitynową (EC 2.1.3.3). W następnym etapie syntaza argininobursztynianowa (EC 6.3.4.5) katalizuje kondensację cytruliny z asparaginianem do argininobursztynianu. Reakcja przebiega kosztem energii ATP, który ulega hydrolizie do AMP i pirofosforanu oraz dzięki następnej hydrolizie pirofosforanu. W ostatnim etapie liaza argininobursztynianowa (EC 4.3.2.1) hydrolizuje argininobursztynian do argininy i fumaranu. Grupa guanidynowa w argininie ulega hydrolizie katalizowanej przez arginazę (EC 3.5.3.1), uwolniony zostaje mocznik, następuje odtworzenie ornityny i cykl zachodzi od początku (Stryer, 2003).

Enzymem katalizującym hydrolizę mocznika do CO_2 i NH_3 jest ureaza (EC 3.5.1.5), czyli amidohydrolaza mocznika, której aktywność uzależniona jest od jonów Ni (II). Im wyższa jest aktywność tego enzymu, tym więcej mocznika, powstającego podczas fermentacji, ulegnie redukcji, co w istocie będzie miało korzystny wpływ na zmniejszenie ilości karbaminianu etylu (Balcerek i Szopa, 2006a).

Aktywność ureazy szczepów drożdży winiarskich nie wystarcza jednak by całkowicie rozłożyć mocznik. Nadmiar tego związku, kumulowanego w komórkach drożdżowych, uwalniany jest do środowiska, gdzie reaguje z etanolem, tworząc karbaminian etylu. Dlatego do nastawów winiarskich zalecany jest dodatek „kwaśnej” ureazy, wyizolowanej z bakterii *Lactobacillus fermentum* (Ough i Trioli, 1988; Butzke i Bisson, 1997; US Patent 4970153; Matthews i in., 2004). Jej aktywność uzależniona jest od pH (optimum przy pH 3÷4) i stężenia etanolu w środowisku. Stosowanie „kwaśnej” ureazy do ograniczenia zawartości mocznika w winach zwiększa koszty produkcji, dlatego podjęto badania nad heterologiczną ekspresją genu, kodującego aktywność ureazy z *Lactobacillus fermentum* do drożdży winiarskich (Zietsman i Viljoen, 2000; Pretorius, 2000, 2003; Verstrepren i in., 2006).

2.5. Wpływ warunków destylacji, maturacji i przechowywania spirytusów owocowych na zawartość karbaminianu etylu

Jakość produkowanych spirytusów uzależniona jest w znacznej mierze od sposobu przeprowadzenia destylacji (Tanner, 1986; Jäger, 1986; Albrecht, 1998; Guan i Pieper, 1999). W gorzelnictwie owocowym najbardziej rozpowszechniona jest metoda podwójnej destylacji. Podczas pierwszej destylacji, określanej mianem odpędu, zostaje praktycznie całkowicie wydzielony alkohol etylowy wraz ze wszystkimi lotnymi substancjami, pochodzącymi z surowca oraz wytworzonymi w czasie fermentacji. Drugą destylację, zwaną korekcyjną, prowadzi się w celu wzmocnienia spirytusu do 60÷75% obj. (Satora i Tuszyński, 2008), przy czym wydziela się z niego określoną ilość przedgonów i pogonów, zawierających substancje wpływające ujemnie na jakość spirytusu.

Jednym ze szczególnych aspektów technologicznych, zdecydowanie wpływających na jakość destylatów owocowych jest materiał wykorzystywany do budowy aparatów destylacyjnych (Bachman i Tuszyński, 1976). Miedziane ścianki kotła odpędowego sprzyjają reakcjom utleniania spirytusu i dehydratacji pentoz. Miedź poprzez swój katalityczny wpływ oddziałuje korzystnie na procesy dojrzewania spirytusów, jak również może wiązać, występujące w spirytusach, związki siarki (Andrade-Sobrinho i in., 2002)

Rodzaj stosowanej aparatury oraz warunki prowadzenia destylacji odgrywają istotną rolę w procesie tworzenia karbaminianu etylu. Szacuje się, że blisko 80% uretanu obecnego w spirytusach powstaje podczas destylacji bądź w czasie 48 godzin po jej zakończeniu (Aresta i in., 2001; Bruno i in., 2007; Fox i Stachowiak, 2007).

Spośród wielu parametrów wpływających na kinetykę syntezy uretanu, do nadrzędnych zalicza się obecność soli metali Cu (II) lub Fe (III) i światło (głównie UV). Z uwagi na katalityczny wpływ miedzi na przemiany cyjanowodoru do kwasu cyjanowego, który w warunkach destylacyjnych łatwo ulega konwersji do karbaminianu etylu, nie zaleca się stosowania do destylacji spirytusów owocowych aparatów destylacyjnych zbudowanych całkowicie z miedzi (Carley i in., 2003; Jung i Adam, 2005). Boscolo (2001) odnotował niższą zawartość uretanu w spirytusach z soku trzcinowego (cachaças), otrzymywanych w aparatach, w których część zstępująca zbudowana była ze stali kwasoodpornej. Jednak spirytusy produkowane w takim systemie mogą wykazywać niepożądane cechy organoleptyczne, związane z obecnością związków siarki (Andrade-Sobrinho i in., 2002; Faria i in., 2003). Omawiany problem nie występuje w przypadku stosowania klasycznych alembików, zbudowanych całkowicie z miedzi, gdyż związki te są wiązane do nielotnych soli (Andrade-Sobrinho i in., 2002).

Według Andrade-Sobrinho i in. (2002), więcej karbaminianu występuje w spirytusach pochodzących z aparatury, w której jest zbyt mała powierzchnia miedziana w części wstępującej. Ritzmann i Fähr (1987) proponują stosować do destylacji kolumny wypełnione miedzianymi pierścieniami Raschiga, dzięki którym można otrzymać spirytusy o zmniejszonej zawartości karbaminianów.

Zaleca się powolną destylację, a odbierane przedgony i pogony z dodatkiem węgla aktywnego należy ponownie oddestylować. Stosowana jest również destylacja z wykorzystaniem tzw. separatora miedziowego (Pieper i in., 1992; Kaufman i in., 1993; Guan i Pieper, 1999), praktykowana w gorzelniach niemieckich. Aparaty destylacyjne wyposaża się w nasadkę wypełnioną pierścieniami miedzianymi, na powierzchni których absorbowane są cyjanki, w postaci nierozpuszczalnych kompleksów (Guan i Pieper, 1999; Andrade-Sobrinho i in., 2002; Jung, 2004). Mimo iż uretan odznacza się wysoką temperaturą wrzenia (ok. 185°C), to jego prekursorzy, takie jak cyjanowodór i jego pochodne (cyjaniany, izocyjaniany) są związkami o wysokiej lotności i niskich temperaturach wrzenia (< 30°C), dlatego szybko przechodzą w stan pary i mogą wchodzić w reakcję z etanolem, prowadząc do powstania karbaminianu w fazie gazowej. Zbyt długie wygrzewanie zacierów oraz odbieranie małej ilości przedgonów, gromadzących cyjanki, przyczynia się do zwiększenia ilości EC w końcowym produkcie (Christoph i in., 1986). Spirytusy (70÷80% obj.) otrzymane metodą tradycyjną (kolumna półkowa, destylacja dwukrotna z częściową deflegmacją) zawierały 3-krotnie więcej uretanu niż pochodzące z destylacji jednostopniowej, w kolumnie z miedzianymi pierścieniami Raschiga (Ritzman i Fähr, 1987). Kolumny z wypełnieniem pozwalają oddzielić więcej HCN i EC oraz uzyskać spirytusy o bardziej zharmonizowanych cechach sensorycznych (Christoph i in., 1986).

Podczas destylacji i rektyfikacji uretan przechodzi do frakcji przedgonowej, środkowej, pogonów oraz do wywaru bądź wody odwarowej. Jednak jego najwyższe stężenia stwierdza się zazwyczaj w środkowych i końcowych frakcjach destylatu (Lachenmeier, 2007). Dlatego istotnym czynnikiem decydującym o zawartości EC w destylacie jest przejście, przy określonej mocy, na odbiór pogonów.

Wyniki badań Bruno i in. (2007) wykazały wpływ rodzaju stosowanej aparatury destylacyjnej i sposobu prowadzenia procesu na zawartości uretanu w brazylijskich spirytusach z soku trzcinowego i gotowych produktach (cachaças). Spirytusy otrzymywane z alembików miedzianych ogrzewanych bezpośrednio ogniem, w większości przypadków wyposażonych w deflegmator miedziany, odznaczały się niższymi stężeniami EC ($145 \pm 111 \mu\text{g/L}$) niż pochodzące z aparatów kolumnowych pracujących w systemie ciągłym ($320 \pm 249 \mu\text{g/L}$). Autorzy tłumaczą to tworzeniem nielotnych kompleksów cyjanków z miedzią w części wstępnej aparatu. Najniższe stężenia EC ($11 \div 17 \mu\text{g/L}$) odnotowano w spirytusach pochodzących z destylacji w alembikach zbudowanych całkowicie ze stali, bez elementów miedzianych, ale również, co ciekawe, w gotowym wyrobie, otrzymanym metodą podwójnej destylacji, w alembiku miedzianym, stosowanym do produkcji whisky.

Wpływ na obniżenie ilości powstającego karbaminianu w wyrobach typu cachaças miało wyposażenie części wstępnej alembików w element deflegmująco-chłodzący (Nóbrega i in., 2009), podczas gdy typowe alembiki do produkcji koniaków wyposażone są jedynie w hełm, chłodzony naturalnie powietrzem. Również Bruno i in. (2007) oraz Alcarde i in. (2012, 2013) donoszą

o znaczeniu deflegmacji w obniżaniu stężenia EC. W przypadku stosowania alembików pracujących na zasadzie współprądu, zaleca się prowadzenie destylacji dwustopniowej pozwalającej na lepsze oddzielenie karbaminianu i jego lotnych prekursorów (Riffkin i in., 1989; Nagato i in., 2000, Nóbrega i in., 2009). de Resende Machado i in. (2013) opracowali szybką metodę oznaczania uretanu w napojach spirytusowych z wykorzystaniem techniki HPLC-FLD z detektorem fluorescencyjnym. Autorzy określili stężenia EC w brazylijskich cachaças, destylowanych w aparatach miedzianych, w granicach od 21,21 do 35,83 $\mu\text{g/L}$. Nie przekraczały one dopuszczalnego limitu zawartości EC, określonego dla tego typu wyrobów (150 $\mu\text{g/L}$) (DOU, 2005).

Świeżo przedestylowane spirytusy, zwłaszcza owocowe, odznaczają się zwykle niezharmonizowanymi cechami organoleptycznymi, dlatego poddawane są dojrzewaniu (maturacji) w drewnianych beczkach, głównie z drewna dębowego. Podczas dojrzewania wyrobów spirytusowych zachodzi wiele reakcji fizyko-chemicznych, wskutek czego zmienia się stężenie, skład napoju, powstają nowe związki (estry, acetale, aldehydy aromatyczne) nadające spirytusom korzystne walory organoleptyczne (Nielepkowicz-Charczuk i Kałużka, 1996; Nielepkowicz-Charczuk i in., 1998). Zmiany dotyczą również związków niepożądanych, m.in. karbaminianu etylu i jego prekursorów. Aylott i in. (1990) zaobserwowali ponad 3-krotne zwiększenie zawartości karbaminianu etylu (od 15 do 54 $\mu\text{g/L}$) w czasie rocznego dojrzewania whisky zbożowej w beczkach dębowych. Wzrost stężenia EC autorzy tłumaczą obecnością w świeżo przedestylowanych spirytusach związków cyjanowych (cyjanowódór, cyjaniany, tiocyjaniany, kompleksy miedzi i cyjanków). Największą dynamikę ubytku tych związków obserwowano w ciągu trzech pierwszych miesięcy, natomiast nie wykryto ich po zakończeniu maturacji. Podobnych obserwacji dokonali Nóbrega i in. (2009) podczas maturacji brazylijskich wyrobów typu cachaça (ze spirytusu trzcinowego), przy czym największy wzrost stężenia uretanu nastąpił w ciągu pierwszych 24÷48 godzin, co znajduje potwierdzenie w doniesieniach innych autorów (Riffkin i in., 1989; Aylot i in., 1990). Zawartości uretanu w spirytusach z cydrów poddanych starzeniu w obecności drewna dębowego były wyższe niż w próbach przed leżakowaniem (Madrera i Valles, 2009).

Zasadniczy wpływ na powstawanie uretanu, zwłaszcza w przypadku produkcji spirytusów z owoców pestkowych, wywierają, oprócz etanolizy prekursorów uretanu w fazie gazowej podczas destylacji (Hesford i Schneider, 2001; Schehl, 2005), warunki ich przechowywania i dystrybucji (światło, temperatura, czas, rodzaj opakowania/kolor szkła butelek) (Tegmo-Larsson i Spittler, 1990; Zimmerli i Schlatter, 1991; Suzuki i in., 2001).

Udokumentowany jest fotochemiczny mechanizm syntezy karbaminianu w warunkach naturalnych. Reakcję taką może wywoływać, m.in. światło widzialne, podczerwień, ultrafiolet. Zachodzi wówczas autooksydacja nie-nasyconych związków (Fox i Stachowiak 2007; Stodolak i in., 2007). Przykładem takiej reakcji jest, zachodzące pod wpływem naświetlania, utlenianie cyjanków (cyjanowodoru) do cyjanianów i izocyjanianów, a następnie synteza uretanu (Muñoz i in., 2000; Aresta i in., 2001; Pedraza-Avella i in.,

2008). Katalizatorem przemian jest światło słoneczne, zwłaszcza w bezchmurne dni (chmury zatrzymują część promieni poniżej 350 nm), (Tegmo-Larsson i Spittler, 1990). Istotny wpływ ma również wysokie stężenie etanolu (Mildau i in., 1987) oraz podwyższona temperatura (Tegmo-Larsson i Spittler, 1990). Mildau i in. (1987) wykazali, że maksimum tworzenia uretanu i przepuszczalności światła dla szkła białego mieści się na zbliżonym poziomie długości fali światła (330-340 nm), w związku z tym największe pobudzenie do tworzenia EC następuje przy świetle dziennym, w butelkach bezbarwnych. Autorzy dowiedli, że stosowanie butelek z brązowego szkła, bądź innych opakowań eliminujących dostęp światła, może zminimalizować tworzenie karbaminianu etylu. Znacznie gorsze efekty odnotowano z użyciem szkła zielonego.

Najwięcej uretanu powstaje w początkowym okresie magazynowania produktów. Podczas pierwszych 4 tygodni przechowywania destylatów owocowych, wzrost stężenia EC może dochodzić nawet do 100%. Zatem zalecane jest ograniczanie dostępu światła i skrócenie czasu przechowywania spirytusów (Christoph i Bauer-Christoph, 1998). Szybkość powstawania EC zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury przechowywania napojów alkoholowych (Tegmo-Larsson i Spittler, 1990; Stevens i Ough, 1993; Woo i in., 2001).

2.6. Metody ograniczania zawartości karbaminianu etylu w napojach alkoholowych

Ze względu na różnorodność prekursorów i złożoność mechanizmów syntezy uretanu oraz zróżnicowany skład chemiczny surowców i otrzymywanych z nich produktów spożywczych, jak i z uwagi na stawiane im wymagania, praktycznie niemożliwe jest opracowanie metod całkowitego wyeliminowania obecności uretanu, zwłaszcza w wyrobach alkoholowych, z zachowaniem ich walorów smakowo-zapachowych i oryginalności surowcowej. Zgodnie z zasadami dobrej praktyki produkcyjnej, celowe jest postępowanie technologiczne, prowadzące do możliwie najwyższego ograniczenia obecności karbaminianów i ich prekursorów w żywności i napojach fermentowanych.

Z obserwacji Hasnipa i in. (2007) wynika, że zawartość uretanu w produktach spożywczych, otrzymywanych z udziałem drobnoustrojów (jogurty, sosy i pasty sojowe, sery) oraz napojach alkoholowych (piwo, wino, cydry) na przestrzeni ostatnich kilku lat (po 2004 roku) uległa obniżeniu i wiele z nich, z wyjątkiem pewnych grup wyrobów spirytusowych, nie zawiera tego związku bądź jest on obecny w niskich stężeniach. Przykładowo, spośród przebadanych w 2004 roku 11 sosów sojowych tylko jeden zawierał karbaminian etylu w ilości 10 µg/kg, podczas gdy wcześniejsze wyniki (1993) wskazywały na znacznie większą jego ilość (ok. 70 µg/kg). Ograniczaniu zawartości uretanu w winach, destylatach winnych i wódkach naturalnych (koniaki, armaniaki) sprzyja eliminacja jego prekursorów, takich jak produkty przemian argininy-cytrulina, mocznik. Zalecane jest stosowanie do fermentacji

drożdży, które odznaczają się uzdolnieniami do uwalniania niewielkich ilości mocznika, czyli wykazujących niską aktywność arginazy (EC 3.5.3.1), kodowanej przez gen CAR1 (Kitamoto i in., 1991).

Kitamoto i in. (1991, 1993) otrzymali mutanty drożdży z zablokowaną ekspresją genu CAR1, których stosowanie nie prowadzi do uwalniania mocznika z argininy. Również Schehl i in. (2005) skonstruowali nowy szczep z delecją genu kodującego aktywność arginazy. Jego zastosowanie do fermentacji miazgi wiśniowej wpłynęło na znaczną redukcję karbaminianu etylu w spirytusie, w porównaniu do otrzymanego z udziałem szczepu rodzicielskiego.

Redukcję mocznika w środowisku fermentacyjnym można osiągnąć przez zastosowanie „kwaśnej” ureazy, wyizolowanej z bakterii *Lactobacillus fermentum* (Foulke, 1993; Food Safety, 1998; Fidaleo i in., 2006). Usuwanie pozostałości mocznika z napojów alkoholowych za pomocą preparatu „kwaśnej” ureazy dopuszczono do stosowania w Japonii (1987 r.). Obróbka ta została uznana za efektywną metodę usuwania EC z saké, która w końcowej fazie fermentacji może zawierać do 30 mg mocznika/L (Fujinawa i in., 1990). Również w Stanach Zjednoczonych BATF (Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms) dopuszcza dodatek ureazy do wina jako czynnika ograniczającego zawartość mocznika. W krajach Unii Europejskiej stosowanie ureazy w winiarstwie reguluje Rozporządzenie Komisji (WE) nr 606/2009 z dnia 10 lipca 2009 roku.

Uzdolnienia do produkcji „kwaśnej” ureazy wykazują również inne gatunki bakterii, m.in. *Arthrobacter mobilis*. Dodatek surowego ekstraktu ureazy do japońskiej saké (20% obj.), zawierającej 35 mg mocznika/L, wpłynął na obniżenie jego stężenia do poziomu poniżej wykrywalnego (Miyagawa i in., 1999). Zotta i in. (2008), badając aktywność ureolityczną wybranych szczepów *Streptococcus thermophilus* wykazali, że ureaza syntetyzowana przez ten gatunek bakterii wykazuje maksimum aktywności w zakresie pH 6,0÷7,0, to jednak relatywnie wysoka aktywność enzymu przy niższych wartościach pH może wskazywać na potencjalną możliwość wykorzystania tych bakterii do obniżenia stężenia mocznika w winach i innych napojach alkoholowych.

Usuwanie mocznika z sake i kalifornijskich win szeryzowanych, poprzez zastosowanie „kwaśnej” ureazy, wprowadzone do praktyki przemysłowej w Japonii i Stanach Zjednoczonych, wykazuje pewne mankamenty w postaci zwiększenia kosztów (Fidaleo i in., 2006). Ograniczenie nakładów związanych z otrzymywaniem preparatów kwaśnej ureazy można osiągnąć poprzez immobilizację enzymu na włóknach poliakrylonitrylowych (PAN) i prowadzenie hydrolizy mocznika w sposób ciągły (Zotta i in., 2007). Podjęto również badania dotyczące możliwości wprowadzenia do drożdży genu kodującego aktywność „kwaśnej” ureazy z *Lactobacillus fermentum* (Zietsman i in., 2000). Ponadto, zalecane jest monitorowanie suplementacji zacierów gorzelniczych i nastawów winiarskich egzogennymi źródłami azotu, z uwzględnianiem składu przetwarzanych surowców, dobór odpowiednich szczepów drożdży, kontrola temperatury podczas przechowywania i transportu gotowych produktów (Butzke i Bisson, 1997).

Szczególną grupę produktów stanowią spirytusy i wyroby spirytusowe, m.in. wódki naturalne z owoców pestkowych, które charakteryzują się najwyższą zawartością karbaminianu etylu. W tym przypadku głównym prekursorem EC jest cyjanowodor i produkty jego przemian (cyjaniany, izocyjaniany). Ryzyko powstawania uretanu w przypadku spirytusów i wódek owocowych nie kończy się na procesie destylacji. Dotyczy ono również powszechnie stosowanej maturacji spirytusów (Ayloitt i in., 1990) oraz destylatów owocowych (Balcerek i Szopa, 2008), wykorzystywanych do produkcji wysokogatunkowych wódek naturalnych, jak i etapu przechowywania, dystrybucji i ekspozycji gotowych wyrobów.

W wielu gorzelnianach owocowych proces destylacji spirytusu odbywa się w miedzianych aparatach odpędowych. Miedź jest katalizatorem przemian, pozytywnie kształtujących bukiet spirytusów, ale również powoduje utlenianie cyjanowodoru do kwasów cyjanowego i izocyjanowego, zarówno podczas prowadzenia procesu w fazie gazowej, jak i w roztworze (w destylacie). W spirytusach destylowanych w takiej aparaturze występują znaczne ilości miedzi Cu (II), nawet powyżej 10 mg/L (Cameán i in., 2001). Zapobieganie powstawaniu uretanu powinno obejmować eliminację cyjanków i ich prekursorów na etapie przygotowania surowców do fermentacji oraz usuwanie miedzi z destylatów (Saidu, 2004).

Możliwe jest obniżenie stężenia cyjanków z wykorzystaniem metod mikrobiologicznych. Rodanazy pochodzenia bakteryjnego (EC 2.8.1.1) to enzymy, katalizujące przemianę jonów cyjankowych (CN^-) do tiocyjanianu (CNS) za pomocą siarki, pochodzącej od kwasu β -merkaptopirogronowego ($HSCH_2COCOOH$). Tę reakcję detoksykującą wykorzystuje się także podczas ratowania osób zatrutych cyjankami (Saidu, 2004; Cipollone i in., 2006). Opisany sposób eliminacji cyjanków nie jest jednak wykorzystywany w procesach produkcji środków spożywczych (Weber i Sharypov, 2009).

Niektórzy badacze zaproponowali dodatek enzymów w celu rozłożenia cyjanowodoru albo całkowite usunięcie pestek przed zmiążdżeniem owoców (Dürr, 1992), co jednak nie wyklucza obecności cyjanowodoru w otrzymanym destylacie, ponieważ glikozydy cyjanogenne obecne są również w miąższu (Ljekocevič, 1993; Schehl i in., 2005). Alternatywą jest chemiczna eliminacja cyjanków w odfermentowanej miazdze owocowej przed destylacją, poprzez tworzenie nierozpuszczalnych kompleksów tych związków z udziałem soli miedzi (Christoph i Bauer-Christoph, 1998, 1999) bądź destylacja z użyciem separatora miedziowego (Pieper i in., 1992). Dostępne są handlowe preparaty, skomponowane w oparciu o sole miedzi Cu (I), jak Cyanurex® (Schliessmann, 2006), pozwalające na ok. 90% obniżenie stężenia cyjanowodoru w środowisku alkoholowym (Laugel i Bindler, 1993). Kontrowersyjne są jednak wyniki tak wysokiej redukcji cyjanowodoru w kontekście wpływu na cechy sensoryczne otrzymywanych spirytusów (Christoph i in., 1988; Laugel i Bindler 1993).

Christoph i in. (1987) opisują metodę strącania cyjanowodoru przy użyciu soli srebra. Mankamentem tego rozwiązania jest konieczność dokładnego określenia zawartości HCN. Natychmiastowe wstrzymanie reakcji powstawania

uretanu może spowodować dodatek soli żelaza, np. siarczanu (VI) żelaza (II) (Adam i Postel, 1987). Są to jednak metody drogie i szkodliwe dla środowiska.

Inna grupa metod obejmuje postępowanie zmierzające do maksymalnego wytworzenia karbaminianu etylu i usunięcie go metodą destylacyjną. Mildau i in. (1987) zaproponowali naświetlanie spirytusu lampą halogenową, z kolei Tanner i in. (1987) wskazują na możliwość zastosowania dodatku kwasu askorbinowego i przetrzymywanie w ciemności przez 4-5 tygodni.

Podczas prowadzenia destylacji zalecane jest ograniczenie kontaktu cyjanków i miedzi, poprzez stosowanie do budowy części zstępującej aparatury stali kwasoodpornej zamiast miedzi. Inny sposób zakłada „pułapkowanie” prekursorów w postaci gazowej na powierzchni miedzianych pierścieni, umieszczonych przed wejściem na kolumnę, bądź w przypadku typowych alembików w części umieszczonej na kotle destylacyjnym, zwanej potocznie gruszką lub cebulą. Pożądana jest duża powierzchnia właściwa wypełnienia (Guerain i Leblond, 1993).

Istotną rolę odgrywa również obróbka podestylacyjna, ponieważ obecność soli miedzi w spirytusach może wpływać na ich cechy organoleptyczne oraz katalizować syntezę karbaminianu etylu. Dlatego wskazane jest usuwanie jonów miedzi Cu (II) i prekursorów uretanu. Jedną z metod jest zastosowanie nierozpuszczalnych środków chelatujących lub żywic jonowymiennych (kationity). W literaturze dostępne są nieliczne informacje dotyczące usuwania miedzi z napojów z wykorzystaniem wymienionych metod (Kogyo, 2002; Shuguang i Gibb, 2008). Są to rozwiązania dość kłopotliwe, ponieważ ich efektywność wymaga ustalenia współzależności wielu zmiennych, m.in.: pH, temperatury, czasu kontaktu z żywicą, wielkości jej cząstek.

Prowadzono próby usuwania prekursorów karbaminianu w skali laboratoryjnej z wykorzystaniem żywic anionitowych (Wucherpfenning, 1992; Guerain i Leblond, 1993). Autorzy odnotowali wysokie obniżenie cyjanków ($< 0,1$ mg/L) i miedzi (II) ($< 0,1$ mg/L) w spirytusach wiśniowych (45% obj.) i śliwkowych (65% obj.). Kationy miedzi były immobilizowane w postaci kompleksów anionowych. Stwierdzono również wysoki stopień obniżenia karbaminianu etylu, do ok. 140 μ g/L. Zastosowane zabiegi znacząco wpłynęły na ich własności organoleptyczne poprzez osłabienie aromatu migdałowego i pojawienie się obcego, nieprzyjemnego zapachu. Neves i in. (2007) opisali efektywną metodę usuwania jonów miedzi (II) ze spirytusów z trzciny cukrowej, bez zmiany ich własności organoleptycznych. Zasada postępowania opiera się na obróbce węglanem wapnia lub magnezu, który zachowuje się jak wymiennicz jonowy. Stwierdzono obniżenie stężenia jonów miedzi do poziomu poniżej 0,01 mg/L, niezależnie od rodzaju węglanu. Mniejszą efektywność obróbki obserwowano w próbach dojrzewających w beczkach drewnianych, co może wynikać z tworzenia kompleksów miedzi ze składnikami drewna.

Interesujące wyniki otrzymali Park i in. (2009), którzy badali efektywność redukcji karbaminianu etylu w spirytusach i sosach sojowych metodą filtracji przez węgiel drzewny. W rozcieńczonych spirytusach wysokie obniżenie stężenia uretanu (o ponad 40%) następowało w ciągu pierwszych 4 minut

przewodzenia procesu. W sosach sojowych maksymalny spadek stężenia EC, o ponad 45%, przypadał na pierwsze 2 minuty, po czym następowało gwałtowne obniżenie wydajności filtracji. Zmniejszenie stężenia uretanu mieściło się w granicach od 45÷47%. Ponadto zaobserwowano znaczną poprawę cech smakowo-zapachowych sosów, podczas gdy roztwory rozcieńczonego spirytusu po filtracji odznaczały się gorszym smakiem. Uznano zatem, że w przypadku tej grupy produktów, filtracja z udziałem węgla powinna być prowadzona przed rozcieńczaniem i dodawaniem aromatów.

Przedstawione doniesienia literaturowe wskazują na różnorodność prekursorów karbaminianu etylu i dróg jego powstawania podczas otrzymywania spirytusów owocowych. Ponadto zróżnicowana skuteczność proponowanych metod eliminacji tych związków, jak i ograniczenia w ich aplikacji, powodowane często zmianami składu chemicznego i cech smakowo-zapachowych produktu, bądź czynnikami natury ekonomicznej, wskazują na potrzebę przeprowadzenia kompleksowych badań z zakresu technologii spirytusów owocowych, które pozwolą na opracowanie wytycznych, dotyczących prowadzenia procesu technologicznego, zapewniających zachowanie oryginalności surowcowej i ograniczoną zawartość związków niepożądanych, ze szczególnym uwzględnieniem uretanu.

3. GENEZA I CEL PRACY

Bezpieczeństwo zdrowotne produktów spożywczych, w tym również napojów alkoholowych, wskazuje na potrzebę ograniczania możliwości powstawania w procesach przetwórczych związków szkodliwych dla zdrowia i ich prekursorów.

Do wyrobów spirytusowych, rozpowszechnionych i cenionych ze względu na ich walory smakowo-zapachowe, należą wódki naturalne owocowe (okowita, brandy). Specjalnością polską, z tradycją sięgającą XVII wieku, są śliwovice. Interesującym, pełnowartościowym surowcem do otrzymywania oryginalnego spirytusu, z przeznaczeniem do zestawiania wódek naturalnych, są owoce aronii ciemnoowocowej (Balcerek, 2001; Balcerek i Szopa, 2002, 2005a).

Wysokie koszty produkcji spirytusów owocowych wynikają, w znacznej mierze, z wyższej ceny owoców, w porównaniu z tradycyjnymi surowcami gorzelnicznymi. Zatem istotne jest stosowanie właściwej technologii przerobu, pozwalającej na zachowanie w produkcie finalnym oryginalności surowcowej i składników aromatu owocowego, jednocześnie z ograniczeniem zawartości związków niepożądanych, do których należy m.in. karbaminian etylu.

Jednym z prekursorów tego związku w spirytusach owocowych jest cyjanowódor – produkt hydrolizy glikozydów cyjanogennych, obecnych nie tylko w owocach pestkowych (śliwki, wiśnie), lecz także w owocach ziarnkowych (jabłka) i jagodowych (aronia).

Znajomość składu surowca nie jest jednak wystarczająca do określenia ryzyka powstawania karbaminianu etylu. Istotny wpływ mogą odgrywać warunki fermentacji, uzdolnienia enzymatyczne drożdży, produkty uboczne fermentacji, jak również metoda i warunki destylacji, maturacji oraz przechowywania spirytusów i zestawianych z ich udziałem wyrobów.

Zagadnienia dotyczące powstawania karbaminianu etylu w procesie otrzymywania spirytusów owocowych nie były dotąd przedstawione w ujęciu kompleksowym. Z uwagi na powyższe przesłanki zasadne stało się przeprowadzenie badań, zmierzających do ustalenia wpływu poszczególnych etapów w procesie otrzymywania spirytusów owocowych, z uwzględnieniem drożdży stosowanych do prowadzenia fermentacji oraz składu jakościowo-ilościowego spirytusów, na syntezę karbaminianu etylu. Celem aplikacyjnym było opracowanie wytycznych, dotyczących postępowania technologicznego, pozwalających na ograniczenie zawartości tego związku i jego prekursorów w spirytusach owocowych, z zachowaniem korzystnych cech smakowo-zapachowych i tożsamości surowcowej.

Zakres badań obejmował:

- określenie składu chemicznego surowców owocowych, wykorzystywanych (śliwki) i możliwych do wykorzystania w polskim gorzelnictwie owocowym (aronia), z uwzględnieniem prekursorów karbaminianu etylu,
- ocenę wpływu obróbki wstępnej owoców, rodzaju pożywki azotowej i warunków fermentacji na kinetykę syntezy karbaminianu etylu w zacierach i jego zawartość w spirytusach,
- ocenę uzdolnień enzymatycznych wybranych ras drożdży winiarskich do biosyntezy lub rozkładu prekursorów karbaminianu etylu, tj. aktywności syntaz karbamylofosforanu (biosynteza karbamylofosforanu), aktywności arginazy (uwalnianie mocznika z argininy) oraz aktywności ureazy (hydroliza mocznika),
- określenie przydatności chemicznych i biologicznych metod ograniczania syntezy karbaminianu etylu podczas fermentacji alkoholowej owoców,
- ocenę roli produktów ubocznych fermentacji i produktów hydrolizy glikozydów cyjanogennych w tworzeniu karbaminianu etylu,
- określenie wpływu warunków destylacji pierwotnej i korekcyjnej na zawartość karbaminianu etylu w spirytusach owocowych,
- ocenę wpływu warunków maturacji na zmiany jakościowe i ilościowe związków uczestniczących, bezpośrednio lub pośrednio (jako katalizatory), w syntezie karbaminianu etylu,
- identyfikację uretanów w otrzymanych spirytusach owocowych.

4. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

4.1. Surowce i materiały pomocnicze

Przedmiotem badań były owoce śliwy Węgierki Zwykłej i Węgierki Łowickiej (*Prunus domestica* L.) oraz aronii czarnooowocowej (*Aronia melanocarpa* Elliot). Owoce wykorzystywane do realizacji badań pochodziły z plantacji k/Kielc i były zbierane w cyklu 6 sezonów zbiorów, w stadium dojrzałości, uznanej za optymalną dla uzyskania wysokiej jakości spirytusu owocowego. Owoce przechowywano w stanie zamrożonym.

Jako pożywkę dla drożdży, podczas prowadzenia fermentacji alkoholowej miazgi owocowej, stosowano dodatek jednozasadowego fosforanu diamonu $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (cz.d.a.), w ilości $0,2 \div 1,0$ g/kg miazgi owocowej. W badaniach wpływu rodzaju pożywek azotowych na syntezę karbaminianu etylu stosowano ponadto: siarczan diamonu (0,2 g/kg), mocznik ($0,1 \div 0,2$ g/kg) oraz preparat Activit (Institut Oenologique de Champagne, Francja), w ilości 0,2 g/kg miazgi owocowej. Preparat zawiera w ściśle określonych proporcjach mieszaninę nieaktywnych komórek drożdżowych, ścian komórkowych i celulozy oraz soli amonowych. W składzie znajdują się aminokwasy, witaminy (B1, B2, B5, B6, B12, PP), cholina oraz sole mineralne (Mg, Na, K, Ca).

Do depektynizacji miazgi owocowej stosowano preparaty handlowe:

- Pektopol PT-400 (Pektowin, Jasło) – 1,5 g/kg miazgi, $T = 50 \div 55^\circ\text{C}$, $t = 20$ min,
- PEKTOZYMETM POWERMash (Danisco A/S, Dania) – 0,07 mL/kg miazgi, $T = 15 \div 35^\circ\text{C}$.

Uwzględniając, że wymieniony preparat wykazuje aktywność enzymatyczną w dość szerokim zakresie temperatur, suplementowana nim miazga owocowa, po wymieszaniu, była od razu zadawana drożdżami i poddawana fermentacji.

Maturację spirytusów owocowych prowadzono w obecności wiórów dębowych (*Quercus pedunculata*), w ilości $60 \text{ cm}^2/\text{L}$ spirytusu.

4.2. Materiał biologiczny

4.2.1. Drożdże

W badaniach wykorzystywano rasy drożdży winiarskich (*Saccharomyces cerevisiae*): *Syrena*, *Tokay*, *Burgund*, *Bordeaux*, *Steinberg*, pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ oraz suszone drożdże *Saccharomyces bayanus* (Prochimica Varese SRL, Włochy). Wybór ras drożdży oparty był na wynikach wcześniejszych badań (Balcerek, 2001), potwierdzających ich wysoką aktywność fermentacyjną w zacierach owocowych (m.in. aroniowych) oraz pożądane cechy smakowo-zapachowe otrzymywanych spirytusów.

4.2.2. Bakterie

Ze względu na wysokie koszty preparatu handlowego „kwaśnej ureazy”, uznano za celowe określenie uzdolnień do produkcji ureazy wybranych szczepów bakterii *Lactobacillus fermentum* (DSM 20049, DSM 20052, DSM 20055, DSM 20391), pochodzących z Kolekcji Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Niemcy). Szczepy bakterii przechowywano na skosach MRS, w temperaturze 4°C.

4.3. Pożywki hodowlane

Hodowle drożdży winiarskich do badania aktywności wybranych enzymów, prowadzono w zmodyfikowanej pożywce wg Romano (1976), zawierającej w 1 L roztworu: 80,0 g glukozy; 2,0 g KH_2PO_4 ; 0,25 g CaCl_2 ; 0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mg $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg KJ; 0,1 mg $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Pożywkę uzupełniano L-argininą (1,74 g) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g) – w badaniach aktywności arginazy, mocznikiem (1,3 g/L) – w przypadku oceny aktywności ureazy, bądź NH_4Cl (0,5 g/L) lub glutaminą (0,5 g/L) – w oznaczaniu aktywności syntaz karbamylofosforanu. pH roztworów regulowano do wartości 3,8, wykorzystując roztwór kwasu cytrynowego o stężeniu 0,5 mol/L. Sterylne pożywki suplementowano dodatkiem witamin w ilości (na 1 L): 25 µg biotyny, 300 µg tiaminy, 300 µg kwasu nikotynowego, 300 µg pantotenianu-Ca, 300 µg pirydoksyny-HCl, 25 mg mezoinozytolu. Kompleks witamin dodawano w postaci stężonego roztworu, sterylizowanego metodą filtracji przez filtry membranowe -Milex®-GV o wielkości porów 0,22 µm.

Aktywację szczepów drożdży prowadzono przez 2-krotne pasażowanie w płynnej pożywce YPG. Pożywki szczepiono 5% inokulum, które stanowiły 48-godzinne hodowle wstrząsane drożdży, w odpowiednich podłożach modelowych. Namnażanie prowadzono w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, w temperaturze $28 \pm 3^\circ\text{C}$, w czasie 72 godzin.

Hodowle bakterii *Lactobacillus fermentum* do badania aktywności ureazy prowadzono w pożywce modelowej MRS-U, wg Zotty i in. (2008), składającej się ze standardowej pożywki MRS, wzbogaconej mocznikiem (5 g/L) i siarczaniem niklu ($\text{NiSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (0,05 g/L), w temperaturze 37°C, w czasie 48 godzin. Inokulum stanowiły 24-godzinne hodowle bakterii w płynnej pożywce MRS, dodawane w ilości 5% obj., w stosunku do objętości podłoża.

4.4. Modelowe podłoża fermentacyjne

W celu określenia wpływu wybranych produktów ubocznych fermentacji na syntezę karbaminianu etylu prowadzono fermentację etanolową w pożywkach modelowych (Romano, 1976), zawierających w 1 L roztworu: 80 g glukozy; 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,5 g KH_2PO_4 ; 0,25 g CaCl_2 ; 0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 1 mg $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 0,5 mg $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; pH roztworów regulowano do wartości 3,8, wykorzystując roztwór kwasu cytrynowego o stężeniu 0,5 mol/L. Sterylne podłoża wzbogacano witaminami

w ilościach analogicznych, jak w przypadku pożywek, wykorzystywanych do hodowli drożdży (p. 4.3). Do każdej z prób fermentacyjnych (włącznie z próbą odniesienia) dodano cyjanek sodu, w ilości odpowiadającej 3 mg CN^-/L . W fazie fermentacji głównej, podłoża (oprócz próby odniesienia) uzupełniono dodatkami następujących związków: octanu etylu (0,5 g/L), metanolu (0,5 g/L), aldehydu octowego (0,3 g/L), aldehydu benzoowego (0,03 g/L), alkoholu benzylowego (0,03 g/L), diacetylu (0,03 g/L), wyższych alkoholi w postaci mieszaniny alkoholu izoamyłowego (1,0 g/L) i izobutyłowego (1,0 g/L). W doświadczeniach wykorzystywano związki chemiczne o stopniu czystości cz.d.a. (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA). Warunki prowadzenia fermentacji podano w p. 4.6.3.

4.5. Metody badań

4.5.1. Analiza owoców

Ocenę przydatności technologicznej owoców, wykorzystanych do prowadzenia doświadczeń, przeprowadzono metodami zalecanymi w przemyśle owocowo-warzywnym (Krełowska-Kułas, 1993). Obejmowała ona oznaczanie zawartości ekstraktu ogólnego, kwasowości, cukrów, azotu oraz popiołu.

4.5.1.1. Glikozydy cyjanogenne

Oznaczenie zawartości glikozydów cyjanogennych w surowcach owocowych przeprowadzono zmodyfikowaną metodą wg Haque i Bradbury (2002). Przygotowano wodne roztwory wzorcowe amygdaliny (zawierające w przeliczeniu od 0,5 do 10,0 mg CN^-/L) lub prunazyny (zawierające w przeliczeniu od 0,005 do 0,5 mg CN^-/L), które następnie poddano hydrolizie kwasowej z udziałem 5 mL 50% (w/w) kwasu ortofosforowego, w temperaturze 100°C, w czasie 1 h, z zastosowaniem aparatu do destylacji próżniowej firmy HACH. Analogicznie prowadzono hydrolizę glikozydów, zawartych w miazdze owocowej i pestkach, wykorzystując 10÷20 g miazgi lub 1÷2 g rozdrobnionych nasion pestek zawieszonych w wodzie destylowanej (250 mL). Uwalniany cyjanowodor był destylowany do 50 mL 0,1 mol/L roztworu NaOH. Otrzymane destylaty przenoszono ilościowo do kolb miarowych o pojemności 100 mL i po uzupełnieniu wodą destylowaną do nominalnej objętości wykorzystywano do oznaczenia cyjanowodoru.

Stężenie cyjanowodoru oznaczano metodą pirydynowo-pirazolonową, polegającą na przeprowadzeniu cyjanowodoru w chlorocyjan z udziałem chloraminy T oraz reakcji między powstałym chlorkiem cyjanu i roztworem pirydyny, zawierającym 1-fenylo-3-metylo-5-pirazolon oraz 4,4'-bis(1-fenylo-3-metylo-5-pirazolon). Absorbancję niebieskiego barwnika powstającego w roztworach wzorcowych oraz badanych próbach mierzono spektrofotometrycznie, przy długości fali $\lambda = 612 \text{ nm}$ (Epstein, 1947; Hach, 2000). Do wykonania analiz wykorzystywano zestaw odczynników firmy Hach Company (Loveland, USA). Zawartość glikozydów cyjanogennych w badanych surowcach podano w prze-

liczeniu na amygdalinę w pestkach śliwek (Voldřich i Kyzlink, 1992) i w owocach aronii (Lehman, 1990) oraz w przeliczeniu na prunazynę w miąższu śliwek (Voldřich i Kyzlink, 1992).

4.5.1.2. Arginina

Oznaczenie zawartości argininy wykonano metodą HPLC, z wykorzystaniem chromatografu cieczowego Perkin-Elmer, z detektorem UV, pracującym w zakresie 190÷360 nm. Roztwory wzorcowe argininy i badane próby dozowano na kolumnę chromatografu, po derywatyzacji z użyciem chloroformianu 9-fluorenylmetylu (FMOC-Cl), (Bauza i in., 1995).

Analizy prowadzono stosując:

- kolumnę NUCLEOSIL C18 o wymiarach 250x4,6 mm.

- detektor UV 255 nm, przepływ 0,5 mL/min.

