



**Szent István Egyetem**

**Körtegyümölcs alkoholos fermentációjának és  
párlatai aromaprofiljának tanulmányozása**

**Kovács Attila Gábor**

**Budapest**

2018.

## **A doktori iskola**

- Megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola
- Tudományága:** Élelmiszertudományok
- Vezetője:** **Dr. Vatai Gyula** egyetemi tanár  
Szent István Egyetem,  
Élelmiszertudományi Kar,  
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék
- Témavezetők:** **Dr. Hoschke Ágoston** egyetemi tanár  
Szent István Egyetem,  
Élelmiszertudományi Kar,  
Sör- és Szeszipari Tanszék  
**Dr. Nguyen Duc Quang** egyetemi tanár  
Szent István Egyetem,  
Élelmiszertudományi Kar,  
Sör- és Szeszipari Tanszék

### **A doktori iskola- és a témavezetők jóváhagyó aláírása:**

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezetők jóváhagyása

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1</b>	<b>BEVEZETÉS .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>6</b>
2.1	GYÜMÖLCS ALAPÚ PÁRLATOK A MÚLTBAN.....	6
2.2	DEFINIÓ, JOGI SZABÁLYOZÁSOK.....	6
2.2.1	<i>Szeszes italok .....</i>	<i>6</i>
2.2.2	<i>Eredetvédett pálinkák .....</i>	<i>7</i>
2.3	ÉGETETT SZESZES ITALOK.....	8
2.3.1	<i>Szőlő alapú párlatok.....</i>	<i>9</i>
2.3.2	<i>Gyümölcs alapú párlatok.....</i>	<i>10</i>
2.4	GYÜMÖLCS, MINT NYERSANYAG .....	11
2.5	ALKOHOLOS FERMENTÁCIÓ .....	14
2.5.1	<i>Élesztőfajok.....</i>	<i>14</i>
2.5.2	<i>Az élesztők szénhidrát hasznosítása .....</i>	<i>15</i>
2.5.3	<i>Erjedési melléktermékek és másodlagos metabolitok képződése.....</i>	<i>17</i>
2.5.4	<i>Metabolizmust befolyásoló környezeti tényezők .....</i>	<i>19</i>
2.6	A PÁLINKAGYÁRTÁS MŰVELETEI.....	21
2.6.1	<i>Cefrézés .....</i>	<i>22</i>
2.6.2	<i>Fermentáció.....</i>	<i>23</i>
2.6.3	<i>Desztillálás .....</i>	<i>24</i>
2.7	PÁRLATOK AROMÁI.....	26
2.7.1	<i>Alapanyagból származó aromák .....</i>	<i>26</i>
2.7.2	<i>A cefre erjesztése és tárolása során keletkező aromák.....</i>	<i>28</i>
2.7.3	<i>Lepárlás során képződő aromák.....</i>	<i>29</i>
2.8	NYERSANYAG-FERMENTÁCIÓ-PÁRLAT KAPCSOLATA.....	30
2.9	PÁRLATOK JELLEMZÉSI LEHETŐSÉGEI .....	34
2.10	ADATELEMZÉS ÉS ÉRTÉKELÉS .....	36
<b>3</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>39</b>
4.1	ANYAGOK .....	39
4.1.1	<i>Felhasznált mikroorganizmusok.....</i>	<i>39</i>
4.1.2	<i>Tápközegek és elkészítési módjuk .....</i>	<i>39</i>
4.1.3	<i>Gyümölcs .....</i>	<i>40</i>
4.2	ELJÁRÁSOK .....	41
4.2.1	<i>Cefrekészítés laboratóriumi léptékben .....</i>	<i>41</i>
4.2.2	<i>Féliuzemi kísérletek cefrézési protokollja.....</i>	<i>41</i>
4.2.3	<i>Pektinbontó enzimek hatásának vizsgálata .....</i>	<i>42</i>
4.2.4	<i>Különböző pH értékeken folytatott fermentáció .....</i>	<i>42</i>
4.2.5	<i>Irányított erjesztés .....</i>	<i>43</i>
4.2.6	<i>Asszimilációs vizsgálat .....</i>	<i>43</i>
4.2.7	<i>Fermentációs képesség vizsgálata.....</i>	<i>44</i>
4.2.8	<i>Desztillálás .....</i>	<i>44</i>
4.3	KLASSZIKUS ANALITIKAI MÓDSZEREK .....	45
4.3.1	<i>pH mérés.....</i>	<i>45</i>
4.3.2	<i>Alkohol meghatározása .....</i>	<i>45</i>
4.3.3	<i>Szárazanyag-tartalom meghatározása .....</i>	<i>46</i>
4.3.4	<i>Redukáló cukortartalom meghatározása.....</i>	<i>46</i>
4.3.5	<i>Titrálható savtartalom meghatározása.....</i>	<i>46</i>
4.3.6	<i>Illósav-tartalom meghatározása.....</i>	<i>47</i>
4.3.7	<i>Észtertartalom meghatározása.....</i>	<i>47</i>
4.3.8	<i>Savak hatásának vizsgálata.....</i>	<i>47</i>
4.3.9	<i>pH hatásának vizsgálata.....</i>	<i>47</i>
4.3.10	<i>Erjedés nyomon követése a tömegváltozás alapján.....</i>	<i>48</i>
4.4	MŰSZERES ANALITIKAI MÓDSZEREK .....	48
4.4.1	<i>HPLC.....</i>	<i>48</i>
4.4.2	<i>GC-FID.....</i>	<i>49</i>

4.4.3	GC-MS.....	49
4.5	STATISZTIKAI VIZSGÁLATOK .....	50
4.5.1	Variancia analízis.....	50
4.5.2	Főkomponens analízis .....	50
4.5.3	Lineáris Diszkriminancia Analízis.....	50
<b>5</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....</b>	<b>52</b>
5.1	MŰSZERES ANALITIKAI MÓDSZEREK ADAPTÁLÁSA.....	52
5.1.1	GC-MS módszer adaptálása.....	52
5.1.2	GC-FID módszer adaptálása.....	54
5.2	KÜLÖNBÖZŐ ÉLESZTŐTÖRZSEK VIZSGÁLATA.....	55
5.2.1	A szerves savak hatása a fermentációra.....	55
5.2.2	Szénhidrát-hasznosítási képesség .....	57
5.2.3	A törzsek növekedése és erjesztése körtecefrében.....	60
5.3	KÜLÖNBÖZŐ KEZELÉSEK HATÁSA .....	62
5.3.1	Pektinbontó enzimek hatása.....	62
5.3.2	Savak hatása .....	63
5.3.3	Az erjedési pH hatása az aromaanyagok képződésére.....	65
5.3.4	A szerves savak hatása a glükóz és fruktóz erjesztésére.....	66
5.3.5	A vizsgált savak hatása a diszacharidok hasznosítására.....	69
5.3.6	Erjedés nyomonkövetése a tömegváltozás alapján.....	70
5.3.7	Élesztőtörzsek és savak hatása az etanol képződésre .....	73
5.3.8	Cefrék desztillálása.....	74
5.3.9	Párlatok jellemzése.....	78
5.3.9.1	Klasszikus analitika .....	78
5.3.9.1.1	Alkoholtartalom .....	78
5.3.9.1.2	Illósav tartalom .....	79
5.3.9.1.3	Észtertartalom .....	81
5.3.9.2	Bosc Kobak körte párlatok jellemzése .....	82
5.4	KÖRTEPÁRLATOK CSOPORTOSÍTÁSA .....	84
5.4.1	Körtefajta szerinti csoportosítás.....	84
5.4.2	Évjárat szerinti csoportosítás .....	87
5.4.3	Körte párlatok termőhely szerinti csoportosítása.....	91
<b>6</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....</b>	<b>100</b>
<b>9</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>101</b>

## Rövidítések jegyzéke

AAT: acetyl koenzim-A-transzferáz  
 Acetyl KoA: acetyl koenzim A  
 ADP: adenzin-difoszfát  
 AMP: adenzin-monofoszfát  
 ATP: adenzin-trifoszfát  
 cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát  
 DA: diszkriminancia analízis  
 DNS: dezoxiribonukleinsav  
 EC: Enzyme Committee – Enzim Bizottság  
 ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
 EMP: Embden-Meyerhof-Parnas metabolikus útvonal  
 FFK: foszfo-frukto-kináz  
 GC: gázkromatográf  
 GC-FID: lángionizációs detektorral (Flame Ionization Detector) szerelt gázkromatográf  
 GC-MS: tömegspektrométerrel összekötött gázkromatográf  
 GCO: olfaktometriás gázkromatográf  
 GRAS: Generally Recognized As Safe – egy minősítési forma, amelyet az Egyesült Államok Food and Drug Administration (FDA) szabályozó szerve használ különböző táplálék, kozmetikum és gyógyszer összetevőkre  
 hl: hektoliterfok: 1 liter 100%-os etilalkohol  
 HPLC: magas nyomású folyadék kromatográfia (High Pressure Liquid Chromatography)  
 HPLC UV-Vis: ultraibolya-látható fény spektroszkóppal ellátott magas nyomású folyadék kromatográf  
 HXT: Hexóz Transport  
 MRS agar: deMan-Rogosa Sharpe - Agar  
 NAD: a nikotin-amid dinukleotid oxidált formája  
 NADH<sub>2</sub>: nikotin-amid-dinukleotid  
 NMR: nukleáris mágneses rezonancia (Nuclear Magnetic Resonance)  
 PC: Principle Component - főkomponens  
 PCA: Principle Component Analysis - főkomponens analízis  
 PCR: Principle Component Regression - főkomponens regresszió  
 PLS: Partial Least Square - részleges legkisebb négyzetek  
 RBC agar: Rose Bengal Chloramphenicol - Agar  
 UV-Vis: ultraibolya-látható fény spektroszkópia (Ultraviolet-visible spectroscopy vagy Ultraviolet-visible spectrophotometry)  
 YEPD-agar: húskivonatot, élesztő kivonatot és glükózt tartalmazó táptalaj

## 1 BEVEZETÉS

A gyümölcspárlat az európai ember egyik legősibb itala, amit ma a világ minden táján fogyasztanak. Jellemző alapanyagaik és gyártási technológiájuk tájanként, országonként igen különbözőek. Ezt a változatosságot a különböző gyorsasággal terjedő technológiai fejlődés mellett az időjárás és a természeti adottságok alakították ki. Talán nem túlzás, hogy a legízletesebbnek tartott gyümölcspárlat félék Magyarországon készülnek, ugyanis a Magyar Alföld (Kárpát medence) éghajlata kifejezetten kedvez a gyümölcs, kiemelten a kajszi-barack, szilva, cseresznye, eper és körte termesztésének. A „jóból jót” elv alapján ételünk és italunk minőségét befolyásolja és meghatározza az alapanyag minősége, így jó pálinkát csak kifogástalan minőségű gyümölcsből készíthetünk.

Világviszonylatban az alkoholtartalmú italok készítése több évezredes múltra tekint vissza. Az első alkoholos italok nem voltak eltarthatóak hosszú ideig a minőség csökkenése nélkül. Azonban az alkímisták kísérletezéseik során felfedezték a desztilláció tudományát, melynek segítségével az alkoholtartalmú italok töményítésére, ezáltal az eltarthatóságára is törekedtek. Számos esetben nem is tudatosan „desztilláltak”, csak hagyták, hogy a nappali forróságban az edény födelén kondenzátum képződjön, amit összegyűjtöttek. A cél akkoriban az volt, hogy a keletkező termék töményebb, valamint eltarthatóbb legyen. A tömény alkoholos párlatok oldószerként való alkalmazhatóságát viszonylag hamar felfedezték, így gyógynövények extrahálására használták, afféle gyógylikörként. Az alkímisták fém, vagy üveg retortákban, edényekben kísérletezgetve rájöttek, hogy sokkal tisztább, és így töményebb párlatot tudnak előállítani, ha fém edényeket, fém páracsővet és aktív hűtést használnak. Égetett szeszes itallal kapcsolatos első magyarországi adat a 14. századi királyi udvarból származik. Johannes Praetorius, a páduai egyetem tanára 1656-ban megjelent munkájában (Opera medica, Frankfurt) írta, hogy Erzsébet királyné, Károly Róbert felesége, pálinkába áztatott gyógynövény (rozsmaring) kivonattal gyógyította férje köszvényét (Kárpáti, 1979).

A világ valamennyi nemzetének kultúrája tartalmaz olyan szokásokat, hagyományokat, amelyekben valamilyen módon legalább egyfajta alkoholos ital fogyasztását már-már rituális módon végzik. Egyes eseményekhez, ünnepekhez kötődő bizonyos alkoholos italok fogyasztása ma már a népi hagyományok részévé vált. Az utóbbi években, a pálinkák újra népszerű termékekké váltak, azonban a fogyasztói elvárásoknak kevés gyártó tud maradéktalanul megfelelni. A gyártók nehéz helyzetét bizonyítja, hogy az évjárat hatásának miatt az eltérő alapanyagok változó minőségű pálinkákat eredményeznek. A fogyasztó szereti állandóan azt a terméket megvásárolni, amit megszokott, de a gyártók nehezen tudják biztosítani részben a változó alapanyag, részben a gyártási technológiai módosítások miatt (az alkalmazott élesztő fajták/törzsek, erjesztési

hőmérséklet, tápsó mennyisége, vagy a pH beállításra használt savak minősége). A fogyasztott italokhoz mindenkiben társul egy emlékkép, egy élmény, ami lehet pozitív vagy negatív. A későbbi fogyasztások alkalmával az előző tapasztalataink szerinti ízelet, szint, illatokat, illetve állagot keressük vagy kerüljük, vagyis az előző tapasztalataink lesznek az etalonok.

Munkám során a gyártástechnológia hatását vizsgáltam a pálinkák minőségére. A gyártásban a fermentáció az első olyan bonyolult/összetett folyamat, amely során a pálinka minősége jelentős mértékben változhat mind pozitív, mind negatív irányba. Ezt a jelentős technológiai műveletet biológiai, fizikai és kémiai eszközökkel szabályozhatjuk. Biológiai eszköznek számít a tudatosan megválasztott élesztő használata, vagy az élesztő sejtszám mennyiségének befolyásolása, fizikai eszköz lehet a hőmérsékletszabályozás, de akár a keverés és az ultrahangos homogenizálás is. Kémiai eszköznek számít a pH beállítása a savak adagolásával.

Az eredetvédett pálinkák magasabb piaci értékkel rendelkeznek, így ezeknek hamisítása a tisztességtelen piaci szereplők számára jelentős hasznot biztosít a tisztességes gyártók kárára, valamint a nagyobb haszonszerzés céljából a vásárlókat is félrevezetik azáltal, hogy egy átlagos, nem eredetvédett terméket eredetvédként jelölnek meg és értékesítenek. Munkám során az eredetvédett termékek ellenőrzésére és minőségbiztosítására olyan eljárás (a műszeres analitikai adatokat feldolgozó kemometriai módszerek alkalmazása) kidolgozását kíséreltem meg, amely hatékony eszköz lehet a bizonyos pálinkák évjáratának, fajtájának, sőt eredetének megállapításában.

Munkám további célja, hogy a gyümölcs alapú párlatok helyes gyártási technológia megállapítása és javaslata, amely nagy segítség lehet a gyártóinak, hiszen e technológia használatával a pálinkák minőségi ingadozása csökkenthető, így élvezeti és piaci értékük növelhető, amely hosszútávon biztosíthatja a piaci pozíciójukat.

## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Gyümölcs alapú párlatok a múltban

Számos történelmi lelet és irodalmi emlék bizonyítja, hogy időszámításunk előtti évezredekben is fogyasztottak erjesztett gyümölcsből készült szeszesitalt, és ezeket az italokat „desztillációval” töményítették (Balázs, 2013; Robin, 2012). Arra azonban nincsenek egyértelmű bizonyítékok, hogy mely népek végeztek először tudatos desztillálást. Bizonyos források szerint az ősi egyiptomiak, más források szerint pedig a kínaiak. Az első borpárlatokat a bódításra, valamint orvosi célokra, pl. gyógynövény kivonatokra használták. A magyarok a XIV. századtól ismerték az égetett szeszt. Az azonban nem egyértelmű, hogy a korábbi időszakban, akár a honfoglalást megelőzően is ismerték volna a pálinka ősét. Égetett bor nyomait tartalmazó palack maradványok igazolják, hogy az 1254-et követő időszakban, már művelték hazánkban a desztillálást (Balázs, 2013).

### 2.2 Definíció, jogi szabályozások

#### 2.2.1 Szeszes italok

A jövedéki adóról és a jövedéki termékek forgalmazásának különös szabályairól szóló 2003. évi CXXVII. törvény értelmében alkoholtermék az, amely 22 térfogatszázaléknál nagyobb alkoholtartalmú friss szőlőből készült bor, szőlőmust, vermut, növényekkel vagy aromaanyagokkal ízesített friss szőlőből készült más bor, illetve egyéb erjesztett ital és ezek keverékei, valamint az 1,2 térfogatszázaléknál nagyobb alkoholtartalmú denaturált és nem denaturált etilalkohol és más szesz, illetve likőr. A kereskedelemről szóló 2005. évi CLXIV. törvény úgy határoz, hogy szeszes ital minden alkohol tartalmú ital, kivéve a gyógynövények gyógyászati jellegű szeszes kivonatát és az ezek felhasználásával készült terméket, továbbá az 1,2%-nál kevesebb alkoholtartalmú üdítőitalokat.