- eluent : A – 50 mM octan sodu; 3% acetonitrylu; pH 5,4

- B – 32 mM octan sodu; 70% acetonitrylu; pH 6,1

Gradient od 100% buforu A do 100% buforu B w czasie 15 minut

Czas retencji argininy 2,8 min, fala analityczna 250 nm.

4.5.2. Analiza zacierów

Ocenę przebiegu i efektywności fermentacji miazgi owocowej prowadzono według metod zalecanych w gorzelnictwie (Krełowska-Kułas, 1993).

4.5.2.1 Cyjanowodór

Cyjanowodór uwalniany podczas fermentacji zacierów owocowych był z nich wydzielany w aparacie do destylacji próżniowej firmy HACH, bez hydrolizy kwasowej. Oznaczenie uwolnionego cyjanowodoru wykonano zgodnie z metodyką podaną w p. 4.5.1.1.

4.5.2.2. Mocznik

Oznaczenie prowadzono w frakcji ciekłej, otrzymanej po przesączeniu zacierów odfermentowanych, z wykorzystaniem testów enzymatycznych firmy R-Biopharm (Darmstadt, Niemcy). Zasada metody polega na przeprowadzeniu reakcji amoniaku (powstałego w wyniku hydrolizy mocznika) z 2-oksoglutaranem, w obecności dehydrogenazy glutaminowej (GIDH) i zredukowanego dinukleotydu nikotynoamino-adeninowego (NADH) do L-glutaminy. Ilość utlenionego dinukleotydu odpowiada ilości amoniaku lub połowie ilości mocznika, zawartego w badanej próbce. Poziom utlenionego NADH był ustalany podczas pomiaru absorbancji przy długości fali światła $\lambda = 340$ nm.

4.5.3. Analiza spirytusów

Analizę fizykochemiczną surowych spirytusów owocowych prowadzono metodami zalecanymi w przemyśle spirytusowym. Obejmowała ona oznaczenie:

kwasowości (PN-A-79529-10:2005P), estrów (PN-A-79529-11:2005P), aldehydów (PN-A-79529-9:2005P), fuzli (PN-A-79529-8:2005P) i metanolu (PN-A-79529-7:2005P).

4.5.3.1. Cyjanowodór

Cyjanowodór wolny oznaczano bezpośrednio w spirytusach, zaś związany po jego uwolnieniu z badanych prób, pod wpływem 50% (w/w) kwasu ortofosforowego, w aparacie do destylacji próżniowej firmy HACH, zgodnie z metodyką podaną w p. 4.5.1.1.

4.5.3.2. Zawartość diacetylu

Zasada oznaczenia polega na przeprowadzeniu diacetylu i pokrewnych diketonów do pochodnych benzopirazyny, pod wpływem działania o-fenylodiaminy i następnie kolorymetrycznym porównaniu zabarwienia badanej próby z zabarwieniem roztworów wzorcowych, o znanych stężeniach diacetylu, przy długości fali światła $\lambda = 335 \text{ nm}$ (PN-A-79093-15:2000P).

4.5.3.3. Zawartość karbaminianu etylu

Zawartość karbaminianu etylu w spirytusach owocowych, cieczach pochodowlanych i zacierach odfermentowanych oznaczano metodą chromatografii gazowej (Conacher i in., 1987). Wykorzystywano chromatograf gazowy firmy Agilent, typ 6890N z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID i dozownikiem SSL (Split-Splitless).

Próbę cieczy pochodowlanej (po oddzieleniu biomasy drożdży) oraz próbę przesączonego zacieru pobierano w ilości 50 mL, zaś próbę spirytusu w takiej ilości, aby po uzupełnieniu do objętości 50 mL stężenie etanolu nie przekraczało 10% obj. Następnie poddawano ją wysalaniu przez dodatek 30 g NaCl. Kolejnym etapem była 2-krotna ekstrakcja dichlorometanem (75 mL). Uzyskany ekstrakt filtrowano przez sączek z bibuły Watman 1 i osuszano, przepuszczając przez kolumnkę szklaną (zabezpieczoną przed działaniem światła), wypełnioną 40 g bezwodnego siarczanu (VI) sodu. Następnie dodawano do niego 4 mL octanu etylu i zatężano na wyparce w temperaturze 28°C, do objętości ok. 2,5÷3,0 mL. Zagęszczony ekstrakt przenoszono ilościowo do próbówki, popłukując kolbę wyparki małymi porcjami octanu etylu i uzupełniano do objętości 5 mL. Ekstrakt karbaminianu etylu w octanie etylu dozowano w ilości 2 μL na kolumnę chromatografu. Jako standard wewnętrzny stosowano karbaminian propylu.

Do rozdzielu składników zastosowano kolumnę kapilarną wypełnioną fazą stacjonarną INNOWAX 19091N-113 o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,32 mm i grubości filmu 0,25 μm .

Warunki analizy:

- programowanie temperatury: 50°C (5 min) → 20°C/min → 140°C (10 min) → 20°C/min → 250°C (10 min),

- temperatura dozownika 240°C,
- temperatura detektora 250°C,
- przepływ gazu nośnego (helu) – 1 mL/min; splitless.

Potwierdzenia tożsamości karbaminianu etylu dokonywano na podstawie obecności jonów m/z 62, 74 i 89, wykorzystując chromatograf gazowy firmy Fisons typ GC 8000, sprzężony ze spektrometrem masowym MD 800. Stosowano kolumnę kapilarną i warunki analizy jw.; energia jonizacji 70 eV, temperatura źródła jonów 200°C. Stężenie karbaminianu etylu w badanych próbach określano na podstawie krzywej kalibracyjnej zewnętrznej.

Identyfikację innych uretanów prowadzono według procedury i w warunkach oznaczania karbaminianu etylu. Potwierdzenia tożsamości karbaminianów dokonywano na podstawie obecności następujących jonów: m/z 75 dla MC; m/z 62, 74 i 89 dla EC, w okresie ich retencji. Stopień odzysku karbaminianów wynosił odpowiednio: 88÷110% dla MC i 90÷104% dla EC. Limit detekcji MC i EC wynosił 0,01 mg/L.

Stosowano następujące odczynniki (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA):

- dichlorometan o stopniu czystości 99,8% (sprawdzony na obecność jonów m/z 62, 74 i 89),
- octan etylu o stopniu czystości 99,8% (sprawdzony na obecność jonów m/z 62, 74 i 89),
- karbaminiany: metylu i etylu (Chem Service, West Chester, USA) oraz propylu jako standard wewnętrzny (Dr. Ehrenstorfer, GMBH, Niemcy), o stopniu czystości 99%.

4.5.3.4. Zawartość miedzi

Zawartość miedzi w spirytusach surowych, poddanych mineralizacji, oznaczano metodą z kwasem 2,2'-bicynchoninowym. W obecności miedzi pojawia się purpurowe zabarwienie, którego intensywność mierzono przy długości fali światła $\lambda = 560$ nm, w spektrofotometrze DR/2000 firmy Hach.

4.5.4. Ocena aktywności wybranych enzymów drożdży i bakterii

4.5.4.1. Przygotowanie ekstraktów bezkomórkowych

Uzyskaną po hodowli biomasę drożdży wirowano (3000 x g, 30 min) w temperaturze 4°C, następnie przemywano buforem o pH 7,5 [50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 5% glicerol] – w oznaczeniach aktywności syntaz karbamylofosforanu i arginazy (Abdelal i Ingraham, 1975; Kitamoto in. 1989, 1991) oraz 100 mmol/L buforem fosforanowym o pH 7,0 – w przypadku oznaczania aktywności ureazy (Ghasemi i in., 2004). Następnie komórki zawieszano w odpowiednim buforze (stosunek objętości buforu do objętości biomasy 2:1). Drożdże poddawano dezintegracji w obecności sterylnego piasku ($\phi = 0,45 \div 0,50$ mm) w lodzie, do osiągnięcia 99% stopnia

destrukcji (ocena mikroskopowa). Surowy ekstrakt wirowano (12000 x g, 30 min) w temperaturze 4°C celem usunięcia piasku i pozostałości komórek.

Otrzymaną po hodowli biomasę bakterii *Lactobacillus fermentum* wirowano (4000 x g) przez 40 min w temperaturze 4°C, następnie 2-krotnie przemyto 100 mmol/L buforem fosforanowym o pH 7,0 i powtórnie wirowano. Oddzielone komórki zawieszono w ww. buforze, po czym poddano sonifikacji w lodzie (2 x 5 min, moc MS 73/D, pulsacja 10 s). Surowy ekstrakt wirowano (8000 x g) przez 30 min w temperaturze 4°C, celem usunięcia pozostałości komórek. Otrzymane ekstrakty bezkomórkowe drożdży i bakterii wykorzystywano do oznaczenia aktywności wybranych enzymów.

4.5.4.2. Białko ogółem

Zawartość białka w ekstraktach bezkomórkowych drożdży i bakterii oznaczano kolorymetrycznie, wg Lowry'ego (1951), wobec krzywej wzorcowej sporządzonej dla krystalicznej albuminy z surowicy wołowej. Istotą oznaczenia jest kolorymetryczne określenie barwnego produktu reakcji odczynnika Folina-Ciocalteu'a z kompleksami miedziowymi białka.

4.5.4.3. Oznaczanie aktywności arginazy

Zasada oznaczenia polega na reakcji enzymatycznej z udziałem arginazy, w wyniku której L-arginina zostaje przekształcona do L-ornityny i porównaniu zabarwienia badanej próby z zabarwieniem roztworów wzorcowych, sporządzonych ze znanych ilości L-ornityny. Pomiaru absorbancji dokonuje się przy długości fali światła $\lambda = 515$ nm (Konarska i Tomaszewski, 1986).

Do 25 μ L 10 mmol/L roztworu $MgCl_2$ dodano 25 μ L ekstraktu bezkomórkowego drożdży i inkubowano przez 20 min w 55°C, w celu uaktywnienia arginazy. Następnie, po schłodzeniu roztworu do temperatury pokojowej dodano do niego 150 μ L 100 mmol/L buforu węglanowego o pH 9,5 i 50 μ L 100 mmol/L L-argininy w 100 mmol/L Tris-HCl o pH 9,5. Mieszaninę poddano inkubacji w 37°C przez 10 min, po czym reakcję zatrzymano poprzez dodatek 750 μ L kwasu octowego lodowatego. Następnie dodano 250 μ L roztworu ninhydryny (2,5 g ninhydryny; 40 mL 6 mol/L kwasu fosforowego; 60 mL kwasu octowego lodowatego) i próby gotowano (1 h, 90÷100°C). Po ostudzeniu mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 515$ nm, wobec próby odniesienia, zawierającej zdenaturowany enzym. Wyniki podano jako ilość nanomoli ornityny, powstałej w ciągu minuty i odniesiono do zawartości białka w badanej próbce.

4.5.4.4. Oznaczanie aktywności syntaz karbamylofosforanu

Zasada oznaczenia polega na ATP-zależnej konwersji wodorowęglanu sodu, znaczonego izotopem ^{14}C , z udziałem jonów NH_4^+ (pochodzących z NH_4Cl) lub z udziałem glutaminy do karbamylofosforanu, który pod wpływem działania hydroksyloaminy jest hydrolizowany do hydroksymocznika (Abdelal i Ingraham, 1975). Mieszaninę reakcyjną, w ilości 0,5 mL, zawierającą: 100 mmol/L bufor

trietanoloaminy o pH 8,0; 100 mmol/L KCl; 12 mmol/L ATP; 16 mmol/L MgCl₂; 10 mmol/L NaH¹⁴CO₃ (0,1 μCi/μmol); 10 mmol/L glutaminy lub 100 mmol/L NH₄Cl oraz badany ekstrakt bezkomórkowy drożdży inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 min. Reakcję przerywano przez dodatek 50 μL 1,2 mol/L chlorowodoru hydroksyloaminy. Następnie próbę ogrzewano przez 10 min we wrzącej łaźni wodnej. Po ochłodzeniu dodawano 0,1 mL 60% kwasu trichlorooctowego i mieszano przez 10 min w celu usunięcia uwolnionego ¹⁴CO₂. 0,5 mL próby przenoszono do probówki, zawierającej 7 mL mieszaniny scyntylacyjnej Insta-Gel Plus (Canberra-Packard) i dokonywano pomiaru jej radioaktywności, z wykorzystaniem licznika LKB Wallac 1219 Rackbeta. Próba kontrolna zawierała zdenaturowany enzym.

Za jednostkę aktywności syntazy karbamylfosforanu przyjęto aktywność, która katalizuje syntezę 1 μmola karbamylfosforanu w temperaturze 37°C, w ciągu 1 godziny. Uzyskane wartości aktywności odniesiono do zawartości białka w badanej próbce. Aktywność syntetazy karbamylfosforanu (N), wyrażoną w [U/mg białka], obliczano wg poniższego schematu:

$$A = \frac{T}{E} \text{ [dpm]}$$

A – radioaktywność (*dpm-desintegration per minute*)

T – liczba impulsów odczytana z licznika (*cpm-counts per minute*)

E – współczynnik wyznaczony dla próbki bez NaH¹⁴CO₃ = 0,961

$$A' = \frac{A}{2.2 \times 10^6} \text{ [}\mu\text{Ci]} \quad \mu\text{Ci} = 2,2 \times 10^6 \text{ dpm}$$

(μCi – mikro curie)

$$n = \frac{A'}{a} \text{ [}\mu\text{mol]}$$

$$n = k \cdot t \cdot N$$

$$N = \frac{n}{k \cdot t} \text{ [U]}$$

a (NaH¹⁴CO₃) – radioaktywność właściwa = 0,1 μCi/ μmol

n – ilość powstałego w reakcji karbamylfosforanu [μmol]

k – stała szybkości reakcji enzymatycznej [μmol/godz x unit]

t – czas reakcji enzymatycznej [godz.]

N – liczba jednostek enzymu [units]

A' – radioaktywność wyrażona w jednostkach μCi (*mikro curie*)

4.5.4.5. Oznaczanie aktywności ureazy

Aktywność ureazy oznaczano metodą Weatherburna (Ghasemi i in., 2004), która polega na przeprowadzeniu reakcji hydrolizy mocznika, pod wpływem ureazy zawartej w badanym ekstrakcie bezkomórkowym bakterii *L. fermentum*, powstaniu barwnego związku amoniaku z mieszaniną reakcyjną fenol-nitroprusydek sodu, w obecności zasadowego roztworu podchlorynu sodu, następnie kolorymetrycznym porównaniu zabarwienia badanej próby i roztwo-

rów wzorcowych, o znanych stężeniach jonów amonowych (sporządzonych z siarczanu (VI) amonu), przy długości fali światła $\lambda = 630 \text{ nm}$.

Do mieszaniny reakcyjnej składającej się z 0,5 mL 100 mmol/L buforu cytrynianu sodu (pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5) lub 0,5 mL 100 mmol/L buforu fosforanu potasu (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) i 0,5 mL 50 mmol/L roztworu mocznika dodawano 0,1 mL ekstraktu bezkomórkowego drożdży lub bakterii i inkubowano 30 min w 37°C. W celu wyznaczenia termostabilności ureazy bakteryjnej, przygotowywano mieszaninę reakcyjną, zawierającą lizaty komórek zawieszone w buforze o pH 4,5 i inkubowano 30 min w temperaturze, od 30 do 75°C. Reakcję przerywano przenosząc 0,05 mL mieszaniny reakcyjnej do probówki zawierającej 0,5 mL mieszaniny fenol-nitroprusydek sodu (0,05 g nitroprusydku sodu; 1 g świeżo przedestylowanego fenolu; 100 mL wody destylowanej). Następnie, dodawano 0,5 mL roztworu alkalicznego podchlorynu sodu (3,56 g Na_2HPO_4 ; 1 mL podchlorynu sodu; 100 mL wody destylowanej) i próbę ponownie inkubowano przez 30 min, w temperaturze pokojowej. Próba kontrolna zawierała denaturowany enzym.

Za jednostkę aktywności ureazy przyjęto aktywność, która prowadzi do uwolnienia w ciągu 1 godziny 1 μmol NH_3 w warunkach oznaczenia. Uzyskane wartości aktywności podano w przeliczeniu na zawartość białka w badanych ekstraktach bezkomórkowych.

4.5.5. Obliczenia

Szybkość powstawania etanolu ($V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$) podczas fermentacji zacierów owocowych, wyrażoną w g/kg h, określono stosunkiem przyrostu stężenia etanolu w badanej próbce ($\Delta C_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$) w kolejnych dobach fermentacji, do czasu, w którym ten przyrost odnotowano:

$$V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} = (\Delta C_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} \cdot \rho) / t,$$

$\Delta C_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ – przyrost stężenia etanolu w zacierze [mL 100% obj./kg zacieru],

q – gęstość etanolu (100% obj.), [0,789 g/mL],

t – doby fermentacji [24 h].

Szybkość uwalniania cyjanowodoru i syntezy karbaminianu etylu ($V_{\text{HCN/EC}}$), wyrażoną w mg/kg h, określano stosunkiem przyrostu stężenia związku ($\Delta C_{\text{HCN/EC}}$) w kolejnych dobach fermentacji, do czasu, w którym ten przyrost odnotowano:

$$V_{\text{HCN/EC}} = (\Delta C_{\text{HCN/EC}}) / t,$$

$\Delta C_{\text{HCN/EC}}$ – przyrost stężenia cyjanowodoru/karbaminianu etylu w zacierze, [mg/kg],

t – doby fermentacji [24 h].

4.5.6. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna, obejmująca: odchylenie standardowe, analizę wariancji, współczynnik korelacji Pearsona (r) na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, wykonana została z wykorzystaniem programu Origin 6.0. (Northampton, USA). Wszystkie próby fermentacyjne i oznaczenia wykonano w, co najmniej, dwóch powtórzeniach.

4.6. Przebieg doświadczeń

4.6.1. Badania wpływu obróbki wstępnej owoców, dodatku pożywek azotowych, ras drożdży i warunków fermentacji na powstawanie karbaminianu etylu

W celu przygotowania owoców do fermentacji, po rozmrożeniu, rozdrabniano je do tzw. miazgi. W przypadku przerobu śliwek, drylowano je, a następnie dodawano odpowiednią ilość pestek do zacierów.

Zacierzy były różnicowane:

- rodzajem przerabianych owoców (śliwki odmiany Węgierka Zwykła, Węgierka Łowicka, aronia czarnoowocowa),
- sposobem obróbki wstępnej surowca: miazga surowa; miazga pasteryzowana ($T = 85^{\circ}\text{C}$, $t = 30$ min), miazga po obróbce ciśnieniowo-termicznej ($p = 0,1$ MPa, $T = 121^{\circ}\text{C}$, $t = 20$ min),
- rodzajem stosowanych preparatów pektynolitycznych: Pektopol PT-400 (1,5 g/kg miazgi, $T = 50\div 55^{\circ}\text{C}$, $t = 20$ min), PEKTOZYME™ POWERMash (0,07 mL/kg miazgi, $T = 15\div 35^{\circ}\text{C}$, działanie w czasie fermentacji),
- rodzajem i ilością pożywek azotowych dla drożdży: fosforan (V) diamonu (0,1÷1,0 g/kg), siarczan (VI) diamonu (0,2 g/kg), mocznik (0,1÷0,2 g/kg), preparat Activit (0,2 g/kg),
- pH zacieru: 3,4÷3,6 (naturalne pH owoców), 4,0, 5,0,
- temperaturą prowadzenia procesu: 18÷20°C, 26°C, 35°C.

Ponadto oceniano uzdolnienia wybranych szczepów drożdży winiarskich do biosyntezy enzymów, katalizujących syntezę lub rozkład prekursorów karbaminianu etylu (opis doświadczeń w p. 4.5.4).

Suszone drożdże winiarskie *S. bayanus*, przed dodaniem do zacierów poddawano rehydratacji. Wielkość inokulum wynosiła 0,3 g s.s./kg miazgi. W celu przygotowania inokulum, czyste kultury drożdży przeszczepiano w warunkach sterylnych ze skosu agarowego YPG do 30 mL brzezki słodowej o gęstości 10°Blg i pH = 5. Wstępną hodowlę prowadzono w temperaturze 28°C w czasie 24 godzin. Drugi etap hodowli przebiegał w kolbach o pojemności 0,5 L, zawierających po 150 mL podłoża o pH = 5, składającego się z mieszaniny (1:1) brzezki słodowej 10°Blg i soku owocowego 10°Blg. Hodowlę prowadzono w czasie 48 godzin, w temperaturze ok. 28°C. Namnożone drożdże, po odwirowaniu i przemyciu sterylną wodą, dodawano do zacierów w postaci mleczka, w ilości 50 mL/kg, co odpowiadało 0,3 g s.s./kg.

Fermentacje zacierów prowadzono w kolbach szklanych płaskodennych (10 L), zakrytych rurkami fermentacyjnymi lub w pojemnikach emaliowanych (50 L) z pokrywami, zabezpieczającymi przed dostępem powietrza, w temperaturze 26°C (lub innej, zależnie od etapu badań), dokonując okresowego mieszania oraz pomiaru ubytku CO₂ lub ekstraktu pozornego jako wskaźnika dynamiki fermentacji. Przeciętny czas fermentacji wynosił ok. 8÷10 dób, zaś w próbach fermentowanych z udziałem mikroflory autochtonicznej – 13÷15 dób.

Zacierzy odfermentowane o zawartości etanolu, od 3,6 do 5,5% obj., poddawano odpędowi, a otrzymane spirytusy surowe o mocy ok. 14÷18% obj. zateżano w szklanym aparacie destylacyjnym z birektyfikatorem (deflegmator wg Golodetza), do mocy ok. 40% obj. i poddawano analizie na zawartość cyjanowodoru oraz karbaminianu etylu.

W celu określenia prawdopodobieństwa syntezy uretanu w reakcjach fotochemicznych, wybrane próby spirytusów poddano działaniu promieni UV, poprzez okresowe naświetlanie wysokociśnieniową lampą rtęciową Psorilux (360 W) (Heraeus Instruments GmbH, Hanau Niemcy).

4.6.2. Ocena skuteczności chemicznych i biologicznych metod ograniczania syntezy karbaminianu etylu w zacierach owocowych

Surowcami wykorzystywanymi do prowadzenia tego etapu badań były śliwki odmiany Węgierka Zwykła i aronia ciemnoowocowa. Fermentacje prowadzono w miazdze surowej, z dodatkiem 5% pestek rozdrobnionych w przypadku śliwek, przy udziale drożdży winiarskich *S. bayanus*, w ilości 0,3 g s.s./kg miazgi owocowej. Jako pożywkę dodawano fosforan diamonu, w dawce 0,2 g/kg. Proces prowadzono w temperaturze 26°C.

Ocena przydatności chemicznych metod ograniczania lub intensyfikacji syntezy uretanu obejmowała suplementację zacierów owocowych, w fazie dofermentowania (po 6 dobie), odpowiednio chlorkiem miedzi (I) (0,1÷0,2 g/kg) lub kwasem askorbinowym (1÷2 g/kg) i przetrzymywanie ich przez 10 dni w ciemności, w temperaturze 20÷22°C.

W ramach badań skuteczności biologicznych metod ograniczania syntezy uretanu, oceniano wpływ bakterii *Lactobacillus fermentum* na obniżenie stężenia mocznika w zacierach śliwkowych i aroniowych, poprzez ich dodatek do miazgi owocowej w fazie dofermentowania (po 6 dobie). Zawartość mocznika powstałego w wyniku aktywności metabolicznej drożdży wynosiła odpowiednio: 0,7 mg/kg miazgi aroniowej i 12,5 mg/kg miazgi śliwkowej. Zacierzy uzupełniono egzogennym związkiem do 50 mg/kg miazgi owocowej oraz dodano lizaty bakterii w takiej ilości, aby wprowadzona aktywność ureazy pozwalała na uwolnienie 90 μ mol NH₃ w ciągu minuty (Kakimoto i in., 1990a; Kobashi i in., 1990) i pozostawiono na okres 8 dób w temperaturze ok. 20°C. W odstępach 2-dobowych pobierano próby, w których badano zmiany stężenia mocznika, zaś po zakończeniu doświadczeń poddano je ocenie na zawartość etanolu, cyjanowodoru i karbaminianu etylu.

Zacierzy odfermentowane poddano destylacji w zestawie szklanym do destylacji prostej, otrzymując spirytusy surowe o mocy 15÷18% obj., które następnie zateżano w zestawie destylacyjnym z birektyfikatorem (bez frakcjonowania), do mocy 40% obj., celem przeprowadzenia analiz fizyko-chemicznych, ze szczególnym uwzględnieniem cyjanowodoru i karbaminianu etylu oraz oceny smaku i zapachu.

4.6.3. Wpływ produktów ubocznych fermentacji na powstawanie karbaminianu etylu

Fermentację alkoholową w podłożach modelowych, o składzie podanym w p. 4.4, prowadzono z udziałem suszonych drożdży winiarskich *S. bayanus* (0,3 g/L), w temperaturze 28°C, do czasu zakończenia wydzielania CO₂, tj. gdy masa kolb fermentacyjnych nie ulegała zmianie. Otrzymane spirytusy surowe o mocy ok. 14% obj. zateżano do zawartości etanolu 40% obj. i poddano ocenie na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu.

W celu określenia wpływu aldehydów alifatycznych i aromatycznych na tworzenie karbaminianu etylu, przeprowadzono badania modelowe w roztworach spirytusu rektyfikowanego o mocy 40% obj., zawierających NaCN, w ilości odpowiadającej 3 mg CN⁻/L oraz aldehyd octowy (0,1÷0,3 g/L), lub aldehyd benzoesowy (0,005÷0,015 g/L). pH roztworów regulowano 0,5 mol/L kwasem cytrynowym, do wartości 4,5. Tak przygotowane próby umieszczono w butelkach z białego szkła. Próbę kontrolną przechowywano bez dostępu światła, w 20÷22°C. Kolejne próby poddano działaniu: światła dziennego (20÷24°C), okresowemu naświetlaniu lampą UV (2 h/dobę). Po 2 tygodniach, w próbach spirytusu określano zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu.

4.6.4. Wpływ cyjanków na syntezę uretanu

Oceniano wpływ obecności jonów cyjankowych (3 mg CN⁻/L), w postaci: NaCN, CuCN, KCNO, KCNS i kwasu cyjanurowego, w roztworach spirytusu rektyfikowanego o mocy 40% obj. (pH = 4,5), z dodatkiem (0,015 g/L) lub bez dodatku aldehydu benzoesowego, na syntezę uretanu. Badano również wpływ stężenia etanolu (10÷60% obj. przy pH = 4,5) i pH roztworów (2,5÷5,5, przy stężeniu etanolu 40% obj., w roztworach zawierających cyjanian potasu), w ilości odpowiadającej 3 mg CN⁻/L. Próby umieszczono w butelkach z białego szkła i poddano działaniu światła dziennego (w temperaturze 20÷24°C) przez 2 tygodnie, po upływie których poddano analizie na zawartość karbaminianu etylu.

4.6.5. Wpływ warunków destylacji pierwotnej (procesu odpędu) i korekcyjnej na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w spirytusach owocowych

Destylację spirytusu z zacierów odfermentowanych prowadzono w miedzianym aparacie odpędowym, typu alembik, pracującym na zasadzie współprądu, wyposażonym w hełm (łapacz kropel), ogrzewanym przeponowo płaszczem wodno-parowym lub w szklanym zestawie do destylacji prostej, ogrzewanym za pomocą łaźni elektrycznej z autotransformatorem. Destylację korekcyjną surowych spirytusów owocowych prowadzono w ww. aparacie miedzianym (typu alembik), w szklanym zestawie destylacyjnym z birektyfikatorem laboratoryjnym (deflegmator wg Golodetza) oraz w kolumnie szklanej (Ø = 85 mm, l = 1300 mm), wypełnionej szklanymi pierścieniami Raschiga (Ø = 5 mm, l = 12 mm).

Ponadto, oceniano wpływ:

- czasu wygrzewania prób [min]: 0, 30, 60, 90,
- szybkości odbioru przedgonów i frakcji środkowej (właściwej), w następujących wariantach: I – wszystkie frakcje odbierane z szybkością 2,5 mL/min, II – przedgony 2,5 mL/min, frakcja właściwa 3,5 mL/min, III – przedgony 2,5 mL/min, frakcja właściwa 5 mL/min, IV – przedgony 5 mL/min, frakcja właściwa 5 mL/min; V – przedgony 5 mL/min, frakcja właściwa 7,5 mL/min, VI – przedgony 5 mL/min, frakcja właściwa 10,0 mL/min,
- wielkości odbioru przedgonów: 3 lub 5%, w przeliczeniu na spirytus 100% obj.,
- mocy frakcji środkowej (właściwej): 65, 75, 85% obj.

Za pogony uznano ciecz pozostałą po zakończeniu odbioru frakcji właściwej, bez wydzielania ich w postaci odrębnej frakcji. W przeliczeniu na objętość spirytusu 100% obj., stanowiły one do ok. 10% etanolu zawartego w próbce wyjściowej, pobranej do destylacji korekcyjnej. Etapy badań, dotyczące czasu wygrzewania, szybkości odbioru przedgonów i frakcji środkowej, wielkości odbioru przedgonów oraz mocy frakcji właściwej, prowadzone były z użyciem birektyfikatora laboratoryjnego.

Przeprowadzono także badania w modelowych roztworach wodno-alkoholowych (20 i 40% obj.), z dodatkiem 20 mg EC/L, mające na celu poznanie rozkładu stężeń karbaminianu etylu podczas destylacji frakcjonowanej. Proces prowadzono w birektyfikatorze laboratoryjnym. Przed rozpoczęciem odbioru frakcji, próby spirytusu w objętości 1000 mL wygrzewano przez 30 min, po czym odbierano kolejno 10 porcji destylatu, w ilości 100 mL każda. Szybkość destylacji wynosiła 2,5 mL/min.

4.6.6. Wpływ warunków maturacji spirytusów owocowych na zmiany zawartości karbaminianu etylu i jego prekursorów

Do prowadzenia maturacji wykorzystywano frakcje właściwe o mocy 75% obj., otrzymane po destylacji korekcyjnej spirytusów śliwkowego i aroniowego, z odbiorem 3% przedgonów. Część spirytusów rozcieńczano wodą destylowaną do mocy 45, 55, 65% obj. i poddano dojrzewaniu w obecności wiórów dębowych (60 cm²/L), w następujących warunkach:

- 45% obj., T = 20°C, mieszanie 3 min/dobę,
- 55% obj., T = 20°C, mieszanie 3 min/dobę,
- 65% obj., T = 20°C, mieszanie 3 min/dobę,
- 55% obj., T = 40°C (próby termostutowano 2 h/dobę, 5 dni w tygodniu),
- 55% obj., T = 20°C, napowietrzanie – natężenie przepływu powietrza 100 L/h (1 h/dobę, 5 dni w tygodniu).

Proces prowadzono w butelkach ze szkła białego, wypełnionych w $\frac{3}{4}$ objętości, szczelnie zamkniętych korkiem, bez dostępu światła. W czasie pierwszych 9 tygodni, próby do badań pobierano w odstępach 3 – tygodniowych, następne zaś po 15 i 30 tygodniach. Analizy chemiczne obejmowały oznaczanie zawartości karbaminianu etylu, cyjanowodoru, diacetylu i miedzi.

5. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

5.1. Charakterystyka chemiczna owoców wykorzystywanych w badaniach

Najpopularniejszymi owocami, wykorzystywanymi w Polsce do produkcji wódek naturalnych typu brandy (Śliwowica Łącka, Śliwowica Paschalna) są śliwki odmiany Węgierka Zwykła (Tuszyński i Satora, 2003; Satora i Tuszyński, 2005; 2008).

Podstawowym surowcem, wykorzystywanym do realizacji badań były owoce dwóch odmian śliwy Węgierki, tj. Zwykła i Łowicka. Za interesujący surowiec uznano również owoce aronii, reprezentujące grupę owoców jagodowych. W Zakładzie Technologii Spirytusu i Drożdży ITFiM PŁ prowadzono w latach 1994-2001 badania w zakresie optymalizacji technologii otrzymywania spirytusu aroniowego, które wykazały, iż dzięki oryginalności może być on półproduktem w zestawianiu naturalnych wódek owocowych (Balcerek, 2001).

Skład chemiczny owoców wykorzystywanych do prowadzenia doświadczeń przedstawiono w tabeli 3. Istotnym składnikiem owoców, z punktu widzenia wydajności fermentacji, są cukry. Stężenie cukrów ogółem wyrażone w g cukru inwertowanego/100 g owoców, mieściło się odpowiednio w granicach: od 7,16 do 8,27 g w Węgierce Łowickiej, od 8,27 do 8,40 g w Węgierce Zwykłej i od 6,67 do 7,81 g w aronii.

Spośród składników odżywczych, asymilowanych przez drożdże podczas fermentacji, drugie miejsce, pod względem ilościowym, zajmuje azot (Pretorius, 2000). Niedobór związków azotowych w środowisku może prowadzić do zakłócenia, a niekiedy nawet zatrzymania fermentacji. Stosowane w praktyce winiarskiej moszcze są zróżnicowane pod względem przyswajalnego azotu i wymagają zwykle jego uzupełniania. Przeciętna zawartość związków azotowych w winogronach wynosi 0,7%, w jabłkach 0,3%, w wiśniach 1%, w porzeczkach 1,7% (Wzorek i Pogorzelski, 1998). Wykazano różnice w zawartości związków azotowych w owocach wykorzystywanych do prowadzenia doświadczeń. Owoce aronii zawierały związki azotowe w ilości od 0,42 do 0,52% s.m., śliwki odmiany Węgierka Łowicka od 0,44÷0,60% s.m., zaś Węgierka Zwykła od 0,74÷0,80% s.m. (tab. 3). Porównanie uzyskanych wyników analiz podstawowego składu chemicznego owoców z wartościami zalecanymi, gwarantującymi prawidłowy przebieg fermentacji zacierów owocowych, wskazuje na potrzebę suplementacji pożywką azotową.

Grupą związków, obecnych nie tylko w owocach pestkowych, ale również ziarnkowych, jagodowych, są glikozydy cyjanogenne, których hydroliza, katalizowana przez rodzime enzymy prowadzi do uwalniania cyjanowodoru, jednego z głównych prekursorów karbaminianu etylu. Zawartość prunazyny w miąższu śliwek, wykorzystywanych w badaniach, wynosiła odpowiednio, od 0,45 do 0,58 mg/100 g (Węgierka Łowicka) i od 0,08 do 0,41 mg/100 g (Węgierka Zwykła). Głównym źródłem glikozydów cyjanogennych są jednak

pestki. W 100 g nasion pestek z Węgierki Łowickiej znajdowało się od 97,29 do 112,50 mg amygdaliny, zaś z Węgierki Zwykłej od 103,55 do 110,00 mg/100 g. Otrzymane wyniki są niższe od wartości, jakie dla śliwek podają Voldřich i Kyzlink (1992). Autorzy wykazali, że w 100 g jąder pestek śliwek (nieokreślonej odmiany) znajdowało się 260 mg amygdaliny, zaś zawartość prunazyny w miąższu wynosiła 9,80 mg/kg.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że zawartość amygdaliny, oznaczona w całych owocach aronii, mieściła się w granicach od 64,30 do 76,00 mg/100 g (tab. 3). Są to wyniki wyższe od podanych przez Kullinga i Rawela (2008), którzy określili stężenie amygdaliny w owocach aronii na poziomie 20,1 mg/100 g, w soku 5,7 mg/100 mL oraz 52,3 mg/100 g wytlóków. Wpływ na rozbieżności między wynikami badań własnych a danymi cytowanymi w piśmiennictwie, mogły mieć nie tylko różnice odmianowe (Voldřich i Kyzlink, 1992; Vetter, 2000), ale również warunki klimatyczne, agrotechniczne oraz stopień dojrzałości owoców w czasie zbioru (Knight i Walter, 2001; Lewis i Elvin-Lewis, 2003).

Uzyskane wyniki wskazują, iż celem ograniczenia ilości uwalnianych cyjanoków, z zachowaniem oryginalności surowcowej spirytusów owocowych, zasadne jest ograniczenie ilości pestek dodawanych do zacierów z owoców pestkowych bądź inne zabiegi w przypadku otrzymywania spirytusu z surowców, przy przerobie których niemożliwe jest oddzielenie pestek.

Tabela 3. Skład chemiczny owoców wykorzystywanych w badaniach (lata 2004÷2009), (n = 2)

Oznaczenie	Jednostka		Śliwki		Aronia czarnoowocowa
			Węgierka Łowicka	Węgierka Zwykła	
Ekstrakt	[g/100g]		12,20÷15,50	13,50÷15,80	13,90÷17,10
Kwasowość	[g kw. jabł./100g]		0,90÷1,12	0,88÷1,12	0,80÷1,22
Cukry ogółem	[g inwertu/100g]		7,16÷8,27	8,27÷8,40	6,67÷7,81
Azot ogólny	[% s. m.]		0,44÷0,60	0,74÷0,80	0,42÷0,52
Popiół	[% s. m.]		2,56÷2,59	0,48÷2,55	2,14÷2,24
pH	-		3,33÷3,70	3,40÷3,65	3,50÷3,67
Glikozydy cyjanogenne	[mg/100 g]	miąższ /prunazyna/	0,45÷0,58	0,08÷0,41	64,30÷76,00*
		pestki /amygdalina/	97,29÷112,50	103,55÷110,00	

* miąższ z pestkami /glikozydy cyjanogenne wyrażone jako amygdalina/

5.2. Wpływ modyfikacji technologicznych oraz warunków fermentacji na uwalnianie cyjanowodoru i syntezę karbaminianu etylu

5.2.1. Kinetyka hydrolizy glikozydów cyjanogennych i syntezy karbaminianu etylu podczas fermentacji alkoholowej zacierów owocowych

Badano wpływ wybranych zabiegów technologicznych na szybkość biosyntezy etanolu, hydrolizy glikozydów cyjanogennych i tworzenia karbaminianu etylu w procesie fermentacji zacierów owocowych. Oceniono zależność między rodzajem drożdży stosowanych do prowadzenia procesu oraz obróbki wstępnej surowca a dynamiką uwalniania cyjanowodoru, syntezy karbaminianu etylu oraz alkoholu etylowego. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabelach 4-6.

Maksymalna szybkość powstawania etanolu podczas fermentacji miazgi surowej z udziałem drożdży *S. bayanus* przypadała na trzecią dobę i wynosiła 0,69 g/kg·h dla zacieru śliwkowego i 0,33 g/kg·h dla aroniowego. W kolejnych godzinach fermentacji tempo syntezy alkoholu malało, mimo wzrostu jego stężenia w zacierze, które osiągnęło maksymalną wartość (5% obj. dla śliwki, 3,5% obj. dla aronii) po ósmej dobie procesu (tab. 4).

Oceniając kinetykę uwalniania cyjanowodoru, stwierdzono, że była ona najwyższa w początkowym okresie, tj. w drugiej dobie fermentacji miazgi śliwkowej ($27,1 \cdot 10^{-3}$ mg/kg·h) i w trzeciej, w przypadku miazgi aroniowej ($29,1 \cdot 10^{-3}$ mg/kg·h). W kolejnych etapach fermentacji następowało znaczące obniżenie szybkości hydrolizy glikozydów cyjanogennych i uwalniania cyjanowodoru, zwłaszcza w miazdze śliwkowej, mimo wzrostu jego stężenia w środowisku. Na szczególną uwagę zasługuje fakt uwalniania znacznie większych ilości tego związku w miazdze aroniowej niż śliwkowej. Zawartość HCN w odfermentowanym zacierze aroniowym wynosiła 4,80 mg/kg, podczas gdy w śliwkowym była ok. 5-krotnie niższa (0,95 mg/kg). Różnice w ilości uwolnionego cyjanowodoru mogą wynikać ze zróżnicowanej ilości związków cyjanogennych w przerabianych owocach (HCN-p, *ang.* „cyanogenic potential”) (Stochmal i Oleszek, 1997; Niedźwiedź-Siegień, 1998; Niedźwiedź-Siegień i Gierasimiuk, 2001), aktywności β -glukozydazy oraz od ilości cyjanowodoru, który może być uwolniony w jednostce czasu (HCN-c, *ang.* „cyanogenic capacity”), (Ballhorn i in., 2005, 2010).

Odwrotne tendencje, niż w przypadku uwalniania cyjanowodoru, odnotowano w odniesieniu do syntezy karbaminianu etylu, która rozpoczęła się w fazie dofermentowania, po szóstej dobie w miazdze śliwkowej i po piątej w aroniowej. Stężenie EC w zacierach odfermentowanych wynosiło odpowiednio, 0,02 mg/kg śliwkowego i 0,03 mg/kg aroniowego (tab. 4). Stosunkowo niskie stężenia karbaminianu etylu w odfermentowanych zacierach aroniowych, mimo kilkakrotnie wyższej zawartości cyjanowodoru niż w zacierach śliwkowych, mogą być wynikiem hamowania syntezy uretanu przez obecne w owocach aronii związki polifenolowe, które wykazują silne właściwości antyoksydacyjne (Sikora i Markowicz, 2008; Kraujalyte i in., 2011; Białek i in., 2012).

Tabela 4. Kinetyka biosyntezy etanolu, uwalniania cyjanowodoru i tworzenia karbaminianu etylu w procesie fermentacji surowej miazgi owocowej, z udziałem drożdży *Saccharomyces bayanus* (n = 2)

Doby fermentacji	Śliwki odmiany Węgierka Zwykła (10% pestek całych)								
	Etanol			Cyjanowodór			Karbaminian etylu		
	C [% obj.]	ΔC [% obj.]	V [g/kg·h]	C [mg/kg]	ΔC [mg]	V [mg/kg·h]	C [mg/kg]	ΔC [mg]	V [mg/kg·h]
0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,8	0,8	0,26	0,08	0,08	$3,3 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
2	1,7	0,9	0,30	0,73	0,65	$27,1 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
3	3,8	2,1	0,69	0,86	0,13	$5,4 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
4	4,2	0,4	0,13	0,89	0,03	$1,2 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
5	4,6	0,4	0,13	0,94	0,05	$2,1 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
6	4,8	0,2	0,07	0,95	0,01	$0,4 \cdot 10^{-3}$	<0,01	<0,01	$<4,2 \cdot 10^{-4}$
7	4,9	0,1	0,03	0,95	0,00	0,00	0,01	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
8	5,0	0,1	0,03	0,95	0,00	0,00	0,02	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
Doby fermentacji	Aronia czarnoowocowa								
	Etanol			Cyjanowodór			Karbaminian etylu		
	C [% obj.]	ΔC [% obj.]	V [g/kg·h]	C [mg/kg]	ΔC [mg]	V [mg/kg·h]	C [mg/kg]	ΔC [mg]	V [mg/kg·h]
0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,4	0,4	0,13	2,30	2,30	$95,8 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
2	0,9	0,5	0,16	2,60	0,30	$12,5 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
3	1,4	1,0	0,33	3,30	0,70	$29,2 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
4	2,1	0,7	0,23	3,90	0,60	$25,0 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
5	2,7	0,6	0,20	4,50	0,60	$25,0 \cdot 10^{-3}$	<0,01	<0,01	$<4,2 \cdot 10^{-4}$
6	3,0	0,3	0,10	4,60	0,10	$4,2 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
7	3,3	0,3	0,10	4,70	0,10	$4,2 \cdot 10^{-3}$	0,02	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
8	3,4	0,1	0,03	4,80	0,10	$4,2 \cdot 10^{-3}$	0,03	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
9	3,5	0,1	0,03	4,80	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00

Podczas fermentacji spontanicznej miazgi owocowej obserwowano dłuższy etap zafermentowania. Synteza etanolu rozpoczęła się w drugiej dobie fermentacji, a największa szybkość jego produkcji (0,49 g/kg·h w miazdze śliwkowej; 0,36 g/kg·h w miazdze aroniowej) przypadała, odpowiednio, na trzecią i czwartą dobę procesu. W ciągu kolejnych godzin następował stopniowy wzrost stężenia etanolu, ale ze znacznie niższą szybkością. Zakończenie fermentacji miazgi śliwkowej nastąpiło po trzynastu dobach (stężenie etanolu 4,3% obj.), a aroniowej po piętnastu (3,3% obj.), (tab. 5).