A szeszesitalok megnevezését, címkézését és a földrajzi árujelzőinek az oltalmát a 110/2008-as EK rendelet határozza meg, amely szerint a szeszes ital olyan alkoholtartalmú ital, amely kizárólag mezőgazdasági eredetű, fermentációval képződő etanolt használhat. További kritérium, hogy az italokhoz csak emberi fogyasztásra készült etilalkohol használható és alkoholtartalma legalább 15 (V/V) %.

Az Európai Unió csatlakozás után, Magyarország kizárólagos jogot (EEC No. 1576/89 Direktíva) kapott a Pálinka megnevezés használatára (a kizárólagosság alól 4 osztrák régió képez kivételt, ahol csak a kajszibarackból készült terméket nevezhetik pálinkának). A 110/2008/EEC rendelet értelmében a pálinka megnevezést csak azon termékek viselhetik, amelyek a valódi



gyümölcsből, a termőföldtől a palackozásig Magyarországon készültek, valamint hozzáadott cukrot nem tartalmaznak.

A Magyar Köztársaság 2008. évi LXXIII. törvénye - a Pálinkatörvény - szerint csak olyan speciális eljárással készített gyümölcspárlat nevezhető pálinkának, amely Magyarországon termelt gyümölcsből készül, valamint a cefrészését, a párlását, az érlelését és a palackozását is Magyarországon végezték. Tehát sűrítmenyből, fagyasztott vagy aszalt gyümölcsből készült termék nem nevezhető pálinkának.

A pálinka, a törkölypálinka és bizonyos helyi változataik európai uniós eredetvédeltséget élveznek. A hasonló nevű pálinka eredetvédett román gyümölcspárlat, amely csak egyszeri kisüsti lepárlással készül (Európai Parlament, 2008; Törvényhozás, 2008).

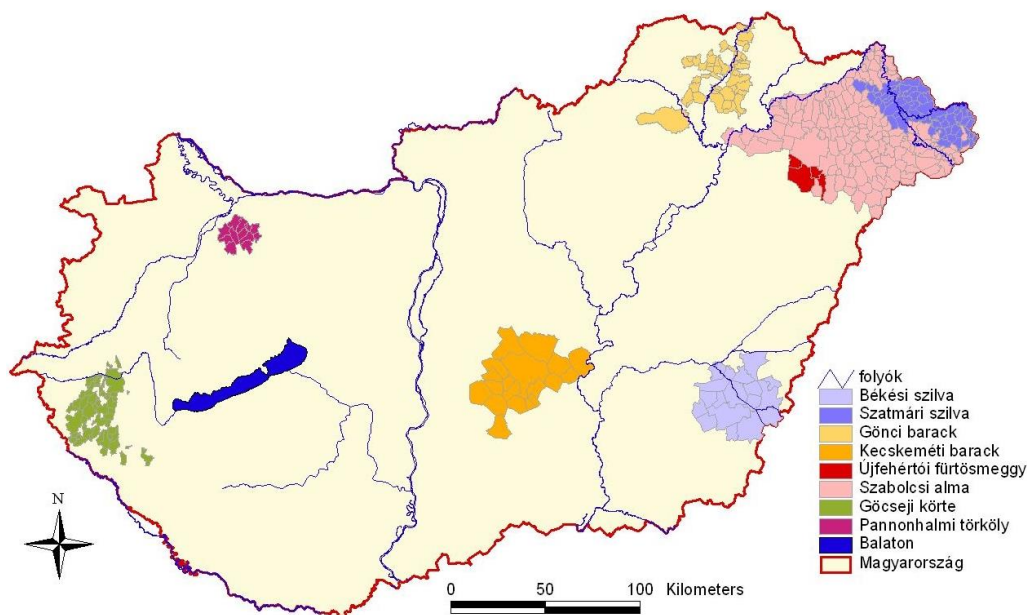
### **2.2.2 Eredetvédett pálinkák**

Magyarország egyes területei (1. ábra) kiemelkedően alkalmasak bizonyos gyümölcsfajták termesztésére. Ezeken a területeken az adott gyümölcsből kiváló minőségű párlat készül, amely ízvilágával kiemelkedik a hasonló alapanyagú, de eltérő származású pálinkák közül. A pálinkák szempontjából hat ilyen tájegységet különböztetünk meg: a szatmári szilvapálinka, a kecskeméti barackpálinka, a szabolcsi almapálinka, a békési szilvapálinka, a gönczi barackpálinka és az újfahértói meggypálinka.

A szatmári szilvapálinka évszázadok óta a Szatmár-Beregi táj kiemelkedő híressége, a kiváló minőségű terület túlnyúlik az ország határain, így a szomszédos Románia Szatmár-vidéke is leginkább a szilvapálinkájáról ismert. A kecskeméti barackpálinka Kecskeméten és a környékén termesztett kajsziarackból készül.

A békési szilvapálinka a Kőrösök völgyében termelt vörös szilvából készül. A Kárpát-medencében a szilva a XVI. században már őshonos volt. A szilvapálinkának afféle népi kultusza van minden szilvatermő vidéken, így Szatmár vidékén és Békésben is.

A szabolcsi almapálinka hagyományos mind kisüsti, mind oszlopos berendezéssel történő desztillációval készül. Almafajtától függően eltérő az íz és illatvilága. Általánosan megállapítható, hogy a nyári almafajtákból készült párlat kisebb kihozattal, de intenzívebb illattal rendelkezik, mint a téli alma párlatok, amelyekre inkább a fűszeresség jellemző.



1. ábra. Eredetvédett pálinkák előállításának földrajzi területei (Panyik, 2013)

A gönczi barackpálinka a gönczi magyar kajsziából és a Pannónia kajsziából készülhet. A különleges illat- és zamatanyagban gazdag gönczi barackpálinka szignifikáns különbséget mutat a más régiókban készült barackpálinkáktól (Nguyen *et al.*, 2013; Panyik, 2013).

A Magyar Szabadalmi Hivatal 2007-ben a földrajzi árujelzők közé felvette az újfehértói meggypálinkát. Az eredetvédett megjelölésű pálinkák gyártására kizárólag az újfehértói fűtös és a debreceni bőtermő fajták használhatóak.

A göcseji körtepálinkák intenzív illatú, a gyümölcs ízvilágát erősen visszaadó párlat. A dunántúli pálinkák közül elsőként kapta meg az eredetvédeltséget. Ahhoz, hogy valaki használhassa az eredetvédett megjelölést (göcseji körtepálinka) meghatározott körtefajtákból válogatva kell párlatot készítenie. Ezek a bosc kobak, a vilmoskörte, a conference körte, a hardenpont téli vajkörte, a clapp kedveltje, a packham's triumph, a fétel apát és nemes krasszán. A göcseji körtepálinka sajátos ízvilágát meghatározza, hogy a gyümölcsöt a szedés után utóérlelik.

### 2.3 Égetett szeszes italok

A "szeszes ital" kifejezés az Európai Unióban olyan italok gyűjtőneve, amelyeknek alkoholtartalma legalább 15 (V/V) % és valamilyen égetett/desztillált szeszből származik. A gyümölcs alapú szeszes italok leginkább szőlő, szilva és alma alapanyagokból készül és különböző nevek alatt kerülnek a forgalomba: Grappa, Cognac, Brandy, Pisco, Calvados, Sligovica, Sliwowica, Ţuica, Metaxa, Armagnac, Pálinka stb. A pálinkákról szóló szakirodalom igencsak szerénynek mondható. Ezzel szemben a Whisky (Artisan Spirits, Distiller, Whiskey Advocate), Grappa, Cognac (Wine and Spirits) témával kapcsolatos közlemények száma igen gazdag.

### 2.3.1 Szőlő alapú párlatok

A gyümölcs-párlat egyik legelterjedtebb fajtája a szőlőpárlat (cognac, brandy, grappa vagy pannonhalmi törkölypálinka). A világpiacon legnépszerűbb szőlő alapú párlatokat az 1. táblázat tartalmazza. A brandy név eredete a holland brandewijn (égetett bor) (Siskin, 2010). Érdekesség, hogy a név eredetileg nem a borpárlatra utalt, hanem bármilyen lepárlással előállított termékre, azaz égetett szeszre. A brandy alkoholtartalma általában 35-60 (V/V) %. Jellegzetes színét a fahordós érlelés és/vagy a hozzáadott karamell adja (Bernát *et al.*, 1893).

Amíg az USA-ban minden gyümölcsből készült párlat lehet (ATF, 1992), addig az EU törvények szerint csak az adalékmentes (kivéve karamell), érlelt szőlőpárlat nevezhető brandynek (Othmer, 2007). Így az Európában a borpárlat és a brandy nem azonos fogalmak. A borpárlatok a száraz, könnyű, savas 8-12 (V/V) % alkoholtartalmú borokból készülnek réz lepárlóüstben történő kétszeres lepárlással. A borpárlatok és brandyk érlelésére különböző módszereket alkalmaznak. A tölgyfahordós érlelés során kapott termék eredményezi a legértékesebb párlatokat. Az érlelés ideje és a fahordó minősége befolyásolja az egyes termék minőségét. A Solera érlelési eljárás dinamikus érlelési eljárás, ahol az egymás felett elhelyezett hordó sorokból folyamatos vezetéssel a legalsó hordókból kapják a mindig azonos minőségű érlelt brandyt (Schwarz *et al.*, 2009; Villamiel *et al.*, 2008). Az érlelés során a párlatokat akár ágyazhatják is a saját gyümölcszeiken, ilyenkor színviláguk megváltozik, ízük édesebb, aromájuk teltebbé válik.

A konyak szőlőbor lepárlásával készül, nevét az előállítási helyéről kapta: a francia Cognac községről. Az ital elkészítéséhez elsősorban (90%) három féle szőlőt használnak: Ugni Blanc (Trebiano), Folle Blanch és Colombard, a maradék 10%-a pedig csak a jogosult 6 régióból származó szőlő lehet. A Charante borkészítésnél szőlőt kiméletesen préselik. Döntő tényező a helyi mikroflórából szelektált *Sacharomyces cerevisiae* élesztő, mivel a fermentáció során alakulnak ki a különleges Charente aromák (Jarrard, 2005). A kétszeri szakaszos lepárlás hagyományos réz Alambic-Charantais rendszerben történik. Azt után legalább kétéves kötelező tölgyfa hordóban történik a párlat érlelése.

Az Armagnac a konyakhoz hasonló borpárlat, a Dél-Francia Gascogne-ban állítják elő. Az Armagnac négy szőlőfajtából (Ugni Blanc, Folle Blanch, Baco 22A és Colombard) készül. A lepárláshoz ma már zömében folyamatos Armagnac lepárlót alkalmaznak.

Az olasz Grappa szintén szőlőből készülő párlat, pontosabban törkölypárlat, alkoholtartalma legalább 37,5 (V/V) %. Alapanyagtól, desztillálástól és érleléstől függően több változata ismert: Giovane, Aromatica, Affinata, Invecchiata vagy Vecchiata, Stravecchia vagy Riserva, Single Variety, Polivitigno, Aromatizzata (Olasz-törvényhozás, 2008). A borkészítés után visszamaradt szőlőtörkölyből párolt italok közül a francia Eau-de-vie de marc mellett a grappa a legismertebb.

A Metaxa az egyik leghíresebb görög ital, amit Szpyrosz Metaxas (görögül: Σπύρος Μεταξάς) talált fel a 18. század végén. Borpárlat, édes muskotályos bor és növényi fűszerek /mixturák elegye (Andriot, 2001). A párlat se nem brandy, se nem borpárlat és hivatalosan csak szeszes itálnak nevezhető.

A spanyol brandy de Jerez eredetvédett kimagasló minőségű borpárlat, amely készítésében hagyományos kétszeri szakaszos és folyamatos lepárlást is alkalmaznak. Az érlelés 500 literes sherrys hordókban Solera rendszerben történik. Kevésbé ismert és fogyasztott párlat, akárcsak a szintén eredetvédett örmény Ararat, a chilei Pisco vagy portugál Lourinha brandy (Wikipedia, 2013)

### 2.3.2 Gyümölcs alapú párlatok

Az ismertebb gyümölcspárlatok megnevezését, származási helyét és alapanyagait az 2. táblázat tartalmazza. A legnépszerűbbek a szilva, alma, körte, kajszi, meggy, szőlő, de elterjedten alkalmazható még a birs, a som, a málna, a bodza, a szamóca és a ribizli. A vadon termő gyümölcsök közül leginkább a berkenye, a som, a kökény, a szeder és az áfonya kerül számításba (Panyik-Lanszki *et al.*, 2008).

A lengyel Śliwowica łącka (Łącko-i sliwowica) egy nagy hagyományra visszatekintő szilvapárlat, amelynek neve a lengyel Łącko régióhoz kötődik. Egyes források szerint a 17. századtól gyártják, alkohol tartalma 70-80 (V/V) % is lehet. A termék eredetvédett és évente kb. 15 ezer liter párlatot állítanak elő (Kowalski, 2009).

A Calvados hagyományos normandiai almaborból készült földrajzilag védett gyümölcspárlat. Előállítására nem gazdaságos, almafajtától függően 12-20 kg alma felhasználásával lehet 1 liter 40 (V/V) % töménységű párlatot készíteni. A Calvados készítése szempontjából meghatározó, hogy a friss almalé cukor, illetve savtartalma. A jelenleg érvényben lévő szabályozás szerint kereskedelmi forgalomba csak 40-42 (V/V)%-os legalább két évig érlelt ital hozható, azonban a hagyományos Calvados ennél erősebb, akár 72 (V/V)% is lehet (Lepelley, 1990).

#### 1. táblázat: Gyümölcspárlatok megnevezése, származási helye, alapanyaga és desztillálási módja

Ital megnevezése	Alapanyaga	Származási helye	Desztillálás módja
Pálinka	gyümölcs és törköly	Magyarország	kisüsti és oszlopos
Raki	gyümölcs és törköly	Balkán félsziget	kisüsti és oszlopos
Slivovitz <sup>[1]</sup>	szilva	közép és K-Európa	kisüsti és oszlopos
Eau de vie	gyümölcs	Franciaország	kisüsti

Schnaps, obstbrand <sup>[2]</sup>	gyümölcs	Németország, Ausztria	kisüsti és oszlopos
Applejack <sup>[3]</sup>	alma	USA	kifagyasztás és kisüsti
Damassine	kökényszilva	Svájc	kisüsti és oszlopos
Medronho	szamóca	Portugál	kisüsti és oszlopos
Tuică	szilva	Románia	kisüsti
Calvados	almabor	Franciaország	kisüsti

<sup>[1]</sup> Az Európai Parlament és a Tanács 110/2008/EK rendelete (2008. január 15.) a szeszes italok meghatározásáról, megnevezéséről, kiszerezéséről, címkézéséről és földrajzi árujelzőinek oltalmáról (EU Parlament, 2008) <sup>[2]</sup> Codex Alimentarius Austriacus B 23 – Spirituosen (Kobdorff, 02.04.2015), <sup>[3]</sup> Applejack (ATF, 1992; Laird)

Különböző növényi alapanyagokból erjesztett és desztillált párlatok készülhetnek: a vodka (kukorica, burgonya), whiskey (gabona), borovicka (boróka), cachaca (cukornád leve), rum (nádcukor), tequila (kék agavé), mezcal (agavé), poitin (árpamaláta).

## 2.4 Gyümölcs, mint nyersanyag

A pálinka gyártására használt gyümölcsök három jelentős csoportra oszthatók: az almatermésűek (alma, birs, körte), a csonthéjasok (meggy, kajszi, szilva, barack) és a bogyósok (szamóca, málna, szeder, bodza, áfonya) (Tóth *et al.*, 2013). Alapszabály, hogy csak optimális érettségű, tiszta, romlási foltoktól mentes gyümölcsből lehet kiváló minőségű pálinkát gyártani. A pálinkák alapanyagára általánosan igaz, hogy a gyümölcsnek növényvédőszermentesnek kell lennie, ellenkező esetben a fungicidek gátolják az élesztők szaporodását és tevékenységét. Az optimális érettség egyrészt az aromaprofil kialakítása miatt fontos, másrészt, mert ekkor rendelkezik a gyümölcs a legnagyobb erjeszhető szénhidrát-tartalommal. A gyümölcsök természetes mikrobiotája (vadélesztők, penészek, baktériumok) kellemetlen aromájú metabolitokat is szintetizálhat. Ezek a metabolitok negatívan befolyásolhatják a cefre aromaprofilját és ronthatják az alkohol kihozatalát (Békési *et al.*, 2010; Panyik-Lanszki *et al.*, 2008; Panyik, 2006).

A gyümölcsök termőhelytől, fajtától, évjáráttól és érettségi állapotuktól függően eltérő cukor- és savtartalommal rendelkeznek. A gyümölcsök savtartalma védelmet jelent a káros mikroorganizmusokkal szemben, mert savas közeg (pH 3,5) gátolja számos baktérium szaporodását. A teljes érettségi állapotában érhető el az egyes gyümölcsök maximális szénhidrát- és savtartalma, optimális aránya, illetve a jellemző aromák maximális koncentrációja, a túl érett állapotban azonban már csökken a mennyiségük (Tóth *et al.*, 2013).