Największe tempo uwalniania cyjanokwenu obserwowano w pierwszej dobie, przed zafermentowaniem owoców. W przypadku zacieru śliwkowego właściwa szybkość uwalniania HCN wynosiła $12,5 \cdot 10^{-3}$ mg/kg·h, zaś w miazdze aroniowej była ponad 10-krotnie wyższa ($17,5 \cdot 10^{-2}$ mg/kg·h), co potwierdza

znacznie wyższy potencjał glikozydów cyjanogennych w owocach aronii i prawdopodobnie wyższą aktywność rodzimych enzymów katalizujących ich hydrolizę. Zawartość cyjanowodoru w odfermentowanej miazdze aroniowej (z udziałem mikroorganizmów autochtonicznych) wynosiła 7,0 mg/kg i była o około 46% wyższa niż w próbie fermentowanej z dodatkiem drożdży szlachetnych (4,8 mg/kg) (tab. 4). W przypadku zaciera śliwkowego nie stwierdzono istotnych różnic ($P > 0,2$) w ilości produktów hydrolizy glikozydów cyjanogennych, niezależnie od tego czy fermentacja była prowadzona z udziałem drożdży szlachetnych, czy też bez ich udziału (tab. 4-5). Różnice w ilości uwolnionego cyjanowodoru mogą wynikać z tego, że zacier śliwkowy fermentowany z udziałem mikroorganizmów bytujących na owocach, zafermentowały szybciej niż aroniowe. Związana z tym wyższa kinetyka syntezy etanolu w miazdze śliwkowej wpływała na hamowanie aktywności enzymów katalizujących hydrolizę glikozydów cyjanogennych. Śladowe ilości karbaminianu etylu w zacierach, zarówno śliwkowym, jak i aroniowym (0,01 mg/kg) oznaczono dopiero w fazie ich dofermentowania, odpowiednio w dziesiątej i czternastej dobie fermentacji (tab. 5).

Wstępna depektynizacja miazgi owocowej spowodowała jej rozluźnienie i upłynnienie, dzięki czemu zacier fermentowały dynamiczniej niż sporządzone z miazgi surowej. Znalazło to odzwierciedlenie w znacznie wyższej szybkości syntezy etanolu, której maksimum, zarówno, w zacierze śliwkowym, jak i aroniowym przypadało na drugą dobę i wynosiło odpowiednio: 1,38 i 0,65 mg/kg·h (tab. 6).

Największa szybkość uwalniania cyjanowodoru, podobnie jak w próbach fermentowanych bez dodatku drożdży, przypadała na pierwszą dobę. Katalityczny wpływ enzymów pektynolitycznych przyczynił się do uwolnienia w ciągu zaledwie 24 godzin, od 84% (aronia) do 91% (śliwki) cyjanów w fermentujących zacierach. Ilość cyjanowodoru uwolnionego w miazdze śliwkowej, poddanej obróbce preparatem PEKTOZYME™ POWERMash (tab. 6), nie różniła się od jego zawartości w miazdze surowej ($P > 0,2$), (tab. 4). W zacierze aroniowym była o ok. 24% wyższa, w porównaniu z otrzymanym z miazgi surowej, fermentowanej z udziałem drożdży *S. bayanus*, ale nie przekroczyła stężenia oznaczonego w próbie fermentowanej bez dodatku drożdży szlachetnych. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, dotyczącymi oddziaływania enzymów pektynolitycznych na szybkość hydrolizy glikozydów cyjanogennych (Pogorzelski, 1990), ale nie potwierdzają wpływu zastosowanego preparatu na wzrost zawartości cyjanowodoru, co zaobserwowała Balcerek i in. (2003, 2006b) w przypadku stosowania preparatu Pektopol PT-400 do depektynizacji miazgi z owoców tarniny i śliwek. Różnice w ilości uwolnionego cyjanowodoru mogą być spowodowane odmiennością profilu enzymatycznego stosowanych preparatów pektynolitycznych, jak również warunkami ich działania. Obróbkę preparatem Pektopol PT-400 prowadzono w temperaturze 50÷55°C, zaś z udziałem PEKTOZYME™ POWERMash w temperaturze ok. 20°C, co mogło znacząco wpływać na aktywność enzymów. Obecność karbaminianu etylu wykryto, podobnie jak we wcześniej omawianych próbach fermentacyjnych, w końcowym etapie fermentacji (tab. 6).

Tabela 5. Kinetyka biosyntezy etanolu, uwalniania cyjanowodoru i tworzenia karbaminianu etylu podczas spontanicznej fermentacji surowej miazgi owocowej (n = 2)

Doby fermentacji	Śliwki odmiany Węgierka Zwykła (10% pestek całych)								
	Etanol			Cyjanowodór			Karbaminian etylu		
	C [% obj.]	ΔC [% obj.]	V [g/kg·h]	C [mg/kg]	ΔC [mg]	V [mg/kg·h]	C [mg/kg]	ΔC [mg]	V [mg/kg·h]
0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,0	0,0	0,00	0,30	0,30	$12,5 \cdot 10^{-7}$	0,00	0,00	0,00
2	0,4	0,4	0,13	0,54	0,24	$10,0 \cdot 10^{-7}$	0,00	0,00	0,00
3	1,9	1,5	0,49	0,65	0,11	$4,6 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
4	2,3	0,4	0,13	0,69	0,04	$1,7 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
5	2,8	0,1	0,03	0,73	0,04	$1,7 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
6	3,2	0,1	0,03	0,77	0,04	$1,7 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
7	3,6	0,1	0,03	0,80	0,03	$1,3 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
8	3,8	0,2	0,07	0,83	0,03	$1,3 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
9	4,0	0,2	0,07	0,84	0,01	$0,4 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
10	4,1	0,1	0,03	0,85	0,01	$0,4 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
11	4,2	0,1	0,03	0,86	0,01	$0,4 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,00	0,00
12	4,3	0,1	0,03	0,87	0,01	$0,4 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,00	0,00
13	4,3	0,1	0,00	0,87	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
Doby fermentacji	Aronia czarnoowocowa								
	Etanol			Cyjanowodór			Karbaminian etylu		
	C [% obj.]	Δ C [% obj.]	V [g/kg·h]	C [mg/kg]	Δ C [mg]	V [mg/kg·h]	C [mg/kg]	Δ C [mg]	V [mg/kg·h]
0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,0	0,0	0,00	4,20	4,20	$17,5 \cdot 10^{-7}$	0,00	0,00	0,00
2	0,4	0,4	0,13	4,80	0,60	$2,5 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
3	0,9	0,5	0,16	5,30	0,50	$2,1 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
4	2,0	1,1	0,36	5,50	0,20	$0,8 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
5	2,1	0,1	0,03	5,70	0,20	$0,8 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
6	2,3	0,2	0,07	5,90	0,20	$0,8 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
7	2,4	0,1	0,03	6,10	0,20	$0,8 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
8	2,6	0,2	0,07	6,30	0,20	$0,8 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
9	2,7	0,1	0,03	6,50	0,20	$0,8 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
10	2,8	0,1	0,03	6,60	0,10	$0,4 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
11	2,9	0,1	0,03	6,80	0,20	$0,8 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
12	3,1	0,2	0,07	7,00	0,20	$0,8 \cdot 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
13	3,2	0,1	0,03	7,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	3,3	0,1	0,03	7,00	0,00	0,00	0,01	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
15	3,3	0,0	0,00	7,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00

Reasumując, badania kinetyki uwalniania cyjanowodoru i syntezy karbaminianu etylu podczas fermentacji miazgi owocowej wskazują, że maksymalna szybkość hydrolizy glikozydów cyjanogennych przypada na początkowy etap fermentacji, zaś synteza uretanu zachodzi w fazie dofermentowania zacierów owocowych. Jego niska zawartość w zacierach odfermentowanych w porównaniu z zawartością oznaczaną w spirytusach (Balcerek, 2005b, 2006b; Lachenmeier i in., 2005; Schehl i in., 2007) pozwala wnioskować, że istotny jest wpływ dalszych etapów otrzymywania spirytusów owocowych (m.in. destylacji) na syntezę EC.

Tabela 6. Kinetyka biosyntezy etanolu, uwalniania cyjanowodoru i tworzenia karbaminianu etylu podczas fermentacji miazgi owocowej po obróbce enzymatycznej (PEKTOZYMETM POWERMash), z udziałem drożdży *Saccharomyces bayanus* (n = 2)

Doby fermentacji	Śliwki odmiany Węgierka Zwykła (10% pestek całych)								
	Etanol			Cyjanowodór			Karbaminian etylu		
	C [% obj.]	ΔC [% obj.]	V [g/kg·h]	C [mg/kg]	ΔC [mg]	V [mg/kg·h]	C [mg/kg]	ΔC [mg]	V [mg/kg·h]
0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,4	0,4	0,13	0,82	0,82	$34,20 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
2	4,6	4,2	1,38	0,83	0,01	$0,42 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
3	4,9	0,3	0,10	0,84	0,01	$0,42 \cdot 10^{-3}$	<0,01	<0,01	$<4,2 \cdot 10^{-4}$
4	5,3	0,4	0,13	0,86	0,02	$0,80 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
5	5,5	0,2	0,07	0,88	0,02	$0,80 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,00	0,00
6	5,7	0,2	0,07	0,90	0,02	$0,80 \cdot 10^{-3}$	0,03	0,02	$8,3 \cdot 10^{-4}$
Doby fermentacji	Aronia czarnoowocowa								
	Etanol			Cyjanowodór			Karbaminian etylu		
	C [% obj.]	ΔC [% obj.]	V [g/kg·h]	C [mg/kg]	ΔC [mg]	V [mg/kg·h]	C [mg/kg]	ΔC [mg]	V [mg/kg·h]
0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,2	0,2	0,06	5,00	5,00	$208,30 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
2	2,2	2,0	0,65	5,92	0,92	$38,30 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
3	3,2	1,0	0,33	5,93	0,01	$0,40 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00	0,00
4	3,6	0,4	0,13	5,95	0,02	$0,83 \cdot 10^{-3}$	0,01	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
5	3,7	0,1	0,03	5,96	0,03	$1,25 \cdot 10^{-3}$	0,02	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
6	3,8	0,1	0,03	5,96	0,00	0,00	0,03	0,01	$4,2 \cdot 10^{-4}$
7	3,9	0,1	0,03	5,96	0,00	0,00	0,06	0,03	$12,5 \cdot 10^{-4}$

5.2.2. Zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w spirytusach owocowych

5.2.2.1. Wpływ obróbki wstępnej owoców

Przeprowadzono fermentację zacierów owocowych, zróżnicowanych metodą obróbki wstępnej surowca, przy pH naturalnym owoców, z udziałem drożdży *Saccharomyces bayanus* (0,3 g/kg), w temperaturze 26°C.

W spirytusie otrzymanym po fermentacji surowej miazgi śliwkowej (Węgierka Łowicka, 10% pestek całych) stężenie cyjanowodoru wynosiło 8,0 mg/L 100 obj. Zastosowanie pasteryzacji miazgi spowodowało obniżenie zawartości HCN w spirytusie o około 36%. Bardziej drastyczna obróbka ciśnieniowo-termiczna nie przyniosła, w tym przypadku, wzrostu inaktywacji enzymów, katalizujących hydrolizę glikozydów cyjanogennych (rys. 1a). Przyczyną takiego kierunku zmian jest poddanie zabiegom termicznym miazgi śliwkowej z dodatkiem pestek całych, co znacznie ograniczało oddziaływanie wysokiej temperatury na nasiona pestek, w których zlokalizowane są glikozydy i katalizujące ich hydrolizę enzymy. Ponadto Vetter (2000) podkreśla, że chociaż enzymy (β -glukozydazy i liazy hydroksynitrylowe) i substraty (glikozydy cyjanogenne) często występują razem w tej samej roślinie, bądź jej organie, są one jednak przestrzennie rozdzielone. Cyjanoglikozydy gromadzone są w centralnej wakuoli komórek roślin cyjanogennych, zaś enzymy hydrolityczne mogą występować w cytoplazmie lub w przestrzeni apoplazmycznej. Uwalnianie HCN możliwe jest wówczas, gdy tkanki rośliny bądź jądro pestki zostają zmacerowane, w wyniku czego dochodzi do kontaktu glikozydów i hydrolizujących je enzymów.

Większą efektywność obróbki ciśnieniowo-termicznej w ograniczaniu uwalniania cyjanokwów odnotowano w przypadku spirytusów aroniowych. Pasteryzacja miazgi w temperaturze 85°C spowodowała ok. 47% obniżenie zawartości cyjanowodoru, zaś w spirytusie z miazgi poddanej obróbce ciśnieniowo-termicznej (0,1 MPa; 121°C) jego stężenie wynosiło 9,12 mg/L 100% obj. i było o ok. 71% niższe, w porównaniu z oznaczonym w próbce z miazgi surowej (rys. 1a). Wyższa zawartość cyjanokwów w spirytusach aroniowych, jak również bardziej wyraźny wpływ działania podwyższonej temperatury na ich ograniczenie, wynikają z tego, że owoce aronii, ze względu na ich strukturę, były rozdrabniane razem z pestkami. Kierunek zmian obserwowany podczas badania wpływu obróbki termicznej na inaktywację enzymów, katalizujących hydrolizę glikozydów cyjanogennych jest zgodny z wynikami badań Pogorzelskiego (1990) oraz własnych, prowadzonych z wykorzystaniem owoców tarniny (Balcerek i in., 2003).

Zastosowanie obróbki enzymatycznej śliwek preparatem Pektopol PT-400 wpłynęło na prawie 4-krotne zwiększenie stężenia cyjanowodoru wolnego w spirytusie, do 29,5 mg/L 100% obj. Znacznie niższy, ok. 48% wzrost jego zawartości oznaczono w przypadku spirytusu aroniowego (rys. 1a). Podobne wyniki uzyskano w ramach badań dotyczących kinetyki powstawania cyjanowodoru w zacierach z owoców tarniny (Balcerek i in., 2003). Enzymy pektyno-

lityczne wchodzące w skład preparatu (poligalakturnazy, pektynoesterazy, liazy pektynianowe) powodują rozkład pektyn w miazgach i sokach owocowych. Oprócz enzymów pektynolitycznych, preparat Pektopol PT-400 zawiera celulazy, hemicelulazy, proteazy, które hydrolizują polisacharydy i białka, wspomagając proces obróbki miazgi. Najprawdopodobniej za wzrost stężenia cyjanowodoru odpowiada aktywność β -glukozydazy (celobiaz) (EC 3.2.1.21) należącej do celulaz, która wykazuje uzdolnienia nie tylko do hydrolizy celobiozy, ale także β -D-glikozydów (IUBMB, 2013).

Innym preparatem pektynolitycznym, zastosowanym do obróbki miazgi owocowej był PEKTOZYME™ POWERMash, odpowiedzialny za degradację pektyn i obniżenie lepkości miazgi. Jest to kompleks enzymów pektynolitycznych, otrzymywany z wyselekcjonowanego szczepu *Aspergillus niger*. Produkt ten został otrzymany z użyciem techniki rekombinacji DNA (self-cloning). Zgodnie z Dyrektywą Rady 98/81/EC z 26 października 1998, zastępującą Dyrektywę 90/219/EEC EU, dotyczącą stosowania organizmów GMO, drobnoustroje modyfikowane techniką self-cloning nie są zaliczane do GMO (European Commission, 1998; Sybesma i in., 2006; VROM, 2005).

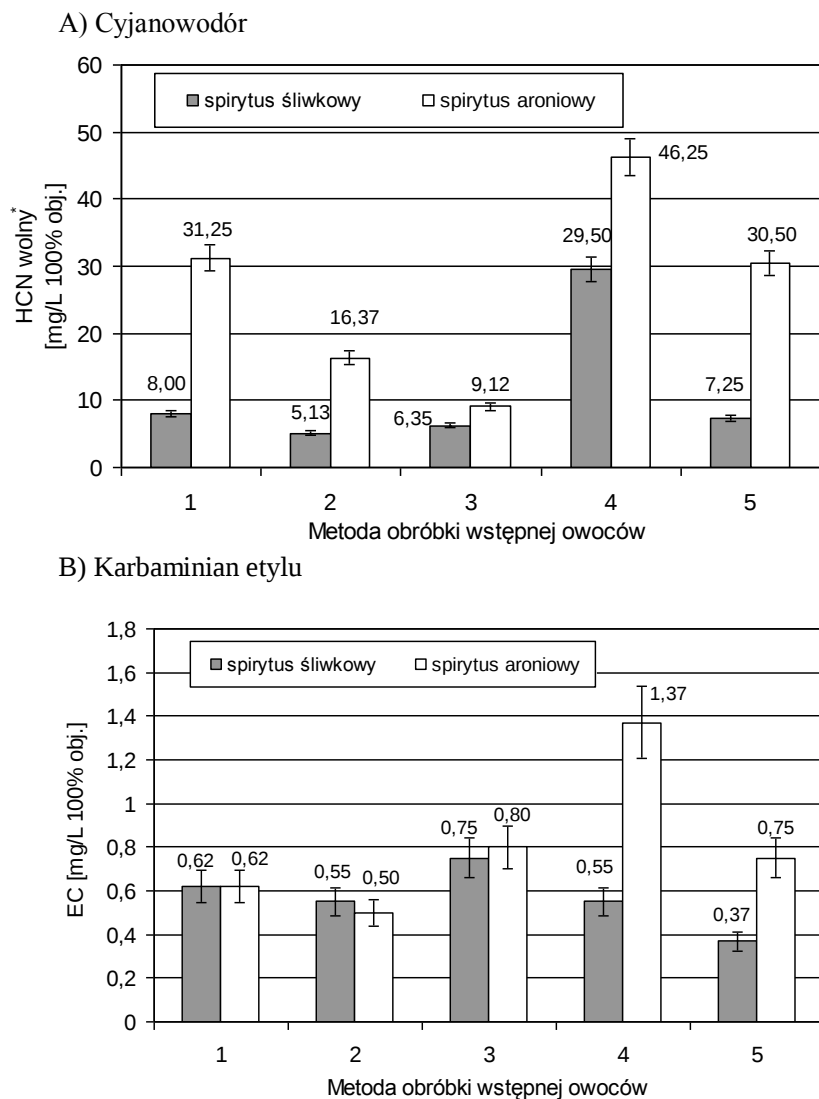
Depektynizacja miazgi śliwkowej i aroniowej preparatem PEKTOZYME™ POWERMash przyniosła wymierne korzyści w postaci zwiększenia dynamiki fermentacji, skrócenia jej czasu oraz wzrostu stężenia alkoholu w miazdze odfermentowanej. Nie stwierdzono natomiast wzrostu stężenia cyjanowodoru w otrzymanych spirytusach, jak to miało miejsce w przypadku zastosowania preparatu Pektopol PT-400 (rys. 1a).

Mimo iż zawartość cyjanowodoru nie jest jedynym czynnikiem decydującym o zawartości uretanu, to biorąc pod uwagę, że w określonych warunkach (światło, podwyższona temperatura) (Aresta i in., 2001; Lachenmeier i in., 2005) ulega on szybkiej przemianie do reaktywnego cyjanianu, jak najbardziej zasadne jest ograniczanie obecności tego związku w spirytusach owocowych.

W świeżo oddestylowanych spirytusach śliwkowych nie odnotowano bezpośredniego wpływu zastosowanych metod obróbki wstępnej na syntezę karbaminianu etylu, natomiast jego podwyższoną zawartością (1,37 mg/L 100% obj.) odznaczał się spirytus aroniowy otrzymany z miazgi po obróbce preparatem Pektopol PT-400 (rys. 1b). Należy jednak zaznaczyć, że zwiększone uwalnianie cyjanowodoru może być przyczyną powstawania nadmiernych ilości uretanu na dalszych etapach postępowania technologicznego.

Porównanie zawartości karbaminianu etylu w surowych spirytusach owocowych (śliwkowe $0,37 \div 0,75$ mg/L 100% obj., aroniowe $0,50 \div 1,37$ mg/L 100% obj.) (rys. 2b) i zacierach, z których zostały otrzymane (śliwkowe $0,02 \div 0,03$ mg/kg, aroniowe $0,03 \div 0,12$ mg/kg) (tab. 4-6), wskazuje, że synteza znaczącej części uretanu zachodzi podczas wydzielania spirytusu z miazgi odfermentowanej. Otrzymane wyniki są zbieżne z doniesieniami wielu autorów (Boulton, 1993; Aresta i in., 2001; Bruno i in., 2007; Fox i Stachowiak, 2007) i wskazują na istotny wpływ destylacji na powstawanie karbaminianu etylu. Mimo że uretan odznacza się wysoką temperaturą wrzenia (ok. 185°C), to jego prekursorzy, takie jak cyjanowodor i jego pochodne są związkami o wysokiej

lotności i niskich temperaturach wrzenia ($< 30^{\circ}\text{C}$), dlatego szybko przechodzą w stan pary i mogą wchodzić w reakcję z etanolem, prowadząc do powstania karbaminianu etylu w fazie gazowej (Hesford i Schneider, 2001; Schehl, 2005).



Rys. 1. Wpływ metody obróbki wstępnej owoców na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w spirytusach otrzymanych z Węgierki Zwyczajnej i aronii czarnoowocowej ($n = 3$)

* badane spirytusy nie zawierały HCN związanego

1. Miazga surowa, **2.** Miazga pasteryzowana (85°C ; 30 min), **3.** Miazga po obróbce ciśnieniowo-termicznej (121°C ; 0,1 MPa; 20 min), **4.** Miazga po obróbce pektynolitycznej (Pektopol PT-400; 1,5g/kg; 55°C , 30 min), **5.** Miazga po obróbce pektynolitycznej (Pektozyme™ POWERMash; 0,07 mL/kg; $15\pm 35^{\circ}\text{C}$).

5.2.2.2. Wpływ dodatku związków azotowych do zacierów owocowych

Oceniano wpływ rodzaju pożywek azotowych dodawanych do zacierów na uwalnianie cyjanowodoru oraz syntezę karbaminianu etylu. Otrzymane wyniki badań przedstawiono w tabeli 7. Wykazano, że przy założonym poziomie istotności ($\alpha = 0,05$), spirytusy otrzymane z zacierów wzbogaconych fosforanem (V) lub siarczanem (VI) diamonu (0,2 g/kg zacieru) charakteryzowały się zbliżoną ($P > 0,20$) zawartością karbaminianu etylu oraz jego prekursora cyjanowodoru (śliwkowe $8,95 \div 9,72$ mg HCN/L 100% obj.; aroniowe $14,70 \div 15,05$ mg HCN/L 100 obj.). Zastosowanie mocznika, powszechnie uznanego za jeden z głównych prekursorów karbaminianu etylu, w ilości 0,1 g/kg zacieru, w której zawartość azotu odpowiada ok. 0,2 g fosforanu lub siarczanu diamonu, nie spowodowało istotnego wzrostu stężenia uretanu w spirytusach aroniowych ($0,10 < P < 0,20$) i śliwkowych ($P > 0,20$). Zwiększenie dawki tego związku do 0,2 g/kg zacierów okazało się niewskazane, gdyż uzyskane spirytusy charakteryzowały się podwyższonym stężeniem cyjanków (śliwkowy 17,97 mg/L 100% obj.; aroniowy 26,90 mg/L spirytusu 40% obj.), lecz zawartość karbaminianu etylu nie różniła się statystycznie istotnie (śliwki $P > 0,2$; aronia $0,05 < P < 0,10$) od oznaczonej w spirytusach z miazgi fermentowanej, zarówno z niższą dawką mocznika, jak i z innymi pożywkami mineralnymi (tab. 7). Wyniki doświadczeń potwierdzają niekorzystny wpływ suplementacji zacierów owocowych mocznikiem, jednak nie ze względu na syntezę uretanu, ale na intensyfikację uwalniania cyjanowodoru. Wiąże się to z jego własnościami denaturującymi oraz towarzyszącymi temu zmianami chemicznymi, między innymi wzrostem podatności związków chemicznych na hydrolizę enzymatyczną (Stryer, 2003). Jednocześnie, zważywszy na liczne doniesienia literaturowe (Zietsman i in., 2000; Delledonne i in., 2001; Wang i in., 2007), nie można wykluczyć możliwości syntezy uretanu z mocznika niewykorzystanego przez drożdże w procesach metabolicznych.

Niezależnie od rodzaju zastosowanej pożywki, zaobserwowano statystycznie istotne różnice ($0,001 < P < 0,01$) w zawartości cyjanowodoru i karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach surowych. Spirytusy aroniowe charakteryzowały się wyższym stężeniem HCN ($14,00 \div 26,90$ mg/L 100% obj.) w porównaniu ze śliwkowymi ($8,95 \div 17,97$ mg/L 100% obj.), natomiast zawartość EC wykazywała zależność odwrotną. Można przypuszczać, że czynnikiem hamującym syntezę uretanu były związki polifenolowe (garbniki, barwniki), obecne w dużych ilościach szczególnie w owocach aronii. Ponadto wyższa zawartość karbaminianu etylu w spirytusach śliwkowych może być związana z obecnością w tych owocach, o ponad 60%, większej ilości związków azotowych (0,74% s.m.) w stosunku do aronii i w konsekwencji niższym zużyciem przez drożdże azotu egzogenego.

Najniższą zawartość karbaminianu etylu oznaczono w spirytusach (śliwkowy 0,37 mg/L 100% obj., aroniowy 0,22 mg/L 100% obj.), otrzymanych po fermentacji miazgi wzbogaconej pożywką w postaci preparatu Activit. Należy zatem uznać za celowe stosowanie kompleksowych pożywek zawierających, oprócz azotu, witaminy i związki mineralne. Jones i Greenfield (1984)

wykazali, że do najważniejszych kationów, wykorzystywanych przez drożdże należą Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Fe^{2+} , a szczególnie istotny dla rozwoju i aktywności drożdży jest stosunek jonów Mg^{2+} do Ca^{2+} (Walker, 1996). Doniesienia literaturowe (Pasternakiewicz i Tuszyński, 1997; Tuszyński i Pasternakiewicz, 2000; Tuszyński, 2001; Poreda i in., 2009) wskazują na istotną rolę jonów Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} w regulacji wzrostu i aktywności fermentacyjnej drożdży.

Tabela 7. Wpływ pożywek azotowych dodawanych do zacierów owocowych na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach (n = 3)

Rodzaj zacieru	Pożywka (0,2 g/kg)		Cyjanowodór wolny**	Karbaminian etylu
	rodzaj	zawartość azotu [g/kg]	mg/L 100% obj.	
Śliwkowy /Węgierka Zwykła, miążga surowa, 10% ww. pestek całych/	$(NH_4)_2HPO_4$	0,042	8,95±0,37	0,70±0,07
	$(NH_4)_2SO_4$	0,042	9,57±0,37	0,65±0,07
	$CO(NH_2)_2^*$	0,047	10,12±0,50	0,62±0,05
	$CO(NH_2)_2$	0,093	17,97±0,75	0,70±0,07
	Activit	0,180	11,25±0,50	0,37±0,05
Aroniowy /miążga surowa/	$(NH_4)_2HPO_4$	0,042	15,05±0,57	0,37±0,05
	$(NH_4)_2SO_4$	0,042	14,70±0,52	0,35±0,05
	$CO(NH_2)_2^*$	0,047	14,00±0,87	0,42±0,05
	$CO(NH_2)_2$	0,093	26,90±0,92	0,45±0,05
	Activit	0,180	15,50±0,87	0,22±0,02

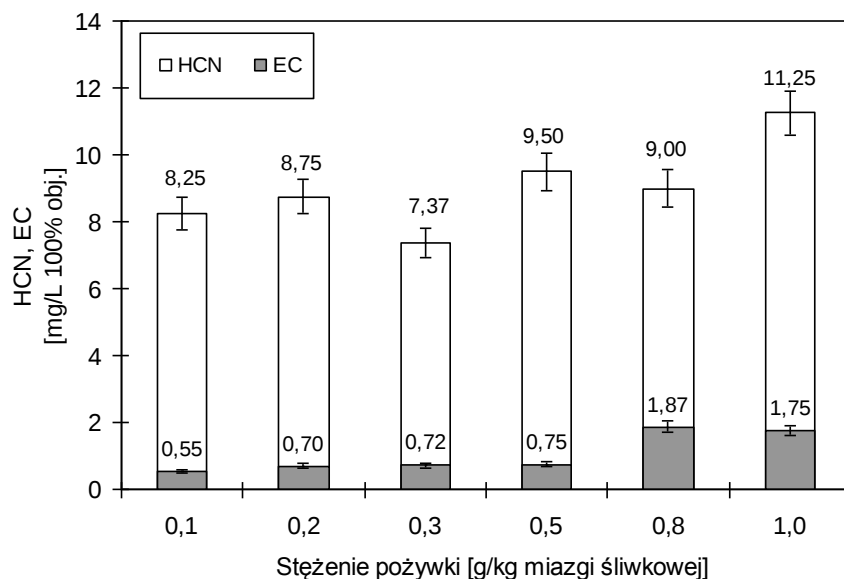
* 0,1 g/kg zacieru

** badane spirytusy nie zawierały HCN związanego

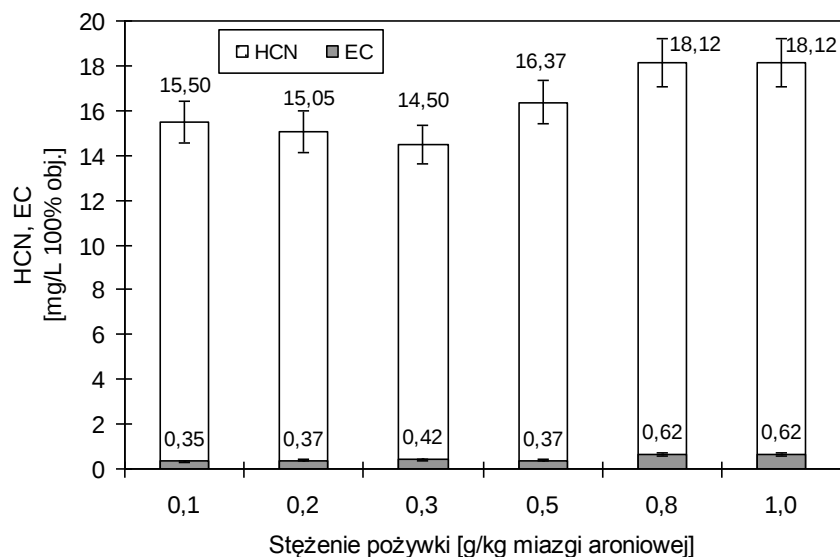
Bely i in. (1990) określili, iż minimalne stężenie FAN (wolnego azotu aminowego, reprezentowanego przez aminokwasy oraz jon amonowy), zapobiegające zakłóceniom fermentacji, wynosi 140 mg/L. Jednak maksymalną szybkość fermentacji osiąga się, jeśli zawartość FAN mieści się w granicach 400÷500 mg/L (Henschke i Jiranek, 1991). Aby przeciwdziałać spowolnieniu, bądź zatrzymaniu fermentacji, powszechnie dodaje się do moszczów sole amonowe (fosforan (V) lub siarczan (VI) diamonu). Suplementacja niekontrolowanymi ilościami tych związków może prowadzić do niestabilności mikrobiologicznej i nadmiernego tworzenia karbaminianu etylu (Pretorius, 2000). Butzke i Bisson (1997) podają, że do uzupełnienia deficytu związków azotowych w podłożach fermentacyjnych wskazane jest stosowanie fosforanu diamonu w dawkach nieprzekraczających 200 mg azotu/L.

Zalecenia wielu autorów (Jäger, 1986; Trioli i Paronetto, 1992; Albrecht, 1998) oraz wyniki badań własnych (Balcerek, 2001) wskazują, że dodatek mineralnej pożywki, zawierającej oprócz azotu, również fosfor, korzystnie wpływa na aktywność drożdży i poprawia wskaźniki fermentacji moszczów i zacierów owocowych. Dotyczy to zwłaszcza surowców bogatych w związki barwnikowe i garbnikowe, których przykładem są owoce aronii (Balcerek i Szopa, 2002).

A) Zacierzy śliwkowe (Węgierka Zwykła, miazga surowa, 10% pestek całych)



B) Zacierzy aroniowe (miazga surowa)



Rys. 2. Wpływ stężenia pożywki azotowo-fosforowej $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w zacierach owocowych na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach (n = 3)

Badano wpływ ilości pożywki azotowo-fosforowej, w postaci $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, dodanej do zacierów aroniowych i śliwkowych na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach. Dodatek fosforanu (V) diamonu, w ilości do 0,5 g/kg miazgi owocowej, nie wpłynął na znaczące zwiększenie rezerwy azotowej i intensyfikację syntezy uretanu, zarówno w zacierach śliwkowych (rys. 2a), jak i aroniowych (rys. 2b). Z punktu widzenia efektywności procesu, za uzasadnione technologicznie uznano wzbogacenie zacierów aroniowych fosforanem diamonu, w ilościach od 0,3÷0,5 g/kg (wydajność fermentacji 90÷92% wydajności teoretycznej), zaś w przypadku zacierów śliwkowych, wysokie odfermentowanie (93,5% wydajności teoretycznej) zapewniał już dodatek 0,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ /kg miazgi. Dawka fosforanu diamonu, od 0,8 do 1,0 g/kg miazgi owocowej, z którą wprowadzono od 0,168 do 0,210 g azotu/kg okazała się zbyt wysoka w stosunku do potrzeb metabolicznych drożdży, co znalazło odzwierciedlenie w znaczącym wzroście stężenia uretanu w spirytusach surowych, zwłaszcza śliwkowych, z 0,55÷0,75 mg do 1,75÷1,87 mg/L 100% obj. (rys. 2a).

Analiza uzyskanych wyników wskazuje na potrzebę indywidualnego ustalania optymalnej dawki pożywki azotowej, w zależności od rodzaju i składu chemicznego przerabianych owoców.

5.2.2.3. Wpływ warunków fermentacji i leżakowania zacierów

Do czynników determinujących wysoką aktywność fermentacyjną drożdży i związany z nią dynamiczny przebieg procesu oraz odpowiednią jakość spirytusów należy optymalne pH środowiska (Modi, 1998) i temperatura prowadzenia procesu (Jäger, 1986; Albrecht, 1998). Odkwaszanie zacierów owocowych, słuszne z racji ochrony aparatury i poprawy jakości wywaru, nie potwierdza celowości tego zabiegu z punktu widzenia wydajności fermentacji (Tuszyński i Bachman, 1981; Balcerek i Szopa, 2002).

Regulacja pH zacierów śliwkowych i aroniowych od wartości 3,4÷3,6 (pH naturalne) do 5,0 spowodowała wzrost ilości uwolnionego cyjanowodoru, o 50% w spirytusach śliwkowych i o 25% w aroniowych. Badania Lei i in. (1999) również wykazały, że wysoka aktywność β -glukozydazy wyizolowanej z *Lactobacillus plantarum*, katalizującej hydrolizę glikozydów cyjanogennych, mieści się w szerokim zakresie pH od 5,5 do ok. 7, zaś optymalna temperatura wynosi 35°C. Z kolei zakwaszenie miazgi owocowej do pH = 3, stosowane powszechnie w gorzelnictwie niemieckim (Lachenmeier i in., 2005; Schehl i in., 2005; 2007), nie wpłynęło istotnie ($P > 0,2$) na zawartość cyjanowodoru, w porównaniu z pH naturalnym owoców. Stężenie karbaminianu etylu w spirytusach śliwkowych wynosiło, średnio, 0,72 mg/L 100% obj. i nie było skorelowane z pH miazgi poddawanej fermentacji.

Spirytusy aroniowe, mimo kilkakrotnie wyższej zawartości cyjanowodoru, w porównaniu do śliwkowych, odznaczały się niższymi, bardziej zróżnicowanymi stężeniami uretanu. W zakresie pH miazgi 3,0÷3,6, stężenie uretanu wynosiło 0,37 mg/L 100% obj., zaś regulacja stężenia jonów wodorowych

do wartości 4,0÷5,0 znalazła odzwierciedlenie w istotnym obniżeniu ilości powstałego uretanu do 0,02÷0,12 mg/L 100% obj.

Za niekorzystne, ze względu na wzmożone uwalnianie cyjanowodoru i syntezę karbaminianu etylu, uznano prowadzenie fermentacji w temperaturze 35°C. Zarówno spirytusy śliwkowe, jak i aroniowe, otrzymane z zacierów fermentowanych w tych warunkach, w porównaniu z pochodzącymi z miazgi fermentowanej w 18÷20°C, zawierały ok. 2-krotnie więcej cyjanowodoru i ponad 2-krotnie więcej karbaminianu etylu (tab. 8). Można zatem za Jägerem (1986) i Albrechtem (1998) wnioskować, że temperatura fermentacji zacierów owocowych, zapewniająca korzystne cechy organoleptyczne spirytusów i niską zawartość uretanu, nie powinna przekraczać 18÷20°C.

Interesujące wyniki odnotowano w przypadku spirytusów aroniowych, pochodzących z owoców fermentowanych z udziałem mikroflory autochtonicznej. Odznaczały się one zawartością cyjanowodoru (72,25 mg/L 100% obj.) ponad 2-krotnie wyższą od oznaczonej w próbie odfermentowanej z udziałem drożdży *S. bayanus* (tab. 8).

Tabela 8. Wpływ warunków fermentacji na zawartość cyjanowodoru (HCN) i karbaminianu etylu (EC) w spirytusach owocowych (n = 3)

Warunki fermentacji			Śliwki /Węgierka Łowicka, 10% pestek całych/		Aronia czarnoowocowa	
			HCN wolny**	EC	HCN wolny**	EC
			mg/L 100% obj.			
Miazga surowa, T = 26°C, <i>S. bayanus</i>	pH zacieru	3,0	8,25±0,37	0,75±0,07	30,50±1,12	0,37±0,05
		3,4-3,6*	8,00±0,37	0,62±0,07	31,00±1,25	0,37±0,05
		4,0	9,25±0,37	0,75±0,07	33,75±1,00	0,12±0,02
		5,0	12,00±0,45	0,80±0,10	38,75±1,55	0,02±0,01
Miazga surowa, pH naturalne owoców*, <i>S. bayanus</i>	temperatura fermentacji	18-20°C	7,00±0,37	0,57±0,05	21,25±0,95	0,30±0,02
		26°C	8,00±0,37	0,62±0,07	31,00±1,12	0,37±0,05
		35°C	13,25±0,45	1,45±0,12	42,00±1,87	0,75±0,07
Miazga surowa, pH naturalne owoców, T = 26°C, fermentacja spontaniczna			8,75±0,37	0,62±0,07	72,75±2,25	0,75±0,07

* pH naturalne owoców (3,4-śliwki; 3,6-aronia),

** badane spirytusy nie zawierały HCN związanego

Według Siegień (2007) i Malinowskiego (2008) podstawowym źródłem uwalnianego cyjanowodoru jest maceracja tkanek roślinnych, prowadząca do kontaktu glikozydów cyjanogennych i katalizujących ich hydrolizę enzymów. Można wysnuć tezę, że spowolniona produkcja etanolu w miazdze aroniowej, fermentowanej bez dodatku drożdży szlachetnych, przyczyniła się do uwolnienia znacznych ilości cyjanowodoru. Nie nastąpiło bowiem szybkie zahamowanie przez etanol aktywności enzymów, katalizujących hydrolizę glikozydów cyjanogennych.

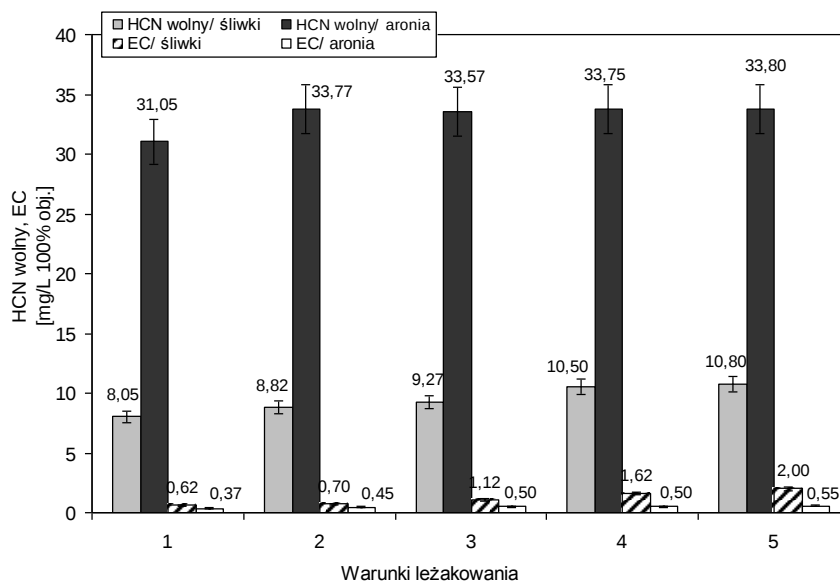
Mimo bardzo dużych różnic w zawartości HCN w spirytusach, śliwkowym i aroniowym, otrzymanych metodą fermentacji spontanicznej, oznaczone w nich stężenia karbaminianu etylu nie różniły się istotnie ($P > 0,2$). Należy jednak zauważyć, że wysoka zawartość cyjanów w surowym spirytusie aroniowym stwarza wysokie prawdopodobieństwo syntezy nadmiernych ilości karbaminianu etylu na dalszych etapach postępowania technologicznego.

Odfermentowane zacierzy owocowe zaleca się poddawać leżakowaniu, celem syntezy związków kształtujących bukiet napoju (Albrecht, 1998; Krell, 1999). Przeprowadzone, w ramach badań, leżakowanie zacierów owocowych (w kolbach szklanych, bez dostępu światła) przez okres 5 dni, w temperaturze 15°C, nie wpłynęło istotnie (śliwki $0,10 < P < 0,20$; aronia $P > 0,2$) na zmiany zawartości cyjanowodoru i karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach, w porównaniu do prób destylowanych niezwłocznie po zakończeniu procesu. Wzrost temperatury leżakowania zacierów, z 15 do 20°C, spowodował zwiększenie zawartości uretanu w spirytusie śliwkowym, z 0,70 mg do 1,12 mg/L 100% obj., tj. o ok. 61%. Z kolei 10-dniowe leżakowanie zacierów śliwkowych przyniosło wzrost stężenia karbaminianu etylu, do 1,62 mg, w temperaturze 15°C i do 2,0 mg/L 100% obj., w 20°C.

Obniżone pH zacierów, obecność wolnego cyjanowodoru oraz katalityczny wpływ metabolitów drożdży, jak i uwalnianego z glikozydów cyjanogennych aldehydu benzoesowego, to czynniki, których synergiczne działanie może prowadzić do syntezy uretanu w czasie leżakowania zacierów odfermentowanych (Christoph i Christoph-Bauer, 1998; Jung i Adam, 2005). Nie można wykluczyć również wpływu produktów autolizy drożdży, powstających podczas długotrwałego leżakowania win i zacierów gorzelnicznych (Butzke i Bisson, 1997). Szybkość powstawania EC zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury przechowywania napojów alkoholowych (Tegmo-Larsson i Spittler, 1990; Stevens i Ough, 1993; Woo i in., 2001).