A legnagyobb mennyiségű gyümölcspárlatot alma, szilva, meggy, körte és kajszi gyümölcsökből állítják elő. A mérsékelt égövi gyümölcsök között az alma után a második legjelentősebb gyümölcsfaj a körte (*Pyrus communis* L.). A *Pyrus* nemzetség fajai főleg

Euráziában fordulnak elő. Rheder és munkatársai (1940) 15 fajt írtak le, ebből 8 faj Európában őshonos. Göcsej, földrajzi fekvésének, illetve ökológiai adottságainak köszönhetően kiemelkedően alkalmas minőségi körték termesztésére. A körte népszerű gyümölcs és alkalmas mind közvetlen fogyasztásra, mind gyümölcslé és pálinka gyártására. A legismertebb és legnagyobb mennyiségben termesztett körte fajták: Bosc Kobak, Clapp kedveltje, Packham's Triumph, William's (Vilmoskörte), Tama, Császár körte. Magyarországon a Bosc Kobak körte termesztési aránya a legnagyobb a körtefajták közül (Tóth *et al.*, 2013). Érési ideje: szeptember közepére tehető. Utóérés gyümölcs, így szedés után több hónapig is tárolható, megfelelő körülmények között. A pálinka gyártása esetén az optimális tárolási időt a körte megpuhulása jelzi. A téli körtefajták (*Pyrus communis* L.) a hideg vagy etilén hatására érnek be. Szedését követően szabályozható hőmérsékletű és gázterű raktárakban tárolják, ahonnan majd újra melegebb hőmérsékletre helyezve kialakul a teljes érettségű állapot (Hansen *et al.*, 1979; Villalobos-Acuña *et al.*, 2008; Villalobos-Acuña *et al.*, 2011). Hideg vagy etilén gáz hatására a körtében megindul az etilén termelés, így rövid kitettségek esetén is elkezdődik a körte ön-érlelése (Blankenship *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1981). Az utóérlelés időtartamát és intenzitását a kívánt állapot elérése határozza meg. Ez általában a kézzel is kitapintható puha húsú, vajjas jellegű lédús állapot, amelyet a hideg vagy etilénes kezelést követő szobahőmérsékletű (megközelítőleg 18–24°C) tárolással érnek el (Mitcham *et al.*, 2007).

A Bosc Kobak körtéket megnyúlt alak, sárgás-zöldből rozsdá-barnába áthajló héj jellemzi. Külső ránézésre átlagos színekkel rendelkezik, fahéj alapszínén rozsdás fedőszín figyelhető meg. A Bosc Kobak egy európai, Belgiumból származó körtefajta. Szállíthatósága, és tárolhatósága igen jó. Húsa kellemes, harmonikus ízvilágú, puha és lédús. Magyarországon az érési ideje kora ősze tehető, szeptember elején szedhető utóérlelés, tartós tárolásra (Tóth *et al.*, 2013). A gyümölcs mérete a körték között nagy vagy igen-nagy (200-280 g). Héja közepes vastagságú, száraz, húsa fehéressárga, puha, olvadó. A Bosc Kobak körte aromaprofilját meghatározó illékony komponenseiként 17 észtert, 4 alkoholt, két szénhidrogént és egy aldehidet (hexanal) azonosított Suwanagul és munkatársai (1998). Az észterei közül a legmeghatározóbb a butil-acetát, amely több mint 55 %-ban van jelen, valamint a hexil-acetát, amely 24 %-ban járul hozzá a gyümölcs jellegéhez. A 2-fenil-etil-acetát koncentrációja is jelentős,  $\alpha$ -farnesin-tartalma azonban alacsony (0,8 %).

A Bosc Kobak után a Vilmoskörte a másik legnépszerűbb körte Magyarországon, amely a 18. század közepén került hazánkba Angliából. Augusztus közepétől szedhető. A tárolási technológiától függően akár 3 hónapig is eltartható. Gyümölcse középestől a nagyméretűig terjedt, 160-220 gramm tartományban. Feldolgozás során lassan oxidálódik, vagyis világos marad a gyümölcshús színe. Fája közepes növekedési erejű, közepesen sűrű koronát nevel. Korán termőre

fordul, évente rendszeresen terem. A nagyobb téli lehűléseket károsodás nélkül elviseli (Tóth *et al.*, 2013).

A Triumph körte szeptember végén érik, igen nagy gyümölcsű körte, tömege 200 - 270 g. Színe éretten sárga, sárgászöld. Húsa fehér, lágy, a Vilmos-hoz hasonló édes-savas. Gyakorlatilag kösejtmentes. Fája középerős növekedésű, termőkorban ívesen lehajló koronát növeszt. Rendszeresen terem és igen bőtermésű (Tóth *et al.*, 2013).

A szilvát (*Prunus domestica*) különböző célokra, friss asztali fogyasztásra és feldolgozásra is rendkívül alkalmas, gyógyászati célokra is alkalmazható. A fajtától függően az energiaértéke: 200–250 kJ/100 g; a friss gyümölcs szárazanyag tartalma: 12–20%. A szárazanyag tartalom 0,16–2,3% rost, 0,15–1,5% tannin és 7–18% cukortartalom, főleg fruktóz, glükóz és szacharóz közel azonos arányú keveréke (Soltész, 2001; Tóth *et al.*, 1980; Tóth, 2009). A Penyigei és Besztercei fajtákból készülő, földrajzi eredetvédelemmel ellátott szatmári szilvapálinkák és a békési szilvapálinkák a legkiemelkedőbbek. A „Békési” eredetmegjelöléssel előállított szilvapálinkák alapanyaga a vörös szilva (minimum 50%), a Besztercei szilva, a Stanley szilva és az Ageni szilva. Az alkoholkihozatal fajtától függően 4,5-6 hlf/100 kg gyümölcs (Panyik, 2006; Tóth *et al.*, 2013).

A kajszi (*Prunus armenica*) Magyarországon nem őshonos növény, ennek ellenére jelentős mennyiséget, évi 30-40 ezer tonnát természetnek hazánkban. Eredetvédett kajszi pálinka a Gönci és Kecskeméti barackpálinka, az eredetvédett pálinka gyümölcsének az eredetvédett megjelölésen szereplő helyről kell származnia. Ismert fajtái: gönci Magyar kajszi, Ceglédi óriás, Ceglédi bíborkajszi, Pannónia és Bergeron (Nguyen *et al.*, 2013; Tóth *et al.*, 2013). A gyümölcs húsának szárazanyagtartalma 20%, glükóz 0,98 – 2.88 %, fruktóz 0,37 – 1,57 %, szacharóz 3,6 – 8,2 %. A kajszi alkoholkihozatala 4 - 5 hlf/100 kg gyümölcs.

A párlatkészítésre legalkalmasabb almafajták (*Malus domestica*) az Idared, Gála, Golden Delicious, Jonagold, Jonathan, Red Delicious, Pinova, Topaz, Florina, Luna, Rosmerta, Hesztia, Reanda, Rebella, Rewena, Goldrush, Sirius, Remo, Mutsu, Relinda (Panyik-Lanszki *et al.*, 2008; Tóth *et al.*, 2013). Az almapálinkák jellege almafajtától függően igen változatos. Lehet diszkrét aromájú, de lehet fűszeres illatú, vagy akár citrusos, de viaszos is. Az almafajták átlagos alkoholkihozatala: 3,0 – 4,5 hektoliter-fok között változik (Panyik, 2013).

Európa adja a világ meggytermelésének (*Prunus cerasus*) 60%-át (Tóth *et al.*, 2013). Pálinka bármilyen Magyarországon termett meggyből készíthető (Tóth, 1997, 2001; Tóth *et al.*, 2013). A földrajzi eredetjelöléssel ellátott meggy-pálinka „Újfehértói fürtös” és „Debreceni bőtermő” fajtákból készül bármilyen egyéb meggy használata nélkül. Az újfehértói meggy-pálinka üde, gyümölcsös karakterrel rendelkezik, kissé fanyarkás szájérzetet okoz, alkoholkihozatala 3-4 hlf/100 kg gyümölcs (Panyik, 2013).

## 2.5 Alkoholos fermentáció

### 2.5.1 Élesztőfajok

Italgyártás szempontjából két fermentáció típust különböztetünk meg: a spontán és az irányított erjesztést. A spontán erjesztésnél a szubsztrátumot a gyümölcsről és a környezetből bekerülő természetes mikrobiota (vadélesztők, baktériumok, penészek) kezdi lebontani. Egy idő után az erjeszhető szénhidrát koncentráció csökken, megszűnik a katabolit represszió és megindul a *S. cerevisiae* szaporodása is. Az anaerob körülmények között a szénhidrátokat a vadélesztők konvertálják etilalkohollá (Kutasi, 2007). Az egészséges szőlőbogyón,  $10^3 - 10^5$  sejt/g nagyságrendű élesztőflóra lehet, de *Saccharomyces* fajok száma nem éri el a 100 sejt/g-t. A penészes, gombás fertőződés az élesztők szaporodását és etanol képzését gátolja (Gandini, 1973). A legáltalánosabban megjelenő törzsek a *Kloeckera* és a *Candida* fajok. Kisebb számban fordulnak elő a *Pichia*, a *Kluyveromyces*, a *Zygosaccharomyces* és a *Torulospora* nemzetség fajai. A fermentáció folyamatát a *Kloeckera* és *Hanseniospora* fajok indítják meg, a kis alkohol toleranciájú élesztők a képződő alkohol miatt elpusztulnak, az alkoholtoleráns élesztők, toleranciájuk mértékének sorrendjében dominálnak, végül a vezető szerepet a kis sejtszámról felszaporodó *S. cerevisiae* veszi át. A nagy alkoholtűrő egyéb élesztőtörzsek is életben maradnak és tovább működnek (Cocolin *et al.*, 2015; Urso *et al.*, 2008). A spontán fermentációval előállított italok elsősorban a másodlagos metabolitok koncentrációiban és a maradék cukortartalomban térnek el a fajélesztővel előállított italok minőségétől. A spontán erjedéssel készített italokban nagyobb a magasabb rendű alkoholok és egyéb másodlagos metabolitok mennyisége, miközben a kierjedt cefre maradék cukortartalma is nagyobb. A *Kloeckera* fajok észter termelésben kiemelkedőek, de sajnos ecetsavat is hasonló hatásokkal szintetizálnak és ez utóbbi nemkívánatos komponens az alkoholos italokban (Magyar, 2010). Az irányított fermentációban szelektált fajélesztőket használnak, amelyek segítségével az erjedés üteme, dinamikája, irányíthatósága és kiszámíthatósága nagymértékben fokozódik. A forgalmazók általában 10g/hl élesztőt javasolnak starterkultúrának, ez  $1-2,5 \times 10^6$  sejt/l kezdeti sejtszámnak/koncentrációnak felel meg, amely optimálisnak bizonyul. Ha kis koncentrációjú starterkultúrával indítunk, akkor a növekedési szakasz elhúzódik, így később áll be a stacioner szakasz. Valójában az irányított erjesztés nem monokultúras fermentáció, csupán a starter élesztő dominálja a fermentációt. A fajélesztőket néha elnyomhatja egy-egy vadélesztő, vagy fordítva, a fajélesztők gátolják a vadélesztők szaporodását. A *Saccharomyces cerevisiae* fajon belül egyes törzsek rendelkeznek az ún. killer hatással. Ezek az élesztők K2 toxinnal gátolják az arra érzékeny fajazonos törzseket, ezért előnyös olyan starter



kultúrát választani, amely rezisztens a toxinnal szemben és maga is képes szintetizálni azt (Magyar, 2010).

A szeszesitalok gyártásában leggyakrabban használt élesztőfajok közé a *Saccharomyces sensu stricto* csoportba sorolt fajok tartoznak: azaz a *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*. A nem *Saccharomyces* vagy más *Saccharomyces* fajok hasznosítása is elterjedőben van. Ezek előnye a megszokott *Saccharomyces* törzsekkel szemben erősen faj és törzs függő. Ilyen élesztők a *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Torulaspota delbrueckii* (Deák *et al.*, 2006; Kurtzman *et al.*, 1998). Célszerű a célterméknek megfelelő élesztőtörzset választani, különben az erjedési határfok alacsony marad és a fermentáció során képződött, ún. másodlagos aromaanyagok (szekunder metabolitok) hátrányosan befolyásolhatják a termék minőségét (Vararu *et al.*, 2016).

## 2.5.2 Az élesztők szénhidrát hasznosítása

### *Asszimiláció*

Az élesztők az oligo- és poliszacharidokat nem tudják közvetlenül asszimilálni. Ezek di- és monoszacharidokra való bontását extracelluláris vagy sejtfalukhoz kötött enzimek végzi. A szacharózt a *S. cerevisiae* először a periplazmában elhelyezkedő invertáz enzim lebontja glükózra és a fruktózra. Az így képződött monoszacharidok, passzív transzporttal, közvetített diffúzió útján jutnak az élesztősejtbe, ahol hasznosulnak. Egyéb diszacharidok (maltóz), permeáz transzport fehérjék révén közvetlenül (aktív transzport) jutnak az élesztősejtbe és a hidrolízis után glükózként hasznosulnak (Randez-Gil *et al.*, 1994).

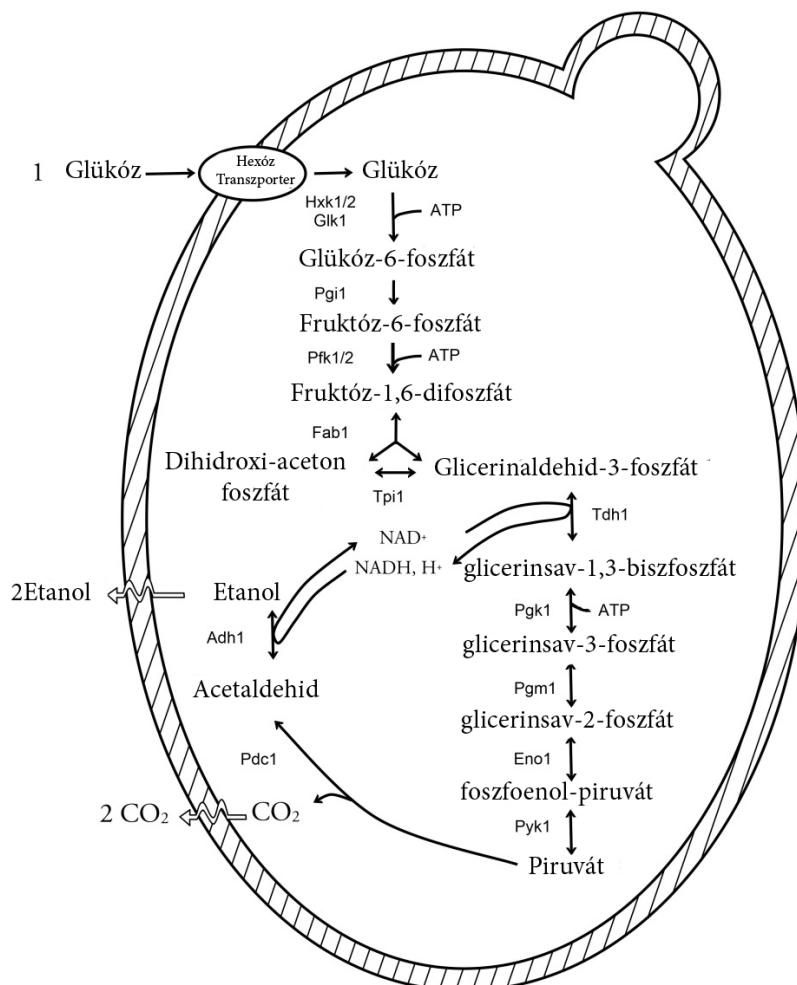
A *S. cerevisiae* élesztő intracelluláris és extracelluláris invertázzal is rendelkezik (Neumann *et al.*, 1967). A két enzim pH optimuma 6,8 és e pH alatt az enzimek működése lassul, de nem áll le (Gascón *et al.*, 1968). Gascón és munkatársai (1968) szerint az enzimek eltérő szerkezetűek, de hasonlóan működnek. Az invertáz szintézise konstitutív, míg a galaktóz és maltóz felvételéért felelős fehérjék génjei induktívak. A glükóz mindkét cukor asszimilációját represszálja. A glükóz általi katabolit represszió általános anyagcsere szabályozási mód, amely a *S. cerevisiae* legtöbb törzsénél tapasztalható. A kutatók azonban lépést tettek ennek kiiktatására. Quarterman és munkatársai (2016) a COX9 respirációs enzimet kódoló DNS szakasz mesterséges törlésével létrehozták a *S. cerevisiae* JQ-G1 törzset, amely nagy glükóz koncentrációnál is képes glükózt és galaktózt asszimilálni és fermentálni.

Specifikus permeázok és transzporter fehérjék (Hexóz Transzport enzimek) működnek az élesztő sejtmembránban és a periplazmatikus térben, amelyek mind a passzív, mind az energiaigényes aktív transzportban vesznek részt. Ezeket az enzimeket a HXT (Hexóz Transport: HXT1-től HXT17-ig + GAL2) géncsalád kódolja. A transzporterek némelyikét a nagy

szubsztrátumkoncentráció indukálja. A HXT enzimek a glükózt gyorsabban, míg a fruktózt lassabban viszik át a sejtfalon. A HXT enzimek előnyben részesítik a glükóz piranóz formáját (Kim *et al.*, 2013; Luyten *et al.*, 2002; Pasula *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2005). A cukortranszporterek száma és fajtája fajoként változik (Quirós *et al.*, 2014).

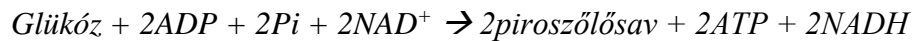
### Anyagcsere

A fermentáció folyamatának egyik kezdeti lépése, hogy a sejt az egyszerű cukrokat (glükóz, fruktóz) a hexokináz ATP felhasználásával foszforilezi, innen izomerizáció és epimerizáció útján lépnek be a metabolikus reakciókba. A tartalék poliszacharid, a glikogén fokozatos lebontását a glikogén-foszforiláz enzim végzi, a trehalózt a trehaláz enzim hasítja glükóz egységekre. A glicerín és a pentózok a triózfoszfátok szintjén léphetnek be a glikolízisbe. A keletkező glükóz-1-foszfát-egységeket pedig a foszfoglükomutáz kapcsolja be a glikolízisbe (2. ábra).



2. ábra Az élesztő sejtben lezajló glikolízis sematikus ábrája (Jacques *et al.*, 2003)

A glikolízis a citoplazmában zajlik le és három szakaszra osztható. Az elsőben a glükóz foszforileződik és fruktóz-1,6-biszfoszfáttá alakul. A második szakaszban a fruktóz-1,6-biszfoszfát gliceraldehid-3-foszfátra és dihidroxiaceton-foszfátra bomlik. A harmadik szakaszban a gliceraldehid-3-foszfát piruváttá oxidálódik ATP és NADH keletkezése mellett. A teljes folyamat 2 ATP-t eredményez glükóz molekulánként:



A glikolízis első szakaszában az alloszterikus foszfo-frukto-kináz (FFK) által katalizált reakció (a szakasz harmadik lépése) a glikolízis egyik fontos szabályozási pontja. Ebben a lépésben a fruktóz-6-foszfátot a FFK fruktóz-1,-6-biszfoszfáttá alakítja. A foszforilezéshez ATP szükséges, a nagy szabadentalpia esés miatt a folyamat irreverzibilis ( $\Delta G^0 = -14,2 \text{ kJ/mol}$ ). A fruktóz-1,6-biszfoszfátot az aldoláz enzim dihidroxi-aceton-foszfátra és gliceraldehid-3-foszfátra bontja (amelyeket a trifoszfát izomeráz egymásba alakítja). A folyamat további szakaszaiban csak gliceraldehid-3-foszfát vesz részt. Az energia egy részét felhasználja a sejt a reakciókban, a többletenergia pedig hő formájában távozik. A redukált koenzim ( $\text{NADH}_2$ ) az alkoholos erjedés folyamán visszaoxidálódik ( $\text{NAD}^+$ ). A piruvát-dekarboxiláz enzim a piroszőlősavat acetaldehiddé alakítja, a képződő  $\text{CO}_2$  az erjedés egyik végterméke. Majd az alkohol dehidrogenáz enzim, a NADH koenzimmel együtt, az acetaldehidet a másik végtermékké, etilalkohollá redukálja ( $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$  regenerálódik) (Deák *et al.*, 2006).

### 2.5.3 Erjedési melléktermékek és másodlagos metabolitok képződése

A szénhidrátok metabolizmusában a meghatározó szerepét a piruvát tölti be, ugyanis e vegyület számos komponens prekursora. Az etanol szintézissel analóg módon a piruvát laktát dehidrogenáz hatására tejsavvá alakul. A redukcióhoz NADH szükséges, amely a gliceraldehid-3-foszfát oxidációja során keletkezik. Fokozott glicerin képződés történik a glicerin-piroszőlősavas erjedés során (az anaerob erjedés kezdeti szakasza), amikor a gliceraldehid-3-foszfát oxidációja a glicerinsav-3-foszfáttá, illetve redukciója dihidroxi-aceton-foszfáttá egyidőben zajló folyamatok. A glikolízis kezdetén még nincs acetaldehid, így a gliceraldehid-3-foszfát oxidációjakor keletkezett  $\text{NADH}_2$  a  $\text{H}_2$ -t nem tudja leadni, így nem tud az acetaldehiden keresztül újraoxidálódni. A glicerin-3-foszfát azonban dihidroxi-aceton-foszfáttá redukálódik ( $\text{NADH}_2 \rightarrow \text{NAD}^+$  oxidációja), amelynek egy része glicerin-3-foszfáton keresztül gliceriné hidrolizál. A glicerin szintézise a fermentáció kezdetén intenzívebb, majd az acetaldehid akkumulációjával az etanol képződés felé tolódik az egyensúly. A borászatban a glicerin fokozott termelésére kéndioxidot használnak. Hatásmechanizmusa abban rejlik, hogy megköti az

acetaldehidet, így az előbb ismertetett úton a glicerín termelődése hangsúlyossá válik (Derrick *et al.*, 1993; Magyar, 2010).

A piruvát szintén prekursor az acetoinon keresztül történő diacetil és 2,3 butándiol képződésében. Magnézium hiány esetén az alkohol dehidrogenáz nem tudja az acetaldehidet etanollá alakítani, így az felhalmozódik a sejtben és a fermentációs közegben. Aerob/mikroaerob körülmények között normál glükóz koncentráció mellett a piruvát oxidatív dekarboxilezéssel acetyl-KoA-vá oxidálódhat, ami a mitokondriumokban végbemenő citrátciklus (Szent-Györgyi-Krebs ciklus) folyamataiba torkollik. Az amfibolikus citrátciklus során képződik a citromsav,  $\alpha$ -keto-glutársav, borostyánkősav, fumársav, almasav, oxálecetsav és egyéb köztes termékek, amelyek további reakciók (észtereződés) során aromaanyagokká alakulhatnak. A citrát ciklusban lényegében az acetyl-KoA acetyl csoportja oxidálódik széndioxidá, mialatt NADH és FADH<sub>2</sub> termelődik, amelyek a légzési láncba szállítódnak. Az acetyl-KoA a citoszolban acetecetsavvá alakulhat, amely alternatív útvonalakon az acetón és a vajsav prekursora (Deák *et al.*, 2010; Sarkadi, 2011).

Acetyl-KoA-karboxiláz az ATP felhasználásával az acetyl-KoA-t malonil-KoA-vá oxidálja, amely a zsírsav szintézisben vesz részt (Ganguly, 1960). A szintetizált és az asszimilált zsírsavak további átalakításokon mennek át. A 4-hidroxi zsírsavak karboxil láncvége az alkoholos hidroxil csoporttal izomerizációs reakcióba lépve gyűrűt képez, így  $\gamma$ -laktonok képződnek. A  $\gamma$ -dodekalakton és a  $\gamma$ -dekalakton gyümölcsös illatú molekula, amit számos élesztő képes szintetizálni (*Rhodosporidium toruloides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sporobolomyces odorus*). A szintézisük  $\beta$ -oxidációval megy végbe, amelynek első lépése a 10-hidroxi-szteránsav 4-hidroxi-dodekánssavvá való bontás az ecetsav termelés kíséretével. Azt követően a 4-hidroxi-dodekánssav karboxilja és  $\gamma$ -hidroxilja a gyűrűzáródással laktonná alakul. A képződött ecetsavat az acetyl-KoA-szintáz, acetyl-KoA-karboxiláz, zsírsav szintáz, zsírsav elongáz és zsírsav deszaturáz enzimek olajsav szintézisre használják (An *et al.*, 2013).

Az élesztők elsődleges nitrogén forrásai a szerves ammóniumsók és néhány könnyen hasznosítható szerves nitrogénvegyület (glutamin, aszparagin, karbamid, prolin, agrinin). Ha nitrogénhiány lép fel, akkor a sejtek szaporodása leáll. A dezaminált szénvázak a citrát körben lebomolva aldehideket és magasabb rendű alkoholokat (két szénatomnál hosszabb szénláncú alkoholokat) eredményeznek (Sarkadi, 2011). A dezaminált aminosavak (Twt1p mitokondriális és Twt2p citoszol dezaminázok)  $\alpha$ -keto savakat képeznek, amelyek szénláncú  $\alpha$ -aldehidekké redukálódnak (Hazelwood *et al.*, 2008). Aerob körülmények között az  $\alpha$ -aldehidek többnyire  $\alpha$ -savakká oxidálódnak, csak kevés magasabb rendű alkohol („kozmaolajok”) keletkezik. Anaerob körülmények között azonban, etanollal analóg módon, alkohol dehidrogenáz enzim hatására

„kozmaalkohollá” (C<sub>2</sub>-nél hosszabb szénláncú alkoholok) redukálódnak (pl. fenilalanin → fenilpiruvát → 2-fenilacetaldehid → 2-feniletanol).

Több élesztő (*Yarrowia lipotica*, *Rhodosporidium toruloides*, *Schizosaccharomyces pombe* stb.) különleges termékeket pl. illatanyagokat, aminosavakat állít elő (Anderson *et al.*, 1998; Rywińska *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2012). Előfodulnak olyan *S. cerevisiae* fajták (Fermactive Thyol), amelyek kén redukció révén gátolják a lepárlásnál a kellemetlen kénhidrogén és merkaptán kialakulását a párlatban (Rankine *et al.*, 1969). Ez a tulajdonság rendkívül hasznos lehet a meggy-pálinka gyártásánál, amely több kéntartalmú fehérjét tartalmaz, mint a pálinkagyártásra használt egyéb gyümölcsseink (Tóth *et al.*, 2013).

Az élesztők az alkohol koncentráció emelkedésére hasonlóan reagálnak, mint a hő okozta stresszre. Hsp fehérjéket (hősokk proteinek) és trehalózt szintetizálnak, továbbá megváltoztatják a sejtmembrán összetételét azáltal, hogy növelik a benne található zsírsavak és szterolok mennyiségét (Kamo *et al.*, 2012; Magyar, 2010; Silveira *et al.*, 2013). A nagy szterol és zsírsav koncentráció, az oldhatóság csökkentésével enyhíti az alkohol membránt roncsoló hatását. A szterolok előállításához az élesztőnek oxigénre van szüksége. Anaerob fermentáció során nem lehetséges ezek szintézise, így az alkohol okozta stresszre adott válaszuk korlátozott (Gyimesi *et al.*, 1979; Sarkadi, 2011). Ha a sejtekben a szterol koncentráció 0,3 % alá csökken, akkor az alkoholképződés is leáll (Lafon-Lafourcade, 1983).

#### 2.5.4 Metabolizmust befolyásoló környezeti tényezők

A párlatok elsődleges (primer) aromaanyagai az alapanyagból származnak. Fermentáció során azonban az elsődleges aromaprofil változik és másodlagos (szekunder) aromaanyagok keletkeznek, amelyek mennyiségét és minőségét a fermentációt végző élesztő fajtája és fermentációs körülmények (pH, hőmérséklet, ion, cukor és sótartalom stb.) befolyásolják. Az erjedő cefrében számos mikroorganizmus (kísérő biota) tevékenykedik, így azok anyagcseréje is hatással van a párlat minőségére.

##### ***Kísérő élesztőbiota***

A gyümölcs cefrében a választott élesztőn kívül más élesztők, vadélesztők is jelen vannak. Sun és munkatársai (2014) bizonyították, hogy bár a *S. cerevisiae* (Lalvin EC1118 és D254) killer toxinjai gátló hatással rendelkeznek a többi élesztőfajtára, mégis attól függően változott a másodlagos aromaanyagok mennyisége és összetétele, hogy milyen más élesztőtörzsek voltak jelen a cefrében. A *S. cerevisiae* a *Metschnikowia plucherrima* élesztő JS22 törzsének jelenlétében több magasabb rendű alkoholt, észtert és savakat szintetizál. A borászati célból szelektált *S.*

*cerevisiae* élesztő a *Torulaspóra delbruecki* (Zymaflore Alpha - Laffort) jelenlétében több gyümölcs-karakterű észtert, magasabb rendű alkoholt és kevesebb illó és nem illó savat produkált (Sun *et al.*, 2014). A multikultúras fermentáció egyre népszerűbbé válik, ugyanis a képződő aroma komponensek változatosabbak. A *C. zemplinina* beoltásával indított fermentációt a *S. cerevisiae*-vel kiegészítve a cefre lakton és terpén tartalma fokozható (Sadoudi *et al.*, 2012). Ez rendkívül előnyös lehet a pálinkák és borok előállításánál. Bár *S. cerevisiae* jelenlétében a *M. plucherrima* tevékenysége gátlódik, az aromakomponensek szintézisében a két faj szinergikus hatással van egymásra (Sadoudi *et al.*, 2012).

## **pH**

A gyümölcsök természetes pH értéke fajtától, évjárártól és érettségi állapottól függően változik, de a természetes savaknak köszönhetően a tradicionálisan pálinka gyártásra használt gyümölcsök általában savas pH-val rendelkeznek. Az élesztő szaporodásánál az ammónium-szulfát tápsó nitrogén asszimilációja miatt csökken a cefre pH-ja. Ezzel egyidőben a sejtmétabolizmus miatt az ammónia is keletkezik a cefrében, amely emeli a pH-ját. A cefre pH növekedése az oldott kalcium-foszfát oldhatatlan trikálcium-foszfáttá való alakulását okozhatja. Ez pedig a foszfortápanyag hiányához és a cefre pH ingadozásához vezethet, fokozódhatja a habképzést, így a termék minősége és kihozatala csökkenhet (Gyimesi *et al.*, 1979). Továbbá a pH emelkedése növelheti a cefre piruvátkoncentrációját, de ez a célkomponensek mennyiségi csökkenését okozhatja (Rankine, 1967). A pH<4 esetén több oktánsav, dekánsav és dodekánsav képződik, amelyek a desztilláció utolsó harmadában, az utópárlati szakaszban a gőzfázisba és végsősorban a párlatba kerülnek. A jelenség leginkább nagyon magas hőmérsékleten történő desztillálásnál jelentkezik, amikor a párlat összetételében már vízgőz kerül túlsúlyba (Ramsay *et al.*, 1984).

A *S. cerevisiae* élesztők számára optimális pH tartomány a pH 3 és pH 7 között (Békési *et al.*, 2010; Magyar, 2010; Panyik, 2006) található. A vadélesztőket és a gyümölcs héján megtelepedett egyéb mikroorganizmusok háttérbe szorítását, savvédelemmel tudjuk elérni. Gyakorlatban gyenge savakat alkalmaznak. Aszkorbinsavat, ecetsavat, citromsavat és foszforsavat számos élelmiszerben alkalmaznak tartósítószerként, amely az így elért alacsony pH miatt kedvezőtlen életkörülményeket teremt a különböző mikrobáknak (Mira *et al.*, 2010; Stratford *et al.*, 2013). A fermentáció során képződő, a cefrében felhalmozódó savak és a nagy etanol koncentráció együttesen gátolják az élesztősejtek enzim- és membránrendszerének működését, ami csökkenti az etanol szintézisét és fokozhatja a szekunder metabolitok termelődését (Abbott *et al.*, 2008).

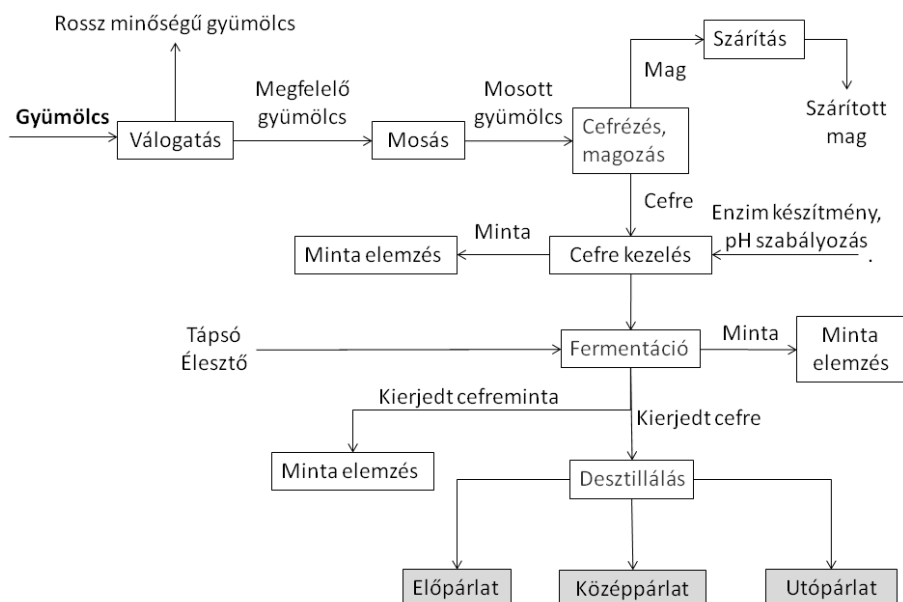
A disszociálatlan savak lipofil tulajdonságaiknak köszönhetően diffúzióval a plazmamembránon keresztül bejutnak a sejtbe, az aqua-glyceroporin Fps1p nevű karrier-fehérje segítségével (Mollapour *et al.*, 2007). Amint a gyenge sav bejut a sejt közel semleges citoszoljába, a közel semleges pH miatt [H<sup>+</sup>] és R-COO<sup>-</sup>] ionokra disszociálnak. Ezek a részecskék, ionos töltéssel rendelkeznek. A töltéssel nyert polaritásuknak köszönhetően elveszítik lipofil tulajdonságukat, vagyis hidrofólké válnak, és nem tudnak kijutni a sejtől a hidrofób lipidmembránon keresztül. A felhalmozódó sav elsavanyítja az élesztő citoszolját, megszüntetve a normális protongradiens a membránok két oldalán (Mollapour *et al.*, 2007). Ezzel szemben az erős savak a cefrébe kerülve azonnal disszociálnak és jelentős mennyiségű proton keletkezik a külső környezetben. Ez hatással van a sejtfa szerkezetére. Inaktiválhatja a sejtfa transzport fehérjéit és denaturálhat más sejtfahez kötött fehérjét (Booth *et al.*, 2003). Az élesztők bizonyos mértékig tolerálják a szerves savak által okozott stressz hatást (Warth, 1989a; 1989b).

### **Hőmérséklet**

A hosszú szénláncú illékony metabolitok akkumulációját nemcsak az alacsony pH, hanem a magas hőmérséklet is okozhatja. A 25-30 °C -on vezetett erjesztésnél a párlatok (pl. whiskey esetén) oktánsav, dekánsav, etil-dekanoát és etil-hexanoát tartalma növekszik (Kundiya *et al.*, 2010; Ramsay *et al.*, 1984). Az élesztőgombák számára optimális erjesztési hőmérsékleti tartomány 10 – 28 °C. Hidegebb tartományban leginkább a láger típusú sörélesztők és néhány borélesztő képes erjeszteni, míg az ipari etanol gyártásnál 30 °C feletti tartományban alkalmaznak szelektált élesztőtörzseket (Deák, 2006). Az elsődleges gyümölcсарomák megőrzése érdekében a 15 – 18 °C-on történő irányított erjesztés javasolható, mert a széndioxid lassú képződése nem mossa ki a gyümölcs finom, elsődleges aromáit.