Stosunkowo niewielki wzrost stężenia karbaminianu etylu w spirytusach otrzymanych z leżakowanych zacierów aroniowych (rys. 3) był, najprawdopodobniej, konsekwencją hamowania utleniania cyjanowodoru do cyjanianu przez inhibujące działanie obecnych w owocach aronii antocyjanów i innych związków polifenolowych (Kraujalyte i in., 2011; Białek i in., 2012). Mechanizm antyoksydacyjnego działania polifenoli jest wielokierunkowy i może polegać na: bezpośrednim reagowaniu z wolnymi rodnikami i ich wiązaniu, przez stabilizację lub delokalizację niesparowanych elektronów, właściwościach redukcyjnych (oddawaniu elektronów lub atomów wodoru), tworzeniu mniej

reaktywnych związków przez nasilenie dysmutacji wolnych rodników, hamowaniu lub nasileniu działania enzymów, helatowaniu jonów miedzi i żelaza (Oszmiański i Wojdyło, 2005; Sikora i Markowicz, 2008; Saluk-Juszczak, 2010).



Rys. 3. Wpływ warunków leżakowania odfermentowanej miazgi owocowej na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach (n = 3) Warunki fermentacji: miazga surowa, pH przed fermentacją – śliwki 3,4; aronia – 3,6; temperatura fermentacji 26°C.

1. Zacier destylowany bez leżakowania, 2. Zacier leżakowany 5 dób w 15°C, 3. Zacier leżakowany 5 dób w 20°C, 4. Zacier leżakowany 10 dób w 15°C, 5. Zacier leżakowany 10 dób w 20°C.

5.3. Uzdolnienia drożdży winiarskich do biosyntezy enzymów katalizujących syntezę lub rozkład prekursorów karbaminianu etylu

Prekursorem uretanu może być karbamylofosforan, wytwarzany przez niektóre szczepy drożdży i pleśni z jonów amonowych, ditlenku węgla, przy udziale ATP (Christoph i in., 1987; Ough, 1988). Enzymem drożdży, katalizującym syntezę karbamylofosforanu, uczestniczącego w cyklu mocznikowym, jest syntaza karbamylofosforanu (EC 6.3.4.16). Głównym donorem azotu są jony NH_4^+ , których źródłem mogą być sole amonowe: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ i inne. Natomiast karbamylofosforan, uczestniczący w syntezie pirymidyn, powstaje przy udziale syntazy karbamylofosforanu (CPS-P) (EC 6.3.5.5), wykorzystującej azot z glutaminy (Serre i in., 2004). W drożdżach *S. cerevisiae*, obydwie syntazy zlokalizowane są w cytozolu (Davis, 1986). Można zatem założyć, że w warunkach fermentacji alkoholowej, reakcji estryfikacji etanolem może ulegać zarówno karbamylofosforan powstały z udziałem

syntazy NH_4^+ -zależnej, jak i glutamino-zależnej. W literaturze brak doniesień na temat aktywności syntaz karbamylfosforanu w szczepach drożdży winiarskich i ich wpływu na tworzenie karbaminianu etylu.

Pośród badanych ras drożdży, najwyższą aktywnością właściwą syntazy NH_4^+ -zależnej ($45,43 \times 10^{-3}$ U/mg białka), w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, odznaczały się drożdże rasy *Steinberg*, zaś glutamino-zależnej *S. bayanus* ($92,48 \times 10^{-3}$ U/mg białka). Najsłabszym producentem tych enzymów okazały się drożdże rasy *Bordeaux*. Aktywność omawianych enzymów, oznaczona w ekstraktach bezkomórkowych, wynosiła od 3,20 do $4,12 \times 10^{-3}$ U/mg białka (tab. 9).

Oceniając uzdolnienia enzymatyczne drożdży *S. bayanus* wykazano, że w warunkach fermentacji alkoholowej, aktywność syntaz, zarówno NH_4^+ -zależnej, jak i glutamino-zależnej, była najwyższa po pierwszej dobie fermentacji (we wczesnej fazie stacjonarnej) i wynosiła odpowiednio, $25,31 \times 10^{-3}$ i $92,95 \times 10^{-3}$ U/mg białka. W przypadku syntazy glutamino-zależnej, jej wysoka aktywność utrzymywała się do 48 godziny prowadzenia hodowli, a ponadto była prawie 4-krotnie wyższa niż obserwowana w tym czasie aktywność syntazy NH_4^+ -zależnej (tab. 10). Relatywnie wysoką produkcję syntazy glutamino-zależnej w warunkach beztlenowych, w ciągu pierwszych 48 godzin prowadzenia hodowli drożdży *S. bayanus*, można tłumaczyć uruchomieniem mechanizmu obronnego, w postaci zwiększonej syntezy pirymidyn, w odpowiedzi na ograniczony dostęp tlenu.

Mimo znaczących różnic w aktywności syntaz karbamylfosforanu w badanych szczepach drożdży, stężenie karbaminianu etylu w cieczach pofermentacyjnych było niskie i wynosiło od 0 do 0,01 mg/L. Świadczy to o braku istotnego wpływu aktywności tych enzymów, w badanych szczepach drożdży, na syntezę karbaminianu etylu (tab. 9). Wyniki badań Ough'a i in. (1988) wskazują na karbamylfosforan, jako potencjalne źródło uretanu, jednak przy jego wyższych stężeniach niż występujące w warunkach prowadzonych badań. Ponadto autorzy realizowali doświadczenia z udziałem egzogennych związków karbamylowych, wyłącznie w roztworach modelowych.

Tabela 9. Aktywność właściwa syntaz karbamylfosforanu wybranych szczepów drożdży winiarskich i zawartość EC w cieczach pohodowlanych (drożdże z fazy stacjonarnej wzrostu) (n = 3)

Drożdże		Aktywność syntaz karbamylfosforanu $\text{Ax}10^{-3}$ (°U/mg białka)		EC w cieczach pohodowlanych [mg/L]	
		NH_4^+ -zależna (I)	Glutamino-zależna (II)	(I)	(II)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Bordeaux</i>	3,20±0,17	4,12±0,21	0,01	0,00
	<i>Burgund</i>	7,18±0,24	4,78±0,23	0,00	0,00
	<i>Steinberg</i>	45,43±2,25	17,78±0,52	0,01	<0,01
	<i>Syrena</i>	10,30±0,35	15,75±0,49	0,01	0,01
	<i>Tokay</i>	14,25±0,31	34,30±1,50	0,01	0,01
<i>S. bayanus</i>		21,17±0,89	92,48±4,20	0,01	0,01

* 1U = (μmol karbamylfosforanu/h)

Tabela 10. Zmiany aktywności syntaz karbamylofosforanu podczas hodowli drożdży winiarskich *S. bayanus* (n = 3)

Czas hodowli [godz]	Aktywność syntaz karbamylofosforanu $A \times 10^{-3}$ (U*/mg białka)		EC w cieczach pohodowlanych [mg/L]	
	NH ₄ ⁺ -zależna (I)	Glutamino-zależna (II)	(I)	(II)
24	25,31±1,10	92,95±4,21	0,00	0,00
48	21,17±0,89	92,48±4,20	<0,01	0,00
72	12,53±0,40	33,61±1,50	0,01	<0,01

*1U = (μmol karbamylofosforanu/h)

Jednym z mechanizmów odkładania rezerwy azotowej jest synteza ornityny i dalsze jej przemiany do argininy. Mechanizm ten jest określany jako cykl ornitynowy lub mocznikowy. Gdy w podłożu zabraknie źródła azotu, duże ilości argininy endogennej zostają uwolnione do cytoplazmy, doprowadzając do aktywacji enzymów odpowiedzialnych za jej degradację (Whitney i Magasanik, 1973). Podczas fermentacji alkoholowej, arginaza drożdży hydrolizuje argininę do ornityny i mocznika. Część mocznika ulega dwuetapowej hydrolizie, z udziałem karboksylazy mocznika (EC 6.3.4.6) do allofanianu i następnie pod wpływem liazy allofanianu (EC 3.5.1.54) do amoniaku i ditlenku węgla. Wymieniona droga nie zapewnia całkowitej degradacji mocznika, zatem wskazane jest stosowanie do fermentacji takich szczepów drożdży, które produkują go jak najmniej (Park i in., 2001).

Spośród badanych ras drożdży, najbardziej wydajnym producentem arginazy, w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, okazał się szczep *Steinberg* (aktywność właściwa 9,36 U/mg białka), podczas gdy najniższą aktywność tego enzymu oznaczono w ekstrakcie bezkomórkowym z hodowli szczepu *Bordeaux* (1,42 U/mg białka). W konsekwencji, spadek stężenia argininy w podłożu po hodowli drożdży rasy *Steinberg* był najwyższy (45,4%), w porównaniu z innymi, badanymi szczepami. Dane te dowodzą, że zastosowanie wymienionej rasy drożdży do fermentacji może prowadzić do uwolnienia większych ilości mocznika, co znajduje potwierdzenie w uzyskanych wynikach. Jego stężenie w podłożu po hodowli szczepu *Steinberg* było wysokie i wynosiło 0,095 g/L (tab. 11).

Wykorzystywane w badaniach drożdże odznaczały się znacznie niższymi aktywnościami arginazy, w porównaniu z innymi, opisywanymi w literaturze. Schehl i in. (2007) podczas konstruowania drożdży z delecją genu kodującego aktywność arginazy wykorzystywali szczep HHD1, który wykazywał aktywność arginazy na poziomie 23,1 U/mg białka. Można zatem uznać większość wykorzystywanych szczepów (oprócz *Steinberg*) za „bezpieczne” pod względem uwalniania mocznika z argininy. Należy jednak pamiętać, że w przypadku niedoboru azotu przyswajalnego w środowisku fermentacyjnym

może następować znaczny wzrost aktywności arginazy (Carrasco i in., 2003) i wydzielanie mocznika, jako wynik uruchomienia rezerwy azotowej.

Tabela 11. Aktywność właściwa wewnątrzkomórkowej arginazy wybranych ras drożdży winiarskich oraz zawartość argininy, mocznika i EC w cieczach pohodowlanych (zawartość argininy w podłożu przed hodowlą – 1,74 g/L), (n = 3)

Drożdże		Aktywność arginazy U*/mg białka	Ciecz pohodowlana		
			Arginina [g/L]	Mocznik [g/L]	EC [mg/L]
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Bordeaux</i>	1,42 ±0,09	1,55±0,05	0,015±0,002	<0,01
	<i>Burgund</i>	1,61 ±0,12	1,58±0,05	0,013±0,002	<0,01
	<i>Steinberg</i>	9,36 ±0,33	0,95±0,03	0,095±0,006	0,01
	<i>Syrena</i>	2,76 ±0,15	1,37±0,03	0,035±0,003	<0,01
	<i>Tokay</i>	1,90 ±0,12	1,52±0,03	0,025±0,002	<0,01
<i>S. bayanus</i>		3,00 ±0,18	1,31±0,03	0,048±0,003	<0,01

*1 U = 1 nmol ornityny/ min; drożdże z fazy stacjonarnej wzrostu

Drożdże rasy *Steinberg*, oprócz relatywnie wysokiej aktywności arginazy, wykazywały również najwyższą aktywność ureazy (0,569 U/mg białka), co znalazło odzwierciedlenie w wysokiej, w porównaniu do innych badanych szczepów, redukcji mocznika (tab. 12). Można przypuszczać, że zwiększone uwalnianie mocznika, powodowane aktywnością arginazy, indukuje biosyntezę enzymu, katalizującego jego rozkład. Najslabsze uzdolnienia ureolityczne wykazywały drożdże rasy *Tokay* (0,192 U/mg białka), co potwierdzone zostało statystycznie nieistotną ($P > 0,2$) redukcją mocznika, obecnego w podłożu fermentacyjnym.

Tabela 12. Aktywność właściwa wewnątrzkomórkowej ureazy wybranych ras drożdży winiarskich oraz zawartość mocznika i EC w cieczach pohodowlanych (zawartość mocznika w podłożu przed hodowlą – 1,30 g/L), (n = 3)

Drożdże		Aktywność ureazy U*/mg białka	Ciecz pohodowlana	
			Mocznik [g/L]	EC [mg/L]
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Bordeaux</i>	0,420 ± 0,008	1,12±0,02	0,01
	<i>Burgund</i>	0,301± 0,005	1,15±0,03	0,01
	<i>Steinberg</i>	0,569 ± 0,012	1,05±0,01	<0,01**
	<i>Syrena</i>	0,367 ± 0,006	1,12±0,02	0,01
	<i>Tokay</i>	0,192 ± 0,004	1,25±0,04	0,02
<i>S. bayanus</i>		0,402± 0,006	1,10±0,03	<0,01**

*1 U = 1 μ mol NH_3 /h,

** do obliczenia współczynnika Pearsona (r) przyjęto wartość 0

Współczynnik korelacji Pearsona, pomiędzy stężeniem karbaminianu etylu wytworzonego w podłożach fermentacyjnych a aktywnością ureazy wynosił $r = -0,712$. Jego wartość bezwzględna świadczy o zależności statystycznie istotnej, natomiast ujemny znak korelacji wskazuje, iż wraz ze wzrostem aktywności ureazy można oczekiwać spadku stężenia uretanu. Należy jednak podkreślić, że badane szczepy drożdży odznaczały się niską aktywnością ureolityczną, co potwierdza tezę sformułowaną przez Pigeau (2000), że aktywność ureazy drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae* nie pozwala na całkowitą hydrolizę mocznika.

Niezależnie od aktywności arginazy i ureazy w komórkach badanych drożdży, zawartość karbaminianu etylu w cieczach pochodowlanych oscylowała wokół poziomu wykrywalności (0,01 mg/L), z wyjątkiem rasy *Tokay*, w hodowli której stężenie EC wynosiło 0,02 mg/L. Mogło to być konsekwencją najniższej aktywności ureazy (0,192 U/mg białka), jaką wykazywał ten szczep w warunkach prowadzonych doświadczeń (tab. 12). Korelacja pomiędzy aktywnościami właściwymi arginazy i ureazy wybranych szczepów drożdży winiarskich na poziomie 0,773 wskazuje na ich statystycznie istotną współzależność. Można zatem wnioskować, że zwiększona aktywność arginazy, której towarzyszy wzrost produkcji mocznika, indukuje również wzrost aktywności ureazy, katalizującej jego hydrolizę. Chan i Cossins (1972) postulują, że mocznik może być regulatorem aktywności arginazy poprzez represję syntezy enzymu. Autorzy wykazali, że specyficzna aktywność arginazy zależy od rodzaju źródła azotu w podłożu, zaś produkty reakcji katalizowanej przez ten enzym mogą hamować biosyntezę, bądź aktywność enzymu, podczas gdy niska zawartość substratu stymuluje biosyntezę arginazy.

Schehl i in. (2007) skonstruowali, metodami inżynierii genetycznej, diploidalny szczep drożdży, wykazujący obniżoną aktywność arginazy ($< 0,3$ U/mg białka), a tym samym nieprodukujący mocznika. Zastosowanie szczepu z delecją genu *CAR1*, kodującego aktywność arginazy, wpłynęło na obniżenie produkcji uretanu, ale nie zapewniło otrzymania spirytusu pozbawionego karbaminianu etylu, co wskazuje na udział także innych prekursorów w jego syntezie.

5.3.1. Wpływ drożdży winiarskich na zawartość karbaminian etylu w spirytusach owocowych

Analiza chromatograficzna surowych spirytusów owocowych wykazała różnice w zawartości karbaminianu etylu, w zależności od rodzaju surowca, jak i rasy drożdży, zastosowanej do prowadzenia fermentacji.

Zawartość argininy w miazdze aroniowej, przed fermentacją, wynosiła 1,04 mg/kg, zaś po zakończeniu procesu mieściła się w granicach, od 0,66 mg (rasa *Syrena*) do 0,87 mg/kg zacieru (rasa *Burgund*). Konsekwencją niskiego stężenia argininy w owocach aronii były śladowe ilości mocznika, od 0,01 mg (rasa *Steinberg*) do 0,25 mg/kg zacieru fermentowanego, z udziałem drożdży rasy *Burgund* (tab. 13).

Jednak stężenia karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach były bardzo zróżnicowane. Wysoką zawartość EC (3,37 mg/L 100% obj.) oznaczono w spirytusie aroniowym, otrzymanym po fermentacji rasą *Burgund*. Mogło to być konsekwencją relatywnie dużej ilości mocznika w zacierze odfermentowanym i niskiej aktywności właściwej wewnątrzkomórkowej ureazy tego szczepu (tab. 12). Zastosowanie do prowadzenia procesu drożdży rasy *Steinberg*, wykazujących w warunkach beztlenowych prawie 2-krotnie wyższą aktywność właściwą ureazy (0,569 U/mg białka) oraz stężenie mocznika w miazdze odfermentowanej na poziomie 0,01 mg/kg, znalazły potwierdzenie w śladowej ilości uretanu w spirytusie (0,02 mg EC/L 100% obj.), (tab. 13). Współczynnik korelacji Pearsona, między zawartością mocznika w zacierach odfermentowanych a stężeniem karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach wynosił $r = 0,899$.

Tabela 13. Wpływ drożdży winiarskich (inokulum 0,3 g s.s./L) na zawartość argininy i mocznika w zacierach odfermentowanych oraz karbaminianu etylu w spirytusach aroniowych (zawartość argininy w miazdze aroniowej przed fermentacją – 1,04 mg/kg), (n = 3)

Drożdże		Arginina	Mocznik	Karbaminian etylu [mg/L 100% obj.]
		[mg/kg miazgi]		
S. cerevisiae	Bordeaux	0,81±0,06	0,15±0,01	1,15±0,07
	Burgund	0,87±0,06	0,25±0,03	3,37±0,17
	Steinberg	0,73±0,06	0,01±0,003	0,02±0,01
	Syrena	0,66±0,04	0,03±0,007	1,07±0,05
	Tokay	0,82±0,05	0,01±0,003	0,75±0,05
S. bayanus		0,79±0,07	0,06±0,01	0,70±0,02

Analiza odfermentowanych zacierów śliwkowych wykazała, że stopień wykorzystania argininy wynosił od ok. 55% (*Burgund*) do 92% (*Steinberg*) (tab. 14), co wskazywało na korelację z aktywnością arginazy badanych ras drożdży (tab. 11). Odwrotna zależność dotyczyła mocznika, którego stężenie w próbce fermentowanej drożdżami rasy *Burgund* było stosunkowo wysokie i wynosiło 4,03 mg/kg miazgi, zaś w przypadku szczepu *Steinberg* osiągnęło wartość ok. 5-krotnie niższą (0,83 mg/kg miazgi), (tab. 14). Należy zaznaczyć, iż mocznik nie pochodził z suplementacji, lecz był produktem przemian metabolicznych drożdży, częściowo jako produkt rozkładu argininy, jak i innych reakcji. Jego wyższe stężenia w odfermentowanej miazdze śliwkowej, w porównaniu z aroniową, mogą być konsekwencją wyższej zawartości argininy w zacierach śliwkowych przed fermentacją (6,15 mg/L).

Badania karbaminianu etylu w surowych spirytusach śliwkowych wykazały jego najniższe ilości (0,52 mg/L 100% obj.) w przypadku zastosowania do

fermentacji drożdży *Tokay*, odznaczających się także niską aktywnością ureazy, spośród badanych szczepów drożdży (tab. 12). Z kolei zastosowanie drożdży rasy *Steinberg*, wykazujących ok. 3-krotnie wyższą aktywność ureolityczną w warunkach beztlenowych (0,569 U/mg białka), w porównaniu do rasy *Steinberg*, nie przyniosło obniżenia stężenia uretanu, mimo stosunkowo niskiej zawartości mocznika w zacierze odfermentowanym (tab. 14). Potwierdza to zatem udział innych prekursorów w syntezie karbaminianu etylu, jak również katalityczny bądź inhibujący wpływ niektórych związków chemicznych, pochodzących z surowca (polifenole, antocyjany) oraz powstających w czasie fermentacji.

Tabela 14. Wpływ ras drożdży winiarskich (inokulum 0,3 g s.s./L) na zawartość argininy i mocznika w zacierach odfermentowanych oraz karbaminianu etylu w spirytusach śliwkowych (zawartość argininy w miazdze przed fermentacją – 6,15 mg/kg), (n = 3)

Drożdże		Arginina	Mocznik	Karbaminian etylu [mg/L 100% obj.]
		[mg/kg miazgi]		
S. cerevisiae	Bordeaux	2,25±0,08	1,82±0,25	0,75 ±0,05
	Burgund	2,78±0,12	4,03±0,42	1,75 ±0,12
	Steinberg	0,46±0,05	0,83±0,06	1,50±0,12
	Syrena	2,30±0,07	2,83±0,23	1,35±0,10
	Tokay	2,20±0,07	2,03±0,15	0,52±0,05
S. bayanus		2,15±0,08	2,04±0,15	0,82±0,02

Obliczając na podstawie danych z tabel 13 i 14 współczynnik korelacji Pearsona między zawartością mocznika w zacierach odfermentowanych a stężeniem karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach, stwierdzono brak statystycznie istotnej współzależności między tymi zmiennymi ($r = 0,065$), na co składała się, w głównej mierze, bardzo zróżnicowana zawartość mocznika w zacierach odfermentowanych (aroniowe 0,01÷0,25 mg/kg; śliwkowe 0,83÷4,03 mg/kg) i znacznie mniejsze różnice w stężeniach karbaminianu w otrzymanych spirytusach.

Reasumując, należy stwierdzić, że uzdolnienia enzymatyczne drożdży mogą wpływać na zawartość karbaminianu etylu i jego prekursorów w podłożach fermentacyjnych, z uwzględnieniem gorzelniczych zacierów owocowych. Niemniej istotny jest jednak skład chemiczny przerabianego surowca, a zwłaszcza prekursorów uretanu (m.in. glikozydów cyjanogennych), jak i innych związków (polifenole, antocyjany), które mogą oddziaływać na aktywność enzymów drożdży i modyfikować skład chemiczny spirytusów.

5.4. Przydatność chemicznych metod obniżania zawartości cyjanowodoru i karbaminianu etylu w spirytusach owocowych

Proponowaną metodą obniżenia zawartości karbaminianu etylu w spirytusach z owoców pestkowych jest stosowanie obróbki chemicznej zacierów, poprzez dodatek związków miedzi (Christoph i Bauer-Christoph, 1998, 1999), bądź destylacja z separatorem miedziowym (Pieper i in., 1992; Kaufman i in., 1993). Można również stosować zabiegi polegające na intensyfikacji syntezy karbaminianu, by następnie oddzielić go w procesie destylacji (Tanner i in., 1987; Schmidt, 1988).

Oceniano wpływ dodatku do miazgi owocowej, w fazie dofermentowania, chlorku miedzi (I) lub kwasu askorbinowego na zmiany zawartości cyjanowodoru oraz karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach, a także na ich jakość (tab. 15).

W spirytusie śliwkowym, pochodzącym z zacieru suplementowanego chlorkiem miedzi (I), w ilości 0,1 g/kg, stężenie wolnego cyjanowodoru uległo obniżeniu o ok. 88%, zaś w przypadku podwojenia dawki CuCl do 0,2 g/kg zacieru stopień redukcji cyjanków wyniósł 93% w stosunku do próby odniesienia. Zaobserwowane zmiany są, najprawdopodobniej, konsekwencją tworzenia trwałych, nietlonych kompleksów miedzi z cyjankami (Schmidt, 1988; Guan i Pieper, 1999). Jednocześnie można uznać dawkę 0,1 g CuCl/kg zacieru jako wystarczającą do znaczącego obniżenia cyjanowodoru w spirytusach śliwkowych. Niezależnie od wielkości dodatku chlorku miedzi (I), stężenia karbaminianu w świeżo oddestylowanych spirytusach były zbliżone ($0,1 < P < 0,2$) i nie różniły się istotnie od oznaczonego w próbie kontrolnej (spirytus z zacieru bez obróbki chlorkiem miedzi), ($0,05 < P < 0,1$).

Podobne tendencje zmian stężenia cyjanowodoru, jakkolwiek z inną dynamiką, obserwowano w przypadku zacierów aroniowych. O ile w zacierach śliwkowych dodatek chlorku miedzi (I) w ilości 0,1 g/kg wystarczył do związania większości cyjanków, to w zacierze aroniowym zastosowanie tej dawki pozwoliło osiągnąć redukcję HCN o 52%, zaś dopiero podwojenie dawki chlorku miedzi (I) spowodowało związanie ok. 90% wolnego cyjanowodoru. Nie zaobserwowano istotnych zmian w zawartości uretanu w otrzymanych spirytusach aroniowych. Zarówno pochodzące z zacieru kontrolnego, jak i z odfermentowanej miazgi poddanej obróbce solą miedzi (I) zawierały zbliżone stężenia EC ($0,37 \pm 0,40$ mg/L 100% obj.), (tab. 15).

Kolejnym etapem badań była intensyfikacja syntezy karbaminianu etylu przy udziale kwasu askorbinowego, który może, w zależności od warunków środowiska, występować w formie utlenionej i zredukowanej. Układ oksydo-redukcyjny kwas askorbinowy $\leftrightarrow$ kwas dehydroaskorbinowy uczestniczy w regulowaniu potencjału oksydo-redukcyjnego środowiska i bierze udział w transporcie elektronów (Konopacka, 2004). W niskich stężeniach formy te są prooksydantami, a w wysokich antyutleniaczami (Madej i in., 2000). Zjawisko prooksydacji nie zostało jeszcze w pełni poznane. Istnieje kilka teorii tłumaczących właściwości prooksydacyjne kwasu askorbinowego w badaniach

in vitro. Deutsch (1998) tłumaczy, że wynikają one z enolowo-ketonowej struktury tego związku, dzięki której kwas askorbinowy może być donorem tlenu lub grup hydroksylowych.

Oceniając wpływ dodatku kwasu askorbinowego do zacierów śliwkowych i aroniowych, stwierdzono tendencję wzrostową, zarówno w odniesieniu do zawartości wolnego cyjanowodoru, jak i uretanu w otrzymanych spirytusach. Stężenie HCN w surowych spirytusach śliwkowych było od ok. 42 do 74% wyższe, w porównaniu z próbą kontrolną i mieściło się w granicach od 14,37 do 17,62 mg/L 100% obj. Zawartość uretanu wynosiła od 0,87 do 1,12 mg/L 100% obj. i również przewyższała koncentrację EC w próbce spirytusu z zacieru, bez dodatku kwasu askorbinowego. Podobny kierunek zmian odnotowano w przypadku spirytusów aroniowych (tab. 15). Uzyskane wyniki wskazują na katalityczny wpływ kwasu askorbinowego na przemianę wolnych cyjanków do izocyjanianów, które w reakcji z etanolem tworzą karbaminian etylu, ale także na intensyfikację uwalniania cyjanowodoru z glikozydów cyjanogennych, o czym świadczą również rezultaty badań Bromleya i in. (2005).

Tabela 15. Wpływ dodatku soli miedzi lub kwasu askorbinowego do zacierów owocowych na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach (n = 3)

Wyszczególnienie	Cyjanowódór wolny*		Karbaminian etylu	
	mg/L 100% obj.			
	śliwkowy ^a	aroniowy ^b	śliwkowy ^a	aroniowy ^b
Bez dodatku związków chemicznych	10,12±0,60	17,37±0,85	0,60±0,07	0,40±0,05
Chlorek miedzi (I) (0,1 g/kg)	1,20±0,05	8,22±0,30	0,55±0,05	0,37±0,05
Chlorek miedzi (I) (0,2 g/kg)	0,75±0,05	1,62±0,12	0,48±0,05	0,40±0,05
Kwas askorbinowy (1,0 g/kg)	14,37±0,12	21,62±0,62	0,87±0,07	0,65±0,07
Kwas askorbinowy (2,0 g/kg)	17,62±0,10	28,75±0,60	1,12±0,07	0,90±0,07

^a Węgierka Zwykła, miazga surowa, 5% pestek rozdrobnionych

^b Aronia czarnoowocowa, miazga surowa

* Badane spirytusy nie zawierały HCN związanego

Czynnikiem decydującym o możliwości praktycznego zastosowania wymienionych związków chemicznych do ograniczenia syntezy uretanu, bądź intensyfikacji jego powstawania, by następnie wydzielić go podczas destylacji, jest brak niekorzystnego wpływu obróbki chemicznej na jakość spirytusów.

Badania składu chemicznego surowych spirytusów śliwkowych i aroniowych wykazały, że dodatek do zacierów soli miedzi (I) lub kwasu askorbinowego, w fazie ich dofermentowania, miał istotny wpływ na zawartość ubocznych produktów fermentacji (tab. 16). Najniższą zawartością tych składników odznaczały się spirytusy otrzymane z zacierów, bez dodatku związków chemicznych. W spirytusach śliwkowych, otrzymanych zarówno z zacierów z dodatkiem chlorku miedzi (I), jak i z dodatkiem kwasu askorbinowego, oznaczono kilkakrotnie wyższe stężenia aldehydów w porównaniu z próbą kontrolną. Tendencję wzrostową odnotowano również w odniesieniu do stężenia estrów i wyższych alkoholi. Natomiast nie stwierdzono istotnego wpływu obróbki chemicznej, zarówno chlorkiem miedzi (I), jak i kwasem askorbinowym, na zmiany stężenia metanolu. Związek ten, jako produkt deestryfikacji pektyn, był obecny w spirytusach śliwkowych w ilościach, od 0,20 do 0,25 g/100 mL 100% obj. (tab. 16), co nie przekraczało wymagań ustalonych dla spirytusów owocowych (m.in. śliwkowych) (do 0,80 g/100 mL 100% obj.), (PN-A-79523:2002P).

Cechą charakterystyczną surowych spirytusów aroniowych była znacznie wyższa kwasowość w porównaniu ze śliwkowymi. Otrzymane z zacierów suplementowanych chlorkiem miedzi lub kwasem askorbinowym, podobnie jak śliwkowe, zawierały ponad 2-krotnie więcej aldehydów ($0,88 \div 0,98$ g/L 100% obj.), średnio o 53% więcej fuzli oraz od 27 do 77% wyższe stężenie estrów w porównaniu z próbą kontrolną (tab. 16). Według Schmidta (1988) podwyższona zawartość produktów ubocznych (m.in. związków karbonylowych) w spirytusach owocowych, pochodzących z zacierów poddanych obróbce solami miedzi, jest konsekwencją jej katalitycznego wpływu na syntezę produktów ubocznych fermentacji.

Ocena organoleptyczna surowych spirytusów śliwkowych wykazała, że dodatek chlorku miedzi lub kwasu askorbinowego do miazgi w fazie dofermentowania nie wpłynął na obniżenie ich jakości, mimo istotnych zmian w składzie chemicznym. Natomiast w przypadku zacierów aroniowych można rozważać jedynie dodatek chlorku miedzi (I), w dawce 0,1 g/kg zacieru, który nie spowodował pogorszenia cech smakowo-zapachowych otrzymanych spirytusów. Zarówno wyższa dawka CuCl (I), jak i obróbka kwasem askorbinowym wpłynęły niekorzystnie na cechy smakowo-zapachowe spirytusów aroniowych (tab. 16).

Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę indywidualnego doboru metod ograniczania zawartości karbaminianu etylu i jego prekursora – cyjanowodoru, w zależności od rodzaju przerabianych owoców.

Tabela 16. Charakterystyka chemiczna i organoleptyczna surowych spirytusów owocowych (n = 3)

Wyszczególnienie	Kwasowość jako kwas octowy	Estry jako octan etylu	Aldehydy jako aldehyd octowy	Fuzle jako miesz. alkoholi izobutyl. i izoamylowego	Metanol	Zapach i smak
	g/L 100% obj.				g/100 mL 100%*	
Węgierka Zwykła, miazga surowa, 5% pestek rozdrobnionych						
Bez dodatku związków chemicznych	0,10±0,01	0,44±0,03	0,11±0,01	3,62±0,25	0,20±0,02	+
Chlorek miedzi (I) (0,1 g/kg)	0,11±0,01	0,50±0,04	0,70±0,05	4,76±0,33	0,25±0,03	+
Chlorek miedzi (I) (0,2 g/kg)	0,17±0,01	0,67±0,05	0,82±0,06	4,40±0,31	0,24±0,02	+
Kwas askorbinowy (1,0 g/kg)	0,11±0,01	0,50±0,04	0,66±0,04	4,36±0,31	0,22±0,02	+
Kwas askorbinowy (2,0 g/kg)	0,17±0,01	0,55±0,04	0,74±0,05	4,61±0,32	0,25±0,03	+
Aronia czarnoowocowa, miazga surowa						
Bez dodatku związków chemicznych	0,54±0,04	0,66±0,05	0,39±0,03	5,48±0,38	0,17±0,03	+
Chlorek miedzi (I) (0,1 g/kg)	0,80±0,06	0,85±0,06	0,88±0,05	8,20±0,50	0,13±0,02	+
Chlorek miedzi (I) (0,2 g/kg)	0,85±0,05	1,17±0,09	0,98±0,06	8,30±0,50	0,16±0,02	—
Kwas askorbinowy (1,0 g/kg)	0,88±0,06	0,84±0,07	0,97±0,07	8,56±0,60	0,13±0,02	—
Kwas askorbinowy (2,0 g/kg)	0,90±0,06	0,97±0,08	0,98±0,07	8,52±0,60	0,20±0,03	—

* stężenie wyrażone wg PN-A-79523:2002P

/+/- typowy, charakterystyczny dla przerabianego surowca; /-/- nietypowy, obcy, ostry, niezharmonizowany

5.5. Zastosowanie bakterii *Lactobacillus fermentum* do obniżenia stężenia mocznika w zacierach owocowych

Do drobnoustrojów, które w określonych warunkach hodowli mogą syntetyzować tzw. „kwaśną” ureazę, o optimum pH w granicach od 2,0 do 4,5 (Mobley i in., 1995), zalicza się niektóre gatunki bakterii mlekowych, m.in.: *Lactobacillus fermentum* (Kakimoto i in., 1990a), *Lactobacillus reuteri* (Kakimoto i in., 1989), *Streptococcus mitior(mitis)* (Yamazaki i in., 1990). Uzdolnienia do biosyntezy ureazy wskazują na możliwość ich wykorzystania w praktyce do eliminacji mocznika, jednego z głównych prekursorów uretanu w podłożach fermentacyjnych, winach bądź napojach alkoholowych (sake), (Butzke i Bisson, 1997). Handlowe preparaty „kwaśnej” ureazy, produkowanej przez bakterie *L. fermentum*, zyskały pozytywną opinię Komisji Europejskiej i zostały dopuszczone do stosowania w technologii winiarskiej (Fidaleo i in., 2006).

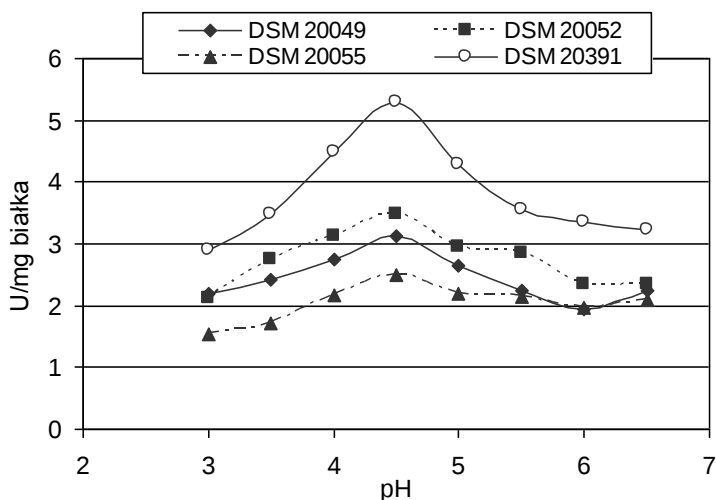
5.5.1. Aktywność ureolityczna bakterii *L. fermentum*

Prowadzono badania zmierzające do określenia aktywności ureolitycznej wybranych szczepów bakterii *Lactobacillus fermentum* (DSM 20049, DSM 20052, DSM 20055, DSM 20391). Aktywność ureazy oznaczano w ekstraktach bezkomórkowych, w zakresie pH 3,0÷6,5. Maksimum aktywności ureazy przypadało na pH 4,5. W tych warunkach najwyższą aktywność wykazywał szczep DSM 20391 (5,29 U/mg białka), natomiast najniższą szczep DSM 20055 (2,50 U/mg białka), (rys. 4). Uzyskane wyniki aktywności są zbieżne z wynikami badań, które otrzymał Suzuki i in. (1979). Autorzy odnotowali aktywność ureazy szczepów *L. fermentum*, w szerokich granicach, od 0,32 do 19,46 U (μmol mocznika/h) na 1 mg białka. Maksymalną aktywność szczepy wykazywały przy pH = 4,0. Z kolei Kakimoto i in. (1990a), badając szczep *L. fermentum* IFO 14511 stwierdzili, że produkcja „kwaśnej” ureazy zachodziła najdynamiczniej w podłożu zawierającym 0,5% mocznika, osiągając po 2 dobach aktywność 8,9 U/mg białka.

Badania wpływu temperatury na aktywność ureazy badanych bakterii *L. fermentum* wykazały, że maksymalna aktywność enzymu występowała w temperaturze 60÷65°C, zaś enzym był termostabilny do 75°C oraz aktywny w całym badanym zakresie pH (3,0÷6,5), (tab. 17). Ureaza wyizolowana przez Kakimoto i in. (1990a, 1990b) ze szczepu *L. fermentum* IFO 14511 odznaczała się maksimum aktywności w temperaturze 65°C i pH 2,0. Większą wrażliwość na temperaturę i pH wykazywała ureaza wyizolowana z *Arthrobacter mobilis*, której utrata stabilności następowała w temperaturze powyżej 65°C i pH < 4,0 (Miyagawa i in., 1999).

Tabela 17. Wybrane właściwości wewnątrzkomórkowej ureazy badanych szczepów *Lactobacillus fermentum* (n = 3)

Szczep	Optymalne pH	Optymalna temperatura [°C]	pH stabilność (37°C, 30 min)	Termostabilność [°C] (pH 4,5; 30 min)
DSM 20049	4,5	60	3,0÷6,5	75
DSM 20052	4,5	60	3,0÷6,5	75
DSM 20055	4,5	65	3,0÷6,5	75
DSM 20391	4,5	65	3,0÷6,5	75



Rys. 4. Aktywność ureazy bakterii *Lactobacillus fermentum* (n = 3)

5.5.2. Efektywność hydrolizy mocznika przez bakterie *L. fermentum*

W zacierach odfermentowanych, bez dodatku bakterii, stanowiących próby odniesienia, zawartość mocznika, po zakończeniu prowadzenia doświadczeń, wynosiła odpowiednio 45,3 mg/kg w śliwkowym i 44,7 mg/kg w aroniowym, co oznacza, że nie uległa istotnej zmianie ($0,10 < P < 0,20$) w stosunku do jego ilości początkowej (50 mg/kg).

W podłożach z dodatkiem bakterii *L. fermentum* obserwowano obniżenie zawartości mocznika, z wyraźnie wyższą dynamiką w przypadku miazgi śliwkowej w porównaniu z aroniową (tab. 18). Różnice w szybkości hydrolizy mocznika były, najprawdopodobniej, spowodowane hamowaniem aktywności ureazy przez obecne w owocach aronii duże ilości związków polifenolowych i garbników (Wolski i in., 2007). Opinię tę potwierdzają badania Byłki i in. (2004), z których wynika, że niektóre aglikony flawonoidowe wykazują zdolność hamowania ureazy.

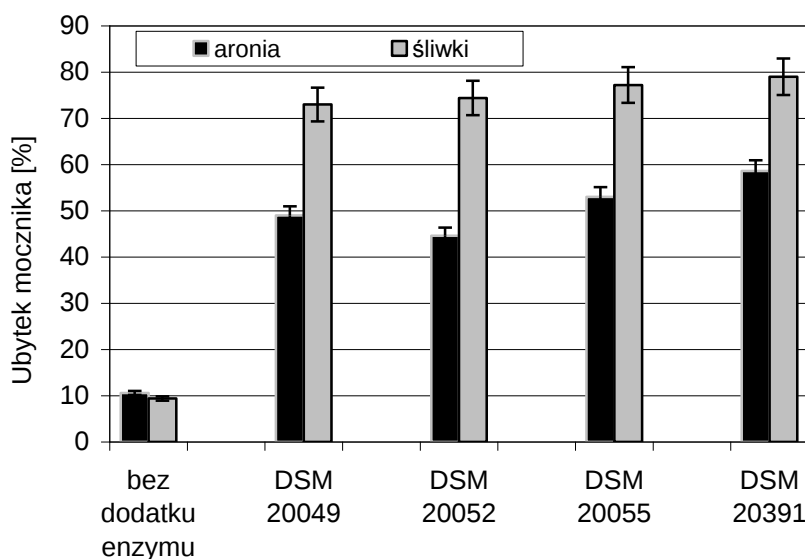
Tabela 18. Wpływ bakterii *L. fermentum* na obniżenie stężenia mocznika w zacierach owocowych (n = 2)

Szczep Doba	Próba kontrolna (bez enzymu)	DSM 20049	DSM 20052	DSM 20055	DSM 20391
Sliwki/Węgierka Zwykła, miazga surowa, 5% pestek rozdrobnionych/ mocznik [mg/kg]					
0	50,0±3,5	50,0±3,5	50,0±3,5	50,0±3,5	50,0±3,5
2	49,7±2,8	41,5±2,5	41,2±2,6	42,6±2,5	39,5±2,4
4	49,3±2,8	33,6±2,2	27,8±2,1	28,2±2,1	25,6±2,2
6	47,5±2,6	21,7±2,0	18,5±1,9	20,8±1,9	15,1±1,6
8	45,3±2,5	13,5±1,8	12,8±1,6	11,4±1,5	10,5±1,5
Aronia czarnoowocowa /miazga surowa/ mocznik [mg/kg]					
0	50,0±3,5	50,0±3,5	50,0±3,5	50,0±3,5	50,0±3,5
2	49,5±2,8	45,5±2,5	46,2±2,7	43,7±2,5	39,5±2,4
4	47,8±2,6	38,2±2,5	40,5±2,4	32,5±2,1	30,7±2,1
6	45,0±2,5	27,3±1,8	32,3±1,9	27,6±1,9	25,6±1,8
8	44,7±2,5	25,5±1,8	27,7±1,5	23,5±1,8	20,7±1,7

W miazgach odfermentowanych, poddanych działaniu ureazy bakteryjnej, zawartość mocznika kształtowała się w granicach, od 10,5 do 13,5 mg/kg miazgi śliwkowej oraz od 20,7 do 27,7 mg/kg miazgi aroniowej, co wskazuje na obniżenie stężenia tego związku, odpowiednio o ok. 45÷59% (aronia) o 73÷79% (śliwki), (rys. 5). Niższe wykorzystanie mocznika w zacierach aroniowych potwierdza wcześniejszą tezę o hamującym wpływie substancji polifenolowych na aktywność ureazy. Jednakże uwzględniając, że ilość egzogenego mocznika, wprowadzona do miazgi owocowej (p. 4.6.2) znacznie przekraczała jego rzeczywiste stężenia, powstałe w wyniku aktywności metabolicznej drożdży (0,7 mg/kg miazgi aroniowej; 12,5 mg/kg miazgi śliwkowej), można wnioskować, że redukcja mocznika w badanych zacierach wskazana jest jedynie w przypadku miazgi śliwkowej.

Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność badanych szczepów bakterii w obniżaniu zawartości mocznika w owocowych podłożach, w których może on powstawać podczas fermentacji z CO₂ i związków azotowych, jak również w wyniku katabolicznego rozpadu argininy, podczas przemian metabolicznych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Sumrada i Cooper, 1984).

Kakimoto i in. (1990a), badając wpływ „kwaśnej” ureazy, otrzymanej ze szczepów bakterii rodzaju *Lactobacillus* i *Streptococcus* na efektywność redukcji mocznika w sake (pH = 4,4; etanol 19%) i winach (pH = 3,6÷4,3; etanol 12÷17%) wykazali, że po ośmiu dniach prowadzenia doświadczeń z udziałem enzymu, którego aktywność odpowiadała 100 μmol uwolnionego amoniaku/min, zawartość mocznika obniżyła się w sake i winie shao-hsing do 0÷1 mg/L, zaś w winie białym, o niższym pH, do 2÷9 mg/L. Również inne gatunki bakterii, takie jak *Arthrobacter mobilis* (Miyagawa i in., 1999) oraz *Enterobacter sp.* (Yang i in., 2008), wykazują uzdolnienia do produkcji „kwaśnej” ureazy, która okazała się skuteczna w eliminacji mocznika z chińskich win ryżowych (m.in. sake). Jednakże Kodama (1996) podkreśla, że efektywność działania „kwaśnej” ureazy uzależniona jest od rodzaju wina i warunków obróbki. Przyspieszenie hydrolizy mocznika może przynieść podwyższona temperatura prowadzenia obróbki, natomiast etanol i związki fenolowe są inhibitorami aktywności ureazy (Trioli i Ough, 1989; Famuyiwa i Ough, 1991).



Rys. 5. Stopień ubytku mocznika w zacierach owocowych (n = 2)

Analiza odfermentowanych zacierów owocowych wykazała, że dodatek ekstraktów bezkomórkowych bakterii *L. fermentum* nie wpłynął na zawartość etanolu, jak również na ilość uwolnionego cyjanowodoru ($0,05 < P < 0,10$). Znaczące różnice w zawartości HCN występowały w zależności od rodzaju przerabianych owoców. W odfermentowanej miazdze aroniowej stężenia cyjanowodoru były, średnio, dwukrotnie wyższe od oznaczonych w zacierach śliwkowych.

Mimo iż badane zacierzy znacząco ($0,001 < P < 0,10$) różniły się pod względem zawartości mocznika, to zawartość uretanu w większości z nich oscylowała wokół poziomu wykrywalności 0,01 mg/kg. Wyższe stężenia tego związku (0,05 mg/kg miazgi aroniowej i 0,03 mg/kg miazgi śliwkowej) oznaczono jedynie w próbach suplementowanych mocznikiem, bez dodatku ekstraktów bezkomórkowych *L. fermentum*.

Surowe spirytusy odznaczały się znacznie większą zawartością uretanu niż zacierzy. Wskazuje to na intensyfikację syntezy karbaminianu w czasie prowadzenia destylacji, co potwierdzają liczne doniesienia literaturowe (Riffkin i in., 1989; Bertrand, 1993; Aresta i in., 2001; Bruno i in., 2007), z których wynika, że ok. 80% uretanu obecnego w spirytusach powstaje podczas tego etapu procesu technologicznego.

Najwyższe stężenia EC oznaczono w spirytusach, otrzymanych z zacierów z dodatkiem mocznika, niepoddanych obróbce ureazą bakteryjną. Aktywność ureolityczna tego enzymu wpłynęła na zmniejszenie stężenia mocznika w zacierach i w konsekwencji obniżenie zawartości uretanu w otrzymanych spirytusach, średnio, o ok. 47% w śliwkowych i o 43% w aroniowych (tab. 19).

Współczynnik korelacji Pearsona, określający współzależność pomiędzy stężeniem mocznika w miazgach odfermentowanych a zawartością karbaminianu etylu w spirytusach surowych wynosił odpowiednio: $r = 0,836$ dla śliwek i $r = 0,576$ dla aronii, co, zwłaszcza w pierwszym przypadku, sugeruje statystycznie istotny wpływ obecności mocznika w zacierach odfermentowanych na powstawanie karbaminianu etylu. Dodać należy, że w zacierach z owoców zawierających glikozydy cyjanogenne, redukcja mocznika nie jest zabiegiem wystarczającym do eliminacji karbaminianu etylu. Potwierdzają to wyniki przeprowadzonych doświadczeń. Zawartość uretanu, oznaczona w spirytusach otrzymanych z miazgi śliwkowej, bez dodatku egzogenego mocznika i obróbki enzymatycznej z udziałem bakterii *L. fermentum*, nie różniła się istotnie ($0,05 < P < 0,10$) od oznaczonej w spirytusach pochodzących z zacierów, suplementowanych mocznikiem (bez dodatku *L. fermentum*), mimo znaczących różnic w jego zawartości w miazgach odfermentowanych (tab. 19). Analogicznie, spirytusy aroniowe z zacierów uzupełnionych dodatkiem mocznika i ureazy (*L. fermentum*) odznaczały się stężeniem uretanu zbliżonym ($0,05 < P < 0,10$) do oznaczonego w spirytusie, otrzymanym z odfermentowanej miazgi bez tych zabiegów, jakkolwiek zawartość mocznika w badanych zacierach statystycznie istotnie się różniła ($P < 0,001$). Uzyskane wyniki mogą wskazywać na większy udział, zwłaszcza na etapie destylacji, produktów hydrolizy glikozydów cyjanogennych, niż mocznika, w syntezie uretanu.

Podatność cyjanków na wchodzenie w reakcje prowadzące do powstawania karbaminianu etylu, znajduje potwierdzenie w wynikach zmian stężenia EC w spirytusach, poddanych działaniu promieni UV. Mimo że nie zawierały one mocznika, to we wszystkich odnotowano wzrost zawartości karbaminianu etylu (od ok. 67 do 88% w śliwkowych oraz od ok. 54 do 133% w aroniowych) i był on istotnie skorelowany z zawartością cyjanowodoru (współczynnik Pearsona $r = 0,827$), (tab. 19). Odnotowany wzrost stężeń uretanu wskazywał,

że obecny w spirytusach cyjanowódor może, w odpowiednich warunkach (światło, podwyższona temperatura), prowadzić do syntezy karbaminianu etylu. Pod wpływem naświetlania zachodzi proces indukowanej autooksydacji cyjanów (cyjanowodoru) do cyjanianów i izocyjanianów, a następnie do uretanu (Muñoz i in., 2000; Aresta i in., 2001; Pedraza-Avella i in., 2008).

Tabela 19. Zawartość etanolu, mocznika, cyjanowodoru i karbaminianu etylu w zacierach odfermentowanych i spirytusach owocowych (n = 3)

Rodzaj próby		Zacier odfermentowany				Spirytusy		
		Mocznik	Etanol	HCN wolny	EC	HCN wolny	EC	
							S ^a	UV ^b
		[mg/kg]	[% obj.]	[mg/kg]	[mg/L 100% obj.]			
Śliwki /Węgierka Zwykła, miazga surowa, 5% pestek całych/								
Zacier bez mocznika egzogenego		12,5±0,5	4,9±0,1	0,42±0,03	0,01	8,00±0,50	0,30±0,03	0,50±0,07
Zacier z dodatkiem mocznika do 50 mg/kg	Bez dod. bakterii	45,3±1,5	4,8±0,1	0,40±0,03	0,03	7,85±0,37	0,37±0,05	0,62±0,07
	DSM 20049	10,0±0,5	4,8±0,1	0,36±0,03	0,01	6,85±0,37	0,17±0,02	0,32±0,05
	DSM 20052	10,0±0,5	4,9±0,1	0,40±0,02	0,01	8,35±0,62	0,22±0,03	0,42±0,05
	DSM 20055	10,7±0,5	5,0±0,1	0,38±0,03	0,01	7,42±0,50	0,17±0,02	0,32±0,05
	DSM 20391	13,3±0,6	4,8±0,1	0,43±0,04	0,01	8,02±0,62	0,20±0,02	0,37±0,05
Aronia czarnoowocowa /miazga surowa/								
Zacier bez mocznika egzogenego		0,7±0,03	3,6±0,1	0,82±0,04	0,01	16,25±0,62	0,37±0,05	0,87±0,07
Zacier z dodatkiem mocznika do 50 mg/kg	Bez dod. bakterii	44,7±1,2	3,5±0,1	0,80±0,03	0,05	17,20±0,75	0,55±0,05	1,00±0,07
	DSM 20049	22,5±0,7	3,6±0,1	0,76±0,03	0,01	15,15±0,50	0,30±0,02	0,50±0,05
	DSM 20052	23,5±0,7	3,5±0,1	0,80±0,05	0,01	16,05±0,75	0,32±0,02	0,75±0,07
	DSM 20055	20,4±0,6	3,5±0,1	0,77±0,04	0,01	17,32±0,87	0,30±0,02	0,67±0,07
	DSM 20391	25,6±0,7	3,5±0,1	0,81±0,04	0,01	15,47±0,50	0,32±0,02	0,50±0,05

S^a – spirytusy badane bezpośrednio po destylacji; UV^b – spirytusy badane po naświetlaniu lampą UV przez 4 godziny

Reasumując, można stwierdzić, że zastosowanie badanych szczepów bakterii *L. fermentum* pozwoliło na obniżenie stężenia mocznika w odfermentowanych miążgach owocowych, ze zróżnicowaną efektywnością, uzależnioną, najprawdopodobniej, od zawartości związków polifenolowych. Nie wpłynęło to jednak na eliminację bądź znaczące ograniczenie ilości powstałego karbaminianu etylu. W przypadku badanych zacierów owocowych dominującym prekursorem uretanu był cyjanowodor. Należy zatem zaakcentować, że podczas przerobu na spirytus owoców, zawierających glikozydy cyjanogenne (pestkowe, ziarnkowe, jagodowe), stosowane zabiegi technologiczne powinny raczej zmierzać w kierunku ograniczania ilości uwalnianych cyjanków. Schehl i in. (2007) podkreślają, że znaczące różnice w składzie surowców wykorzystywanych, np. do produkcji sake i spirytusów owocowych sprawiają, że o ile w przypadku wina z ryżu, niezawierającego związków cyjanogennych, obróbka „kwaśną” ureazą przynosi eliminację dominującego prekursora uretanu, to w zacierach gorzelnicznych i nastawach winiarskich, z owoców pestkowych, ziarnkowych i jagodowych, zabieg taki pozwala jedynie na częściowe obniżenie ilości powstającego karbaminianu etylu.

5.6. Wpływ produktów ubocznych fermentacji na powstawanie karbaminianu etylu

Badano wpływ związków chemicznych, stanowiących główne produkty uboczne fermentacji alkoholowej (aldehyd octowy, wyższe alkohole – m.in. izoamylowy i izobutyłowy, octan etylu), związków charakterystycznych dla spirytusów owocowych (metanol), pochodzących z owoców pestkowych (cyjanowodor, aldehyd benzoesowy, alkohol benzylowy) i diacetylu, reprezentującego grupę związków dikarbonylowych, na powstawanie karbaminianu etylu. W tym celu przeprowadzono fermentację podłoży modelowych, wzbogaconych wymienionymi związkami. Z uwagi na to, iż jednym z głównych prekursorów uretanu jest cyjanowodor, wszystkie podłoża uzupełniono dodatkiem cyjanku sodu (NaCN), w ilości odpowiadającej 3 mg CN^-/L , tj. maksymalnej, dopuszczonej wymaganiami normatywnymi dla spirytusów z owoców pestkowych (PN-A-79523:2002P). Próbę odniesienia stanowiło podłoże fermentacyjne, zawierające wyłącznie cyjanek sodu (3 mg CN^-/L), bez dodatku pozostałych ww. związków. Odfermentowane podłoża modelowe oraz otrzymane z nich spirytusy surowe poddano analizie na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu.

W odfermentowanym podłożu, do którego dodano wyłącznie cyjanek sodu, stężenie HCN wynosiło 1,85 mg/L, zaś karbaminian etylu obecny był w ilości 0,17 mg/L. Najmniej cyjanowodoru (0,35 mg/L) oznaczono w podłożu z dodatkiem diacetylu (rys. 6a). Jednocześnie stwierdzono w nim relatywnie wysokie stężenie uretanu (0,43 mg/L) (rys. 6b). Uwzględniając, że ketony podlegają reakcji addycji nukleofilowej, można zakładać, że nastąpiło przejściowe przyłączenie cząsteczki cyjanowodoru do diacetylu, a następnie uwolnienie utlenionej formy cyjanków w postaci cyjanianu, który reagując z etanolem

doprowadził do powstania karbaminianu etylu. Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi (Mildau i in., 1987, Taki i in., 1992), że związki dikarbonylowe mogą być utleniaczami cyjanoków. Muller i Fugelsang (1996) donoszą o możliwości powstawania produktów reakcji diacetylu z mocznikiem, które w winach mogą być przyczyną wzrostu uretanu.

Wzbogacenie podłoża aldehydem octowym lub benzoesowym, uważanymi przez Christopha i in. (1987) za czynniki sprzyjające syntezie uretanu, nie spowodowało istotnego wzrostu stężenia uretanu w czasie fermentacji, w porównaniu z podłożem zawierającym jedynie cyjanowodor ($0,05 < P < 0,10$). Obserwowano natomiast znaczący ubytek tego związku (o 57÷62% wobec 38% w próbie odniesienia, rys. 6a), co można wyjaśnić powstawaniem cyjanohydryn tych aldehydów.

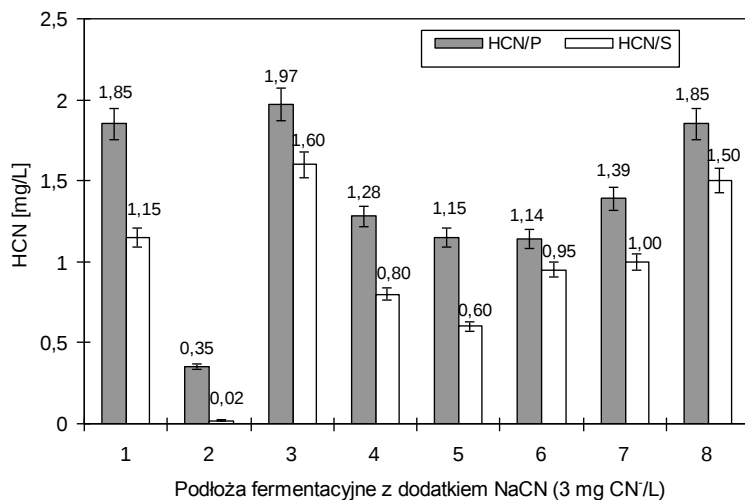
Przemiany fizykochemiczne, zachodzące podczas destylacji spirytusu z podłoża odfermentowanych wpłynęły na dalsze obniżenie stężenia cyjanoków i wzrost zawartości uretanu. Wysoką koncentracją karbaminianu etylu (0,95 mg/L 100% obj.), przy śladowej ilości cyjanowodoru (0,02 mg/L 100% obj.) odznaczał się spirytus z podłoża, z dodatkiem diacetylu (rys. 6). Obserwowano również statystycznie istotny ($0,001 < P < 0,01$) wpływ aldehydu octowego i benzoesowego na syntezę EC na etapie destylacji. Można to wyjaśnić działaniem podwyższonej temperatury, panującej podczas destylacji oraz katalityczną aktywnością miedzianej powierzchni aparatu destylacyjnego, na rozszczepienie powstałych cyjanohydryn, z uwolnieniem cyjanianu, podlegającego przemianom do karbaminianu etylu.

Nie stwierdzono wpływu alkoholu benzyloвого oraz alkoholi alifatycznych (metanolu oraz izoamyloвого i izobutyloвого) na powstawanie uretanu. Stężenie EC, zarówno w podłożach odfermentowanych, jak i w otrzymanych z nich spirytusach, kształtowało się na poziomie zbliżonym, bądź niższym, od określonego w podłożu kontrolnym (zawierającym wyłącznie HCN) i otrzymanym z niego destylacie spirytusowym.

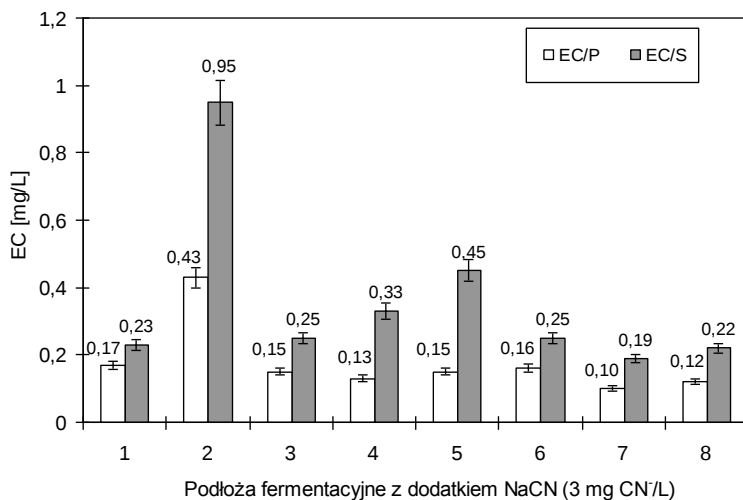
Reasumując, do związków, które mogą w warunkach fermentacyjnych wpływać na syntezę karbaminianu etylu można zaliczyć związki dikarbonylowe (diketony), których przedstawicielem jest diacetyl. Wpływ badanych aldehydów (octowego i benzoesowego) na powstawanie uretanu był widoczny bardziej na etapie destylacji niż w czasie fermentacji. W warunkach prowadzonych doświadczeń nie stwierdzono wpływu innych związków chemicznych na syntezę karbaminianu etylu.

W literaturze brak szczegółowych doniesień na temat wpływu metabolitów drożdży oraz produktów ich przemian na tworzenie karbaminianu etylu w czasie prowadzenia fermentacji alkoholowej.

A) Cyjanowodór



B) Karbaminian etylu



Rys. 6. Wpływ wybranych związków chemicznych na syntezę karbaminianu etylu w procesie fermentacji alkoholowej ($n = 3$) HCN/P, HCN/S – zawartość HCN w podłożu odfermentowanym (P) i otrzymanym z niego spirytusie (S); EC/P, EC/S – zawartość EC w podłożu odfermentowanym (P) i otrzymanym z niego spirytusie (S) Wszystkie podłoża fermentacyjne zawierały 3 mg CN^-/L : **1** – Próba kontrolna (wyłącznie z cyjankiem); **2** – z diacetylem (0,03 g/L); **3** – z octanem etylu (0,5 g/L); **4** – z aldehydem octowym (0,3 g/L); **5** – z aldehydem benzoesowym (0,03 g/L); **6** – z alkoholem benzylowym (0,03 g/L); **7** – z mieszaniną alkoholi izoamylowego (1 g/L) i izobutyloвого (1 g/L); **8** – z metanolem (0,5 g/L)

Z uwagi na to, że wyniki uzyskane w ramach wcześniejszego etapu badań potwierdziły uczestnictwo związków karbonylowych, jako utleniaczy (diacetyl), bądź jako katalizatorów (aldehyd octowy, benzoesowy) przemian cyjanowodoru do karbaminianu etylu, przeprowadzono dalsze badania, dotyczące wpływu tych związków na syntezę EC w roztworach spirytusowych.

Oceniano wpływ stężenia aldehydu benzoesowego i octowego w roztworach spirytusu rektyfikowanego o mocy 40% obj. (z dodatkiem cyjanku sodu w ilości odpowiadającej 3 mg CN⁻/L), przechowywanych w różnych warunkach, na zmiany zawartości karbaminianu etylu.

Po dwóch tygodniach ekspozycji prób spirytusu, zawierających wyłącznie cyjanowodor, stwierdzono obniżenie zawartości tego związku we wszystkich badanych roztworach. Najniższe stężenie HCN stwierdzono w spirytusach poddanych działaniu promieni UV (0,91 mg/L), któremu odpowiadała stosunkowo wysoka zawartość uretanu (0,43 mg/L). W przypadku prób przechowywanych bez dostępu światła (temperatura pokojowa, 20÷22°C), stężenie cyjanowodoru wyniosło 2,75 mg/L, zaś karbaminian etylu obecny był w ilości śladowej (< 0,01 mg/L). Wraz ze spadkiem stężenia HCN następował wzrost zawartości uretanu (tab. 20). Otrzymane wyniki potwierdziły doniesienia literaturowe (Christoph i in., 1987, 1988; Mildau i in., 1987), iż światło dzienne, a w szczególności intensywne nasłonecznianie, katalizuje syntezę karbaminianu etylu z cyjanowodoru.

W przypadku obecności w roztworach spirytusu, oprócz jonów cyjanowych, aldehydu benzoesowego, w stężeniach od 0,005 do 0,010 g/L, ilości powstałego karbaminianu etylu były zbliżone i wynosiły 0,12÷0,15 mg/L. Zróżnicowana była natomiast zawartość cyjanowodoru. W próbie z większą ilością aldehydu benzoesowego (0,010 g/L), stężenie HCN uległo obniżeniu, z 3,0 do ok. 1,3 mg/L (o ok. 57%), podczas gdy przy dawce 0,005 g aldehydu benzoesowego/L spirytusu, zaledwie o ok. 29%. Przyczyną powyższych zmian zawartości cyjanowodoru może być wysoka addycja HCN do grupy karbonylowej aldehydu benzoesowego, prowadząca do powstania cyjanohydryny (Pine i in., 1980). Zwiększenie stężenia aldehydu benzoesowego do 0,015 g/L, przy zachowaniu warunków przechowywania prób (światło dzienne), nie przyniosło wzrostu ilości powstałego uretanu. Jego synteza przebiegała dynamiczniej, gdy badane próby spirytusu poddano naświetlaniu lampą UV. Zawartość cyjanowodoru obniżyła się do 0,38 mg, zaś uretanu wzrosła do 0,66 mg/L. Uzyskane wyniki wskazują, że uwalniany podczas hydrolizy glikozydów cyjanogennych aldehyd benzoesowy może być katalizatorem syntezy karbaminianu, w szczególności w procesach fotosensybilizowanych (Skibsted, 2000).

Podczas 2-tygodniowego przetrzymywania prób spirytusu (40% obj.), z dodatkiem cyjanowodoru (3 mg/L) i aldehydu octowego (0,1÷0,3 g/L) w świetle dziennym, wykazano wysoki stopień obniżenia cyjanoków, z 3,0 mg do 0,03÷0,22 mg/L oraz obecność uretanu, w granicach od 0,05 do 0,33 mg/L (tab. 20). Niezależnie od zawartości aldehydu octowego, w próbach przechowywanych w świetle dziennym, stężenie uretanu było zbliżone (0,05÷0,07 mg/L) i nie różniło się od oznaczonego w roztworze, bez dodatku tego aldehydu

(0,05 < P < 0,10). Jedynie w spirytusie poddanym naświetlaniu lampą UV odnotowano wzrost zawartości EC do 0,33 mg/L. Nie można zatem jednoznacznie stwierdzić, że podwyższona zawartość aldehydu octowego w spirytusach owocowych może katalizować syntezę karbaminianu etylu. Natomiast znaczne obniżenie stężenia cyjanowodoru w próbach, z dodatkiem aldehydu octowego (o 92,6÷99,0%), w stosunku do prób bez jego udziału (o 57,3÷69,6%), daje podstawy do uznania tezy o tworzeniu kompleksów aldehydów alifatycznych i aromatycznych z kwasem cyjanowodorowym. Christoph i in. (1987) oznaczyli w roztworach spirytusowych (o kwaśnym pH), zawierających cyjanowodor oraz aldehyd octowy i benzoesowy, już po kilku dniach, o około 50% niższe stężenie kwasu cyjanowodorowego, w porównaniu z próbą kontrolną, bez ww. aldehydów.

W toku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, iż obecność cyjanokw oraz naświetlanie prób spirytusu są głównymi przyczynami wzrostu zawartości karbaminianu etylu.

Tabela 20. Wpływ aldehydów benzoesowego i octowego na powstawanie karbaminianu etylu w roztworach spirytusowych (badania modelowe) (n = 3)

Wyszczególnienie	Dawka [g/L]	Warunki przechowywania	Cyjanowodor [mg/L]	Karbaminian etylu [mg/L]
Bez dodatku	-	bez dostępu światła, 20÷22°C	2,75±0,15	<0,01
	-	światło dzienne, 20÷24°C	1,28±0,06	0,07±0,01
	-	naświetlanie lampą UV [2 h/dobę]	0,91±0,04	0,43±0,03
Aldehyd benzoesowy	0,005	światło dzienne, 20÷24°C	2,12±0,12	0,12±0,01
	0,010		1,29±0,05	0,15±0,02
	0,015		1,32±0,05	0,15±0,02
	0,015	naświetlanie lampą UV [2 h/dobę]	0,38±0,02	0,66±0,04
Aldehyd octowy	0,1	światło dzienne, 20÷24°C	0,22±0,01	0,05±0,01
	0,2		0,20±0,01	0,07±0,01
	0,3		0,04±0,01	0,07±0,01
	0,3	naświetlanie lampą UV [2 h/dobę]	0,03±0,01	0,33±0,04

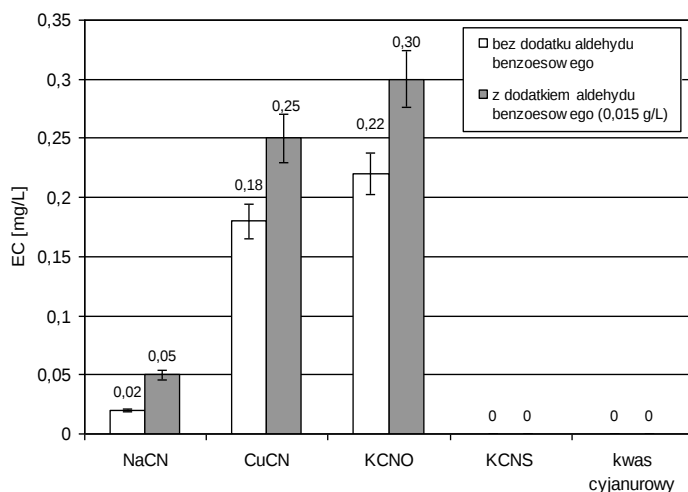
5.7. Wpływ soli kwasu cyjanowodorowego na syntezę karbaminianu etylu (badania modelowe)

Oceniano wpływ cyjanków, z udziałem (lub bez) aldehydu benzoesowego, na syntezę karbaminianu etylu w roztworach spirytusowych o mocy 40% obj.

Spośród badanych związków, brakiem reaktywności w kierunku syntezy uretanu odznaczały się tiocyjanian potasu i kwas cyjanurowy. W próbach zawierających te pochodne kwasu cyjanowodorowego, niezależnie od obecności bądź braku aldehydu benzoesowego, nie wykryto uretanu. Natomiast w spirytusie z cyjankiem sodu, który łatwo ulega hydrolizie, z uwolnieniem wolnego cyjanowodoru, zawartość powstałego uretanu była na poziomie 0,02 mg/L, podczas gdy zastosowanie dodatku aldehydu benzoesowego (0,015 g/L) spowodowało 2,5-krotny wzrost stężenia uretanu. Można wnioskować o jego katalitycznym wpływie na syntezę karbaminianu, poprzez tworzenie cyjanohydryny, której etanoliza prowadzi do syntezy karbaminianu etylu.

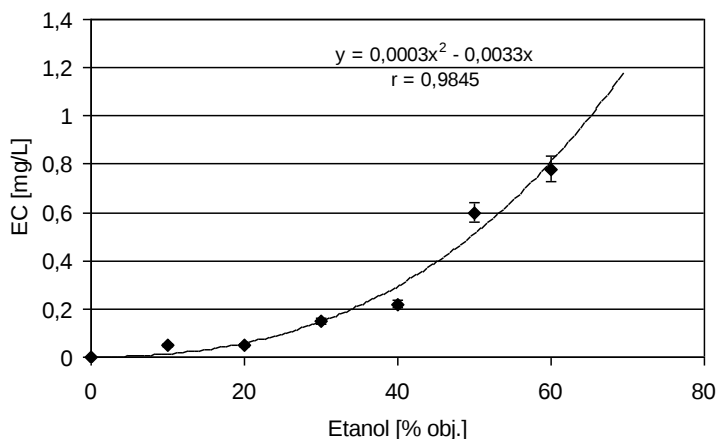
Najwyższą podatnością do tworzenia karbaminianu odznaczał się cyjanek miedzi i cyjanian potasu. Zawartość EC w badanych roztworach modelowych, z udziałem wymienionych związków, mieściła się w granicach, od 0,18 do 0,22 mg/L. Dodatek aldehydu benzoesowego do roztworów spirytusowych wpłynął na zwiększenie stężenia uretanu, średnio o ok. 38% (rys. 7).

Aylot i in. (1990), badając zmiany zawartości uretanu i jego prekursorów podczas maturacji whisky zbożowej, wykryli obecność cyjanów, zarówno w postaci wolnego cyjanowodoru, jak i form związanych – cyjanohydryn, kompleksów z miedzią, cyjanianów, tiocyjanianów. W trakcie maturacji autorzy obserwowali dynamiczny spadek zawartości cyjanowodoru wolnego i związane-go z miedzią. Zmianom nie ulegała zawartość tiocyjanianów, co potwierdza wniosek o braku udziału tych związków w syntezie karbaminianu etylu. Taki i in. (1992) za najbardziej podatne na przemiany w roztworach alkoholowych uznali cyjanki w postaci utlenionej, tj. cyjanianów.



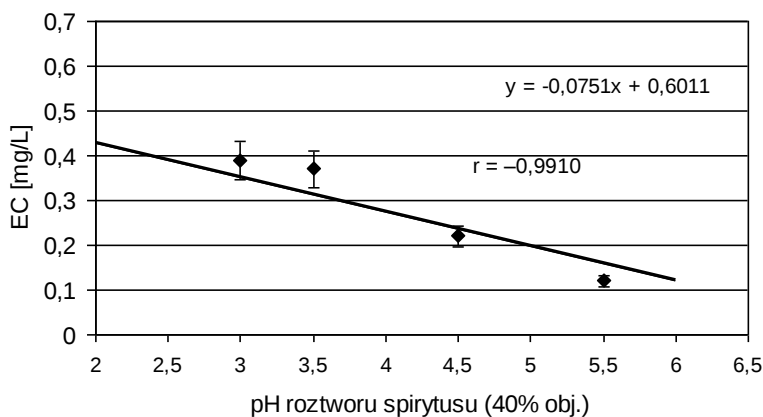
Rys. 7. Wpływ cyjanów i ich pochodnych na syntezę karbaminianu etylu w spirytusowych roztworach modelowych (n = 3)

W ramach badań uzupełniających oceniano wpływ stężenia etanolu oraz pH roztworów na syntezę uretanu z cyjanianu potasu. Zależność pomiędzy stężeniem karbaminianu etylu (y) a stężeniem etanolu (x), w roztworach cyjanianu, opisano wielomianem 3-stopnia: $y = 0,0003x^2 - 0,0033x$. Współczynnik korelacji Pearsona wyniósł $r = 0,9845$, co wskazuje na znaczący wpływ stężenia etanolu na szybkość tworzenia karbaminianu etylu (rys. 8).



Rys. 8. Wpływ stężenia etanolu na syntezę karbaminianu etylu z cyjanianu potasu (n = 3)

Analogicznych obserwacji dokonano badając wpływ pH. Korelację między stężeniem karbaminianu etylu w roztworach cyjanianu (y) a pH roztworów (x), wyrażono równaniem postaci $y = -0,368x + 0,2406$, zaś współczynnik korelacji wyniósł $r = -0,991$. Jego wartość bezwzględna świadczy o bardzo silnej zależności, natomiast ujemny znak korelacji wskazuje, iż wraz z obniżaniem pH roztworów następuje wzrost stężenia uretanu (rys. 9).



Rys. 9. Wpływ pH roztworów spirytusowych na syntezę karbaminianu etylu z cyjanianu potasu (n = 3)

Otrzymane wyniki wskazują na potrzebę stosowania działań prewencyjnych, poprzez ograniczanie dostępu czynników katalizujących syntezę uretanu (m.in. światło), w przypadku wyrobów spirytusowych o relatywnie wysokiej kwasowości, sporządzanych z udziałem soków i morsów owocowych, zawierających glikozydy cyjanogenne.

5.8. Wpływ warunków destylacji pierwotnej (procesu odpędu) i korekcyjnej na zawartość cyjanowodoru oraz karbaminianu etylu w spirytusach owocowych

Szacuje się, że blisko 80% uretanu obecnego w spirytusach powstaje podczas destylacji bądź w czasie 48 godzin po jej zakończeniu (Riffkin i in., 1989; Bertrand, 1993; Aresta i in., 2001; Bruno i in., 2007; Boulton, 1993; Fox i Stachowiak, 2007). Podczas destylacji i rektyfikacji uretan przechodzi do frakcji przedgonowej, środkowej, pogonów oraz do wywaru bądź wody odwarowej. Jednak jego najwyższe stężenia stwierdza się zazwyczaj w środkowych i końcowych frakcjach spirytusu. Dlatego ważnym czynnikiem, decydującym o zawartości EC w destylacie, jest przejście przy określonej mocy na odbiór pogonów. Istotny wpływ ma również zasada prowadzenia procesu (współprąd, przeciwpład), konstrukcja wykorzystywanego aparatu (półki, deflegmator) oraz szybkość destylacji (Christoph i in., 1986; Tanner, 1986).

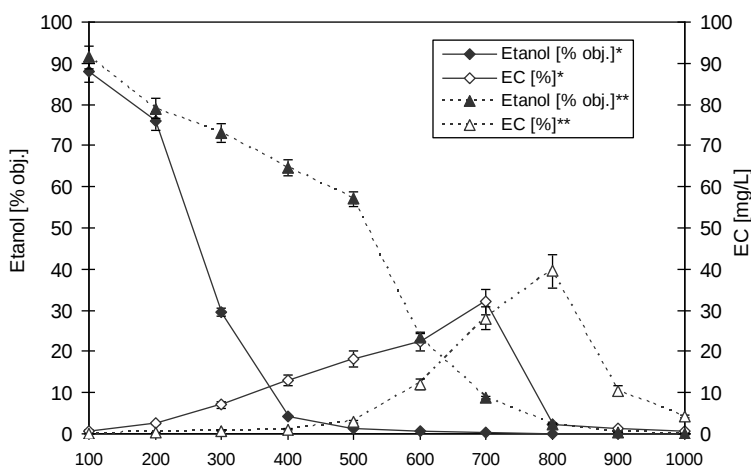
W celu określenia wpływu stężenia etanolu w roztworze na zachowanie karbaminianu etylu podczas destylacji, przeprowadzono destylacje frakcjonowane prób spirytusu rektyfikowanego, o różnej mocy (20 i 40% obj.), z dodatkiem 20 mg EC/L, w zestawie szklanym z birektyfikatorem. Przed rozpoczęciem odbioru frakcji, próby spirytusu w objętości 1000 mL wygrzewano przez 30 min, po czym odbierano kolejno 10 porcji destylatu, w ilości 100 mL każda. W otrzymanych frakcjach oznaczano zawartość etanolu i karbaminianu etylu, uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 10.

W pierwszej porcji destylatu o mocy 88% obj., otrzymanej po frakcjonowaniu spirytusu o mocy 20% obj., udział uretanu stanowił 0,8% jego całkowitej ilości, obecnej w spirytusie poddanym destylacji. Frakcje 1-3, w których wydzielone zostało ok. 97% etanolu, zawierały zaledwie 10,3% karbaminianu etylu. Wraz ze wzrostem temperatury odbioru kolejnych porcji spirytusu i obniżaniem się jego mocy, obserwowano wzrost stężenia karbaminianu etylu, z maksimum udziału (32%), przypadającym na frakcję 7 (stężenie etanolu 0,2% obj.). Oceniono, że we frakcjach od 4 (etanol 4,2% obj., temperatura destylacji 90-96°C) do 7 (etanol 0,2% obj., 99,5-99,8°C), obecne było ok. 88% całkowitej ilości karbaminianu etylu. W dalszych frakcjach (8-10) nastąpiło obniżenie stężenia uretanu, a jego udział wynosił od 0,6÷2,2%.

W przypadku prowadzenia destylacji frakcjonowanej roztworu karbaminianu etylu w spirytusie o mocy 40% obj., we frakcjach od 1 do 5, o mocy od 91,5 do 57% obj., wydzielone zostało ok. 91% etanolu i 5,3% uretanu, obecnych

w roztworze poddanym destylacji. W kolejnej, 6 frakcji zaobserwowano zmniejszenie stężenia etanolu do 23,5% obj. i 4-krotny wzrost ilości karbaminianu, w porównaniu do frakcji 5. Jego maksymalny udział (39,5%) przypadał na frakcję 8, zawierającą 2,4% obj. etanolu (rys. 10). Otrzymane wyniki wykazały, że im niższe jest stężenie etanolu w roztworze poddanym destylacji, tym wyższe są stężenia EC w początkowych partiach destylatu.

Poznanie zachowania uretanu w czasie odpędu spirytusu z zacierów odfermentowanych, a w szczególności podczas destylacji korekcyjnej, pozwala uzyskać spirytus o możliwie najniższej zawartości tego związku.



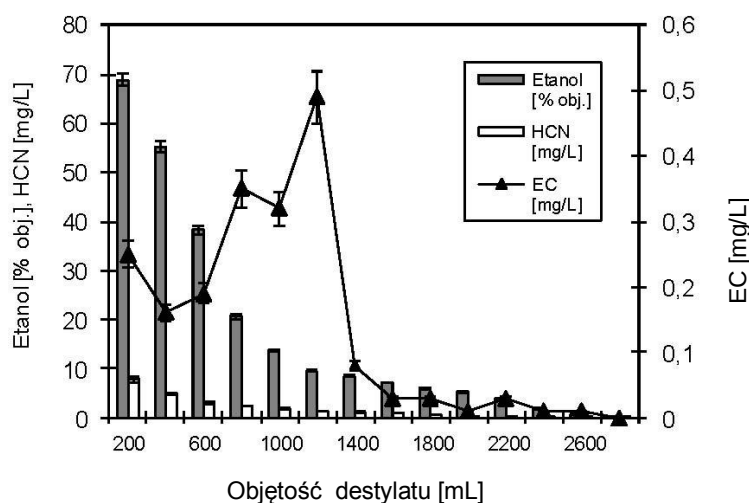
Rys. 10. Zawartość karbaminianu etylu w próbach otrzymanych po destylacji frakcjonowanej spirytusowych roztworów karbaminianu etylu (*20 mg EC/L spirytusu 20% obj.; **20 mg EC/L spirytusu 40% obj.) (n = 2)

Popularną metodą destylacji spirytusu w gorzelniach owocowych jest destylacja w aparatach miedzianych, typu alembik. Miedź jest katalizatorem wielu przemian, pozytywnie kształtujących cechy sensoryczne spirytusów, ale również przyspiesza przemiany cyjanowodoru do uretanu, zarówno podczas prowadzenia procesu destylacji, jak i w roztworze (w destylacie) (Beattie i Polyblank, 1995; Camea'n i in., 2001; Carley i in., 2003; Jung i Adam, 2005; Baffa Júnior i in., 2011).

Przeprowadzono destylację spirytusu z odfermentowanej miazgi śliwkowej (10 L, o mocy 5,2% obj.) w aparacie miedzianym współprądowym, z ogrzewaniem przeponowym, odbierając destylat w postaci kolejnych frakcji. W przypadku stosowania takiego rozwiązania, bez elementu deflegmującego-chłodzącego, nie następuje, jak to ma miejsce w aparatach wyposażonych w deflegmator, wykraplanie z powstałych oparów składników wysokowrzących, do których zaliczany jest karbaminian etylu. W konsekwencji, w czasie prowadzenia destylacji spirytusu z odfermentowanego zacieru śliwkowego, obecność uretanu odnotowano już w pierwszej odebranej porcji spirytusu, o mocy 68,9% obj. (0,25 mg/L). W dwóch kolejnych nastąpiło obniżenie jego

stężenia do $0,16 \pm 0,19$ mg/L, zaś w następnych obserwowano ponowny wzrost zawartości EC, z maksimum ($0,49$ mg/L) przypadającym na frakcję 6, o mocy 9,6% obj. (rys. 11).

Mimo że uretan odznacza się wysoką temperaturą wrzenia (ok. 185°C), to jego obecność we frakcjach początkowych może wynikać z faktu, że prekursorzy, takie jak cyjanowodor i jego pochodne (cyjaniany, izocyjaniany), jako związki o wysokiej lotności i niskich temperaturach wrzenia ($< 30^{\circ}\text{C}$), szybko przechodzą w stan pary i wchodzą w reakcję z etanolem, prowadząc do powstania karbaminianu w fazie gazowej. Ponadto, obserwowany wzrost stężenia EC wraz z wyczerpywaniem etanolu może być rezultatem wydłużonego czasu działania podwyższonej temperatury na składniki zacierów. Według Boultona (1993) źródłem uretanu jest również mocznik, powstający w wyniku aktywności metabolicznej drożdży, który w roztworach wodno-alkoholowych, ogrzewanych do $60\text{--}100^{\circ}\text{C}$, ulega termicznemu rozkładowi do cyjanianów i izocyjanianów.

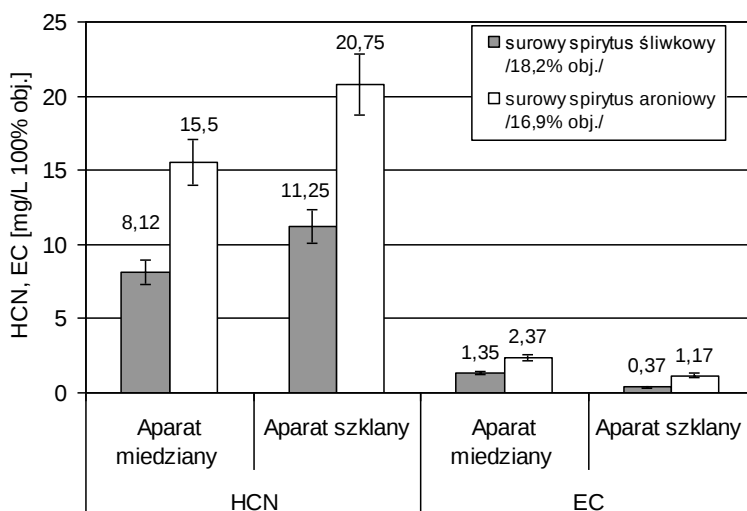


Rys. 11. Przebieg destylacji frakcjonowanej odfermentowanego zacieru śliwkowego w aparacie destylacyjnym miedzianym, współprądowym ($n = 2$)

Porównanie zawartości uretanu w zacierach odfermentowanych i spirytusach wskazuje na zasadniczy wpływ etapu destylacji na jego obecność w spirytusach. W warunkach prowadzonych doświadczeń, w czasie wydzielania spirytusu z miazgi odfermentowanej, zachodziła synteza znaczącej części uretanu, obecnego w spirytusach owocowych (82-91% w aparacie miedzianym, 64-67% w zestawie szklanym), (rys. 12).

Tham (2006) oraz Bruno i in. (2007) wskazują, że kiedy temperatura destylacji przekroczy $80\text{--}82^{\circ}\text{C}$, dochodzi do kumulacji w zstępującej części aparatury związków azotowych wysokowrzących, które w podwyższonej temperaturze, zwłaszcza w kontakcie z miedzią, mogą prowadzić do powstawania uretanu.

Surowe spirytusy owocowe (śliwkowy i aroniowy), otrzymane po odpędzie w alembiku miedzianym, współprądowym, zawierały 2-3-krotnie więcej karbaminianu etylu ($1,35 \div 2,37$ mg/L 100% obj.) niż otrzymane po destylacji w aparacie szklanym ($0,37 \div 1,17$ mg/L 100% obj.). Odwrotną zależność wykazano dla cyjanowodoru, którego w spirytusach z aparatu miedzianego było, średnio, o ok. 27% mniej niż w otrzymanych po destylacji w zestawie szklanym ($11,25 \div 20,75$ mg/L 100% obj.), (rys. 17). Uzyskane wyniki i korelacja między nimi wskazują, że miedź katalizuje przemiany cyjanowodoru do kwasu cyjanowego, który w warunkach destylacyjnych łatwo ulega konwersji do karbaminianu etylu. Potwierdzają to wyniki doświadczeń prowadzonych przez Arestę i in. (2001), dotyczących wpływu miedzi (II) na syntezę uretanu podczas produkcji spirytusów.