## **2.6 A pálinkagyártás műveletei**

A pálinkagyártás három fő műveleti lépésből és több kisebb jelentőségű, de a minőség szempontjából elengedhetetlen műveletből tevődik össze, amelyet a 3. ábra szemléltet.



3. ábra: A pálinkagyártás folyamatábrája (Nguyen *et al.*, 2013)

A gyártás folyamatát megelőzi a gyümölcs mosása, és átválogatása, amely során a fertőzött gyümölcsöket, valamint a gyümölcsök külsején levő szennyeződések (a növényvédőszer maradványok, talaj maradványok, természetes mikrobiota stb.) eltávolítják. Ezt követi a mosott gyümölcs feldolgozása.

### 2.6.1 Cefrőzés

A cefrőzés első lépése az aprítási művelet, amely a csonthéjasoknál a magozással együtt történik a pálinka minősége miatt, ugyanis a magok belsejében található amigdalín glükózzá, benzaldehiddé és hidrogén-cianiddá bomlik. Az utóbbi vegyület az alkoholban korlátlanul elegyedik és gőze rendkívül mérgező. Gyakorlatban a mag-karakter miatt a szárított mag 20-25%-át keverik vissza a kierjedt cefréhez a lepárlás megkezdése előtt). Az aprítás célja a növényi szövet felszakítása, homogénizálása. Ez fokozza a sejtszövetek szénhidrát, sav és egyéb szerves anyagainak felszabadítását és folyadékfázisba történő átvitelét (Békési *et al.*, 2010). Az almatermésűek aprítása késes darálóval történik, míg a csonthéjasok aprítására a verőléces passzírozó terjedt el leginkább az iparban. Az utóbbi berendezés egyszerre magozza és pépesíti a gyümölcsöt.

A második lépés a fermentációt elősegítő enzimek adagolása. A pektin a magasabb rendű szárazföldi növények sejtfalában található, kocsonyásító hatású poliszacharid (poli-galakturonsav-metil észter), és minden gyümölcsben előfordul változó mennyiségben. A pektin a természete miatt jelentősen gátolja az értékes szervesanyagok folyadékfázisba való átvitelét. Ennek alapján a cefrőzés hatékonyságának fokozására pektinbontó enzim készítményeket alkalmaznak (Békési *et*



al., 2010; Panyik, 2013). A pektin bontásánál az enzimek készítmény galakturon-metilészteráz aktivitása a metanol koncentráció növekedését eredményezi, amely hátrányt jelent a pálinka minősége szempontjából. A borászatban és pálinkagyártásban csak nem génmódosított és GRAS státuszú enzimek készítmények engedélyezettek.

Az enzimadagolást a pH beállítása követi. A legtöbb patogén vagy romlást okozó baktérium pH optimumának alsó határa pH 3,4 és pH 4,0 közé esik. Ezzel szemben a szeszipari fajlesztők pH optimuma jóval alacsonyabb, még pH 2,8 mellett is képesek aktív anyagcserét folytatni. Az irányított erjesztésnél célszerű a cefre pH-ját 3,2 és pH 3,5 közé állítani. A savszegény gyümölcsök esetén (körte, faeper, stb.) különösen javasolt a sav adagolás, mivel a cefréik magasabb pH értéke miatt kevésbé védettek a romlást okozó baktériumokkal szemben (Panyik, 2013).

A pH beállítása után a tápsó adagolása következik. A tápsó élesztő-autolizátumot tartalmaz, amelyet kiegészítenek ammónium sókkal, ureával, foszfátokkal,  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  sókkal, valamint vitaminokkal (niacin, pantoténsav, folsav stb.). A szerepe abban rejlik, hogy tartalmazza azokat az anyagokat, amelyek az élesztő szaporodásához és a zavartalan erjedéshez szükségesek. A cefrőzési folyamat az élesztő adagolásával lezárul (Panyik, 2006).

## 2.6.2 Fermentáció

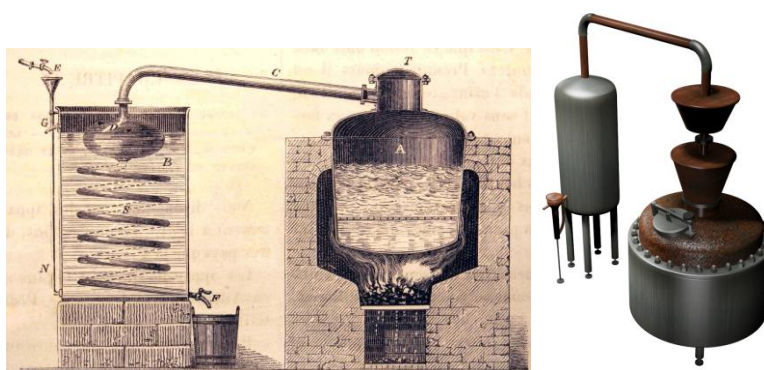
Az italtechnológiákban többféle fermentációs eljárás ismert. A legegyszerűbb fermentációs eljárás a spontán erjedés, amikor a gyümölcs természetes mikroflórájának mikroorganizmusai végzik az alkoholos erjedést. A módszer hátránya a gyenge alkoholkhozatal és a magas illósav tartalom. A héjon megtapadó tejsav-, vajsav-, ecetsav- és talajbaktériumok befertőzhetik a cefrét és kellemetlen ízű és illatú metabolitokat juttathatnak a cefrébe. A vadélesztők károsan befolyásolják az erjesztés folyamatát, ezért italipari etanol előállítására szelektált fajlesztőket alkalmaznak (Békési *et al.*, 2010; Magyar, 2010)

A szakaszos erjesztés során az erjesztőtartályt legfeljebb a teljes térfogat 80%-áig töltik. Az intenzív erjedés 8-72 óras lag szakasz után kezdődik. Az irányított erjesztésnél célszerű a pH és a szárazanyagtartalom változását folyamatosan nyomon követni. A mérések eredményei rámutathatnak az erjesztési hibákra (mikróbás fertőzés, tápanyag probléma stb.) és igazolhatják a helyes fermentációvezetést és a kihozatal határfokát.

Az átvágásos (fél folyamatos) erjesztés során a főerjedési szakaszban levő cefre felét vagy harmadát a következő tartályok beoltására használják. Ez a módszer nagyszámú erjesztő tartályt igényel, továbbá fontos figyelni, hogy hány tartályt oltottak be ugyanazzal az élesztővel, ugyanis az élesztők előregszenek és ilyenkor a határfok és a minőség is csökken (Békési *et al.*, 2010).

### 2.6.3 Desztillálás

A következő művelet a kiejedt cefre lepárlása. Általános elv a pálinka/párlat előállításánál az erjedést követő mielőbbi desztillálás. Desztilláló berendezések számos változata ismert. A pálinkák desztillálására általában szakaszos lepárlókat, elsősorban a kisüsti (4. ábra) és újabban az ún. oszlopos/erősítő feltétes berendezéseket (5. ábra) alkalmaznak. A pálinka desztillálására használt kisüsti berendezésekkel szemben követelmény, hogy a páracső az üst irányába lejtjen, így a részleges deflegmáció során kondenzáló komponensek nem kerülnek át a párlatba, és a párlat gazdagabb lesz a gyümölcsökre jellemző illó komponensekben. Kisüsti pálinka legfeljebb 1000 literes üstben, legalább kétszeri szakaszos lepárlással előállított pálinka lehet (Panyik, 2006). A kisüsti desztilláló berendezések egyszerű szerkezetek. Legegyszerűbb változatai egy üstből, páracsőből és egy hőcserélőből állnak. Az egyszerű szerkezetet számos esetben bonyolítják azzal, hogy minőség javító egységeket iktatnak be a pára útjába. Ilyen kiegészítő lehet a Pistorius-tányérnak nevezett korlátolt hatékonyságú deflegmátor, vagy a páracsőben kialakított tartály réztöltettel stb. (Békési *et al.*, 2010; Jacques *et al.*, 2003). A hagyományos kisüsti berendezések esetében kevés a szabályozási lehetőség (fűtés intenzitás, kondenzáció mértéke, részleges deflegmáció intenzitása) a lepárlás folyamatának a szabályozására.



**4. ábra: Kisüsti típusú desztilláló berendezések**

Bal: fatüzelésű konyak és pálinkagyártásra használt berendezés (Bibliomata, 2014).

Jobb: Pistorius tányérral ellátott gőzfűtésű kisüsti pálinkafőző berendezés

A modern oszlopos desztilláló berendezéseknél (5. ábra) szabályozhatjuk a reflux arányát, az elméleti és gyakorlati tányérszámot, a tányér típusát, a deflegmáció mértékét és idejét, a fűtés módját (fenék vagy falfűtés), a keverés intenzitását és profilját, sőt a párologási felületet is növelhetjük (Mujtaba, 2004). Az oszlopos berendezésnél a fizikai tányérok hivatottak a részlegesen kondenzáló komponenseket felfogni és visszajuttatni az üstbe (Gyimesi *et al.*, 1979; Piggot, 2003). Az etanol-víz elegy minimál-forrponotú azeotróp, nem ideális elegy és maradéktalanul nem választhatóak el egymástól. Az elválasztási hatékonyság növelésére egyre

bonyolultabb, energia és hűtővíz igényesebb berendezések jelentek meg. A desztillált italok gyártásában ma leginkább a buboréksapkás, a szitatányéros és a töltetes oszlopok használatosak. Az oszlop kialakításánál alapvető, hogy az alja legyen a legforróbb, valamint a hőmérséklet az oszlop csúcsa felé csökkenjen (Katzen *et al.*, 2003).



**5. ábra: Oszlopos desztilláló berendezés (Hagyó Kft.)**

A pálinkagyártásban használt szakzsargon a rektifikáló oszlopot több névvel is illeti, leggyakrabban az "erősítőfeltétes oszlop" kifejezést használják, de gyakran hallani az "aroma oszlopos" kifejezést is. Az oszlop felső negyedében deflegmátor (hőcserélő) helyezkedik el, amelynek a hőmérséklete pontosan szabályozható. A deflegmátorban kondenzált, kevésbé illékony komponensek visszajutnak az oszlop aljára, miközben a felfelé áramló gőzökkel érintkeznek. Az alkohol és az illékonyabb komponensek a tányérok folyamatosan dúsulva felfelé haladnak (ellenáram elve) és a hőcserélőben kondenzálnak (Katzen *et al.*, 2003). Az elméleti 100%-os hatékonyságot az alkohol víz azeotrop jellege miatt atmoszférikus desztillációval nem lehet elérni (Katzen *et al.*, 2003; Szep *et al.*, 2008).

A desztillált italok gyártására használt berendezések ma acélból és rézből készülnek. A rézfelület alkalmazása nemcsak a könnyű megmunkálhatósága és hővezető képessége miatt előnyös, hanem a réz katalizátor szerepe miatt is. A réz szerepe kettős: megköti a kénvegyületeket és így nem kerülnek a párlatba káros, illékony kénvegyületek, illetve a lepárlásnál katalizálja az aromaanyagok kialakulását (Piggot, 2003).

Desztillálás során a párlat komponensei illékonyaságuk sorrendjében távoznak az üstből. Az illékonyaság a folyékony és szilárd halmazállapotú anyagoknak az elpárolgásra való készségét jelenti. Egy komponens elpárolgásra való készsége az adott komponens gőznyomásával függ össze, a komponens gőznyomása viszont a hőmérséklettel emelkedik. Az „A” komponens, gőznyomása azt a nyomást jelenti amennyivel az „A” komponens hozzájárul az össznyomás

kialakulásához, ami egy adott hőmérsékleten egyensúlyt tart az anyag szilárd, vagy folyékony fázisú parciális nyomásával. Az anyag illékonyságát nem csak a forráspontja határozza meg, hanem a relatív mennyisége is (Katzen *et al.*, 2003; Szep *et al.*, 2008).

Az illékonysági sorrendnek köszönhetően három részre oszthatjuk a desztillátumot: elő, közép és utópárlatra. Az előpárlatban az alkoholnál illékonyabb komponensek dúsulnak fel, beleértve a gyümölcsök egyes aroma alkotóit is. Ebben a frakcióban dúsul fel az acetaldehid és az etilacetát is, amelyek a köztudatban az oldószeres pálinkaként ismert hatásért felelősek. Az utópárlatban az alkoholnál kevésbé illékonyabb, elsősorban a hosszabb szénláncú alkoholok dúsulnak fel, amelyek kellemetlen ízűek és szagúak. Korlátozott mértékben oldódnak vízben, így a hígított pálinkát opállossá tehetik (Piggot, 2003). A középpárlat az a frakció, amely a kellemetlen aromájú alkotóktól leginkább mentes, értelemszerűen ez a frakció kerül fogyasztásra (Békési *et al.*, 2010; Piggot, 2003).

## 2.7 Párlatok aromái

A fermentációval előállított alkoholos párlatok számos komponenst tartalmaznak, amelyeknek többsége 100 °C alatti forrásponttal rendelkezik és érzékszervi szempontból aromaanyagoknak tekinthetők. A csoportosításuk a származás alapján történik: az elsődleges aromák a gyümölcsből származó komponensek, a fermentáció során keletkezők pedig másodlagosak, míg a desztillálás során képződő harmadlagos aromák. Az illékony komponensek összessége az aromaprofil, amely tükrözi a párlat tulajdonságát és karakterét. Ennek alapján az aromaprofil alkalmas lehet egy adott gyümölcs-párlat beazonosítására.

### 2.7.1 Alapanyagból származó aromák

A gyümölcsökben számos aromakomponens található, amely az érés során keletkezik (Sanz *et al.*, 1997). Ezek a terpének és a furánok, amelyek a körtében is fellelhetők. A terpének főleg monoterpének és szeszkviterpének ( $\alpha$ -farnezin), amelyek kétféle módon keletkezhetnek a mevalonsavból:

- a) a citoplazmatikus acetát-mevalonát úton a szeszkviterpének,
- b) alternatív nem mevalonát 1-deoxi-D-xilulóz-5-foszfát úton az izoprének, mono- és diterpének (Eisenreich *et al.*, 1998).

Egyéb bioszintézis utak során is keletkeznek aroma komponensek.

Az illékony ízkomponensek kialakulása a lipidekből kétféle módon jöhet létre: az egyik út a  $\beta$ -oxidáció, míg a másik a lipoxigenáz út. A körtékben és almákban elsősorban a  $\beta$ -oxidáció a jellemző. Az alkohol aciltranszferáz (AAT) katalizálja az alkoholok és savak észtereződését az

acetyl-KoA savgyökének átvitelével az alkoholra, míg az észteráz enzim hidrolizálja az észtereket. Ezen enzimek tulajdonságai és mennyiségük, valamint a szubsztrátumok (acetyl-KoA és az alkoholok) elérhetősége, határozza meg az észterek jelenlétét a gyümölcsökben (Rapparini *et al.*, 2010).

Az elsődleges aromák az erjedés során nem bomlanak el és a mikroorganizmusok sem képesek szubsztrátumként hasznosítani, így a desztillálás során átkerülnek a párlatba. A prefermentatív aromaanyagok a feldolgozás során kerülhetnek a cefrébe, ezek jellemzően a polifenol-oxidáz enzim által termelt fanyar íz hatást okozó vegyületek (Satora *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011). A gyümölcsből származó aromák esetében fontos a gyümölcs megfelelő érettségi állapota. Az érési folyamatot kísérő jelenség a klimaktérikus légzés megindulása, a raktározott tartaléktápanyagok hidrolízise, továbbá a poliszacharidok, lipidek, fehérjék és aminosavak enzimesen illékony vegyületekké alakulása (Costa *et al.*, 2012; García-Salinas *et al.*, 2016; Huan *et al.*, 2016).

A Vilmoskörte és még számos körtefajta (Kieffer, Clapp kedveltje stb.) utóérő típusú, amely azt jelenti, hogy a gyümölcs leszedését követően, a tárolás ideje alatt alakul ki az illat- és rostszerkezete, valamint a cukor-sav arány javul, a jellemző aromaprofil kialakul az adott gyümölcsben. Suwanagul és munkatársai (1998) nyolc érett körtefajta illékony összetevőit összegyűjtötték és azonosították GC-MS rendszerrel. A vizsgálataik során 112 aromakomponenst határoztak meg. Az illékony összetevők az észterek, alkoholok, szénhidrogének, aldehidek és ketonok közül kerülnek ki. Az illékony nagyobb része (60-98%) az észterek. A legtöbb vizsgált körteben a hexil-acetát a legjellemzőbb aromakomponens, kivéve a Bosc Kobak és Vicar of Winkfield fajták esetében, ahol a butil-acetát volt a jellemző aromakomponens. Dekadiénsav észtereket is meghatározták minden fajtában, különböző mennyiségben és izomerizációs formában; 2-8 szénatomú, egyenes láncú alkoholok a második legnagyobb csoportként vannak jelen az aroma-framokban a körtéknél.

A körte jellemző aromái közül a hexil-acetát és a transz,cisz-2,4-dekadienoát a legmeghatározóbb komponensek (Rapparini *et al.*, 2010). A hexil-acetát kísérő aromaként vesz részt a körte karakter kialakításában, míg a gyümölcs tipikus karakterisztikájáért a transz-, cisz-2,4-dekadienoát a felelős.

HPLC, GC és érzékszervi módszerekkel számos körtefajtát megvizsgálva arra a következtethetünk, hogy a 2,4-dekadienoátok minden körte fajtánál jellegzetes aromák. Ezek relatív mennyisége, összetétele alakítja ki a fajtára jellemző íz- és illatvilágot (Paillard, 1990). A nagymértékű ipari körteital gyártás ellenére a körtefajtákra, évjáratra, illetve termőhelyre vonatkozó analitikai információgyűjtés szakirodalma igen hiányos. A 2,4-dekadienoáton és a hexil acetáton kívül más komponenseket is azonosítottak körte-karakterisztikus aromaként (Wei *et al.*,

2016; Yi *et al.*, 2016; Zlatić *et al.*, 2016). Ezek közül két komponens: az oktán-1-3-diol és az 5-cisz-oktán-1,3-diol kevésbé jelentősek, mint a fent említettek. Leginkább csak egyes körtefajtákra jellemző, és elsősorban fajta azonosításra alkalmasak (Beuerle *et al.*, 1997). Az oktán-1-3-diol számos almafajtában is megtalálható és igazolták, hogy almáknál karakter kialakító szerepe van (Kahle *et al.*, 2005).

### 2.7.2 A cefre erjesztése és tárolása során keletkező aromák

Hahn és munkatársai (2016) közlése szerint egyes fermentációs eredetű, másodlagos aromakomponensek bioszintézise már a körtében elkezdődik és a körte sejtjei normál metabolizmusról fermentációra váltanak. Ez a jelenség megmagyarázza a friss körtében mérhető magasabb acetaldehid koncentrációt. Természetes élelmiszerekben az acetaldehid nem számít minőségromtó tényezőnek (Bautista-Baños, 2014). Bizonyos mértékig, az acetaldehid előfordul kenyérben, kávéban és érett gyümölcsökben is (Uebelacker *et al.*, 2011). Egyes élelmiszerekhez, ízjavítóként kismennyiségű acetaldehidet adnak (Feron *et al.*, 1991). Sörökben, nem alkoholos italokban, vodkában, ginben kevesebb acetaldehid található, mint a pálinkákban, borokban, likőrökben vagy a whiskykben. Az acetaldehid természetesnek ható szintjeiben jelentős eltérés lehet (pl. 0,78-1850 mg/l gin és grappa). Ha az acetaldehid mennyisége meghaladja az ingerküszöböt, akkor a közeg, amiben van, „oldószeres, oxidált” jellegűvé válik (Paiano *et al.*, 2014).

Az aromaanyagok másik nagy csoportját képezik az észterek, közülük leginkább az etil-acetát, a butil-acetát, a hexil-acetát és a 2-metil-butil-acetát halmozódik fel az erjesztett italokban. Az észterek számos gyümölcs, zöldség, étel és ital természetes aromakomponensei, pl. az alma vagy a banán karakteres ízét az észterek adják (Ortiz *et al.*, 2010; Young *et al.*, 1996).

A fermentáció során számos kedvező és kedvezőtlen illatú és ízű komponens is képződik. Scacco és munkatársai (2012) a *S. cerevisiae* élesztő tanulmányozása közben fehér borokban jellegzetes körtearoma összetevőket (cisz-etil-4-dekanoát és a transz-etil-4-dekanoát) mutattak ki, amit az élesztő tevékenységének tulajdonítottak. Nykanen és munkatársai (1983) pedig beszámoltak arról, hogy a borban az élesztők képesek a körte vezérearomáit szintetizálni.

A másodlagos aromaanyagok mennyisége dinamikusan változik a cefre érése és tárolása során. Általánosan elmondható, hogy minél hosszabb ideig tárolódik gyümölcscefre, annál kellemetlenebb szagú és ízű komponensek kerülnek túlsúlyba a párlatokban (kozmaalkoholok). A cefre tárolása során a keletkezett, elhalt élesztők autolizátumok (aminosavak) az elődleges és más másodlagos összetevőkkel reakcióba lépve új íz-karaktert alakítanak ki. Ezen aromakomponensek elsősorban az észterek. A nagy szénhidrát koncentráció a cefrékben az erjedési melléktermékek

arányait is módosítja. Egyik jellemző hatása, az élesztőgombák szignifikánsan megnövekedő ecetsav termelése (Ferreira *et al.*, 2006).

Az ecetsavképzés mértéke a *S. cerevisiae*-ben törzsenként változó, de amíg normál cukortartalmú (150-200 g/l) cefrék erjesztésénél általában 0,2-0,5 g/l között van, addig 300g/l cukortartalom fölött 1-3 g/l is lehet. A borélesztők közül a *S. cerevisiae* törzsek általában több ecetsavat termelnek, mint a *S. uvarum*, de a cukortartalom mindkét fajban fokozza az illósav képzést. A nagy cukorkoncentráció a glicerintermelést is növeli. Bizonyos glicerín koncentrációt elérve, ez a hatás visszaszorul. A nagy külső koncentráció gátolja a glicerínsejtből történő diffúzióját és csökkenti a glicerinfoszfát hidrolízisét (Magyar, 2010).

Az alkohol toxikus hatása a sejtek élettani funkcióit módosítja. Az élesztők anaerob szaporodásának felső határa törzsenként változó és erősen függ a mátrixtól, vagyis a cefrétől, általában 14-15 (V/V) %. Aerob körülmények között ez az érték magasabb, akár 18 (V/V) % is lehet. Az alkohol legfontosabb támadási felülete a sejtmembrán. A membránlipidek oldásával a membrán átjárhatóságát fokozza a protonokkal szemben. Leépíti a sejt külső és belső környezete között fennálló proton gradienst, csökkenti a sejt belső pH-ját és specifikusan gátolja a membránhoz kötött ATP-áz enzim működését (Magyar, 2010).

### 2.7.3 Lepárlás során képződő aromák

Desztillálás során a hőmérséklet emelkedésével egyre több nagy molekulájú, az alkoholnál kevésbé illó összetevő kerül a folyadék fázisból a gőzfázisba. Az így illékonyvá vált komponensek egy része kellemes aromájú, általában enyhe viaszos szájérzetet vált ki, azonban a többségük kellemetlen ízű és illatú vegyület. Minél melegebbé válik a cefre a desztillálás során, annál több ilyen aromaanyag kerül át a párlatba. Az, hogy ezek a komponensek milyen hőmérsékleten kerülnek illékony állapotba, nemcsak a fizikai tulajdonságaiktól (forrpon, molekula méret stb.), hanem a cefrében összegyűlt mennyiségtől, valamint a cefre feletti gőztér kérdéses komponens telítettségétől is függ.

A pálinkánál a lepárlás során gazdagodhat az aromajelleg. A desztilláció során kisebb mennyiségű, de nagy jelentőségű aromaanyagok képződnek. A desztilláció során az erős hőhatás miatt az aromakomponensek szétesnek vagy átalakulnak (új komponensek képződnek), amit a kisüsti és a rektifikáló oszlopos párlatok között tapasztalható íz és illatbeli különbség is megerősít. A rektifikáló oszlopon készült pálinka illékony aromakomponenseket csak egyszer, míg a kisüsti desztillálás során kétszer tettük ki erős hőhatásnak jelentősen növelve azok átalakulását. A desztillálást követően a párlatokat ágyazhatjuk, hordóban érlelhetjük, vagy hígítás után palackozhatjuk is. Célszerű a párlatokat három hónapig tárolni a kereskedelmi forgalomba hozatal előtt (Békési és Pándi, 2005; Panyik, 2013).

A harmadlagos aromák mennyisége, minősége és dominanciája függ a tárolás módjától, a tárolóedény anyagától, a jelenlévő oxigén mennyiségétől, a gyümölcságy összetételétől és frissességétől, illetve az aszalásától, a hordó minőségétől, az érlelés vagy az ágyazás időtartamától stb. A frissen lepárolt pálinka a hő hatására szétesett aromák miatt még “karcosnak” hat és kissé jellegtelen (Panyik, 2006). E minőségi probléma kiküszöbölésére a pálinkák/párlatok pihentetése nyújthat megoldást. A pihentetéshez pórusmentes, rozsdamentes tartályok használata ajánlott. A friss párlatok mindig “szögletesek”, “nyersek”, mivel az új aromaanyagok még nem harmonizálódhattak (Panyik-Lanszki *et al.*, 2008). A párlatok pihentetése és érlelése a levegő oxigénjének segítségével elengedhetetlen követelmény a megfelelő aromaprofil kialakítása érdekében. A tárolóedényekben 10–15% gőzteret érdemes hagyni, a komponensek gőz/folyadék fázisok határrétegén történő kicserélődésére (Panyik, 2006). Az ebbe a gőztérbe szorult oxigén elegendő a mikrooxidációs folyamatok oxigén-igényeinek kielégítésére. A desztillálást követően a párlatokat ágyazhatjuk, hordóban érlelhetjük vagy hígítás után palackozhatjuk is. Célszerű a párlatokat három hónapig tárolni a kereskedelmi forgalomba hozatal előtt (Békési és Pándi, 2005; Panyik, 2013).

A körtepálinka jellege általában “visszafogott”, nem túl intenzív illatú. Illata citrusos, fűszeres, selymes és fiatalosan, frissen gyümölcsös. Ízvilágában meghatározóan a gyümölcsre jellemző, „lágý”, “könnyed” fajtajelleg dominál, de jól érezhető a gyümölcsshéj fanyarsága és a kősejtek kesernyés íze is. A Vilmoskörtéből készült pálinkák illatalkotói bonyolult összetételűek, de rendkívül intenzívek. Az őszi-téli körtékből főzött pálinkák illatvilágát illetően visszafogottak, enyhe fűszeresség tapasztalható, ízükre az érett gyümölcsre emlékeztető gyümölcsösség jellemző (Békési és Pándi, 2005).

## 2.8 Nyersanyag-fermentáció-párlat kapcsolata

Az ágyazatlan, nem érlelt párlatokat alkotó illékony komponensek csak elsődleges és másodlagos aromakomponensek lehetnek, azaz alapanyag és fermentáció eredetűek. Az időjárási körülmények, mint a napsütés, a szél és a csapadék, valamint a termesztés során alkalmazott növényvédőszeres meghatározzák a termény minőségét. A begyűjtést megelőző eső a gyökérszinten keresztül bejut a növénybe, így a gyümölcs beltartalmi minőségét hígítja. Az elhúzódó, erős szárazság okozta stressz, a nitrogén hiányhoz hasonlóan, szintén korlátozza az aroma komponensek képződését (des Gachons *et al.*, 2005). A Golden Delicious almafajta példáján kimutatták (Ciesa *et al.*, 2013; Salas *et al.*, 2011), hogy a gyümölcs illékony anyagainak termelését, különösen az alkoholok és észterek termelését a környezeti tényezők erősen befolyásolják. A magasabb hőmérsékletek a gyümölcs növekedését és érését fokozza, azonban egy bizonyos hőmérsékleti határon túl a növény asszimilációs tevékenysége csökken. Alleweldt 1982-ben



megállapította, hogy átlagosan 25°C az a hőmérséklet, amelyen a fotoszintézissel járó asszimilációs ráta optimálisnak tekinthető (Alleweldt *et al.*, 1982). Természetesen az optimális hőmérséklet felső határát egyéb tényezők (a levegő páratartalma és nyomása stb.) is befolyásolják, így inkább szinergiáról beszélhetünk, mintsem egyetlen környezeti tényező elkülöníthető hatásáról. Az előbbi megállapítást Kliewer (1973) tanulmánya alapozta meg, amely szerint a fotoszintézis 18°C és 33°C között a legintenzívebb, a teljes kapacitás 90-100%-a. Ezen az intervallumon kívül a fotoszintézis intenzitása jelentősen csökken. További tanulmányok azt is bizonyították, hogy a hő okozta stressz csökkenti a gyümölcsök glükóz tartalmát (Sepulweda *et al.*, 1986). A nedves talaj négyszer több hőt képes felvenni és tárolni, mint a száraz talaj, ezért a nedves talaj később éri el a fagyponthoz, mint a száraz talaj (Reiners, 2001).

Moretti és munkatársai (2010) egy tanulmányuk szerint az atmoszférikus CO<sub>2</sub> koncentráció emelkedése direkt és indirekt módon is hatással van a másodlagos növényi metabolitok szintézisére. Ezzel a jelenséggel ugyancsak magyarázható, hogy egy adott évjáratú gyümölcs párlat miért rajzolódik elkülönülő csoportként egy lineáris diszkriminancia ábrán, mint az azonos gyümölcsfajtából készült, de eltérő évjáratú párlat. A hőmérséklet emelkedés vagy csökkenés azáltal, hogy módosítja a gyümölcscukor összetételét, szerves savtartalmát, flavonoid mennyiségét, fizikai állagát és az antioxidáns aktivitását. Ezen tényezők közvetlen hatással vannak a fotoszintézisre. A hosszú ideig tartó atmoszférikus széndioxid szintemelkedés, különösen a begyűjtést megelőző időszakban maradandó hatást vált ki a begyűjtött terményben (Moretti *et al.*, 2010).

A szárazság által okozott stresszhatás nemcsak a beltartalmi értékekben nyilvánul meg, hanem a gyümölcsök fiziológiai tulajdonságait is érinti, valamint csökkenti a hozamot. Morandi és munkatársai (2014a) a hosszú idejű szárazság levelek gázcseréjére gyakorolt hatásait, valamint a csapadék és a növény növekedése közti rövid idejű (24 óra) összefüggéseket vizsgálták, hogy megértsék, hogy a különböző fiziológiai folyamatok kölcsönhatásai hogyan segítik a körtét a fokozódó szárazság okozta stressz leküzdésében, és hogy hogyan hatnak ezek a kölcsönhatások a körte termésének időszakos teljesítményére. A vegetációs időszakban a laza talajszerkezet és a száraz levegő kiváltott talaj/levegő víz-gradiens csökkenés a szárazság okozta stressz fokozódásához vezetett. Az első fiziológiai hatás, amit megfigyeltek (Morandi *et al.*, 2014b), hogy a szárazság hatására a gyümölcsök szára összeszűkül, víztartalma jelentősen lecsökkent, ennek következményeként a növény szállítórendszerének (xilém) áteresztési kapacitása is csökkent. A szár összeszűkülése a gyümölcs növekedését korlátozta, ezt napi gyakorisággal mérték. A levelek fotoszintézise a szárazság és a meleg hatására ugyancsak csökkent, de ez csak késleltetett hatást jelentett a gyümölcs szár floémjában áramló folyadékokra. A megfigyelések alapján arra a

következtetésre jutottak, hogy a floém fizikai állapota jelentősen befolyásolja a gyümölcs szárazanyag tartalmát.

Diamantidis és munkatársai (2002) alma gyümölcsöket vizsgálva megerősítették, hogy a gyümölcsök húsának homogenitása, oldott savtartalma, keményítő indexe, etilén koncentrációja, színe, héját fedő foszfolipidek zsírsav összetétele, valamint a becsült antioxidáns tartalma erősen változik a hőmérsékletváltozás függvényében. Továbbá erős szignifikáns korreláció tapasztalható a hősokk dózis és a vegetációs periódus között.

Az ásványi anyagok (a kalcium, magnézium vagy a cink) nélkülözhetetlenek számos enzim működéséhez (Candan *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Sarkadi, 2011). A talajban található víz kioldja kötött, sók formájában levő ásványi anyagokat, majd ezeket az elemeket a növény a gyökérzetén keresztül a talajból oldat formájában veszi fel. Tartós szárazság esetén ezek az elemek hegesedést okoznak a növény szöveteiben. Hasonló jelenség figyelhető meg, amikor heves esőzések alkalmával a növények ásványianyag tartalma jelentősen hígul. A cink több mint 300 enzim működéséhez szükséges elem (Frylinck *et al.*, 1998). A fehérjék (enzimek) kötődési helyei, kötődés mechanizmusa cink függő. A cink részt vehet közvetlen módon a katalízisben vagy közvetett módon azáltal, hogy jelenlétével stabilizálja a fehérje szerkezetét, lehetővé téve a katalitikus tevékenységet. A kalcium, a magnéziumhoz hasonlóan, számos enzim működéséhez nélkülözhetetlen. Azonban az enzimeken kívül egyéb aktív biológiai szerepet betöltő molekulával is interakcióban van. Jelentőségét az is bizonyítja, hogy a sejtekben evolúciós szinten kialakult pumparendszer szabályozza a  $Ca^{++}$  mennyiségét és a Ca-hoz kötött aktív transzporttal az egyes szubsztrátumok sejtbe juttatását (Frylinck *et al.*, 1998).

A gyümölcsök illó komponenseit legalább öt féle vegyületcsoport alkotja. Ezek bioszintézisében számos metabolikus útvonal vesz részt. Bár ezen metabolikus utak nem mind teljes részleteikben ismertek, de megállapítható, hogy a legtöbb gyümölcs esetében hasonlóak. Az íz és aromaanyagok bioszintézise aminosavakból, membrán lipidekből és szénhidrátokból indul ki (Sanz *et al.*, 1997). Az illó komponensek szintézise biokémiai folyamatokban képződnek. A vegyületek további enzimátikus átalakuláson eshetnek át, hidroxilálódnak, acetilálódnak, metilálódnak, így a képződő aromák spektruma tovább bővül. Az ilyen jellegű átalakulások illékonyság növekedéssel járnak (Dudareva *et al.*, 2004; Gang, 2005).