Rys. 12. Wpływ rodzaju aparatu destylacyjnego na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w surowych spirytusach owocowych (n = 3)

Zaciery odfermentowane: śliwkowy (etanol 5,2% obj.; 0,85 mg HCN/kg; 0,05 mg EC/kg); aroniowy (etanol 3,6% obj.; 1,46 mg HCN/kg; 0,17 mg EC/kg)

Bruno i in. (2007), oceniając wpływ systemów prowadzenia destylacji na zawartość uretanu w spirytusach z trzciny cukrowej oraz gotowych wyrobach spirytusowych (cachaças), stwierdzili wyższe stężenia tego związku w spirytusach z alembików miedzianych, ogrzewanych bezpośrednio ogniem, niż z wyposażonych w generator pary. Śladowe ilości karbaminianu ($0,011 \div 0,017$ mg/L) zawierały spirytusy z alembików stalowych, jak i gotowe wyroby, produkowane metodą destylacji dwukrotnej w aparatach, wykorzystywanych do produkcji whisky. Relatywnie wysokie stężenie EC (0,32 mg/L) oznaczono w napojach alkoholowych, otrzymanych metodą destylacji ciągłej. Niektórzy autorzy

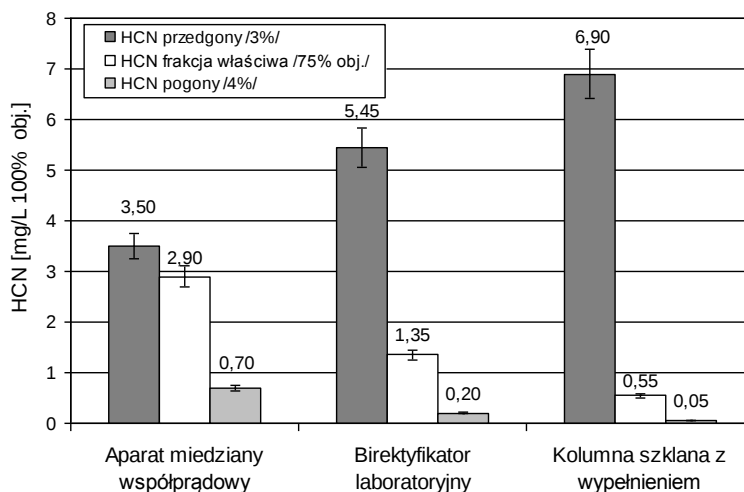
(Andrade-Sobrinho i in., 2002; Faria i in., 2003) zalecają ograniczenie kontaktu cyjanków i miedzi, poprzez stosowanie do budowy części zstępującej aparatu stali kwasoodpornej zamiast miedzi. Boscolo (2001) odnotował niższą zawartość uretanu w spirytusach z soku trzcinowego, otrzymanych z tego rodzaju aparatów. Jednakże takie spirytusy mogą wykazywać niepożądane cechy smakowo-zapachowe, związane z obecnością związków siarkowych. W klasycznych alembikach, zbudowanych całkowicie z miedzi, związki te są wiązane do nierozpuszczalnych soli (Andrade-Sobrinho i in., 2002).

Istotny wpływ na obniżenie ilości powstającego karbaminianu w spirytusach odgrywa wyposażenie części wstępującej alembików w element deflegmująco-chłodzący (Bruno i in., 2007; Nóbrega i in., 2009), lecz typowe alembiki do produkcji koniaków wyposażone są jedynie w hełm, chłodzony naturalnie powietrzem. W przypadku stosowania alembików, pracujących na zasadzie współprądu, zaleca się prowadzenie destylacji dwustopniowej, pozwalającej na lepsze oddzielenie karbaminianu (Riffkin i in., 1989; Nóbrega i in., 2009).

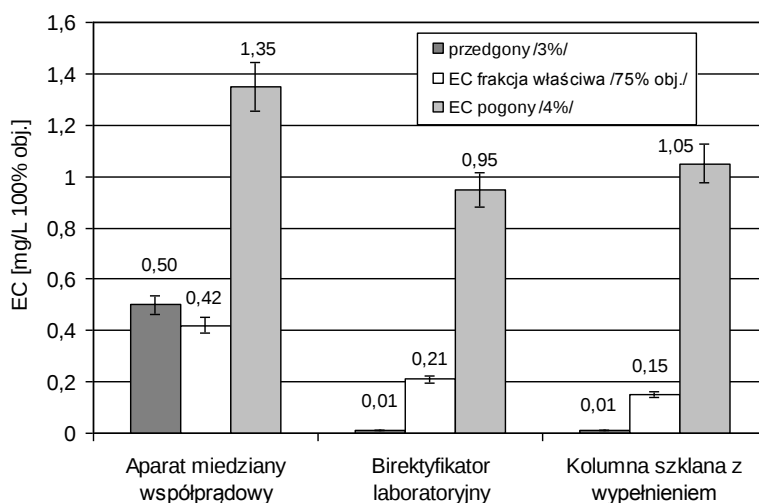
Celem destylacji korekcyjnej surowych spirytusów owocowych jest ich wzmocnienie do 60÷75% obj. oraz wydzielenie przedgonów i pogonów. Otrzymana frakcja środkowa, zwana frakcją właściwą, stanowi około 90% ogólnej ilości wprowadzonej do procesu (Guan i Pieper, 1999; Satora i Tuszyński, 2008). Dlatego też oceniano wpływ aparatury wykorzystywanej do prowadzenia destylacji korekcyjnej na zawartość karbaminianu etylu i jego prekursora, cyjanowodoru, w odbieranych frakcjach. Do badań wykorzystano surowy spirytus śliwkowy (18,5% obj.; 8,12 mg HCN/L 100% obj.; 1,35 mg EC/L 100% obj.), otrzymany po destylacji w aparacie miedzianym, współprądowym. Destylację korekcyjną rozpoczynano od wstępnego wygrzewania (30 min), szybkość odbioru przedgonów wynosiła 2,5 mL/min, frakcji właściwej – 5,0 mL/min. Za pogony uznano ciecz pozostałą po zakończeniu odbioru frakcji właściwej, bez wydzielania ich w postaci odrębnej frakcji.

Zaobserwowano znaczące różnice w zawartości badanych związków, w zależności od rodzaju zastosowanego aparatu destylacyjnego i związanej z tym metody prowadzenia procesu (współprąd, przeciwprąd). Frakcja właściwa o mocy 75% obj. (3% przedgonów), otrzymana w wyniku destylacji współprądowej, w aparacie miedzianym, odznaczała się stężeniem cyjanowodoru i karbaminianu etylu, odpowiednio na poziomie 2,9 mg HCN i 0,42 mg EC/L 100% obj., co wskazywało na stopień obniżenia cyjanków o ok. 65% i uretanu o ok. 69% (rys. 13). Mankamentem destylacji współprądowej jest brak możliwości pełnego rozfrakcjonowania zanieczyszczeń spirytusu.

A) cyjanowodór



B) Karbaminian etylu



Rys. 13. Wpływ rodzaju aparatury wykorzystywanej do prowadzenia destylacji korekcyjnej na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w odbieranych frakcjach (n = 3)

Efektywne wydzielanie cyjanowodoru i karbaminianu etylu nastąpiło podczas prowadzenia destylacji korekcyjnej w birektyfikatorze laboratoryjnym (deflegmator wg Golodetza) oraz zestawie, składającym się z kolumny szklanej z wypełnieniem i deflegmatora. W przypadku zastosowania rozwiązań pracujących w układzie przeciwpłądowym, stężenia cyjanowodoru wydzielonego w przedgonach wynosiły od 5,45 do 6,90 mg/L 100% obj., co wpłynęło na ich znaczące obniżenie we frakcjach środkowych (75% obj.), do 1,35 mg/L 100% obj.

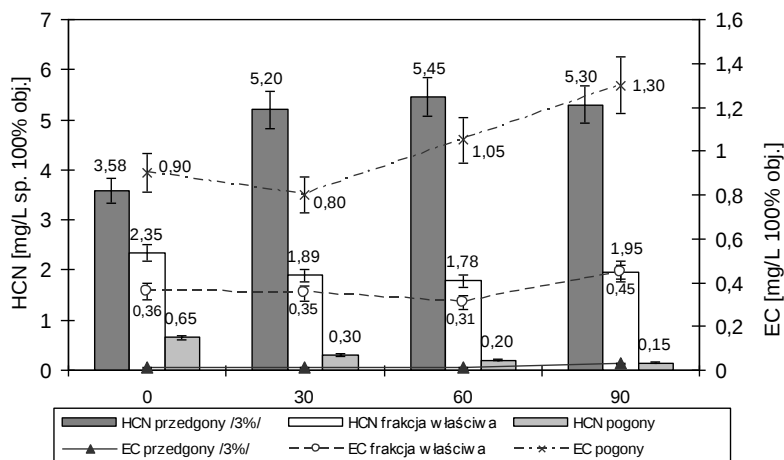
(birektyfikator) i 0,55 mg/L 100% obj. (kolumna z wypełnieniem), (rys. 13). Odmienne charakter zmiany odnotowano w przypadku karbaminianu etylu, który w tych warunkach zachowywał się w sposób typowy dla związków wysokowrzących. O ile w przedgonach, pochodzących z destylacji w alembiku, zawartość uretanu wynosiła 0,5 mg/L 100% obj., to w analogicznych próbach, otrzymanych po destylacji w birektyfikatorze i kolumnie szklanej, kształtowała się na poziomie 0,01 mg/L 100% obj. We frakcjach właściwych (środkowych) zawartość uretanu wynosiła odpowiednio 0,21 i 0,15 mg/L 100% obj., zaś maksimum jego koncentracji przypadało na pogony (0,95÷1,05 mg/L 100% obj.), (rys. 13).

Proces wstępnego wygrzewania roztworów etanolowych, polegający na cyrkulacji oparów w układzie destylacyjnym, ma na celu koncentrację przedgonów w górnych partiach kolumny, co przyczynia się do ich efektywniejszego wydzielenia. Badano wpływ czasu wygrzewania (0÷90 min) spirytusu surowego śliwkowego (18,5% obj.; 3,25 mg HCN/L; 0,54 mg EC/L) na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu we frakcjach otrzymanych po destylacji korekcyjnej. Szybkość odbioru przedgonów wynosiła 2,5 mL/min, frakcji właściwej 7,5 mL/min. Za pogony uznano ciecz pozostałą po zakończeniu odbioru frakcji właściwej, bez wydzielania ich w postaci oddzielnej próby. Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 14.

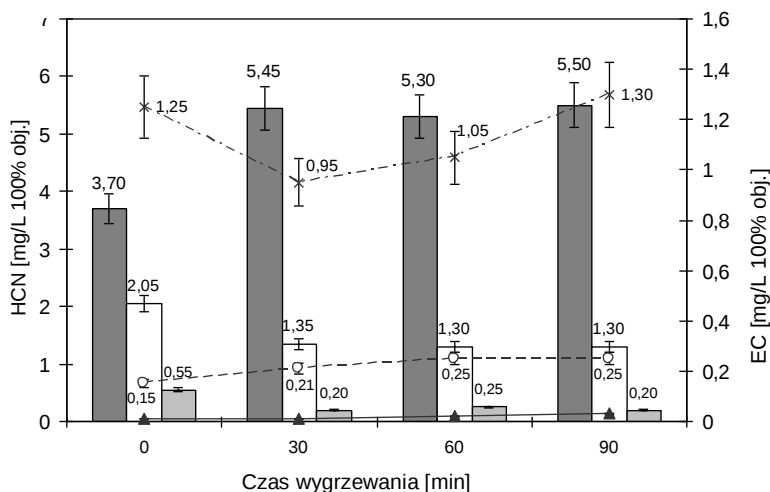
Wygrzewanie spirytusu przez 30 min, przed destylacją korekcyjną, wpłynęło na zwiększenie stężenia cyjanowodoru w przedgonach, z 3,58÷3,70 mg (próby odniesienia, bez wygrzewania) do 5,20÷5,45 mg/L 100% obj. Konsekwencją było obniżenie zawartości tego związku we frakcjach właściwych o ok. 20% (65% obj.) i o 34% (75% obj.) w stosunku do prób otrzymanych po destylacji, bez wstępnej cyrkulacji oparów (rys. 14). Dalsze wydłużanie czasu wygrzewania spirytusu surowego nie przyniosło wzrostu stężenia cyjanów we frakcjach przedgonowych, jak i ich redukcji w spirytusach właściwych. Podobne wyniki uzyskał Tuszyński (1990) podczas prowadzenia badań, dotyczących wpływu czasu wygrzewania roztworów etanolowych na stopień wydzielenia metanolu we frakcjach przedgonowych.

Wstępna cyrkulacja oparów w układzie destylacyjnym, w czasie 30 min, okazała się wystarczająca również z punktu widzenia ograniczania zawartości uretanu. Frakcje początkowe zawierały 0,01 mg EC/L, zaś właściwe od 0,21 mg (75% obj.) do 0,35 mg EC/L (65% obj.). Zbyt długie wygrzewanie spirytusów surowych przed destylacją korekcyjną może być przyczyną intensyfikacji syntezy uretanu, o czym świadczy wyższa jego zawartość w przedgonach (0,03 mg/L), jak również w destylacie właściwym, o mocy 65% obj. (0,45 mg/L), otrzymanych po zastosowaniu 90-minutowej cyrkulacji wstępnej (rys. 14). Również wyniki badań Hesfolda i Schneidera (2001) oraz Schehla (2005), wskazują na nadmierne, wydłużone ogrzewanie, jako przyczynę wzrostu zawartości uretanu podczas destylacji spirytusów z owoców pestkowych.

A) Frakcja właściwa o mocy 65% obj.



B) Frakcja właściwa o mocy 75% obj.



Rys. 14. Wpływ czasu wygrzewania surowego spirytusu śliwkowego na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu we frakcjach otrzymanych po destylacji korekcyjnej (n = 2)
A – frakcja właściwa 65% obj., B – frakcja właściwa 75% obj.

Wzajemne proporcje poszczególnych składników spirytusu są także funkcją intensywności wygrzewania i szybkości destylacji oraz wyjściowego składu roztworu poddanego destylacji. W przypadku prowadzenia destylacji korekcyjnej spirytusów owocowych, istotnym etapem jest wydzielenie w odpowiedniej ilości przedgonów, w których koncentrują się związki niskowrzące, o wysokiej lotności (m.in. cyjanowódór). Zbyt szybki odbiór tej frakcji utrudnia efektywne wydzielenie zanieczyszczeń.

Oceniano wpływ szybkości prowadzenia destylacji korekcyjnej surowego spirytusu śliwkowego (18,5% obj.; 3,25 mg HCN/L; 0,54 mg EC/L) na zmiany stężenia cyjanowodoru i karbaminianu etylu w odbieranych frakcjach. Czas wstępnego wygrzewania próby w zestawie destylacyjnym wynosił 30 min.

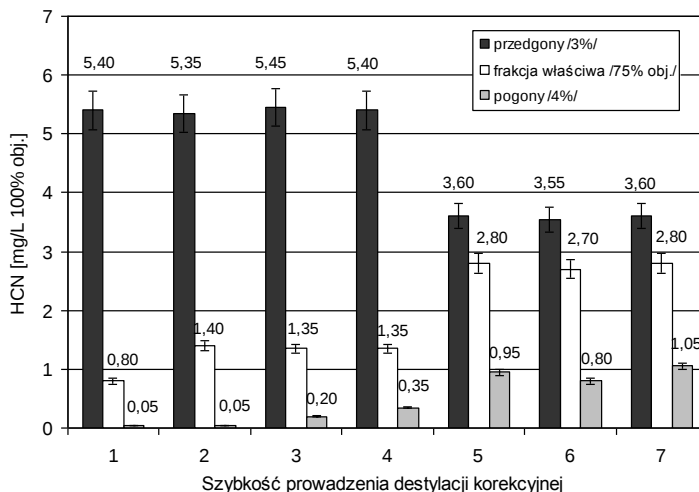
Destylacja korekcyjna surowego spirytusu śliwkowego, z odbiorem przedgonów w ilości 3% (w stosunku do objętości spirytusu 100% obj., poddanego destylacji), z szybkością 2,5 mL/min pozwoliła na wydzielenie w tej partii spirytusu cyjanowodoru w ilości, średnio, 5,40 mg/L 100% obj. Zwiększeniu szybkości odbioru destylatu właściwego, z 2,5 mL do 7,5 mL/min, towarzyszył wzrost stężenia HCN, z 0,80 do 1,40 mg/L 100% obj. (rys. 15). Dalej jednak były to stężenia znacznie niższe od limitu jego obecności (3 mg HCN/L) w wódkach owocowych (PN-A-79530:2001).

Celowość takiego postępowania potwierdza również zawartość karbaminianu, oznaczona w otrzymanych frakcjach. Destylaty (spirytusy) właściwe, odbierane z szybkością równą (2,5 mL/min) lub o 40% wyższą (3,5 mL/min) od szybkości destylacji przedgonów, odznaczały się 2-krotnie wyższą zawartością EC, niż otrzymane przy odbiorze 5,0÷7,5 mL/min. Zbyt długi czas przebywania spirytusu w aparacie może powodować zakłócenia równowagi międzyfazowej, tworzenie azeotropów, w konsekwencji czego następuje wzmożone przechodzenie zanieczyszczeń wysokowrzących, takich jak karbaminian etylu, do frakcji środkowej. Można również przypuszczać, że długotrwałe przebywanie oparów spirytusu, wraz z towarzyszącymi związkami chemicznymi w aparacie destylacyjnym, może prowadzić do dalszej syntezy uretanu.

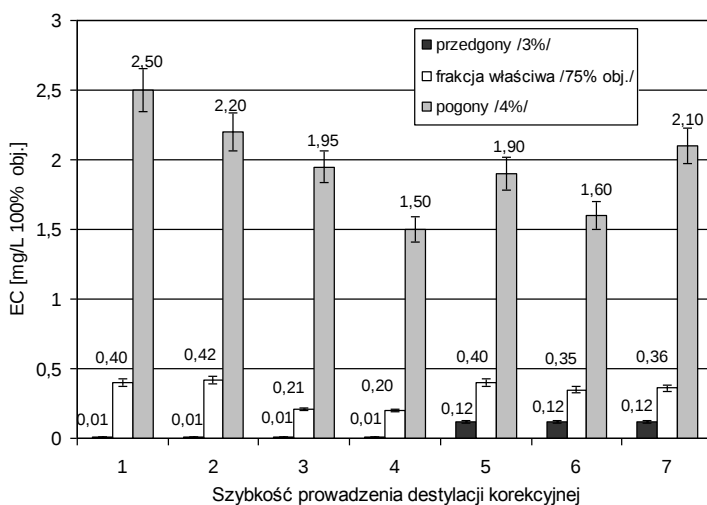
Wzrost szybkości destylacji przedgonów, z 2,5 do 5,0 mL/min, spowodował obniżenie stężenia cyjanowodoru w tych frakcjach, średnio, o ok. 33% i jednocześnie zwiększenie jego zawartości we frakcjach właściwych, do ok. 2,8 mg/L. Relatywnie wysokie stężenia tego związku występowały również we frakcjach pogonowych (0,80÷1,30 mg/L 100% obj.), w porównaniu do roztworów destylowanych z mniejszą szybkością (0,05÷0,35 mg/L 100% obj.). Zaobserwowano również 12-krotny wzrost zawartości uretanu w przedgonach, do 0,12 mg/L 100% obj. Frakcje środkowe odznaczały się stężeniem EC na zbliżonym poziomie (0,35÷0,40 mg/L 100% obj.), zaś w pogonach związek ten był obecny w ilościach od 1,60 do 2,10 mg/L 100% obj. (rys. 15).

Reasumując, należy podkreślić konieczność ustalania szybkości destylacji, zwłaszcza podczas wydzielania przedgonów, co determinuje efektywność rozdziału zanieczyszczeń w procesie frakcjonowania spirytusów owocowych. Otrzymane wyniki wskazują, że optymalna szybkość odbioru zanieczyszczeń niskowrzących, zawierających m.in. cyjanowodór, powinna wynosić ok. 30% szybkości odbioru destylatu właściwego. Christoph i in. (1986) oraz Nóbrega i in. (2009) podkreślają, że powolna destylacja i właściwe oddzielenie frakcji początkowej i końcowej pozwalają na otrzymanie produktów o niskiej zawartości EC. W literaturze przedmiotu niewiele jest jednak informacji na temat szybkości wydzielania poszczególnych frakcji podczas prowadzenia destylacji korekcyjnej spirytusów i w związku z tym utrudniona jest dyskusja otrzymanych wyników.

A) Cyjanowodór



B) Karbaminian etylu



Rys. 15. Wpływ szybkości prowadzenia destylacji korekcyjnej surowego spirytusu śliwkowego na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w odbieranych frakcjach (n = 2)

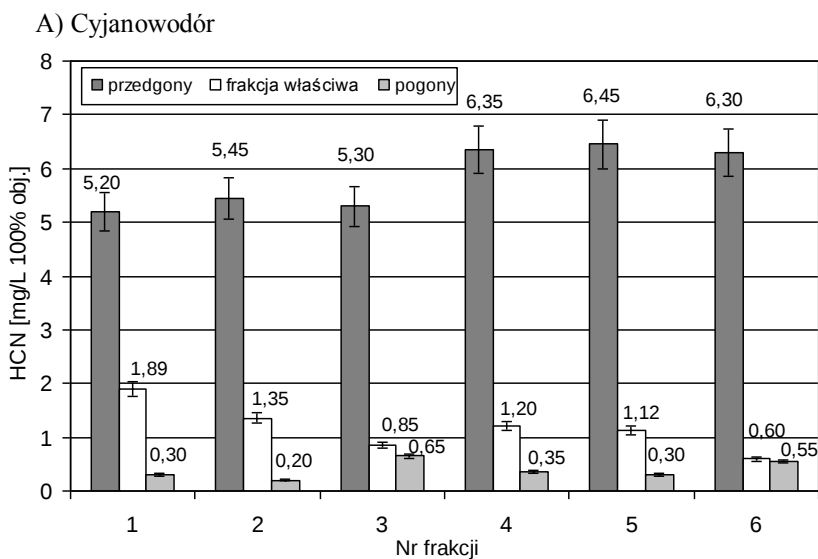
Szybkość prowadzenia destylacji korekcyjnej: **1.** Przedgony – 2,5 mL/min; frakcja właściwa – 2,5 mL/min; **2.** Przedgony – 2,5 mL/min; frakcja właściwa – 3,5 mL/min; **3.** Przedgony – 2,5 mL/min; frakcja właściwa – 5,0 mL/min; **4.** Przedgony – 2,5 mL/min; frakcja właściwa – 7,5 mL/min; **5.** Przedgony – 5,0 mL/min; frakcja właściwa – 5,0 mL/min; **6.** Przedgony – 5,0 mL/min; frakcja właściwa – 7,5 mL/min; **7.** Przedgony – 5,0 mL/min; frakcja właściwa – 10,0 mL/min

Oceniano również wpływ wielkości odbioru przedgonów oraz mocy frakcji właściwej na zmiany zawartości cyjanowodoru i karbaminianu etylu, podczas destylacji korekcyjnej surowego spirytusu śliwkowego (18,9% obj.) o zawartości 8,12 mg HCN i 1,35 mg EC/L 100% obj. Czas wstępnej cyrkulacji oparów w układzie destylacyjnym wynosił 30 min, zaś szybkość odbioru przedgonów 2,5 mL/min, frakcji właściwej 5 mL/min. Podobnie jak w poprzednich etapach badań, dotyczących destylacji korekcyjnej, za pogony przyjęto ciecz pozostałą po destylacji. Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 16.

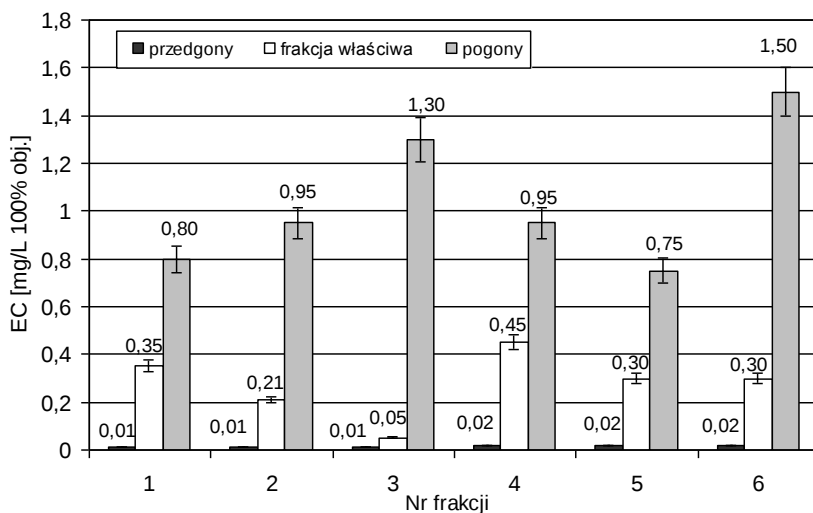
Zależnie od ilości odebranych przedgonów ($3\div 5\%$), oznaczona w nich zawartość cyjanowodoru mieściła się w granicach od 5,3 do 6,4 mg/L 100% obj., zaś karbaminian etylu, z uwagi na jego pogonowy charakter, w warunkach prowadzenia destylacji, obecny był w śladowych ilościach ($0,01\div 0,02$ mg/L 100% obj.). Zwiększenie mocy odbieranego destylatu właściwego, z 65 do 85% obj., wpłynęło na obniżenie stężenia HCN, z 1,89 do 0,85 mg/L 100% obj., przy 3% odbiorze przedgonów i z 1,20 do 0,60 mg/L 100% obj., po oddzieleniu 5% frakcji początkowej. Zaobserwowano również zmniejszenie stężenia uretanu, zwłaszcza we frakcjach środkowych, po oddestylowaniu 3% przedgonów.

Obniżenie zawartości omawianych związków może wydawać się zjawiskiem bardzo korzystnym z punktu widzenia aspektów zdrowotnych, jednakże wyniki przeprowadzonej oceny organoleptycznej destylatów (nie zamieszczano ich w niniejszej pracy) wykazały, że zwiększanie ilości odbieranych przedgonów, jak również zbyt wysoka moc destylatu właściwego, mogą powodować nadmierne jego oczyszczenie i utratę oryginalności surowcowej. Za optymalny, dla uzyskania spirytusu śliwkowego, o korzystnym zapachu i smaku, uznano odbiór przedgonów w ilości 3%, zaś jego moc nie powinna być wyższa niż 75% obj. (rys. 16).

Nóbrega i in. (2009), oceniając zawartość karbaminianu etylu w wyrobach spirytusowych (cachaças) otrzymywanych ze spirytusu z soku trzciny cukrowej, wykazali, że jego najwyższe stężenia były w napojach ze spirytusu, z którego nie wydzielano przedgonów. Potwierdzają to również badania Andrade-Sobrinho i in. (2009), którzy podczas destylacji frakcjonowanej spirytusów trzcinowych, prowadzonej w aparatach współprądowych „pot still”, odnotowali wysoką zawartość EC w frakcji przedgonowej. Autorzy tłumaczą, że w prostych aparatach destylacyjnych, wyposażonych jedynie w tzw. hełm w kształcie gruszki lub cebuli („hot head” – element chłodzony powietrzem, pełniący funkcję łapacza skroplonych oparów), bez deflegmatora, istnieją optymalne warunki do reakcji, obecnych w przedgonach, niskowrzących cyjanów z etanolem, co prowadzi do syntezy uretanu (Christoph i in., 1987; Guerain i Leblond, 1992; Nóbrega i in., 2009).



B) Karbaminian etylu



Rys. 16. Wpływ ilości odbieranych przedgonów i mocy frakcji właściwej na zawartość cyjanowodoru i karbaminianu etylu w kolejnych frakcjach (n = 2)

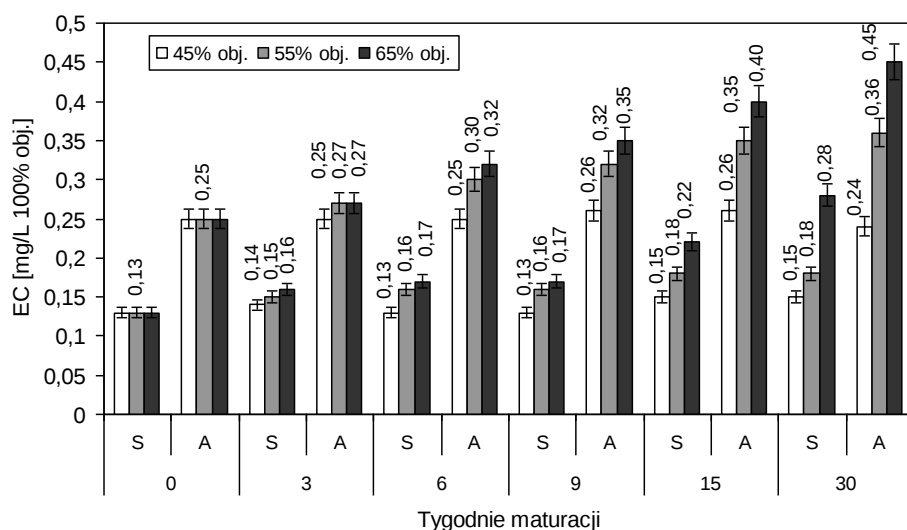
1. Przedgony – 3%; frakcja właściwa – 65% obj.; **2.** Przedgony – 3%; frakcja właściwa – 75% obj.; **3.** Przedgony – 3%; frakcja właściwa – 85% obj.; **4.** Przedgony – 5%; frakcja właściwa – 65% obj.; **5.** Przedgony – 5%; frakcja właściwa – 75% obj.; **6.** Przedgony – 5%; frakcja właściwa – 85% obj.

5.9. Wpływ maturacji spirytusów owocowych na zawartość karbaminianu etylu i jego prekursorów

Celem osiągnięcia pełnowartościowych cech organoleptycznych, spirytusy owocowe poddawane są maturacji, czyli dojrzewaniu. Proces prowadzi się najczęściej w beczkach z drewna dębowego (Jarosz, 1989; Aylott i in., 1990; Sefton i in., 1993; Ferreras i in., 2002). Przydatność drewna dębowego spowodowana jest jego mikrostrukturą, na powierzchni której zachodzą procesy katalizowane przez składniki drewna (Baran i Schwedt, 1993; Mosedale, 1995).

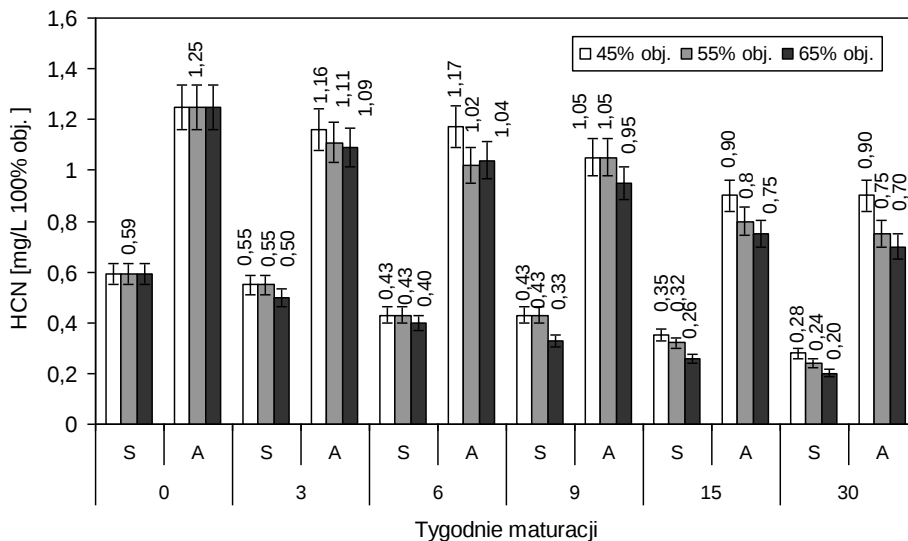
Oceniano wpływ mocy spirytusu, temperatury prowadzenia procesu oraz napowietrzania na zmiany zawartości karbaminianu etylu, cyjanowodoru, diacetyle i miedzi podczas leżakowania prób spirytusów śliwkowych i aroniowych, w obecności 60 cm² wiórów dębowych/L. Przeprowadzone badania wykazały, że kierunek zmian zawartości karbaminianu etylu w spirytusach owocowych był skorelowany ze stężeniem, zawartego w nich, etanolu.

W próbach spirytusów śliwkowych, jak i aroniowych, o zawartości etanolu 45% obj., maturowanych w temperaturze 20°C, po 30 tygodniach nie odnotowano statystycznie istotnego wzrostu zawartości karbaminianu etylu (śliwki $0,05 < P < 0,10$; aronia $P > 0,20$). Wyższa zawartość etanolu w próbach dojrzewających spirytusów (55÷65% obj.) wpłynęła na znaczące zwiększenie stężenia EC, od 38 do 115% w spirytusach śliwkowych i od 44 do 80% w aroniowych (rys. 17). Istotność korelacji, między stężeniem etanolu a zawartością uretanu, potwierdza wysoka wartość współczynnika Pearsona (r), od 0,956 (spirytusy śliwkowe) do 0,997 (aroniowe).



Rys. 17. Wpływ mocy spirytusów owocowych na zmiany zawartości karbaminianu etylu podczas maturacji (S – spirytus śliwkowy, A – spirytus aroniowy), ($n = 3$)

Zawartość cyjanowodoru w spirytusach przed maturacją mieściła się w granicach od 0,59 mg (śliwkowy) do 1,25 mg/L 100% obj. (aroniowy). Do 6 tygodnia maturacji nie obserwowano istotnego wpływu mocy spirytusów na zmiany zawartości HCN. W kolejnych tygodniach następował spadek zawartości tego związku, przy czym największą dynamikę zmian odnotowano w próbach spirytusów o mocy 65% obj. Po 30 tygodniach prowadzenia procesu stężenie cyjanowodoru obniżyło się, od 53 do 66%, w próbach spirytusu śliwkowego i od 28 do 44%, w próbach spirytusu aroniowego (rys. 18).

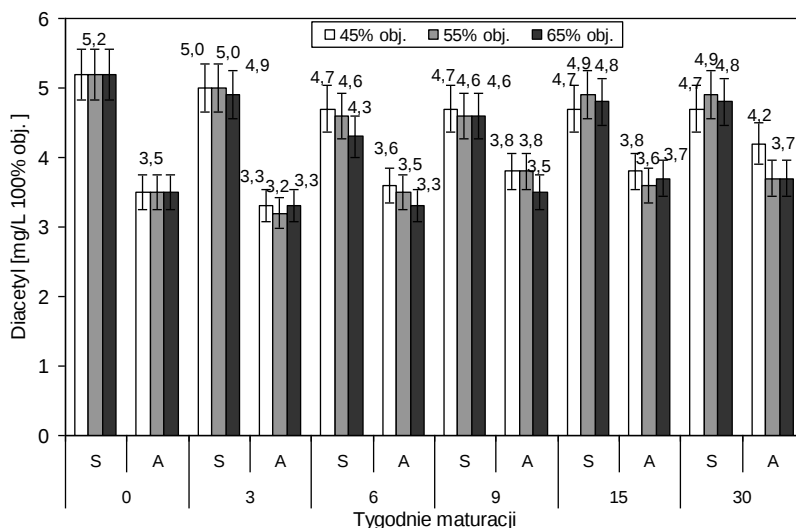


Rys. 18. Wpływ mocy spirytusów owocowych na zmiany zawartości cyjanowodoru podczas maturacji (S – spirytus śliwkowy, A – spirytus aroniowy), (n = 3)

Z grupy ketonów, do reprezentatywnych komponentów dla dojrzałych napojów alkoholowych należą: diacetyl (butanodion), acetoina i 2,3-pentanodion (Rostkowska-Denmer i Wzorek, 1998; Meng i in., 2011). Postel i Adam (1988, 1990) stwierdzili, że w winiakach niemieckich stężenie diacetylu dochodziło do 13 mg/L 100% obj., zaś w koniakach francuskich występował on w śladowych ilościach. Wyniki badań własnych (p. 5.6), jak i dane literaturowe (Adam i Postel, 1987; Bauman i Zimmerli, 1986, 1987; Mildau i in., 1987), wykazały istotną rolę tego związku w syntezie uretanu.

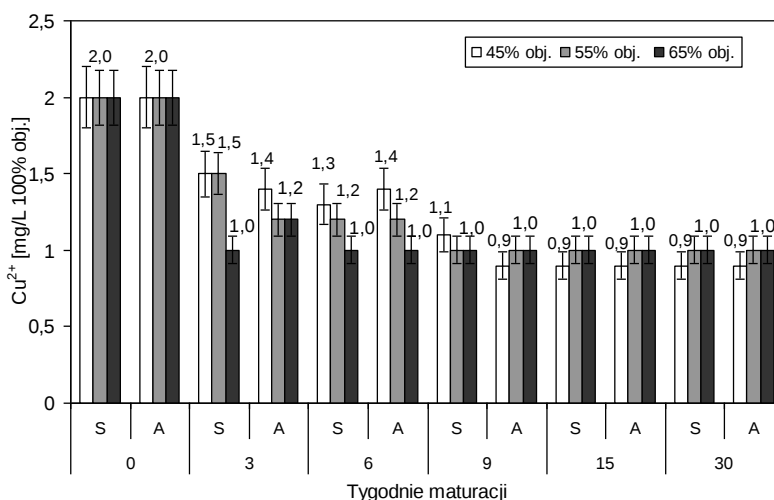
Zawartość diacetylu w ocenianych spirytusach, przed maturacją, wynosiła odpowiednio: w śliwkowym – 5,2 mg/L 100% obj., w aroniowym – 3,5 mg/L 100% obj. W czasie pierwszych 6-9 tygodni prowadzenia maturacji, stężenie diacetylu wykazywało niewielką tendencję spadkową, co w połączeniu z obserwowanym obniżaniem zawartości cyjanowodoru może z wysokim prawdopodobieństwem świadczyć o tworzeniu produktów przejściowych w postaci cyjanohydrin, cyanianów, które przy katalitycznym udziale nadtlenu diacetylu mogą prowadzić do syntezy uretanu (Bauman i Zimmerli,

1987; 1988). W dalszym okresie dojrzewania spirytusów obserwowano powolny wzrost zawartości tego związku, jako wynik dalszych przemian chemicznych zachodzących w czasie dojrzewania (rys. 19).



Rys. 19. Zmiany zawartości diacetylu podczas maturacji spirytusów owocowych (S – spirytus śliwkowy, A – spirytus aroniowy), (n = 3)

Zmianom zawartości karbaminianu etylu, cyjanowodoru i diacetylu towarzyszyły również zmiany w ilości oznaczonej miedzi, która w spirytusach śliwkowych i aroniowych, przed dojrzewaniem, wynosiła 2 mg/L spirytusu 100% obj., zaś po 30 tygodniach prowadzenia procesu obniżyła się o ok. 50%, niezależnie od rodzaju spirytusu i zawartości w nim etanolu (rys. 20).



Rys. 20. Zmiany zawartości miedzi podczas maturacji spirytusów owocowych (S – spirytus śliwkowy, A – spirytus aroniowy), (n = 3)

Istotny wpływ na przemiany fizyczne i chemiczne, zachodzące podczas dojrzewania napojów alkoholowych, odgrywa również zawartość tlenu i temperatura prowadzenia procesu (Ferreira i in., 1997; Woo i in., 2001). Maturacja w temperaturze 20°C, z okresowym napowietrzaniem prób, nie spowodowała istotnych zmian zawartości uretanu ($0,05 < P < 0,10$ dla spirytusów śliwkowych; $P > 0,20$ w przypadku prób z aronii), w porównaniu z oznaczoną jego ilością przed rozpoczęciem procesu. Natomiast zdecydowanie katalitycznie na syntezę tego związku wpłynęło podwyższenie temperatury z 20 do 40°C. Okresowa maturacja spirytusów owocowych w podwyższonej temperaturze, oprócz intensyfikacji pożądaných przemian, spowodowała wzrost zawartości EC (od $0,13 \pm 0,25$ do $0,33 \pm 0,45$ mg/L 100% obj.), (rys. 21). Odnotowano również znaczące obniżenie zawartości cyjanowodoru (o $96 \div 98\%$), która mieściła się w granicach od 0,01 mg/L 100% obj. spirytusu śliwkowego do 0,05 mg/L 100% obj. spirytusu aroniowego (rys. 22). Podobne zmniejszenie zawartości cyjanów odnotowano w próbach napowietrzanych. W tym przypadku mogło być ono konsekwencją dyfuzji cyjanowodoru.

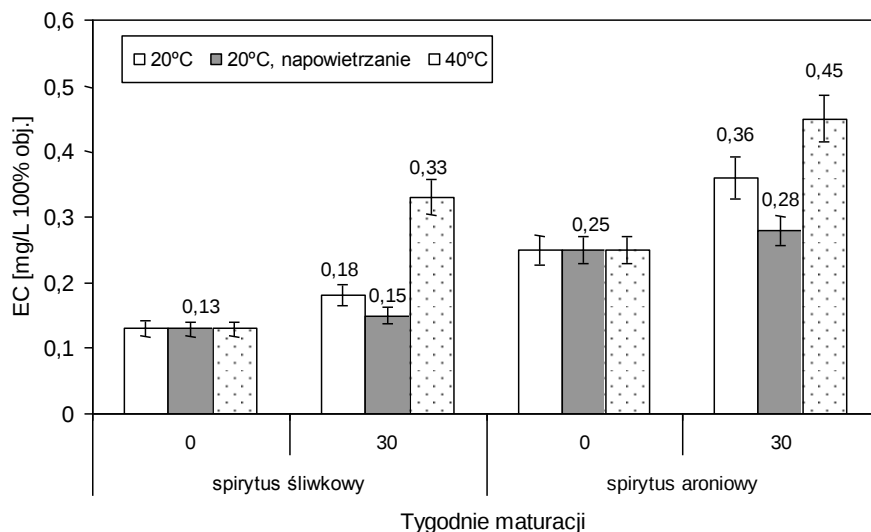
Znaczącemu obniżeniu cyjanów w próbach napowietrzanych i leżakowanych w 40°C towarzyszył spadek zawartości miedzi o $75 \div 85\%$ (rys. 23), co może wskazywać na tworzenie przejściowych kompleksów tych związków, wykazujących wysoką reaktywność w kierunku syntezy uretanu (Taki i in., 1992; Aresta i in., 2001).

Odmienne kierunki zmian obserwowano odnośnie do zawartości diacetylu, zarówno przy zastosowaniu napowietrzania, jak i przy podwyższonej temperaturze prowadzenia procesu. W próbach maderyzowanych (40°C) przez 30 tygodni, stężenie tego związku było najwyższe i wynosiło 4,5 mg/L 100% obj. spirytusu aroniowego i 6,9 mg/L 100% obj. spirytusu śliwkowego (rys. 24).

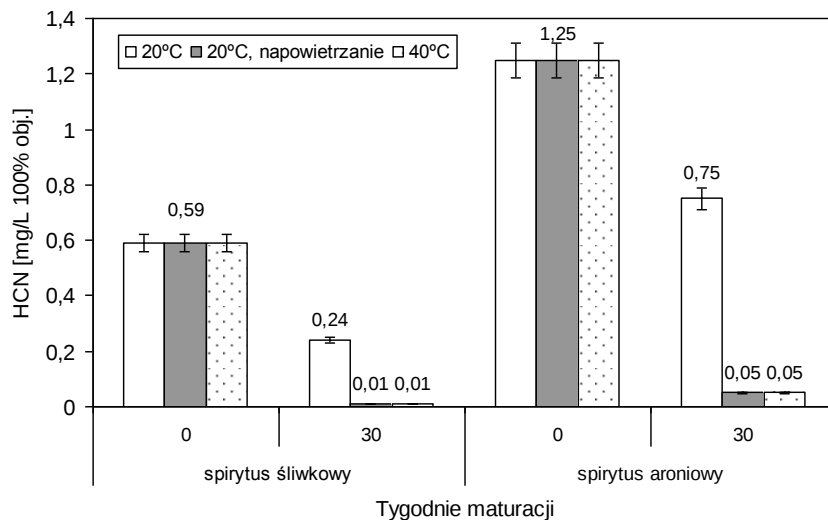
Aylott i in. (1990), badając zmiany zawartości uretanu i jego prekursorów podczas maturacji spirytusów zbożowych, odnotowali gwałtowny wzrost jego zawartości w trzech pierwszych tygodniach (z 0,015 do 0,064 mg/L) oraz równie dynamiczne obniżenie zawartości cyjanowodoru oraz jego kompleksów z miedzią. Tendencji wzrostowej podlegały natomiast stężenia cyjanohydrin i cyjanianów – utlenionej formy cyjanów, które w reakcji z etanolem prowadzą do powstania karbaminianu. Autorzy zwracają uwagę, że czynnikami katalizującymi tę reakcję może być nie tylko światło i temperatura, lecz także związki ekstrahowane z drewna dębowego. Dodatek alkoholowego ekstraktu z drewna dębowego do spirytusów zbożowych powodował znaczący wzrost stężenia karbaminianu etylu.

Silne właściwości utleniające wykazują przechodzące z drewna polifenole, m.in.: pirokatechiny i pirogallol. Substancje garbnikowe, a w szczególności taniny, przechodząc do destylatów ulegają hydrolizie do kwasów galusowego i elagowego, które wpływają na zwiększenie kwasowości spirytusu (Jaarsveldt i Hattingh, 2012). Obniżone pH sprzyja z kolei syntezie uretanu (Christoph i in., 1986). W czasie leżakowania spirytusów ekstrahowane są barwniki dębu, tzw. flawonole (kwercetyna, kempferol), nadające spirytusom złocistożółtą barwę. Nóbrega i in. (2009) wykazali, średnio 4-krotnie, wyższą zawartość uretanu

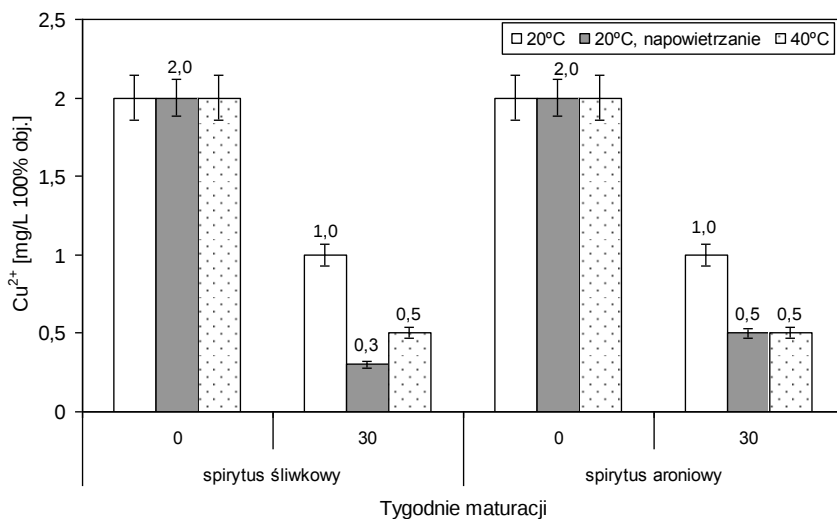
w żółtych wyrobach cachaças (ze spirytusu trzciniowego), maturowanych w beczkach z drewna tropikalnego freijó (*Cordia goeldiana*) niż w wódkach bezbarwnych, sporządzonych ze świeżych spirytusów. Również Madrera i Valles (2009) oznaczyli kilkakrotnie wyższe stężenie karbaminianu etylu w leżakowanych spirytusach z cydrów niż w świeżych ($0 \div 0,09$ mg/L).



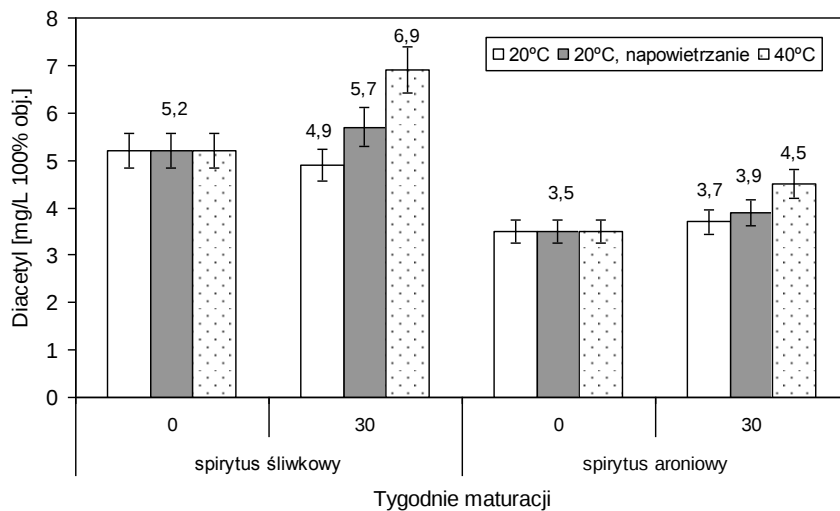
Rys. 21. Wpływ napowietrzania i podwyższonej temperatury na zmiany zawartości karbaminianu etylu po maturacji spirytusów owocowych (o mocy 55% obj.), (n = 3)



Rys. 22. Wpływ napowietrzania i podwyższonej temperatury na zmiany zawartości cyjanowodoru po maturacji spirytusów owocowych (o mocy 55% obj.), (n = 3)



Rys. 23. Wpływ napowietrzania i podwyższonej temperatury na zmiany zawartości miedzi po maturacji spirytusów owocowych (o mocy 55% obj.), (n = 3)



Rys. 24. Wpływ napowietrzania i podwyższonej temperatury na zmiany zawartości diacetylu po maturacji spirytusów owocowych (o mocy 55% obj.), (n = 3)

5.10. Identyfikacja uretanów w spirytusach owocowych

Zdaniem Tannera i in. (1987) od 5 do 20% całkowitej ilości karbaminianów, obecnych w produktach spirytusowych może być estrami innych alkoholi niż etanol. Najprawdopodobniej powstają one w reakcjach analogicznych, jak w przypadku syntezy karbaminianu etylu.

W ramach prowadzonych badań ocenie na zawartość uretanów poddano 249 prób spirytusów śliwkowych i 151 aroniowych zróżnicowanych: sposobem obróbki wstępnej owoców, rodzajem i ilością pożywek, warunkami fermentacji, rasą drożdży i wielkością inokulum oraz warunkami destylacji i maturacji. We wszystkich spirytusach stwierdzono obecność karbaminianu etylu (EC). W ok. 71% prób spirytusów w obydwu grupach surowcowych odnotowano wzrost sygnału jonów w stosunku do sygnału bazowego, w czasie retencji karbaminianu metylu (MC). Niemożliwa była jednak analiza ilościowa tego związku, z uwagi na stężenia poniżej poziomu detekcji MC (0,01 mg/L), (tab. 21).

Tabela 21. Skład jakościowy karbaminianów w spirytusach owocowych

Rodzaj destylatów	Liczba prób ogółem	Liczba prób, w których wykryto	
		Karbaminian metylu (MC)	Karbaminian etylu (EC)
śliwkowe	249	177*	249
aroniowe	151	108*	151

* próby, w których odnotowano wzrost sygnału jonów charakterystycznych dla MC w stosunku do sygnału bazowego

Sen i in. (1993) stwierdzili, oprócz karbaminianu etylu, obecność karbaminianu metylu w chlebie, winach, spirytusach owocowych i likierach. Jego zawartość w napojach nie przekraczała przeważnie 0,002 mg/kg i była znacząco niższa od stężenia karbaminianu etylu ($0,003 \div 0,432$ mg/kg). W pojedynczych próbach karbaminian metylu był obecny w większych ilościach ($0,009 \div 0,028$ mg/kg). Wyroby te odznaczały się wysoką zawartością karbaminianu etylu, do ponad 2 mg/kg. Shin i Yang (2012), badając koreańskie produkty fermentowane, wykazali, że zawartość karbaminian etylu była relatywnie wysoka w napojach alkoholowych owocowych, lecz nie przekraczała 0,087 mg/L, zaś karbaminian metylu był obecny w ilościach do 0,8 µg/L zaledwie w kilku próbach wódek owocowych. Śladowe stężenia uretanu oznaczyli również Iwouno i Victory (2013) w nigeryjskich wyrobach spirytusowych.

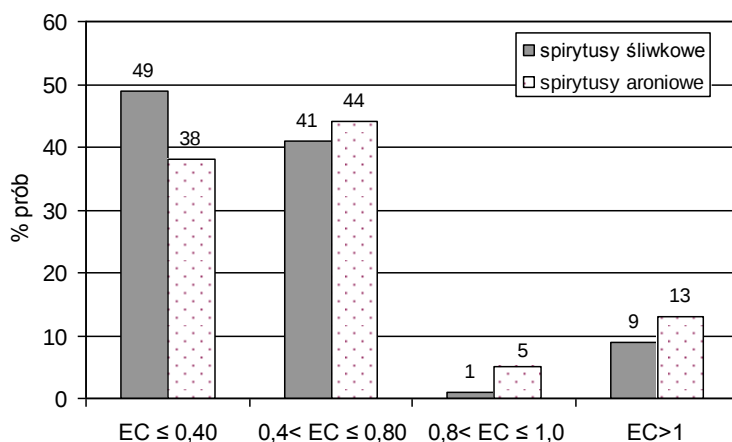
W badanych spirytusach śliwkowych i aroniowych nie wykryto karbaminianu propylu. Podobnych obserwacji dokonali Daudt i in. (1992), którzy prowadzili identyfikację składu jakościowego karbaminianów w winach alkoholizowanych. Autorzy stwierdzili, że nieobecność karbaminianu propylu w ocenianych napojach alkoholowych może być konsekwencją niższej reaktywności propanolu w porównaniu z etanolem.

Dokonano porównania zawartości uretanu w spirytusach otrzymanych w ramach niniejszej pracy ze stężeniami EC w spirytusach z innych owoców pestkowych (wiśnie) i ziarnkowych (jabłka), (Balcerek i Szopa, 2006; badania własne niepublikowane). Średnie stężenia uretanu w spirytusach śliwkowych ($0,52 \pm 0,38$ mg/L 100% obj.) i aroniowych ($0,63 \pm 0,55$ mg/L 100% obj.) nie różniły się istotnie ($P > 0,2$), przy założonym poziomie istotności ($\alpha = 0,05$), (tab. 22). Relatywnie wysokie, średnie stężenie uretanu, 2,42 mg/L 100% obj. (zakres $0,37 \div 6,02$ mg/L 100% obj.) oznaczono w próbach spirytusów wiśniowych, pochodzących z fermentacji zacierów, zróżnicowanych udziałem od 0 do 30% pestek całych lub rozdrobnionych. Z kolei niską zawartością karbaminianu etylu odznaczały się spirytusy jabłkowe (fermentacja miazgi surowej, sporządzonej po wstępnym usunięciu lub bez usuwania gniazd nasiennych), w których związek ten występował, średnio, w ilości 0,22 mg/L 100% obj. (13 prób, zakres od $< 0,02 \div 0,50$ mg/L 100% obj.). Badania prowadzone przez EFSA (2007) wykazały, że w wódkach naturalnych typu brandy i spirytusach owocowych karbaminian etylu występował, przeciętnie, w ilości 0,26 mg/L.

Tabela 22. Zawartość karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach owocowych

Wyszczególnienie		Rodzaj spirytusów	
		śliwkowe	aroniowe
N (liczba prób)		249	151
Średnia $\pm$ SD	[mg/L 100% obj.]	$0,52 \pm 0,38$	$0,63 \pm 0,55$
Zakres		$0,04 \div 2,10$	$0,01 \div 3,54$
Mediana		0,42	0,50

Dozwolona zawartość karbaminianu etylu w wyrobach spirytusowych (brandy) owocowych w Kanadzie i Czechach nie powinna przekraczać 0,4 mg/L wyrobu (EFSA, 2007). Wśród badanych spirytusów zaleceniom tym odpowiadało 49% śliwkowych i 38% aroniowych (rys. 25). Jeżeli jednak za graniczne dopuszczalne stężenie EC uznać 0,8 mg/L (wymagania norm niemieckich), (Christoph i in., 1986; Jung i Adam, 2005), to udział prób mieszczących się w limitach będzie wynosił 90% dla śliwkowych i 82% dla aroniowych (rys. 25). Z kolei z zaleceń Komisji Europejskiej z 2010 roku wynika, że akceptowalny poziom uretanu w napojach alkoholowych nie powinien przekraczać 1,0 mg/L (European Commission, 2010). Wartość tę przekraczało jedynie 9% prób spirytusów śliwkowych i 13% spirytusów aroniowych. Ponadto należy zauważyć, iż stężenia karbaminianu etylu w badanych spirytusach podano w przeliczeniu na etanol 100% obj., zaś najczęściej moc wyrobów spirytusowych oscyluje wokół 40% obj. Zatem przeliczając stężenie uretanu w ocenianych próbach na spirytus 40% obj., można stwierdzić, że wszystkie spirytusy śliwkowe i 97% spirytusów aroniowych spełniało, przytaczane wyżej, dopuszczalne stężenia karbaminianu etylu.



Rys. 25. Rozkład stężeń karbaminianu etylu w badanych spirytusach owocowych

Relatywnie niska zawartość karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach na tle danych literaturowych, dotyczących spirytusów i wódek owocowych, zwłaszcza z owoców pestkowych (Mildau i in., 1987; Lachenmeier i in., 2005; Weltring i in., 2006), jest wynikiem, między innymi, ograniczonej ilości pestek wprowadzanych do zacierów oraz destylacji zacierów odfermentowanych bez długotrwałego ich przetrzymywania.

W gorzelnictwie niemieckim praktykowane jest prowadzenie fermentacji w miazdze owocowej, bez usuwania pestek („complete mash”), wstępnie zakwaszanej do pH około 3 (Schehl i in., 2005). „Ochrona kwasowa” zacierów jest zabiegiem ograniczającym uwalnianie cyjanowodoru (Christoph i in., 1988), lecz obniżone pH wpływa katalitycznie na syntezę uretanu (Taki i in., 1992). Ponadto kilkutygodniowe „dojrzewanie” zacierów zwiększa ryzyko zakażeń mikrobiologicznych i syntezy karbaminianu etylu (Christoph i in., 1986; Laugel i Bindler, 1993; Christoph i Bauer-Christoph, 1998).

Ujednolicenie przepisów, dotyczących wprowadzenia do obrotu na rynek europejski napojów spirytusowych, przyczynia się do ochrony konsumentów i rozwoju sektora. Określone ramy prawne sprzyjają wdrażaniu innowacji technologicznych, chroniąc jednocześnie tradycyjne metody produkcji. Dotyczy to również wódek naturalnych owocowych (brandy, okowita), rozpowszechnionych i cenionych na świecie, ze względu na ich walory smakowo-zapachowe. Wysokie koszty ich produkcji wymagają stosowania technologii, ukierunkowanej na zachowanie oryginalności surowcowej i bezpieczeństwa zdrowotnego, rozumianego przez możliwie najniższą zawartość związków szkodliwych, takich jak karbaminian etylu (uretan) oraz cyjanowodor (HCN), jeden z głównych prekursorów uretanu w spirytusach i wódkach (okowitach) z owoców, zawierających glikozydy cyjanogenne.

Dla ochrony renomy wyrobów spirytusowych, których jakość jest nierozdzielnie związana z pochodzeniem, Parlament Europejski i Rada Unii Europejskiej, wprowadziły w *Rozporządzeniu nr 110/2008 z dnia 15 stycznia 2008 r., w sprawie definicji, opisu, prezentacji, etykietowania i ochrony oznaczeń geograficznych napojów spirytusowych*, termin „oznaczenie geograficzne”.

Oznaczenie geograficzne nie może służyć jedynie do promocji wyrobu, ale powinno przysługiwać, wyłącznie, produktowi spełniającemu szczególne wymagania surowcowe i technologiczne. Starania branży spirytusowej powinny być ukierunkowane na wytwarzanie wyrobów, odpowiadających najwyższym standardom w zakresie składu chemicznego i walorów sensorycznych. Można zatem wnioskować, iż rosnące wymagania i wzrost świadomości konsumentckiej, w zestawieniu z bardzo silną konkurencją między producentami napojów spirytusowych, sprawią, że kanonem postępowania w technologii produkcji spirytusu i napojów spirytusowych będzie stosowanie Dobrych Praktyk Wytwarzania (GMP), gwarantujących wysoką jakość sensoryczną i bezpieczeństwo zdrowotne oferowanych wyrobów, ze szczególnym uwzględnieniem wódek naturalnych (okowit) owocowych.

6. WNIOSKI

Realizacja badań, zmierzających do wskazania czynników determinujących zawartość karbaminianu etylu w spirytusach śliwkowych i aroniowych, pozwala na sformułowanie wniosków, zarówno o znaczeniu teoretycznym, jak i aplikacyjnym.

1. Rodzaj obróbki wstępnej surowca, skład zacierów owocowych oraz warunki ich fermentacji wpływają na stężenie cyjanowodoru i karbaminianu etylu. Obróbka enzymatyczna miazgi owocowej, z udziałem selektywnie działających preparatów pektynolitycznych, nie powoduje istotnego wzrostu stężenia uwalnianego cyjanowodoru i intensyfikacji syntezy uretanu. Stosowanie kompleksowych pożywek, w postaci preparatów zawierających związki amonowe oraz aminokwasy, witaminy i składniki mineralne, zapewnia prawidłowy rozwój i aktywność fermentacyjną drożdży i nie wpływa istotnie na tworzenie karbaminianu etylu. Korekta kwasowości miazgi owocowej do pH = 5,0 wpływa na wzrost stężenia cyjanowodoru uwalnianego z glikozydów cyjanogennych.
2. Maksymalna szybkość uwalniania cyjanowodoru z glikozydów cyjanogennych przypada na początkowy etap fermentacji, zaś synteza karbaminianu etylu zachodzi najintensywniej w fazie dofermentowania miazgi owocowej, niezależnie od warunków fermentacji.
3. Temperatura fermentacji zacierów śliwkowych i aroniowych ok. 18–20°C pozwala na otrzymanie spirytusów o zawartości EC nieprzekraczającej 0,4 mg/L 100% obj. Leżakowanie zacierów odfermentowanych w czasie do 5 dób, w 15°C, nie wpływa na zwiększenie stężenia karbaminianu etylu w otrzymywanych spirytusach śliwkowych i aroniowych.

4. Drożdże winiarskie (*S. cerevisiae* i *S. bayanus*), wykorzystywane do fermentacji zacierów owocowych, powinny odznaczać się niską aktywnością enzymów katalizujących syntezę karbamylfosforanu i rozkład argininy. Aktywność właściwa syntazy karbamylfosforanu I (NH_4^+ -zależnej) do ok. 45×10^{-3} U/mg białka i syntazy karbamylfosforanu II (glutaminozależnej) do ok. 93×10^{-3} U/mg białka nie wpływa istotnie na powstawanie karbaminianu etylu. Niska aktywność właściwa arginazy drożdży do około 3,00 U/mg białka ogranicza uwalnianie mocznika z argininy.
5. Zastosowanie chemicznych metod obniżania zawartości cyjanowodoru i karbaminianu etylu, poprzez dodatek do zacierów owocowych chlorku miedzi (I) lub kwasu askorbinowego, intensyfikuje wytwarzanie produktów ubocznych fermentacji, m.in. aldehydów i wyższych alkoholi. Zabiegi te pogarszają smak i zapach spirytusów aroniowych.
6. Usuwanie mocznika z zacierów śliwkowych i aroniowych, zawierających glikozydy cyjanogenne, z zastosowaniem „kwaśnej” ureazy, pochodzącej z bakterii *Lactobacillus fermentum*, pozwala na częściowe obniżenie zawartości karbaminianu etylu w otrzymanych spirytusach.
7. Spośród soli kwasu cyjanowodorowego wysoką podatnością na przemiany prowadzące do powstawania karbaminianu etylu w spirytusach odznacza się cyjanek miedzi i cyjanian potasu. Obecność diacetylu, aldehydu benzoowego, jak i obniżanie pH roztworu spirytusu oraz zwiększanie w nim zawartości etanolu wpływają na wzrost stężenia EC.
8. Synteza znaczącej części karbaminianu etylu, obecnego w spirytusach śliwkowych i aroniowych, zachodzi podczas ich destylacji z miazgi odfermentowanej. Istotnie na tworzenie uretanu wpływa materiał, z którego zbudowana jest aparatura destylacyjna. Prowadzenie procesu w aparacie miedzianym, typu „alembik”, przyczynia się do wzrostu stężenia karbaminianu etylu o 82÷91%, zaś w aparacie szklanym o 64÷67%.
9. Technika i warunki destylacji korekcyjnej surowych spirytusów owocowych wpływają na zawartość karbaminianu etylu i cyjanowodoru w odbieranych frakcjach. Wykorzystanie aparatury pracującej na zasadzie przeciwprądu (kolumna z wypełnieniem i deflegmatorem) pozwala na wydzielenie znaczącej części cyjanowodoru w przedgonach, zaś karbaminianu etylu we frakcji pogonowej. Wstępna cyrkulacja oparów w układzie destylacyjnym w czasie 30 min jest wystarczająca dla prawidłowego rozfrakcjonowania zanieczyszczeń. Destylacja korekcyjna z powolnym (2,5 mL/min) wydzieleniem 3% przedgonów i odbiorem frakcji właściwej o mocy ok. 75% obj. zapewnia otrzymanie spirytusu śliwkowego i aroniowego o pożądanym zapachu i smaku oraz niskiej zawartości cyjanowodoru i karbaminianu etylu.

10. W czasie maturacji spirytusów owocowych w obecności drewna dębowego, zachodzi dalsza synteza karbaminianu etylu, z dynamiką uzależnioną od mocy spirytusu i warunków prowadzenia procesu. Podwyższenie temperatury tego etapu postępowania technologicznego (40°C) przyspiesza syntezę karbaminianu etylu.
11. Przeprowadzone badania, zmierzające do ograniczenia zawartości karbaminianu etylu w spirytusach śliwkowych i aroniowych, dowodzą, że zastosowanie odpowiedniej obróbki wstępnej owoców, drożdży o niskiej aktywności syntaz karbamylofosforanu i arginazy oraz odpowiednich warunków fermentacji, destylacji i maturacji umożliwia otrzymanie spirytusów o zawartości EC poniżej 0,4 mg/L, z zachowaniem ich oryginalności surowcowej. Proces nie wymaga stosowania dodatkowych zabiegów chemicznych lub biologicznych, które mogą powodować zmiany cech organoleptycznych spirytusu oraz wzrost kosztów produkcji.

INFORMACJA UZUPEŁNIAJĄCA

Niektóre wyniki badań, prezentowanych w monografii, zostały częściowo opublikowane:

1. Balcerek M., Szopa J.St. (2005) Wpływ warunków fermentacji zacierów śliwkowych na powstawanie karbaminianu etylu. cz. 1-2, *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 11: 23-25; 12: 14-15.
2. Balcerek M., Szopa J. St. (2006) Zawartość karbaminianu etylu w destylatach owocowych. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość.* 1(46): 91-101.
3. Balcerek M. (2006) Prekursory karbaminianu etylu w napojach alkoholowych. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 5: 23-25.
4. Balcerek M., Szopa J.St. (2006) Evaluation of the effect of the carbamylphosphate synthetase and urease activities in selected strains of wine yeast on the production of ethyl carbamate. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 15/56(4): 445-452.
5. Balcerek M., Szopa J.St. (2008) Maturation of fruit distillates. Major volatile compounds and ethyl carbamate – changes of content. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 104(6): 288-292.
6. Balcerek M. (2009) Evaluation of the effect of arginase and urease activities in selected strains of wine yeast on the production of ethyl carbamate. W: *Food Technology Operations. New Vistas. Monography LXXII*, Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego, Wrocław, pp. 125-133.

7. LITERATURA

- Abdelal A., Ingraham J.** (1975) Carbamylophosphate synthetase from *Salmonella typhimurum*. Regulation, subunit, composition and function of the subunits. J. Biol.Chem. 12:4410-4417.
- Adam L., Postel W.** (1987) Gaschromatographische Bestimmung von Ethylcarbamat (Urethan) in Spirituosen, Die Branntweinwirtschaft 127(5):66-68.
- Albrecht W.** (1998) Die Obstbrennerei in Deutschland und ihre Produkte. Alk. Ind. 111(1-2):4-21.
- Alcarde A.R., de Souza L.M., Bortoletto A.M.** (2012) Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. J. Inst. Brew. 118:27-31.
- Alcarde A.R., de Souza L.M., Bortoletto A.M.** (2012) Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. Part 2: Influence of type of pot still 118(4):352-355.
- Andrade-Sobrinho L.G., Boscolo M., Lima-Neto B.S., Franco D.W.** (2002) Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (Cachaca, tiquira, uísque e grapa). Química Nova 25:1074-1077.
- Arena M.E., Saguir F.M., Manca de Nadra M.C.** (1999) Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. Int. J. Food Microbiol. 52(3):155-161.
- Aresta M., Boscolo M., Franco D.W.** (2001) Cooper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. J. Agric. Food Chem. 49:2819-2824.
- Aylott R.I., Cochrane G.C., Leonard M.J., MacDonald L.S., MacKenzie W.M., McNeish A.S., Walker D.A.** (1990) Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part I: Post-distillation ethyl carbamate formation in maturing grain whisky. J. Inst. Brew. 96(7/8):213-221.
- Bachman B., Tuszyński T.** (1976) Wybrane zagadnienia gorzelnictwa owocowego. Przem. Ferm. Rolny 10:1-4.
- Baffa Júnior J.C., Santos Mendonça R.C., de Assis Teixeira Kluge Pereira J.M., Marques Pereira J.A., de Fátima Ferreira Soares N.** (2011) Ethyl-carbamate determination by gas chromatography–mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit. Food Chem. 129:1383-1387.
- Balcerek M.** (2001) Optymalizacja technologii otrzymywania spirytusu aroniowego, Praca doktorska, Wydział Chemii Spożywczej i Biotechnologii, Politechnika Łódzka, Łódź.
- Balcerek M., Szopa J.S.** (2002) Optimierung der Gewinnungstechnologie von Aronia Spirituosen – Teil 1: Auswahl der Gärungsbedingungen für Aronia – Maischen. Dtsch. Lebensm. Rundsch. 98(9):326-331.
- Balcerek M., Szopa J.S., Adamczyk M.** (2003) Kinetyka powstawania cyjanowodoru w procesie fermentacji zacierów z owoców tarniny. Przem. Ferm. Owoc. Warz. cz. I, 47(11):24-26; cz. II, 47(12):21-22.

- Balcerek M., Szopa J.S.** (2005a) Optimierung der Gewinnungstechnologie von Aronia Spirituosen Teil 2: Einfluss der Maischegärungs-Bedingungen auf die Zusammensetzung der flüchtigen Inhaltstoffe. Dtsch. Lebensm. Rundsch. 101(1):16-19.
- Balcerek M., Szopa J.S.** (2005b) Wpływ warunków fermentacji zacierów śliwkowych na powstawanie karbaminianu etylu. Przem. Ferm. Owoc. Warz. cz. I, 11:23-25; cz. II, 12:14-15.
- Balcerek M.** (2006) Prekursory karbaminianu etylu w napojach alkoholowych. Przem. Ferm. Owoc. Warz. 5:23-26.
- Balcerek M., Szopa J.** (2006a) Evaluation of the effect of carbamylphosphate synthetase and urease activities in selected strains of wine yeast on the production of ethyl carbamate. Pol. J. Food Nutr. Sci. 15/56 (4): 445-452.
- Balcerek M., Szopa J.S.** (2006b) Zawartość karbaminianu etylu w destylatach owocowych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 1(46):91-101.
- Balcerek M., Szopa J.S.** (2008) Maturation of fruit distillates. Major volatile compounds and ethyl carbamate. Changes of content. Dtsch. Lebensm. Rundsch. 104(6):261-265.
- Ballhorn D.J., Lieberei R., Ganzhorn J.U.** (2005) Plant cyanogenesis of *Phaseolus lunatus* and its relevance for herbivoreplant interaction: the importance of quantitative data. J. Chem. Ecol. 31:1445-1473.
- Ballhorn D.J., Kautz S., Lieberei R.** (2010): Comparing responses of generalist and specialist herbivores to various cyanogenic plant features. Entomol. Experimen. Appl., 134: 245-259.
- Baran H., Schwedt G.** (1993) HPLC-Analytik von ethanolischen Eichenholzextrakten mit UV-, Fluoreszenz- und amperometrischer Detektion. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 196(4):370-374.
- Battaglia R., Conacher H.B.S., Page B.D.** (1990) Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. Food Addit. Contam. 7:477-496.
- Bauman U., Zimmerli B.** (1986) Beschleunigte Ethylcarbamatbildung in Spirituosen. Schweiz. Z. Obst Weinb. 122(21):602-607.
- Bauman U., Zimmerli B.** (1987) Origin and mechanism of formation of ethyl carbamate in stone fruit brandies (in German). Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 78(3-4):317-324.
- Baumann U., Zimmerli B.** (1988) Accelerated formation of ethyl carbamate in spirits. Mitt. Geb. Lebensm. Hyg. 22:175-185.
- Bauza T., Blaise A., Daumas F., Cabanis J.C.** (1995) Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. J. Chrom. A. 707:373-379.
- Beattie J.K., Polyblank G.A.** (1995) Copper-catalysed oxidation of cyanide by peroxide in alkaline aqueous solution. Aust. J. Chem. 48:861-868.

- Beland F.A., Benson W.R., Mellick P.W., Kovatch R.M., Roberts D.W., Fang J.-L., Doerge D.R.** (2005) Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. *Food Chem. Technol.* 43:1-19.
- Bely M., Sablayrolles J.M., Barre P.** (1990) Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferm. Bioeng.* 70:246-252.
- Bertrand A.** (1993) Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin in Roger Cantagrel Editor, *E' laboration et Connaissance des Spiritueux, Recherche de la qualite', tradition et innovation*, BNIC, diffusion Tec et Doc Lavoisier Paris, pp. 278-289, cyt. wg Weber i Sharypov, 2009.
- Bialek M., Rutkowska J., Hallmann E.** (2012) *Aronia czarnoowocowa (Aronia melanocarpa)* jako potencjalny składnik żywności funkcjonalnej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 6 (85):21-30.
- Boscolo M.** (2001) Caramelo e carbamato de etila em aguardente de cana. Ocorrência e quantificação, Doctor Thesis, Instituto de Química de São Carlos, USP, São Paulo. cyt. wg Bruno i in. (2007).
- Boulton R.** (1993) The formation of ethyl carbamate from isocyanate and ethanol at elevated temperature, in Roger Cantagrel Editor, *E' laboration et Connaissance des Spiritueux, Recherche de la qualite', tradition et innovation*, BNIC, diffusion Tec et Doc Lavoisier Paris, pp. 479, cyt. wg Weber i Sharypov, 2009.
- Bromley J., Hughes B.G., Leong D.C., Buckley N.A.** (2005) Life-threatening interaction between complementary medicines: cyanide toxicity following ingestion of amygdalin and vitamin C. *Ann. of Pharmacother.* 39(9), 1566-1569.
- Bruno S.N.F., Vaitsman D.S., Kunigami C.N., Brasil M.G.** (2007) Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. *Food Chem.* 104(4):1345-1352.
- Butzke C.E., Bisson L.F.** (1997) Ethyl carbamate preventative action manual, US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. US, Food and Drug Administration, Washington;
<http://www.Fooda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/EthylCarbamateUrethane/ucm078546.htm>
- Bylka W., Matlawska I., Pilewski N.A.** (2004) Natural flavonoids as antimicrobial agents. *JANA.* 7(2):9-16.
- Cameán A.M., Moreno I., López-Artíguez M., Repetto M., Gonzalez A.G.** (2001) Differentiation of Spanish brandies according to their metal content. *Talanta* 54(1):53-59.
- Canas B.J., Diachenko G.W., Nyman P.J.** (1997) Ethyl carbamate levels resulting from azodicarbonamide use in bread. *Food Addit. Contam.* 14(1):89-94.
- Carley A.F., Chinn M., Parkinson C.** (2003) Adsorption and reaction of $CN + O = OCN$ on Cu (100) surface: a density functional theory study. *Surf. Sci.* 537:64-74.
- Carrasco P., Pérez-Ortín J.E., del Olmo M.** (2003) Arginase activity is a useful marker of nitrogen limitation during alcoholic fermentations. *System Appl. Microbiol.* 26(3):471-479.

- Cha S.W., Gu H.K., Lee K.P., Lee M.H., Han S.S., Jeong T.C.** (2000) Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. *Toxicol. Lett.* 115(3):173-181.
- Chan P.Y., Cossins E.A.** (1972) Regulation of arginase levels by urea and intermediates of the Krebs-Henseleit cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 19(4):335-339.
- Christoph N., Schmitt A., Hildenbrand K.** (1986) Untersuchungen zur Bildung und zum Destillationsverhalten von Äthylcarbamat bei der Branntweinherstellung. *Alk. Ind.* 15:347-354.
- Christoph N., Schmitt A., Hildenbrand K.** (1987) Ethylcarbamat in Obstbranntweinen. *Alk. Ind.* 100(16): 342 -347.
- Christoph N., Schmitt A., Hildenbrand K.** (1988) Ethylcarbamat in Obstbranntweinen. *Alk. Ind.* 101(15):342-347, 101(16):369-374.
- Christoph N., Bauer-Christoph C.** (1998) Massnahmen zur Reduzierung des Ethylcarbamates bei der Herstellung von Steinobstbränden (I). *Kleinbrennerei* 50:9-13.
- Christoph N., Bauer-Christoph C.** (1999) Maßnahmen zur Reduzierung des Ethylcarbamatgehaltes bei der Herstellung von Steinobstbränden. Teil II *Kleinbrennerei* 51:5-9.
- Cipollone R., Ascenzi P., Frangipani E., Visca P.** (2006) Cyanide detoxification by recombinant bacterial rhodanese. *Chemosphere* 63:942-949.
- Conacher H.B.S., Page B.D.** (1986) Ethyl carbamate in alcoholic beverages: A Canadian case history. *Proceedings of Euro Food Tox. II, European Society of Toxicology, Schwerzenbach, Switzerland.* pp. 237-242.
- Conacher H., Page B.D., Lau B.P., Lawrence J.F., Bailey R., Calway P., Hanchay J.P., Mori B.** (1987) Capillary gas chromatographic determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with confirmation by GC/MS. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70(4):749-751.
- Daudt C.E., Ough C.S., Stevens D., Herraiz T.** (1992) Investigations into ethyl Carbamate, *n*-propyl carbamate, and urea in fortified wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(4):318-322.
- Davis R.H.** (1986) Arginine Pathways of *N. crassa* and *S. cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 50(3):285-288.
- Delledonne D., Rivetti F., Romano U.** (2001) Developments in the production and application of dimethyl- carbonate. *Appl. Catal. A: General* 221(1-2):241-251.
- Dennis M.J., Howarth N., Key P.E., Massey R.C.** (1986) Investigation of ethyl carbamate levels in some fermented foods and alcoholic beverages. *Food Add. Contam.* 6:383-389.
- Dennis M.J., Howarth N., Key P.E., Pointer M., Massey R.C.** (1989) Investigation of ethyl carbamate levels in some fermented foods and alcoholic beverages. *Food Add. Contam.* 6:383-389.

- Dennis M.J., Massey R.C., Ginn R., Willems P., Crews C., Parker I.** (1997) The contribution of azodicarbonamide to ethyl carbamate formation in bread and beer. *Food Addit. Contam.* 14(1):101-108.
- Deutsch J.C.** (1998) Ascorbic acid possesses labile oxygen atoms in aqueous solution. *J. Chrom.* 802:385-390.
- Dijkstra Z.J., Doornbos A.R., Weyten H., Ernsting J.M., Elsevier C.J., Keurentjes J.T.F.** (2007) Formation of carbamic acid in organic solvents and in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 41(1):109-114.
- DOU (2005) Diário Oficial da União, No. 124, Instrução Normativa No. 13 de 29 de junho de 2005, que aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Brazil: Ministério da Agricultura.
- Dürr P.** (1992) 1er Symposium scientifique international de cognac, Lavoisier-Tec & Doc, Paris, France, 328-329.
- EFSA (2007) Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. Scientific opinion of the panel on contaminants. *EFSA J.* 551:1-44.
- Eicher R., Bouchard E., Tremblay A.** (1999) Cow level sampling factors affecting analysis and interpretation of milk urea concentrations in 2 dairy herds. *Can. Vet. J.* 40(7):487-492.
- Epstein J.** (1947) Estimation of microquantities of cyanide. *Anal. Chem.* 19(4):272-274.
- European Commission (1998) Council Directive 98/81/EC of 26 October 1998 amending Directive 90/219/EEC on the contained use of genetically modified microorganisms, Off. J. Eur. Union vol. L330:13-31.
http://www.biosafety.be/PDF/98_81.pdf
- European Commission (2010) Commission recommendation of 2 March 2010 on the prevention and reduction of ethyl carbamate contamination in stone fruit spirits and stone fruit marc spirits and on the monitoring of ethyl carbamate levels in these beverages, Off. J. Eur. Union, vol. L52:53-57.
- European Commission health and consumer protection directorate general Directorate C, Scientific Opinions (2003) C2, Management of scientific committees: scientific co-operation and networks. Scientific Committee on Food SCF/CS/PM/GEN/M95 Final Opinion of the Scientific Committee on Food on the 23rd additional list of monomers and additives for food contact materials. cyt. wg Weber i Sharypov, 2009.
- Famuyiwa O.O., Ough C.S.** (1991) Modification of acid urease activity by fluoride ions and malic acid in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(1):79-80.
- FAO/WHO (2005) Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (WHO Food Additives Series 30) World Health Organisation, Geneva. WHO Tech. Rep. Ser. 928:1-47.
http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_report_64_final.pdf.

- FAO/WHO (2006) Safety evaluation of certain contaminants in food. Prepared by the Sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) FAO Food Nutr. Pap. 82:1-778.
- Faria J.B., Loyola E., Lopes M.G., Dufour J.P.** (2003) Cachaca, pisco and tequila. In A.G.H. Lea, J.R. Piggott (Org.). Fermented beverage production (2nd ed.), New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 335-363.
- Ferreira V., Escudero A., Purificación F., Cacho J.F.** (1997) Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process Z. Lebensm. Unters. Forsch. 205(5): 392-396.
- Ferreras D., Fernández E., Falqué E.** (2002) Effects of oak wood on the aromatic composition of *Vitis vinifera* L. var. *treixadura* wines. Food. Sci. Technol. International 8(6):343-349.
- Fidaleo M., Esti M., Moresi M.** (2006) Assessment of urea degradation rate in model wine solutions by acid urease from *Lactobacillus fermentum*. J. Agric. Food Chem. 54:6226-6235.
- Fischer G., Geith J., Klapötke T.M., Krumm B.** (2002) Synthesis, properties and dimerization study of isocyanic acid. Z. Naturforsch. 57b:19-24.
- Food Safety: from the Farm to the Fork. Opinion on the use of urease prepared from *Lactobacillus fermentum* in wine production (expressed on 10 december 1998). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out19_en.html
- Fox N.J., Stachowiak G.W.** (2007) Vegetable oil-based lubricants – a review of oxidation. Tribology Int. 40(7):1035-1046.
- Francis P.S., Lewis S.W., Lim K.F.** (2002) Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. Trends Anal. Chem. 21(5):389-400.
- Fujinawa S., Todoroki H., Ohashi N., Toda J., Terasaki. M.** (1990) Application of an acid urease to wine: determination of trace urea in wine. J. Food Sci. 55(4):1018-1022, 1038.
- Ghasemi M.F., Bakhtiari M.R., Fallahpour M., Noohi A., Moazami N., Amidi Z.** (2004) Screening of urease production by *Aspergillus niger* strains. Iran. Biomed. J. 1:47-50. [<http://ibj.pasteur.oc.ir/ibj21/html/bakhtiari.htm>]
- Gotor V.** (1999) Non-conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. Bioorg. Med. Chem. 7(10):2189-2197.
- Guan S., Pieper H.J.** (1999) Einfluss der in Obstbrennereien variierten Destillationsverfahren auf die flüchtigen Inhaltsstoffe im Destillat unter besonderer Berücksichtigung der Nachlaufkomponenten. Dtsch. Lebensm. Rundsch. 1:1-7.
- Guerain J., Leblond N.** (1993) Formation du carbamate d'éthyle et élimination de l'acide cyanhydrique des eaux-de-vie de fruits à noyaux in Roger Cantagrel Editor, Élaboration et Connaissance des Spiritueux, Recherche de la qualité, tradition et innovation, BNIC, diffusion Tec et Doc Lavoisier Paris, pp. 330-338.
- Guidelines** for selection and use of anesthetics and sedatives. (2003) Irvine. University of California <http://www.rgs.uci.edu/ular/usofanesthetics.htm>

- Hach Company (2000) Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater. Metody nr: 8027 (Oznaczanie zawartości cyjanków), 8506 (Oznaczanie zawartości miedzi).
- Haque R.M., Bradbury J.H.** (2002) Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chem.* 77(1):107-114.
- Haynes, W.M., Lide D.R., Bruno T.J.** (2012) Handbook of Chemistry and Physics, 93th edition, CRC Press, pp. 577.
- Hasnip S., Crews C., Potter N., Christy J., Chan D., Bondu T., Matthews W., Walters B., Patel K.** (2007) Survey of ethyl carbamate in fermented foods sold in the United Kingdom in 2004. *Agric. Food Chem.* 55:2755-2759.
- Henschke P.A., Jiranek V.** (1991) Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape must. w: Rantz J., ed. Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wine; Washington, USA. Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture, pp. 172-184.
- Henschke P.A., Jiranek V.** (1993) Yeast-metabolism of nitrogen compounds. w Fleet G.H. ed. Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, Switzerland, pp.77-164.
- Hernandez Lya G., Forkert P.-G.** (2007a) Inhibition of vinyl carbamate-induced mutagenicity and clastogenicity by the garlic constituent diallyl sulfone in F1 (Big Blue x A/J) transgenic mice. *Carcinogenesis* 28(8):1824-30.
- Hernandez L.G., Forkert P.-G.** (2007b) In vivo mutagenicity of vinyl carbamate and ethyl carbamate in lung and small intestine of F1 (Big Blue1 3 A/J) transgenic mice. *Int. J. Cancer* 120:1426-1433.
- Hernandez L.G., Forkert P.-G.** (2009) Inhibition of vinyl carbamate-induced lung tumors and Kras2 mutations by the garlic derivative diallyl sulfone. *Mut. Res.* 662(1-2):16-21.
- Hesford F., Schneider K.** (2001) Validation of a simple method for the determination of ethyl carbamate in stone fruit brandies by GC–MS. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 92(3):250-259.
- Hirakawa K., Midorikawa K., Oikawa S., Kawanishi S.** (2003) Carcinogenic semicarbazide induces sequence-specific DNA damage through the generation of reactive oxygen species and the derived organic radicals. *Mut. Res./Genetic Toxic. Environ. Mutagen.* 536(1-2):91-101.
- Hoffler U., Ghanayem B.I.** (2005) Increased bioaccumulation of urethane in CYP2E1 -/- versus CYP2E1 +/- mice. *Drug Metab. Dispos.* 33:1144-1150.
- IARC (1974) Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man. Some antithyroid and related substances, nitrofurans and industrial chemicals, vol. 7. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 111-140.
- IARC (2007) Vol. 96: Alcoholic Beverage Consumption and Ethyl Carbamate (Urethane) 6-13 February 2007 1-5. World Health Organization, Lyon, France. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/vol96-summary.pdf>

- IUBMB Biochemical Nomenclature (2013) Last update 24 May, 2013.
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- Iwouno J.O., Victory I.** (2013) Prevalence of ethyl carbamate in spirits from different sources. *Afr. J. Food Sci. Technol.* 4(2):25-28.
- Jarosz K.** (1989) Starka – szlachetny wyrób z tradycjami. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 33(7):25-26.
- van Jaarsveldt F.P., S. Hattingh** (2012) Rapid induction of ageing character in brandy products. Ageing and general overview. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 33(2):225-252.
- Jäger P.** (1986) Praktische Hinweise zur Maischarbeit und Destillation für Obstbrennerei. *Mitt. Versuchsst. Gärungsgew.* 7-8:82-83.
- JECFA (2006) FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations/World Health Organisation). Safety evaluation of certain contaminants in food. Prepared by the Sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives FAO. *Food Nutr. Pap.* 82:1-778.
- Joint FAO/WHO (2007), JECFA – Joint FAO/WHO Food Standards Programme (2007) Codex committee on contaminants in foods, Beijing, China, 16-20 April 2007, cyt. wg Weber i Sharypov, 2009.
- Joint FAO/WHO (2009) Codex alimentarius commission E; Codex committee on contaminants in foods. Discussion paper on ethyl carbamate in alcoholic beverages. Rotterdam, the Netherlands, 23-27 March 2009.
- Jones R., Greenfield P.** (1884) A review of yeast ionic nutrition. Growth and fermentation requirements. *Proc. Biochem.* 19:48-60.
- Jung O.** (2004) Destillation von Obstmaischen. *Obst & Garten*, 12:452-455.
- Jung G., Adam L.** (2005) Wissenschaftliche Unterstützung der Qualitätsproduktion. Ethylcarbamat – so vermeiden Sie Beanstandungen. *Die Kleinbrennerei* 8:4-6.
- Kakimoto S., Sumino Y., Akiyama S., Nakao Y.** (1989) Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillum reuteri* *Agric. Biol. Chem.* 53(4):1119-1125.
- Kakimoto S., Sumino Y., Kawahara K., Yamazaki E., Nakatsui I.** (1990a) Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32(5):538-543.
- Kakimoto S., Miyashita H., Sumino Y., Akiyama S.** (1990b) Properties of acid ureases from *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains. *Agric. Biol. Chem.* 54(2):381-386.
- Kaufman T., Tuor A., Doerig H.** (1993) Studies on the production of light-stable stone-fruit brandies with reduced urethane content. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 84:173-184.
- Kim Y.K.L., Koh E., Chung H.J., Kwon H.** (2000) Determination of ethyl carbamate in some fermented Korean foods and beverages. *Food Add. Cont.* 17:469-475.