Az aromakomponensek bioszintézisének legfőbb előfeltétele, hogy a prekursorok (zsírsavak és aminosavak) megfelelő mennyiségben legyenek jelen. A gyümölcs fejlődése során ezek mennyisége és arányos összetétele erősen szabályozott (Song *et al.*, 2003). Egyes aminosavak (alanin, valin, leucin, izoleucin, fenilalanin és aszparagin sav) közvetlen prekursorai a gyümölcsökben szintetizálódó aromakomponenseknek, metabolizmusuk során különböző alkoholok, savak, észterek és karbonilvegyületek keletkeznek (Baldwin *et al.*, 2002). A

fermentáció során a gyümölcsökhöz hasonló mechanizmussal alakítja az élesztő ezeket a komponenseket magasabb rendű alkoholokká.

A növényekben zajló bioszintézis sematikusán hasonlít a baktériumok és élesztők bioszintetikus folyamataihoz (Beck *et al.*, 2002; Tavaría *et al.*, 2002). A gyümölcsökben (banán, alma, eper, paradicsom) képződő elágazó szénláncú, magasabb rendű alkoholok, aldehidek és észterek elágazó szénláncú aminosavak (leucin, izoleucin, valin) metabolizmusa során képződnek (Goff *et al.*, 2006; Rowan *et al.*, 1996; Wyllie *et al.*, 2000). Az aminosavak ugyanakkor az acetil-CoA prekursorai is lehetnek, amelyek az alkohol észterezésében is részt vesznek. A folyamatot az acetil-CoA (AAT) transzferáz katalizálja. Az izoleucin a 3-metil-butanol és a 2-metil-butil-CoA prekursora is lehet. E két komponens észterezési reakcióján keresztül képződik a 3-metil-butil-2-metil-butanoát, ami a banán jellegzetes illatát adja. Az eperben az alanin szolgál prekuzorként a jellegzetes, illékony etil-észterek bioszintézisében, a szintézisben kulcsszerepet játszik az AAT (Perez *et al.*, 1992).

A szintén nagy jelentőséggel bíró acetálok aldehidekből és alkoholokból (leginkább metil és etil alkoholból) képződnek (Mastalerz, 1986). A valin, leucin, izoleucin, metionin, tirozin, triptofán és fenilalanin aminosavak  $\alpha$ -keto savvá transzaminálódhatnak (Chen, 1978; Eden *et al.*, 1996; Hazelwood *et al.*, 2008). A keletkező  $\alpha$ -keto sav egy dekarboxilációs folyamaton keresztül aldehiddé alakul, majd az Ehrlich metabolikus útvonalon keresztül magasabb rendű alkohol képződik belőle (Dickinson *et al.*, 1997; Ehrlich, 1907). A szénhidrát metabolizmusban képződő  $\alpha$ -keto savakból az anabolikus folyamatokban szintén magasabb rendű alkoholok szintetizálódnak (Chen, 1978). A magasabb rendű alkoholok (1-butanol) anabolikus szintézise anaerob körülmények között fokozódik (Mauricio *et al.*, 1997). Az acetálok stabilis molekulák, a desztillálás során nem bomlanak (Morrison *et al.*, 1990). Az utóerjedés szakaszában számos olyan összetevő képződik, amely a párlatok érzékszervi megítélését javítja vagy rontja.

Az illékony észterek meghatározzák a pálinkák bouquet-ját, számos ízesített szeszesital aromáját észterekkel alakítják ki. A fermentáció során képződő észterek többnyire az élesztősejtekben képződnek észteráz enzimek hatására. A cefrében kialakuló észterek mennyisége visszafogottabb, ott ugyanis a katalitikus feltételek kevésbé kedvezőek (Amerine *et al.*, 1972; Piggott *et al.*, 1989; Scheer, 1993).

Klosowski és munkatársai (2006) szerint az ecetsav etil és metil észterei, valamint a magasabb rendű alkoholok észterei (i-amil-acetát, i-butil-acetát, etil-hexanoát) is a fermentáció első nyolc órájában képződnek. A butanol és a propanol mennyisége évjáratonként eltérően szintetizálódnak a gyümölcsben, illetve a gyümölcs évjáratra jellemző beltartalmi értékeitől függően a fermentáció alatt is eltérő mértékben képződnek. A nagy hőösszeg és a sok napsütéses óra kevés csapadékkal társulva megnöveli a gyümölcsök relatív szénhidrát-tartalmát, ez végső

oron az alkoholhozamnak kedvez. Tartós szárazság idején, különösen a rövid gyökérzetű növények, nem tudnak sókat és szerves vegyületeket felvenni a talajból, így kénytelenek a tartalékaikat (víz és tápanyag) használni (Boyer, 1982). A csapadék mennyisége, a növény kitettsége a közvetlen napsütésnek, a levegő CO<sub>2</sub> tartalma, a vegetációs periódus hossza stb. mind befolyásolják a növények és így a gyümölcsök minőségét (Moretti *et al.*, 2010). A gyümölcs fermentációjával előállított párlatok minősége tehát közvetetten kapcsolatban van a gyümölcsstermő vidék mikroklímájával.

Az acetaldehid (ethanal) erősen illékony vegyület, forrponja 20,2 °C, számos gyümölcsben fellelhető (Uebelacker *et al.*, 2011). Viszonylagos mennyisége meghatározhatja a gyümölcs illatkarakterét. A pálinkákban legnagyobb mennyiségben előforduló aldehid. Mennyiségétől függően lehet üde, gyümölcsös, frissen kaszált fű, nyers vagy átható illatú (Miyake *et al.*, 1993). Nagyobb mennyiségű aldehid a gyümölcsben is tud szintetizálódni, az élesztőhöz hasonló mechanizmussal.

Korlátozott gáz diffúzionál, a gyümölcs sejtjei a gyümölcsben található cukrot elkezdik anaerob úton lebontani. Ha ez az állapot előrehaladott, akkor gyümölcsrothadásról beszélünk. Ezekben a gyümölcsökben magasabb az acetaldehid, etanol, metanol, etilacetát és amilacetát koncentráció (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2001; Lammertyn *et al.*, 2003).

Egy másik nagy jelentőségű illékony komponens csoport az észterek csoportja. Pálinkákban leggyakrabban fellelhető képviselőik az etilacetát, butilacetát, hexilacetát és a 2-metil-butil acetát. Az észterek fontos szerepet töltenek be az almák és más gyümölcsök aromaprofiljának kialakításában (Echeverria *et al.*, 2008; Young *et al.*, 1996). A Jonatán és a Jonagold almákat az alacsony alkil-észter arány, valamint a magas cis-3-hexen-1-ol és trans-2-hexanal szintek jellemzik. Mivel mindkét fajtára jellemzőek ezek a vegyületek és azok megoszlásai, ezért azok nem alkalmasak arra, hogy a két almafajta elkülönítésénél markervegyületeknek tekintsük őket.

## 2.9 Párlatok jellemzési lehetőségei

Az alkoholos italok analitikája és minőségi változásainak nyomon követése alapvető feladat a minőség biztosítás és ellenőrzés területén. Manapság megnőtt az igény azon módszerek fejlesztése és alkalmazása iránt, amelyek alkalmasak az élelmiszerek és italok azonosítására, valamint földrajzi és minőségi eredetük ellenőrzésére (Aylott, 2013). A pálinkák eredetvédelmének biztosítására és ellenőrzésére jelenleg nincs olyan átfogó módszer, amely kivitelezése egyszerű (egyszerű mintaelőkészítés, robosztus mérés technika, gyors adatértékelés) és nem költséges. Az élelmiszerek és italok analitikai eszköztára gazdag és igencsak szerteágazó. Az egyszerű érzékszervi minősítéstől a költséges NMR vizsgálatokig bármit alkalmazhatnak az élelmiszerkutatók, az élelmiszer biztonsági szakemberek és a minőségbiztosítók.

Asensio és munkatársai (2008) átfogó, a mai kor igényeinek megfelelő gyors és olcsó, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) módszeren alapuló módszerrel gyűjteményt publikált, amelyek alkalmasak az élelmiszerek csomagolásán feltüntetett alapanyagok nagy biztonsággal történő beazonosítására, a genetikailag módosított alkotók jelenlétének, a sugárzó, illetve nehézfémeket tartalmazó összetevők, valamint az allergének kimutatására.

Az NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroszkópia széleskörben alkalmazott eljárás az italok és élelmiszerek analitikájában (Marccone *et al.*, 2013). Ciprusi törkölypárlatok (Zivania) eredet és minőségi analitikájában nagyon hatékonyan bizonyult a  $^1\text{H-NMR}$  módszer (Cuny *et al.*, 2008; Petrakis *et al.*, 2005), de almafajták (Belton *et al.*, 1998) és sörök (Duarte *et al.*, 2002) analitikájánál is sikeresen alkalmazták. A nagy felbontás ellenére, az NMR önmagában nem elegendő egy ital alapanyagának, a földrajzi eredetének megállapítására, továbbá a bonyolultsága és a magas üzemeltetési költsége miatt korlátozott az alkalmazása (Peres *et al.*, 2007).

Görög borok minőség-vizsgálata közben megfigyelték, hogy a fermentációból származó acetaldehid, etil acetát és az amil-alkoholok nagy mértékben befolyásolják az ital ízét és minőségét (Apostolopoulou *et al.*, 2005). Ezek az illékony komponensek a bor alapú párlatokba is átjutnak, ezért ezek jelenléte, egymáshoz viszonyított aránya vagy azok teljes hiánya utalhat arra, hogy valódi szőlőből, fermentáció útján készült a párlat, vagy aroma és szesz elegye csupán. Peruban 33, a kereskedelemben forgalmazott, olasz szőlőből készült borpárlat (Pisco) mintákat vizsgáltak olfaktometriás gázkromatográf (GCO) eljárással (Cacho *et al.*, 2013; Moncayo *et al.*, 2014). A szőlők Olaszország öt különböző területéről származtak. Mintánként átlagosan 62 komponenst izoláltak és megállapították, hogy az illékony komponensek minősége és mennyisége hasonlított a borpárlatok profiljához. A vizsgálati eredmények azt mutatták, hogy az olasz szőlőből készült perui piscot egy 25 marker-komponenses aromaprofil jellemzi. A komponensek nagy része másodlagos aroma, vagyis fermentáció eredetű, azonban a guaiacol,  $\beta$ -damascenon, geraniol és a linalool a szőlőből származnak. Továbbá azt tapasztalták, hogy az aromásabb szőlőből készült pisco nagy  $\beta$ -fenil-etanol és  $\beta$ -fenil-etil acetát tartalommal és kis etil észter, hexanol és etil acetát koncentrációval rendelkezik. Az aromaprofil emlékeztet a grappa és orujo italokhoz, ám azok egyéb jellegzetes összetevőinek nagy része korlátozott koncentrációban van jelen. A vizsgálati eredmények elegendőnek bizonyultak a minták földrajzi eredet szerinti osztályozására (Cacho *et al.*, 2012).

Majoros és munkatársai (2006) a barackpálinkát és a barack ízesítésű szeszes ital közti különbségeket mutatták ki GC-MS módszerrel. Megállapították, hogy a barackpálinka jóval több aromakomponenst tartalmaz, mint a barack ízesítésű másolata. A valódi barack aroma szignifikánsan több komponensből tevődik össze, mint a természetes azonos aroma. Ez a módszer

egyszerűsége, gyorsasága, kis vegyszerköltsége és kevés mintaelőkészítési igénye miatt alkalmas lehet a barackpálinka valódiságának megállapítására.

Az EU számos országa és az USA, Kanada igen eltérő, szigorú határértékeket ad az etil-karbamát és a metanol tartalomra a gyümölcsalapú párlatok és az erjesztett italok forgalmazásánál (Lachenmeier, 2005). Az etil-karbamát erősen mérgező, genotoxikus vegyület, ami a fermentált élelmiszerekben (pl. kenyérhéjban), égetett szeszekben és a pálinkákban is gyakran előfordul. A csonthéjas eredetű pálinkák kimagasló mennyiségben tartalmazzák ezeket a vegyületeket (Deák *et al.*, 2010; Nout, 1994; Weber *et al.*, 2009). Elképzelhető, hogy e vegyületek mennyiségi analízise alkalmas lehet a csonthéjas gyümölcsök párlatainak azonosítására.

A párlatok összetételének meghatározását szolgáló hagyományos gravimetrián alapuló, hivatalosan elfogadott módszerek számos esetben elavultak (illósav meghatározás gravimetriás módszerrel, a klasszikus Schoorl módszer), így nem minden esetben felelnek meg a vizsgálat támasztotta kritériumoknak. Továbbá számtalanszor szükségessé válik a meglévő módszerek adaptálása egy adott párlat fajtához vagy annak egyes meghatározott komponensének méréséhez, esetleg a vizsgálat céljához (Majoros *et al.*, 2006).

## 2.10 Adatelemzés és értékelés

A főkomponens elemzés (PCA), a főkomponens regresszió (PCR) és a részleges legkisebb négyzetek (PLS) módszere a mátrixba rendezhető adatok értékelésére szolgálnak. Csatolt technikákkal (pl. HPLC-UV-Vis, LC-MS, GC-MS) többdimenziós adathalmazt kapunk, ezek kiértékeléséhez kemometriai módszerek alkalmazhatók (Rajkó, 2011).

A főkomponens-analízis (PCA – Principal Components Analysis) elsődleges célja a teljes variancia nagy hányadát kevés változónak tulajdonítani. A PCA eljárással egy „ $n$ ” csoportot tartalmazó, csoportonként „ $m$ ” változóval rendelkező „ $M$ ” adat mátrix rejtett irányzatait ábrázolhatjuk (Yang *et al.*, 2015). Az első dimenziót úgy választjuk meg, hogy az maximálisan lehetséges mértékű variabilitást hordozzon. A második dimenzió merőleges az elsőre és e kényszerfeltétel mellett a fennmaradó variabilitásból a lehető legtöbbet hordozza (Tan *et al.*, 2012). A csökkentett dimenziókat nevezzük főkomponenseknek (PC). Az első főkomponens (csökkentett  $m$  adathalmaz halmaza) PC1 hordozza az adathalmazban fellelhető legnagyobb különbségeket, a második főkomponens (PC2) merőleges az első főkomponensre és kevesebb különbség lelhető fel az adathalmazában. A PCA-nak számos felhasználási területe ismert, többek között élelmiszer biztonsági és fejlesztési felhasználása is. PCA segítségével könnyebb megtalálni az adatokat legjobban jellemző mintázatokat. Ezért a PCA mintázat-kereső módszerként is használható. Másfelől gyakori, hogy az adatok nagyon nagymértékben tömöríthetők az információtartalom lényeges csökkenése nélkül. Utóbbi miatt a PCA-n alapuló

dimenziócsökkentés viszonylagosan alacsony dimenziót eredményez, mely már olyan eszközökkel is kezelhető, ami a kiinduló adatokon nem használható. Harmadik előny, képes csökkenteni a mérési módszerekből származott vagy a technológiai lépések során felhalmozódott zajt. A PCA egy hasznos adatbányászati eszköz, amely az erjedési profilok közti különbségek kimutatására is alkalmas (Tóthné, 2011).

A diszkriminancia analízis (DA) célja, hogy olyan diszkriminancia függvényeket hozzon létre, amelyekkel a minták csoportosítása pontosan kivitelezhető. A lineáris diszkriminancia-analízis egy olyan statisztikai módszer, amit minta-felismerésben és gépi tanulásban használnak, így a független változók olyan lineáris kombinációját képes megtalálni, amely a függő változó alapján kialakított csoportok megkülönböztetők (diszkriminálja). A diszkriminancia-analízis, a varianciaanalízis és a regresszióanalízis módszerben hasonlítanak egymáshoz, ugyanis ezek mind egy függő változót igyekeznek kifejezni más változók lineáris kombinációjaként. A két utóbbi eljárásnál a függő változó folytonos változó, míg a diszkriminancia-analízisnél ez kategórikus változó. A regresszióanalízis abban különbözik a diszkriminancia elemzéstől, hogy esetében magas mérési szintű folytonos függő és független változók szerepelhetnek az elemzésben. Amennyiben kategórikus független változókkal van dolgunk, úgy a megfelelési diszkriminancia-analízis az ekvivalens módszer (Tóthné, 2011).

### 3 CÉLKITŰZÉSEK

A párlatok ízvilágát és aromaösszetételét javító törekvések fontosak és egyre inkább előtérbe kerülnek a termék fejlesztésében, hiszen ezekkel népszerűsíthető és eladhatóvá tehető egy-egy termék, valamint saját márka/imázs építhető. A pálinka előállításánál a gyümölcsből származó, valamint a fermentáció során képződő illékony komponensek nagy része a desztillálás során a párlatba jut, kialakítva annak élvezeti értékét. Az alkalmazandó gyümölcs-alapanyag aromája függ az érettségi állapottól, de összességében determinális, így a párlatok minőségét inkább a savak és élesztők, valamint a desztilláció és az érlelési technológia határozza meg. A különböző élesztő törzsek eltérő arányban képeznek különböző metabolitokat és ez a minőségben is tapasztalható. Az élesztők tudatos alkalmazásához azonban ismerni kell az egyes törzs tulajdonságát, valamint aromatermelő képességét. Továbbá ezen keresztül különlegessé és egyediségessé tehető a pálinka, így azonosíthatóvá is válhat. A témakörhöz kapcsolódva kutatásaim fő célkitűzései a következők:

1. A pálinkák aromaprofilját befolyásoló tényezők megismerése
2. Standard eljárás alkalmazása a különböző körtepálinkák előállítására
3. Megfelelő analitikai módszer kidolgozása vagy adaptálása, amely segítségével a pálinka összetevői minőségileg és mennyiségileg is meghatározhatók
4. Statisztikai módszerek adaptálása és alkalmazása, amelyek által az analitikai mérések során szerzett információk értékelhetőek és értelmezhetőek
5. Kapcsolatok keresése a körtepálinkák és a felhasznált gyümölcsfajták között
6. Marker vegyület(ek) keresése, amelyek minőségi és mennyiségi profilja jellemezhető egy-egy pálinka évjáratára, esetleg termőhelyére



## 4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 Anyagok

#### 4.1.1 Felhasznált mikroorganizmusok

Kísérleteimhez három különböző *Saccharomyces cerevisiae* törzset használtam. A törzsek a kanadai központú Lallemand gyártótól származnak. A *S. cerevisiae* 342 törzset tömény szeszek előállítására szelektálták, azonban a borászatban is elterjedt a használata a magas alkoholtűrő, és gyors erjesztő képessége miatt. További előnyös tulajdonsága ennek a törzsnek a rövid lag-szakasz, a killer tulajdonsága és kimagasló invertáz aktivitása.