- Kitamoto K., Oda K., Gomi K., Takahashi K.** (1991) Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(1):301-306.
- Kitamoto K., Oda-Miyazaki K., Gomi K., Kumagai C.** (1993) Mutant isolation of non-urea producing sake yeast by positive selection. *J. Ferment. Bioeng.* 75(5):359-363.
- Knight A.P., Walter R.G.** (2001) A guide to plant poisoning to animals in North America. Teton NewMedia, Jackson, USA: 1-2.
- Kobashi K., Takebe S., Kobayashi T., Honda S., Mishima H.** (1990) Method of producing acid urease and the use of the urease. U S Patent no. 4970153.
- Kodama S.** (1996) Optimal conditions for effective use of acid urease in wine. *J. Food Sci.* 61(3):548-552.
- Kogyo K.H.** (2002) Mixed fruit juice alcoholic beverage production – including removing copper by treating with substance binding with copper or absorbing copper. Patent no. JP3310382-B2.
- Konarska L., Tomaszewski L.** (1986) A simple quantitative micromethod of arginase assay in blood spots dried on filter paper. *Clin. Chim. Acta* 154:7-17.
- Konopacka M.** (2004) Rola witaminy C w uszkodzeniach oksydacyjnych DNA. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 58: 343-348. www.phmd.pl/fulltxt.php
- Kraujalyte V., Venskutonis R., Leitner E.** (2011) Volatile and odour active compounds in chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *Pol. J. Food. Nutr. Sci.*, 2011, 61, Suppl. 1, Conference proceedings: Euro Food Chem XVI „Translating food chemistry into health benefits”, Gdańsk 6 -8th July, p. 140.
- Krell U.** (1999) Die Kalkulation des Verkaufspreises von Obstbränden unter besonderer Berücksichtigung der Produktionsbedingungen einer Obstabfindungsbrennerei. *Die Branntweinwirtschaft* 139(2):17-25.
- Krelowska-Kulas M.** (1993) Badanie jakości produktów spożywczych. PWE Warszawa, pp. 218, 267-272.
- Kulling S.E., Rawel H.M.** (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.* 74(13):1625-1634.
- Lachenmeier D.W., Schehl B., Kuballa T., Fank W., Senn T.** (2005) Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits. *Food Addit. Contam.* 22(5):397-405.
- Lachenmeier D.W.** (2007) Folgerungen der IARC-Neubewertungen von alkoholischen Getränken und Ethylcarbamat für Lebensmittelüberwachung. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 103(7): 307-311.
- Larsen J.C.** (2006) Risk assessment of chemicals in European traditional foods. *Trends Food Sci. Technol.* 17(9):471-481.
- Laugel P., Bindler F.** (1993) Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de fruits à noyaux, in Roger Cantagrel Editor, *E' laboration et Connaissance des Spiritueux*,

- Recherche de la qualite, tradition et innovation, BNIC, diffusion Tec et Doc Lavoisier, pp. 290-295.
- LCBO (Liquor Control Board of Ontario) (2006) Information supplied by the Liquor Control Board of Ontario, LCBO Corporate Communications, 55 Lake Shore Boulevard, East Toronto, ON M5E 1A4, cyt. wg EFSA J. 551:1-44.
- Lee K.-G.** (2013) Analysis and risk assessment of ethyl carbamate in various fermented foods. *Eur. Food Res. Technol.* 236(5):891-898.
- Lehman H.** (1990) Die Aroniabeere und ihre Verarbeitung. *Flüss. Obst.* 57(11):746-752.
- Lei V., Kofi W., Amoa-Awua A., Brimer L.** (1999) Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 53:169-184.
- Lewis W.H., Elvin-Lewis M.P.F.** (2003) Medical botany: plant affecting human health. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, p. 71.
- Liu S.-Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G.J.** (1994) Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *Am. J. Enol. Vitic.* 45:235-242.
- Liu S.-Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G.J.** (1995) Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:310-316.
- Liu S.-Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G.J.** (1996) Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginaseurease pathway? *J. Appl. Bacteriol.* 81:486-492.
- Ljekocevič M.** (1993) Effects of stone fruit species and cultivars on potential content of prussic acid and benzaldehyde in brandies. *Rev. Res. Work Fac. Agric.* 38(2):119-126.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randell L.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-268.
- Lurton L., Vidal J.P., Estreguil S., Cantagrel R.** (1993) Comportement du carbamate d'e'thyle lors de la distillation des vins pour l'obtention des eaux-de-vie de Cognac in Roger Cantagrel Editor, E 'laboration et Connaissance des Spiritueux, Recherche de la qualite', tradition et innovation, BNIC, diffusion Tec et Doc Lavoisier Paris, pp. 344-349.
- Madej E., Grzęda M.** (2000) Właściwości, niedobór i zakres zastosowań witaminy C w lecznictwie zwierząt *Med. Wet.* 56 (10):627-631.
- Madrera R.R., Valles B.S.** (2009) Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD. *Food Contr.* 20:139-143.
- Malinowski H.** (2008) Strategie obronne roślin drzewiastych przed szkodliwymi owadami. *Leśne Prace Badawcze (Forest Res. Pap.)* 69(2):165-173.

- Matsudo T., Aoki T., Abe K., Fukuta N., Higuchi T., Sasaki M., Uchida K.** (1993) Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. *J. Agric. Food Chem.* 41(3):352-356.
- Matthews A., Grimaldi A., Walker M., Bartowsky E., Grbin P., Jiranek V.** (2004) Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10):5715-5731.
- Meng J., Fang Y., Gao J., Zhang A., Liu J., Guo Z., Zhang Z., Li H.** (2011) Changes in aromatic compounds of cabernet sauvignon wines during ageing in stainless steel tanks. *Afric. J. Biotechnol.* 10(55):11640-11647.
- Messenguy F., Vierendeels F., Scherens B., Dubois E.** (2000) In *Saccharomyces cerevisiae*, expression of arginine catabolic genes CARI and CARI, in response to exogenous nitrogen availability is mediated by the Ume6 (CargRI)-Sin3 (CargRII)-Rpd3 (CargRIII) complex. *J. Bacteriol.* 182:3158-3164.
- Mildau G., Preuss A., Frank W., Heering W.** (1987) Ethylcarbamate (Urethane) in alkoholischen Getränken. Verbesserte Analyse und lichtabhängige Bildung. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 3:69-74.
- Millery A., Duteurtre B., Boudaille J.P., Maugean A.** (1986) Differentiation des trios cépages champenois à partir de l'analyse des acides aminés libres des mouts des récoltes 1983 et 1984. *Rev. Franc. Oenol.* 26:32-50.
- Miyagawa K., Sumida M., Nakao M., Harada M., Yamamoto H., Kusumi T., Yoshizawa K., Amachi T., Nakayama T.** (1999) Purification, characterization and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*. *J. Biotechnol.* 68(2-3):227-236.
- Mobley H.L., Island M.D., Hausinger R.P.** (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59(3):451-480.
- Modi D.R., Garg S.K., Johri B.N.** (1998) Comparative behaviour of yeast strains for ethanolic fermentation of culled apple juice. *Indian J. Experiment. Biol.* 36(7):728-731.
- Monteiro F., Bisson L.F.** (1991) Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42:199-208.
- Monteiro F., Bisson L.F.** (1992) Nitrogen supplementation of grape juice. I. Effect on amino acid utilization during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 43:1-10.
- Mosedale J.R.** (1995) Effects of oak wood on the maturation of alcoholic beverages with particular reference to whisky. *Forestry* 68(3):203-230.
- Mulder P.P.J., Beumer B., Van Rhijn J.A.** (2007) The determination of biurea: a novel method to discriminate between nitrofurazone and azodicarbonamide use in food products. *Anal. Chim. Acta* 586(1-2):366-373.
- Muller C.J., Fugelsang K.C.** (1996) 3a,6a-Dimethylglycoluril, the product of the interaction of urea and diacetyl, as a source of post-bottling ethyl carbamate in wine. *CATI Bull.* 960502.
<http://cati.csufresno.edu/VERC/rese/96/960502/index.html>

- Muñoz F., Schuchmann M.N., Olbrich G., von Sonntag C.** (2000) Common intermediates in the OH-radical-induced oxidation of cyanide and formamide. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*:655-659.
- Nagato L.A.F., Silva O.A., Yonamine M., Penteado M.V.C.** (2000) Quantitation of ethyl carbamate by gas chromatography and mass spectrometric detection in distilled spirits. *Alimentaria* 311:31–36.
- Neves E.A., Oliveira A., Fernandes A.P., Nobrega J.A.** (2007) Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. *Food Chem.* 101(1):33-36.
- Niedźwiedz-Siegień I.** (1998) Cyanogenic glucosides in *Linum usitatissimum*. *Phytochem.* 49:59-63.
- Niedźwiedz-Siegień I., Gierasimiuk A.** (2001) Environmental factors affecting the cyanogenic potential of flax seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 23:383-380.
- Nielepkowicz-Charczuk A., Kalużka S.** (1996) Wpływ warunków leżakowania spirytusu śliwkowego na zawartość w nim związków karbonylowych. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 3:15-17.
- Nielepkowicz-Charczuk A., Balcerek M., Koper A.** (1998) Dobór warunków leżakowania spirytusu mandarynkowego. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 8:34-37.
- Nowicki Z.** (1999) Alkohole mocne i ich klasyfikacja cz. IV. *Rynki alkohol.* 11:28-30.
- Nóbrega I.C.C., Pereira J.A.P., Paiva J.E., Lachenmeier D.W.** (2009) Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane spirits): Influence of distillation and storage conditions. *Food Chem.* 117:693-697.
- de Orduña M.R., Liu S.-Q., Patchett M.L., Pilone G.J.** (2000) Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 183(1):31-35.
- Oszmiański J., Wojdyło A.** (2005) *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* 221:809-813.
- Ough C.S.** (1976) Ethyl carbamate in fermented beverages and food I. Naturally occurring ethyl carbamate. *J. Agric. Food Chem.* 24(2):323-328.
- Ough C.S.** (1976a) Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. II Possible formation of ethylcarbamate from diethyl dicarbonate addition to wine. *J. Agric. Food Chem.* 24(2):328-331.
- Ough C.S., Crowell E.A., Gutlove B.R.** (1988) Carbamyl compounds reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.* 39(3):239-242.
- Ough C.S., Trioli G.** (1988) Urea removal from wine by an acid urease. *Am. J. Enol. Vitic.* 39:303-307.
- Ough C.S., Huang Z., An D., Stevens D.** (1991) Amino acid uptake by 4 commercial yeasts at different temperatures of growth and fermentation-effects of urea excretion and reabsorption. *Am. J. Oenol. Vitic.* 42(1):26-40.
- Park K.K., Liem A., Stewart B.C., Miller J.A.** (1993) Vinyl carbamate epoxide, a major strong electrophilic, mutagenic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate (urethane). *Carcinogenesis* 14:441-450.

- Park H.-D., Shin M.-Ch., Woo I.-S.** (2001) Antisense-mediated inhibition of arginase (CAR1) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biosci. Bioeng. 92(5):481-484.
- Park S.R., Ha S.D., Yoon J.H., Lee S.Y., Hong K.-P., Lee E.-H., Yeom H.-J., Yoon N.-G., Bae D.-H.** (2009) Exposure to ethyl carbamate in alcohol-drinking and nondrinking adults and its reduction by simple charcoal filtration. Food Contr. 20:946-952.
- Pasternakiewicz A., Tuszyński T.** (1997) Effect of calcium, magnesium, cobalt (II), and zinc cations on the *Saccharomyces cerevisiae* growth. Pol. J. Food Nutr. Sci. 6/47(4):61-70.
- Paterson E, Haddon A, Thomas I.A., Watkinson J.M.** (1946) Leukemia treated with urethane compared to deep X-ray therapy. Lancet I:677-683.
- Pedraza-Avella J.A., Acevedo-Peña P., Pedraza-Rosas J.E.** (2008) Photocatalytic oxidation of cyanide on TiO₂: an electrochemical approach. Catal. Today 133-135:611-618.
- Pieper H.J., Seibold R., Luz E., Jung O.** (1992) Reduction of the ethyl carbamate concentration in manufacture of Kirsch (cherry spirit). Kleinbrennerei 44:125-130.
- Pigeau G.** (2000) Characterization of wild-type and mutants ureases of the fission yeast *S. pombe*. Project Administered by dr Debra Inglis.
<http://www.bracku.ca/ccovi/res/inglis7.html>L-8k
- Pine S.H., Hendrickson J.B., Cram D.J., Hammond G.S.** (1980) Organic chemistry 4th Ed. McGraw-Hill Book, pp. 247.
- Pogorzelski E.** (1990) Glikozydy cyjanogenne, tworzenie cyjanowodoru i histaminy w procesie otrzymywania moszczów i win z jagód czarnego bzu. ZN PŁ Rozprawa habilitacyjna 597:10-11.
- Poreda A., Antkiewicz T., Tuszyński T., Makarewicz M.** (2009) Accumulation and release of metal ions by brewer's yeast during successive fermentations. J. Inst. Brew. 115(1):78-83.
- Postel W., Adam L.** (1988) Flüchtige Stoffe in deutschen Weinbränden II. Cabonylverbindungen, Acetale und Terpene. Die Branntweinwirtschaft 129(6):82-85.
- Postel W., Adam L.** (1990) Gaschromatographische Charakterisierung von Cognac und Armagnac – Gehalte an flüchtigen Verbindungen. Die Branntweinwirtschaft 131(12):208-213.
- PN-A-79529-10:2005P Napoje spirytusowe i spirytus butelkowany. Metody badań. Część 10: Oznaczanie kwasowości.
- PN-A-79529-11:2005P Napoje spirytusowe i spirytus butelkowany. Metody badań. Część 11: Oznaczanie zawartości estrów.
- PN-A-79529-7:2005P Napoje spirytusowe i spirytus butelkowany. Metody badań. Część 7: Oznaczanie zawartości alkoholu metylowego.
- PN-A-79529-8:2005P Napoje spirytusowe i spirytus butelkowany. Metody badań. Część 8: Oznaczanie zawartości fuzli.

PN-A-79529-9:2005P Napoje spirytusowe i spirytus butelkowany. Metody badań. Część 9: Oznaczanie zawartości aldehydów.

PN-A-79093-15:2000P Piwo. Metody badań. Oznaczanie zawartości dwuacetylenu i pokrewnych dwuketonów metodą spektrofotometryczną.

PN-A-79530:2001 Wyroby spirytusowe gatunkowe. Wspólne wymagania i badania.

PN-A-79523:2002P Destylat rolniczy.

Pretorius I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16(8):675-729.

Pretorius I.S. (2003) Functional Genetics of Industrial Yeasts. Chapter 4. The genetic analysis and tailoring of wine yeasts. Springer Berlin/Heidelberg Vol. 2, pp. 99-142.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 110/2008 z dnia 15 stycznia 2008 r. w sprawie definicji, opisu, prezentacji, etykietowania i ochrony oznaczeń geograficznych napojów spirytusowych oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 1576/89; OJL 39:16-54.

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 606/2009 z dnia 10 lipca 2009 ustanawiające niektóre szczegółowe zasady wykonania rozporządzenia Rady (WE) nr 479/2008 w odniesieniu do kategorii produktów winiarskich, praktyk enologicznych i obowiązujących ograniczeń. Off. J Eur. Union, L 193:1-59.

de Resende Machado A.M., Cardoso Md., Saczk A.A., dos Anjos J.P., Zacaroni L.M., Dórea H.S., Nelson D.L. (2013) Determination of ethyl carbamate in cachaça produced from copper stills by HPLC. *Food Chem.* 138(2-3):1233-1238.

Riffikin H.L., Wilson R., Howie D., Müller S. (1989) Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. *J. Inst. Brew.* 95:115-119.

Romano P. (1976) Biosynthesis of sulphur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 108:211-215.

Rostkowska-Denmer E., Wzorek W. (1998) Biochemiczne zmiany składu wina w procesie szeryzacji. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 42(6):34-38.

Saidu Y. (2004) Physicochemical features of rhodanese: a review. *Afr. J. Biotechnol.* 3(4):370-374.

Sakano K., Oikawa S., Hiraku Y., Kawanishi S. (2002) Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 33(5):703-714.

Salomon J.M., Barre P. (1998) Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by depression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3831-3837.

Saluk-Juszczak J. (2010) Antocyjany jako składnik żywności funkcjonalnej stosowanej w profilaktyce chorób układu krążenia. *Post. Hig. Med. Dośw.* 64:451-458.

Sarla M., Pandit M., Tyagi D.K., Kapoor J.C. (2004) Oxidation of cyanide in aqueous solution by chemical and photochemical process. *J. Hazard Mater.* 116(1-2):49-56.

- Satora P., Tuszyński T.** (2005) Biodiversity of yeast during plum Węgierka Zwykła spontaneous fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 43(3):277-282.
- Satora P., Tuszyński T.** (2008) Chemical characteristics of Śliwowica Łącka and other plum brandies. *J. Sci. Food Agric.* 88(1):167-174.
- Shin H.-S., Yang E.-Y.** (2012) Simultaneous determination of methylcarbamate and ethylcarbamate in fermented foods and beverages by derivatization and GC-MS analysis. *Chem. Centr. J.* 6:157.
- Schaber P.M., Colson J., Higgins S., Thielen D., Anspach B., Brauer J.** (2004) Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. *Thermochim. Acta* 424:131-142.
- Schaefer A., Küchler T., Simat T.J., Steinhart H.** (2003) Migration of lubricants from food packagings: Screening for lipid classes and quantitative estimation using normal-phase liquid chromatographic separation with evaporative light scattering detection. *J. Chrom. A* 1017(1-2):107-116.
- Schehl B.** (2005) Development of a genetically defined diploid yeast strain for the application in spirit production. Doctor Thesis, University of Hohenheim, Stuttgart.
- Schehl B., Senn T., Lachenmeier D.W., Rodicio R., Heinisch J.J.** (2007) Contribution of the fermenting yeast strain to ethyl carbamate generation in stone fruit spirits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:843-850.
- Schliessmann** Kellerei-chemie (2006) Kurzbeschreibung des CYANUREX® Verfahrens, stand 03/2007.
- Schmidt B.** (1988) Beitrag zur Herstellung von urethanarmen Steinobstbränden. *Die Branntweinwirtschaft* 2:122-125.
- Sefton M.A., Spillman P.J., Pocock K.F., Francis, I.L., Williams P.J.** (1993) The influence of oak origin, seasoning, and other industry practices on the sensory characteristics and composition of oak extracts and barrel-aged white wines. *Australian Grapegrower & Winemaker* 355:17-25.
- Sen N.P., Seaman S.W., Boyle M., Weber D.** (1993) Methyl carbamate and ethyl carbamate in alcoholic beverages and other fermented foods. *Food Chem.* 48:359-366.
- Serre V., Penverne B., Souciet J.L., Potier S., Guy H., Evans D., Vicart P., Herve G.** (2004) Integrated allosteric regulation in the *S. cerevisiae* carbamylphosphate synthetase – aspartate transcarbamylase multifunctional protein. *BMC Biochem.* 1:6-21.
- Siegień I.** (1998) Cyjanogeneza u roślin. *Post. Biochem.* 44:325-333.
- Siegień I.** (2007) Cyjanogeneza u roślin i jej efektywność w ochronie roślin przed atakiem roślinożerców i patogenów. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych* 56 (1-2):155-166.
- Sikora J., Markowicz M.** (2008) Właściwości związków biologicznie aktywnych zawartych w owocach aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa* Elliot). *Farm. Pol.* 64(17):780-785.
- Skibsted L.H.** (2000) Light-induced changes in dairy products. *Int. Dairy Fed.* 346: 4-9.

- Stevens D.F., Ough C.S.** (1993) Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *Am J. Enol. Vitic.* 44:309-312.
- Stochmal A., Oleszek W.** (1997) Changes of cyanogenic glucosides in white clover (*Trifolium repens* L.) during the growing season. *J. Agric. Food. Chem.* 45:4333-4336.
- Stoewsand G.S., Anderson J.I., Munson I.** (1991) Inhibition by wine of tumorigenesis induced by ethyl carbamate (urethane) in mince. *Food. Chem. Toxicol.* 29:291-295.
- Stodolak B., Starzyńska A., Czyszczoń M., Żyła K.** (2007) The effect of phytic acid on oxidative stability of raw and cooked meat. *Food Chem.* 101(3):1041-1045.
- Stryer L.** (2003) *Biochemia*. PWN Warszawa, pp. 446, 676-678.
- Sumrada R.A., Cooper T.G.** (1984) Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* arginase gene (CAR1) and its transcription under various physiological conditions. *J. Bacteriol.* 160:1078-1087.
- Suzuki K., Benno Y., Mitsuoka T., Takebe S., Kobashi K., Hase J.** (1979) Urease-producing species of intestinal anaerobes and their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(3):379-382.
- Suzuki K., Kamimura H., Ibe A., Tabata S., Yasuda K., Nishijima M.** (2001) Formation of ethyl carbamate in umeshu (plum liqueur). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 42:354-358.
- Sybesma W., Hugenholtz J., de Vos W.M., Smid E. J.** (2006) Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. *Electron. J. Biotechnol.* 9(4), Issue of July 15, 2006. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue4/full/12/index.html>.
- Taki N., Imamura L., Takebe S., Kobashi K.** (1992). Cyanate as a precursor of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 38(6):498-505.
- Tanner H.** (1986) Anleitung zum Destillieren von Steinobstmaisichen. *Schweiz. Z. Obst Weinb.* 122:638-639.
- Tanner H., Brunner H.R., Bill R.** (1987) Zur Herstellung von urethanarmen Steinobstdestillaten. *Schweiz. Z. Obst Weinb.* 123:661-665.
- Tegmo-Larsson I.M., Spittler T.D.** (1990) Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage. *J. Food Sci.* 55(4):1166-1169.
- Trioli G., Ough C.S.** (1989) Causes for inhibition of an acid urease from *Lactobacillus fermentus*. *Am. J. Enol. Vitic.* 40(4):245-252.
- Trioli G., Paronetto L.** (1992) Relation between nitrogenous components of must and wine quality. *Vignevin* 19(1-2):29-36.
- Tundo P., Selva M.** (2002) The chemistry of dimethyl carbonate. *Acc. Chem. Res.* 35(9):706-716.
- Tuszyński T., Bachman B.** (1981) Cherry distillates Part I. The effect of various yeast strains on the composition of distillates obtained from fermented cherries. *Acta Aliment. Polon.* 7:157-168.

- Tuszyński T.** (1990) Fizyczne, chemiczne i biotechnologiczne aspekty występowania metanolu w moszczach i destylatach owocowych. Rozprawa habilitacyjna. ZN AR im. H. Kołłątaja w Krakowie.
- Tuszyński T., Kwiecień A.** (1993) Karbaminian etylu (uretan) – niepożądany składnik napojów alkoholowych. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 5:4-7.
- Tuszyński T., Pasternakiewicz A.** (2000) Bioaccumulation of metal ions by yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 9/50(4):31-39.
- Tuszyński T.** (2001) Effect of metal ions on the selected characteristics of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 10/51(2):11-18.
- Tuszyński T., Satora P.** (2003) Microbiological characteristics of the Węgierka Zwykła plum orchard in submontane region. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 12/53(2):43-48.
- Uthurry C.A., Varelao F., Colomoa B., Suárez Lepea J.A., Lombardero J., García del Hierro J.R.** (2004) Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chem.* 88:329-336.
- Uthurry C.A., Suárez Lepe J.A., Lombardero J., García Del Hierro J.R.** (2006) Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chem.* 9(2):262-270.
- Vahl M.** (1993) A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark. *Food Add. Contam.* 10(5):585-592.
- Valero E., Mauricio J.C., Milan M.C., Ortega J.M.** (1999) Changes in the urea content of wine under different fermentation and aging conditions by two *Saccharomyces cerevisiae* races. *Biotechnol. Lett.* 21(6):555-559.
- Verstrepen K.J., Chambers P.J., Pretorius I. S.** (2006) Yeasts in food and beverages. The development of superior yeast strains for the food and beverage industries: challenges, opportunities and potential benefits. Springer Berlin /Heidelberg, pp. 399-444.
- Voldřich M., Kyzlink V.** (1992) Cyanogenesis in canned stone fruits. *J. Food Sci.* 57(1):161-162, 189.
- VROM** (2005), Verantwoord en zorgvuldig vereenvoudigen van het Besluit genetically modified organismen, Brief van de staatssecretaris van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Tweede Kamer, vergaderjaar 2005-2006, 27 428, no. 69, 21 november 2005.
www.vrom.nl/get.asp?file=docs/kamerstukken/Fri2Dec20051107500100/vereenvoudigingbesluitGMOAnnex.pdf
- Vetter J.** (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicol.* 38:11-36.
- Walker G.M.** (1996) Magnesium, calcium and fermentative metabolism in industrial yeast. *Am. Soc. Brew. Chem.* 54:13-18.
- Wang D., Yang B., Zhai X., Zhou L.** (2007) Synthesis of diethyl carbonate by catalytic alcoholysis of urea. *Fuel Proc. Technol.* 88(8):807-812.
- Weber J.V., Sharypov V.I.** (2009) Ethyl carbamate in food and beverages. *Environ. Chem. Lett.* 7:233-247.

- Weltring A., Rupp M., Arzberger U., Rothenbücher L., Koch H., Sproll C., Lachenmeier D.W.** (2006) Ethylcarbamate: Auswertung von Fragebögen zur Erhebung von Steinobstbränden bei Kleinbrennereien. Dtsch. Lebensm. Rundsch. 102(3): 97-101.
- Whitney P.A., Magasanik B.** (1973) The induction of arginase in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 17:6197-6202.
- Wiemken A., Durr M.** (1974) Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 101:45-57.
- Wolski T., Kalisz O., Prasal M., Rolski A.** (2007) Aronia czarnoowocowa – *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot – zasobne źródło antyoksydantów. Postępy Fitoterapii 3:145-154.
- Woo I.-S., Kim I.-H. M., Yun U.-J., Chung S.-K., Rhee I.-K., Choi S.-W.** i in.(2001) An improved method for determination of ethyl carbamate in Korean traditional rice wine. J. Ind. Microb. Biotechnol. 26:363-368.
- Wucherpennig K., Clauss E., Konja G.** (1987) Formation of ethyl carbamate in alcoholic beverages based on the maraschino cherry. Dtsch. Lebensm. Rundsch. 83:344-349.
- Wucherpennig K.** (1992) Removing iron and copper ions out of beverages by means of selective complexing agents. Part 2. Factors affecting heavy-metal bonding to chelon resins. Dtsch. Lebensm. Rundsch. 88:313-317.
- Wzorek W., Pogorzelski E.** (1998) Technologia winiarstwa owocowego i gronowego. Sigma NOT Warszawa, pp. 40, 136.
- Yamazaki E., Kurasawa T., Kakimoto S., Sumino Y., Nakatsui I.** (1990) Characteristics of acid urease from *Streptococcus mitior*. Agric. Biol. Chem. 54(9):2433-2435.
- Yang L.Q., Wang S.H., Tian Y.P.** (2010) Purification, properties and application of a novel acid urease from *Enterobacter* sp. Appl. Biochem. Biotechnol. 160(2):303-313.
- Zagrobelny M., Bak S., Rasmussen V., Jorgensen B., Naumann C.M.** (2004) Cyanogenic glycosides and plant-insect interactions. Phytochem. 65:293-306.
- Zietsman A., Viljoen M.** (2000) Preventing ethyl carbamate formation in wine. Department of Microbiology. University of Stellenbosch.
<http://www.wynboer.co.za/recentaricles/1200ethyl.php3>
- Zietsman A., Viljoen M., van Vuuren H.** (2000) Preventing ethyl carbamate formation in wine. Wine Land South Africa 12:83-85.
- Zimmerli B., Schlatter J.** (1991) Ethyl carbamate: Analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. Mut. Res. 259:325-350.
- Zotta T., Ricciardi A., Parente E.** (2007) Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from cornetto di matera sourdoughs. Int. J. Food Microbiol. 115:165-172.
- Zotta T., Ricciardi A., Rossano R., Parente E.** (2008) Urease production by *Streptococcus thermophilus*. Food Microbiol. 25:113-119.

8. SUMMARY

ETHYL CARBAMATE AND ITS PRECURSORS IN FRUIT DISTILLATES

Ethyl carbamate (EC), referred to as urethane, is an undesirable component of fermented foodstuffs and alcoholic beverages due to its probable carcinogenic effects on humans (IARC, 2007). The risk of increased EC concentrations occurs especially in spirits (okovita, brandy) composed from distillates derived from fruit containing cyanogenic glycosides.

The aim of this study was to determine the effect of pretreatment of fruit, enzymatic activities of yeast strains, fermentation conditions, selected fermentation by-products, products of hydrolysis of cyanogenic glycosides as well as technique and parameters of distillation and maturation of fruit distillates on ethyl carbamate formation. The experiments were conducted using following raw materials: plums (Węgierka Zwykła and Łowicka) and aronia berries (*Aronia melanocarpa* Elliot) acknowledged as a very interesting raw material in the production of distillates (Balcerek and Szopa, 2001, 2002, 2005a).

The analysis of chemical composition of processed fruit revealed the presence of ethyl carbamate precursors in the form of cyanogenic glycosides (amygdalin) both in plums (especially in seeds) and in aronia berries. The highest rate of hydrocyanic acid liberation during fermentation of fruit mashes was observed in the initial phase of the process, while the synthesis of ethyl carbamate took place in the final phase of fermentation. Pasteurization of fruit pulp inactivated partly enzymes catalyzing hydrolysis of cyanogenic glycosides and resulted in a decrease in hydrocyanic acid (HCN) content in obtained distillates (between 38% in plum distillates and 47% in aronia distillates) without affecting their taste and aroma. The selectively acting pectolytic preparations (PEKTOZYME™ POWERMash) improved the dynamics and efficiency of fermentation without an increase in the content of HCN and EC in obtained distillates. Supplementation of mashes with a preparation containing ammonium salt, amino acids, vitamins and mineral compounds assured proper growth and fermentation activity of yeast and led to obtaining distillates with ethyl carbamate content less than 0,4 mg/L. Differences in the chemical composition of fruit indicated a need of the addition of an individual dose of nutrient for yeast before fermentation. The reduction of acidity of fruit pulp intensified hydrocyanic acid liberation in plum and aronia mashes, while fermentation at 18-20°C favored a limitation of ethyl carbamate synthesis.

Enzymatic activities of selected wine yeast (*S. cerevisiae*: *Burgund*, *Bordeaux*, *Steinberg*, *Syrena*, *Tokay* and *S. bayanus*) towards a biosynthesis of enzymes which catalyze synthesis, liberation or hydrolysis of ethyl carbamate precursors was tested. Under conditions of limited access of oxygen enzymatic activities of carbamoyl phosphate synthase I (EC 6.3.4.16) and carbamoyl phosphate synthase II (EC 6.3.5.5) not exceeding ca. 45×10^{-3} U/mg protein, and

ca. 92×10^{-3} U/mg protein, respectively, had no effect on the synthesis of ethyl carbamate. Low specific activity of arginase (EC 3.5.3.1) of tested yeast strains ($1,42 \div 3,00$ U/mg protein), with the exception of Steinberg strain ($9,36$ U/mg protein), indicated that the strains are “safe” because of low liberation of urea from arginine to the fermentation medium.

Limited utility of chemical methods of reduction of hydrocyanic acid and ethyl carbamate in fruit mashes (especially originating from aronia berries) by treatment with copper chloride (I) or ascorbic acid was observed. The addition of these compounds to aronia mashes caused an increase in aldehydes and higher alcohols content in obtained distillates and had an adverse impact on their taste and aroma.

The ureolytic activity of *Lactobacillus fermentum* bacteria added to fruit mashes in the final phase of fermentation caused a decrease in urea content varying between $49 \div 59\%$ in aronia mashes and $73 \div 80\%$ in plum mashes. The reduction of urea did not cause the elimination of ethyl carbamate in distillates derived from fruit containing cyanogenic glycosides. In this case, the technological treatment should be centered on the reduction of hydrocyanic acid which was identified as a major reason of an increase in ethyl carbamate content in tested fruit distillates.

The presence of diacetyl in fermentation medium intensified synthesis of urethane from hydrocyanic acid, both at the stage of fermentation and distillation. The high susceptibility to the production of ethyl carbamate was revealed by copper cyanide and potassium cyanate. The presence of benzaldehyde as well as a decrease in pH of ethanolic solutions, and an increase in ethanol concentration accelerated synthesis of ethyl carbamate.

The synthesis of significant part of ethyl carbamate, which was found in fruit distillates, took place during distillation ($82 \div 91\%$ in copper pot still, $64 \div 67\%$ in glass still).

The use of an apparatus working accordingly to the law of parallel-current flow did not provide a full separation of chemical compounds occurring in tested distillates. Conducting of distillation using an apparatus with a dephlegmation possibility (dephlegmator according to Golodetz) or a counter-current flow working apparatus (packed column with dephlegmator) ensured the separation of hydrocyanic acid in heads, and ethyl carbamate in tails. The collection of 3% of heads with a velocity on the level of $2,5$ mL/min led to obtaining a distillate with desirable taste and aroma as well as with low content of hydrocyanic acid (< 3 mg/L) and ethyl carbamate ($< 0,4$ mg/L). Ethanol content in the main fraction did not exceed 75% v/v (150 proof).

The possibility of urethane synthesis during maturation of plum and aronia distillates with dynamics dependent on conditions of aging was revealed. The accelerated maturation at 40°C was the reason in ethyl carbamate content increase in tested distillates.

Among urethanes identified in tested distillates the major compound was ethyl carbamate. Its mean concentrations in plum ($0,52 \pm 0,38$ mg/L 100% v/v) and aronia distillates ($0,63 \pm 0,55$ mg/L) did not differ statistically at the assumed significance level ($\alpha = 0,05$). Presence of other urethanes in tested distillates was not found.

Experiments carried out in the scope of this study indicated that the application of appropriate pretreatment of fruit, yeast strains with low activity of carbamoyl phosphate synthases, and arginase as well as proper conditions of fermentation, distillation, and maturation led to obtaining distillates with raw material originality and containing less than 0,4 mg EC/L. Methods of limitation of ethyl carbamate formation presented in this research work could be helpful in receiving fruit spirits with desirable sensoral quality and safe in terms of content of harmful compounds.

CHARAKTERYSTYKA ZAWODOWA AUTORKI

Dr inż. Maria Balcerek ukończyła studia na Wydziale Chemii Spożywczej Politechniki Łódzkiej (kierunek dyplomowania Technologia Spirytusu i Drożdży) w roku 1992. W latach 1992-2001 była asystentem w Zakładzie Technologii Spirytusu i Drożdży Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ. W roku 2001 uzyskała stopień doktora nauk technicznych i została zatrudniona na stanowisku adiunkta.

Obiektem jej zainteresowań naukowych jest technologia gorzelnictwa, głównie owocowego, składniki smakowo-zapachowe spirytusów naturalnych, ograniczanie zawartości związków niepożądanych (cyjanki, uretany) w procesie fermentacji alkoholowej, uszlachetnianie i dojrzewanie destylatów owocowych, nowoczesne technologie produkcji okowit uwzględniające ich przyspieszone dojrzewanie oraz poprawę stabilności fizyko-chemicznej, badania przyczyn utraty klarowności podczas przechowywania wódek naturalnych (okowit).

Jest autorką opracowania technologii otrzymywania oryginalnego spirytusu aroniowego, który jest doskonałym komponentem do produkcji naturalnej wódki owocowej (brandy) (Patent PL 213189 B1). Oferta gotowego wyrobu pn. „Aroniak” była prezentowana na targach w Veronie (2006).

Była kierownikiem i głównym wykonawcą 2 projektów badawczych (2006-2009), finansowanych przez MNiSW, dotyczących ograniczania zawartości karbaminianów i ich prekursorów w procesie otrzymywania spirytusów owocowych. W ramach tej problematyki badawczej wykonana została praca habilitacyjna. W latach 2010-2012 była również współwykonawcą 3 projektów badawczych, w tym 1 badawczo-rozwojowego. Od roku 2013 uczestniczy w realizacji projektu w ramach Programu Badań Stosowanych (I konkurs) oraz jest kierownikiem projektu realizowanego przez Konsorcjum Naukowo-Przemysłowe, w ramach II Konkursu PBS.

Dotychczasowy dorobek naukowy dr inż. Marii Balcerek obejmuje łącznie 109 pozycji, w tym 37 oryginalnych prac doświadczalnych opublikowanych w formie artykułów recenzowanych w czasopismach zagranicznych i krajowych, 4 prace przeglądowe w polskich czasopismach recenzowanych, 2 prace w czasopismach popularno-naukowych, 1 monografia, 8 rozdziałów w monografiach (7 w języku angielskim, 1 w języku polskim), 1 rozdział w podręczniku, 1 patent, 5 referatów prezentowanych na konferencjach międzynarodowych oraz 50 doniesień na konferencjach międzynarodowych i krajowych.

W ramach działalności dydaktycznej dr inż. M. Balcerek opracowała programy wykładów dla kierunku Biotechnologia (studia I i II stopnia) z przedmiotów: „Regionalne napoje spirytusowe” (fakultet), „Technologia spirytusu i wódek” dla kierunku dyplomowania Technologia Spirytusu i Drożdży, „Technologia napojów alkoholowych” dla kierunku dyplomowania Mikrobiologia Techniczna, „Wybrane działy technologii spirytusu i drożdży” dla kierunku dyplomowania Technologia Fermentacji oraz programów i instrukcji do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu „Laboratorium specjalizacyjne” i ćwiczeń rachunkowych, a także projektowania z przedmiotu

„Aparatura specjalna” dla kierunku dyplomowania Technologia Spirytusu i Drożdży. Ponadto, opracowała program i jest kierownikiem przedmiotu „Technologie przemysłu fermentacyjnego” (wykłady, laboratorium) oraz współprowadzącym wykłady i ćwiczenia z „Towaroznawstwa produktów fermentowanych” dla międzywydziałowego Kolegium Towaroznawstwa. Była koordynatorem prac nad tworzeniem programu dla studiów podyplomowych „Technologia gorzelnictwa, spirytusu i wódek”.

Była opiekunem 58 prac dyplomowych (16 inżynierskich, 42 magisterskich) oraz 4 prac podyplomowych. Była recenzentem 21 prac dyplomowych. Część prac dyplomowych była realizowana we współpracy z gorzelniami oraz zakładami przemysłu spirytusowego. 9 prac dyplomowych magisterskich zostało nagrodzonych przez POLMOS Żyrardów. 1 praca magisterska („Wykorzystanie mocznika przez *Lactobacillus fermentum* z zacierów owocowych”, 2009) została wyróżniona w Konkursie Naczelnej Organizacji Technicznej (NOT) na najlepszą magisterską pracę dyplomową w Politechnice Łódzkiej (2010).

W ramach współpracy z przemysłem, dr inż. M. Balcerek bierze aktywny udział w realizacji prac badawczych, ekspertyz i innych prac świadczonych na zamówienie instytucji naukowych i gospodarczych, producentów spirytusu i wyrobów spirytusowych, cukrowni i innych podmiotów gospodarczych. Jest współautorką, m.in. opracowania pt. „Opinion on raw materials used in the production of vodka” dla Krajowej Rady Przetwórstwa Spirytusu (2006). Ponadto, w ramach tej współpracy czynnie uczestniczy w seminariach branżowych, prezentując wykłady dotyczące zagadnień technologii produkcji spirytusu i wódek.

Była współorganizatorem kursu z zakresu technologii spirytusu dla pracowników przemysłu fermentacyjnego (1999). W latach 2003-2004 była kierownikiem studium podyplomowego pt. „Technologia gorzelnictwa, spirytusu i wódek”.

W latach 2003-2009 była członkiem Komitetu Technicznego nr 82 ds. Wyrobów Spirytusowych, przy Polskim Komitecie Normalizacyjnym. Od 2013 roku pełni funkcję Pełnomocnika Dziekana ds. Współpracy z Przemysłem. Jest członkiem Łódzkiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności.

W ramach działalności organizacyjnej pełniła funkcję opiekuna grup studenckich, brała udział w akcjach informacyjnych dotyczących rekrutacji na PŁ, uczestniczyła w nadzorowaniu egzaminów wstępnych na PŁ (1998-2001), była członkiem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej (2002) oraz Wydziałowej Komisji Wyborczej (2012).

Za osiągnięcia w pracy badawczej, dydaktycznej i organizacyjnej, dr inż. M. Balcerek była wielokrotnie nagradzana przez J. M. Rektora PŁ. W roku 2010 została uhonorowana Brązowym Medalem za Długoletnią Służbę.