A *S. cerevisiae* YS4 törzset a sütőipar számára szelektálták és a "Holland pék élesztője"-ként tartják számon (Bell *et al.*, 2001; Ismeretlen, 2007; Giannone *et al.*, 2010). Kiemelkedő tulajdonsága, hogy alacsony redukáló cukor koncentrációnál is képes életben maradni és alkoholos fermentációt végezni. A *S. cerevisiae* 228 törzs borászati célokra szelektált élesztő, de szélesebb körben alkalmazzák más szeszes italok előállításában is (pálinkák, konyakok, grappa, vodka gyártásában). A 228-as törzs jellegzetes tulajdonsága a hidegtűrő képessége (hőmérséklet minimuma ~10 °C). Ezen kívül nagy  $\beta$ -glükozidáz aktivitás és rövid lag-szakasz jellemzi. Használata lehetőséget nyújt kiszámítható, jól kontrollálható fermentáció kivitelezésére. A 228-as törzs további előnye a sejtek rendkívüli stabilitása.

A 342-es és 228-as törzset a Kokoferm Kft. bocsátotta rendelkezésemre, míg a sütőipari élesztőt, az YS4 törzset kiskereskedelemről szereztem be. A gyártótól kapott információ szerint az élelmiszerboltban beszerzett élesztő monokultúrás YS4 törzs dehidratált készítménye.

#### 4.1.2 Tápközegek és elkészítési módjuk

Alap tápközeg:

- 0,1 (m/v) %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,05 (m/v) %  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 (m/v) %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 1 (v/v) % Wickerham vitamin oldat
- 0,01 (m/v) % brómkrezol bíbor indikátor

A tápközeg pH-ját 5 (m/v) % -os NaOH-val semlegesre állítottam be. A vizsgált szénhidrátokat 0,5 (m/v) % -os koncentrációban adtam az alap tápközeghez.

YNB tápközeg (Yeast Nitrogen Base): 100 ml vízhez 6,7 g YNB port mértem be, azt követően 1 L összmennyiségre hígítottam desztillált vízzel. A tápközeget autoklávban steriliztem 121 °C-on 15 percig.

YEED-Agar: A táptalaj elkészítéséhez 1 liter desztillált vízhez a következő összetevőket mértem be:

- 10 g glükóz
- 10 g pepton (hús alapú)
- 3 g élesztő kivonat
- 25 g agar

A felsorolt összetevőket mágneskeverő segítségével feloldottam, majd az elkészült közeget autoklávban steriliztem.

#### 4.1.3 Gyümölcs

A kísérletben használt körtéket a Göcsej eredetvédett területéről és Nagykanizsáról (6. ábra), vásárolta a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszéke kutatási célokra. A körtéket utóérlelés céljából klimatizált hűtőházban tároltam a feldolgozás napjáig (5 napig).



6. ábra: Göcsej eredetvédett területe

A több mint 3 éves kísérletsorozat kivitelezéséhez az egyes gyümölcsök beszerzése mindig azonos termelőktől történt három egymást követő éven át (2010, 2011 és 2012).

A gyümölcsök egészségi állapota, épsége, valamint vegyszermentessége alapvető elvárás volt a termelőktől, ezáltal egy homogénebb alapanyagot kívántunk biztosítani a kísérleteinkhez,

csökkenteni a változók mennyiségét. A gyümölcsök termelési technológiája és begyűjtési technikája is azonos volt.

## **4.2 Eljárások**

### **4.2.1 Cefrekészítés laboratóriumi léptékben**

A gyümölcs feldolgozását alapos mosással kezdtem, ami öblítéses és vízsugaras mosást tartalmazott. A gyümölcs mosását követően eltávolítottam a körte szárát, majd félbe vágtam a gyümölcsöket. Ezt követően konyhai elektromos darálóval aprítottam. Az így nyert levet és a zúzalékot újra összekevertem egy 8 liter térfogatú edényben. A körte pépből mintát véve megmértem annak kezdeti pH-ját, szárazanyag tartalmát, valamint redukálócukor tartalmát. Az alapos aprítás után pektinbontó enzim-komplexet (az egyes kísérletnek megfelelően Rapidase Clear, Lallzyme EXV vagy Lallzyme HC) adagoltam a mintához (3g/hl). Ezt követte a tápsó adagolása (11g/hl). Az így összeállított félkész cefrét ezután 500 ml térfogatú erjesztő lombikokba mértem be (400 ml volt a hasznos térfogat). A cefrék pH-ját 3,0-ra állítottam különböző savak felhasználásával (kénsav, foszforsav és tejsav vagy foszforsav és tejsav együttes), oly módon, hogy minden egyes erjesztő lombik csak egyfajta savat tartalmazott. A kísérleteket három párhuzamos mintákkal végeztem, így a cefrészési folyamat végére élesztőtörzsenként három kénsavas, három foszforsavas és három tejsavas kísérleti minta állt rendelkezésemre, ami összességében 27 erjesztőlombikot jelent.

A pálinkák aromaprofiljának vizsgálatára, valamint a desztilláló protokoll kidolgozására félüzemi léptékű kísérletekre volt szükség, így a cefrészést félüzemi léptékben is elvégeztem.

### **4.2.2 Félüzemi kísérletek cefrészési protokollja**

A félüzemi kísérletek során végzett cefrészési protokoll hasonló a laborkísérletekben használt protokollhoz, azonban egyes berendezések működési elve eltérő. A cefrészés folyamatát a mosással kezdtem, ezt követte az aprítás, amelyhez egy késes gyümölcsdaráló állt a rendelkezésemre. A berendezés a gyümölcs szilárd komponenseit nem választja el, így utólagos összekeverésre a félüzemi darálást követően nincs szükség. A daráló fogadóedénye 10 liter térfogatú műanyag vödör volt, ami lehetőséget adott a cefre pontos tömegének a mérésére. A cefrét 50 l térfogatú acél erjesztőtartályba helyeztem. A tartályokba 40 kg cefrét mértem be, amelyet a tápsó adagolás követett. Csapvízben oldva 11 g/100 kg (Uva-Vital) élesztő tápsót adagoltam minden egyes tartályba, amelyet keveréses homogenizálás követett. A körtepépből mintát véve megmértem annak természetes pH-ját, szárazanyag tartalmát, valamint redukálócukor tartalmát. 100 ml cefre pH értékét pH 3-ra állítottam 10% v/v foszforsavat használva. A 100 ml cefre pH 3

értéknek beállításához szükséges sav mennyiségéből meghatároztam, hogy egyes tartályokhoz mennyi savat kell adagolnom, majd a számított mennyiségű savat bekevertem a cefrébe. Az enzimek készítményt csapvízes oldás után kevertem a cefréhez. Utolsó adalékként az élesztőt kevertem a cefréhez, amelyet előzetesen 5 g cukor és 50 ml cefrét tartalmazó 250 ml vízben rehidratáltam.

#### **4.2.3 Pektinbontó enzimek hatásának vizsgálata**

A pektinbontó enzimek hatásának vizsgálatát laboratóriumi körülmények között vizsgáltam, Bosc Kobak körte cefrét használva. A kísérletben három enzimek hatását vizsgáltam három párhuzamos mintasoron. A piacon számos enzimek készítmény található. Az általam választott három pektinbontó enzimek készítmény három jelentős készítménycsoportot képvisel: ülepítő/tisztulási képességet növelő készítmény (Rapidase Clear), macerációs hatékonyságot fokozó készítmény (Lallzyme EXV), valamint az előző két csoport ötvözésével megalkotott aromafelszabadító készítmény csoport (Lallzyme HC). A Cefrészés c. fejezetben leírt aprítási módszerrel a gyümölcsöt aprítottam, tápsóval elláttam, azt alaposan elkevertem majd szétosztottam 12 darab 500 ml térfogatú erjesztő lombikba úgy, hogy minden lombikba 250 g cefre kerüljön. Az enzimek liofilezett por formában érkeztek, ezeket 30 ml csapvízben feloldottam, majd 10 ml enzimszuszpenziót a körtecefrékhez adagoltam oly módon, hogy enzimenként három lombikot kapjak. A három kontrol minta nem tartalmazott enzimet. A cefrék viszkozitását 12 órán át óránként ellenőriztem, majd 24 óra elteltével a lombikokat rázással kevertem, a 10 g mintát centrifugáltam (10000 x g, időtartam 3 perc). A nyert felülúszó mennyiségét 10 ml térfogatú mérőhengerben mértem. Az enzimek adagolását követő első 12 órában a lombikok rázásával a kontrol mintához viszonyítva állapítottam meg, hogy szemmel észlelhető elfolyósítás észlelhető-e vagy sem. Az elfolyósítás mértékét itt nem vettem figyelembe, csak a jelenség megléte vagy hiánya számított.

#### **4.2.4 Különböző pH értékeken folytatott fermentáció**

A kísérlet célja az volt, hogy kimutassam, hogy az erjedési pH mérhető hatással van a párlatok aromaösszetételére. A Cefrészés c. alfejezetben leírt gyümölcs aprítást, darálását követően a pépesített gyümölcshöz tápsót (11g/hl) és pektináz hatású enzimek készítményt (3g/hl) adagoltam. A tápsót közvetlenül, előzetes oldás nélkül adagoltam, míg a liofilezett enzimet 20 ml csapvízben oldottam fel és így adagoltam a cefréhez. Az így összeállított cefrének megmértem a pH értékét, majd 500 ml térfogatú erjesztő lombikokba szétosztottam. A lombikok tartalmának egyenként beállítottam a pH-ját 2,5, 3,0, 3,5 és 4,0 értékekre. A kísérleteket három párhuzamos mintasoron végeztem, így a kísérletben 12 lombik állt a rendelkezésemre.

#### 4.2.5 Irányított erjesztés

A beoltást követően az erjesztő lombikokat analitikai mérleggel lemértem, majd a lombik nyílását vízzárás kotyogóval lezártam. A cefréket 16 °C-ra beállított termosztátban erjesztettem. A fermentációt 7 napig végeztem. Naponta 40 cm<sup>3</sup> mintát vettem, amit -50 °C fokon tároltam a további vizsgálatokig.

A vizsgálat során naponta mértem az erjedő cefre pH-ját, és oldott szárazanyag tartalmát (törésmutatóját: Brix %), valamint tömegváltozását, amivel a keletkezett és eltávozott CO<sub>2</sub> mennyiségét követtem nyomon. A fermentáció befejeztével, a kiejert cefréket Gibertini típusú laboratóriumi gőzdesztilláló berendezéssel desztilláltam le.

A félyezemi fermentáció szintén az élesztő adagolásával kezdődött. *Sacharomyces cerevisiae* faj 228-as számú törzsét (Kokoferm Kft.) használtam. A szárított élesztőt steril lombikban rehidratáltam, a rehidratációhoz 0,1M töménységű NaCl oldatot, 2g/L glükózt és steril élesztő tápsót használtam (7g/L). A szuszpenziót rázó asztalon egy órán át inkubáltam. Fermentáció hossza 10 nap volt, minden cefre esetében irányított fermentációval ennyi idő elegendő a cefre kiejedésére. Fermentáció hőmérséklete 16 °C, 3,0 pH érték mellett. A párlat készítése során 3 ponton vettem mintákat:

1. a friss darált gyümölcsből
2. a 10 napos kiejert cefréből
3. a kész párlatból.

#### 4.2.6 Asszimilációs vizsgálat

Törzsenként 0,5 g élesztőt rehidratáltam 5 ml fiziológiás sóoldatban. Külön kémcsőbe 5 ml sterilizált YPG táplevest készítettem elő, a törzseket YPG táplevesben inkubáltam egy éjszakán át. Az így kapott élesztő szuszpenzióból 2 ml-es Eppendorf csőben centrifugáltam 10000 rpm 5 percig. A felülúszó eltávolítása után a pelletet 0,85%-os NaCl oldattal kétszer átmostam (szuszpendálás-centrifugálás). Végül 1,5 ml 0,85%-os NaCl oldatban szuszpendáltam és két órán át inkubáltam 25°C fokon folytonos rázatás mellett. Az inkubálást követően a szuszpenziót újra centrifugáltam és a pelletet pedig szuszpendáltam 1 ml 0,85%-os NaCl oldatban.

A teszt elvégzéséhez a következő szénforrásokat használtam: glükóz, fruktóz, ribóz, melibióz, laktóz, raffinóz, inulin, celibióz, metanol (90%) és etanol (96,4%). 0,5 g szénforrást (kristályforma) feloldottam 90 ml vízben és 4,5 ml oldatot pipettáztam kémcsövekbe. Ezt követően 0,5 ml steril YNB táplevest adtam hozzá, majd egy kacsnyi élesztőtörzsszel oltottam be. A mintákat szobahőmérsékleten inkubáltam, aerob körülmények között.

A kísérlet 14 napig tartott és a mintákat a hatodik, a tizedik és a tizennegyedik napon vettem és analizáltam. Ha a minta zavaros, akkor pozitívnak tekinthető, ha látszatra víz-tiszta akkor negatív a teszt.

#### **4.2.7 Fermentációs képesség vizsgálata**

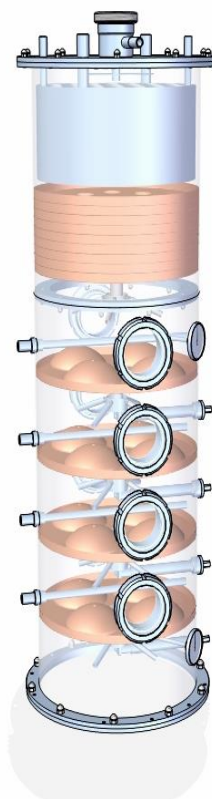
Az élesztőtörzseket egy éjszakán keresztül szaporítottam YEPD táplevesben. A sejtszuspenziót a 4.2.2 fejezetben foglaltaknak megfelelően kezeltem.

A fermentációs teszthez használt szénforrásokból (glükóz, fruktóz, ribóz, melibióz, laktóz, raffinóz, inulin, cellibióz, etanol, metanol) 0,5% -os oldatokat készítettem és autoklávban sterilizáltam. A Vidal tesztcsöveket bázikus táplevessel töltöttem meg, csövenként 2 ml táplevest pipettáztam be, a táplevest 50 µl sejtszuspenzióval oltottam be, majd 1 cm vastagon befedtem vazpar (vazelin-parafin keverék) dugóval. A tesztcsöveket aerob körülmények között  $25\pm 2^\circ\text{C}$ -on inkubáltam. A növekedést tíz napon át mindennap megvizsgáltam. A tápleves zavarossága növekedésre, a vazpar dugó elmozdulása és az indikátor sárgára színeződése arra utal, hogy az élesztő erjesztette a vizsgált szénhidrátot (gáz-, illetve savtermelődés).

#### **4.2.8 Desztillálás**

A laboratóriumi kísérleti mintáimat céltól függően konduktív fűtésű desztilláló berendezéssel vagy gőzdesztillációval desztilláltam. Az illósav és össz-észtertartalom meghatározására gőzdesztilláló berendezést használtam, az aromaanyagok vizsgálatára a konduktív fűtési módot választottam, az ugyanis kevésbé hígítja a kondenzátumot.

Félipari desztilláló berendezésnek egy Hagyó gyártmányú, számítógépvezérelt, rektifikáló oszlopos berendezést használtam. Az üst térfogata 60 liter, ebből a hasznos térfogat 48 liter. A Hagyó féle rektifikáló oszlop (7. ábra) teljes magassága 120 cm, átmérője 18 cm, az oszlop alsó felében (60 cm) kapott helyet a 3 buboréksapkás tányér, az analóg és a digitális (bimetál) hőmérők, valamint a tányér-folyadékszintet szabályzó stepper motorok, amelyeket számítógépről vezérelhetünk. Az oszlop felső felében a deflegmátor kapott helyet, a deflegmátor hőmérsékletét szintén számítógépről vezérelhetjük, szabályozási pontunk a deflegmátor hűtőfolyadék belépő hőmérséklete, hőmérséklet kontroll pontok a belépő és kilépő ágakon vannak, de a deflegmátor térfogatáramát is méri a berendezés és egy piezo szeleppel szabályozza azt. A felső buboréksapkás tányér és a csököteges deflegmátor közti távolság 25 cm.



**7. ábra: Hagyó féle rektifikáló oszlop** (forrás: Hagyó kft., Miskolc)

Az oszlopból a párat egy 1 méteres koracél páracső vezeti a kondenzátorba. A cső-kígyós kondenzátor szintén 120 cm magas, hűtőköpenyének átmérője 18 cm, a csőkígyó hélix-menetek közti távolsága 5 cm, anyaga rozsdamentes acél. A fűtő gőzt egy Certuss gyártmányú, E 16 típusú kazán szolgáltatta.

### 4.3 Klasszikus analitikai módszerek

#### 4.3.1 pH mérés

A cefre minták és a párlatminták pH meghatározását egy Mettler Toledo Seven Easy típusú pH-mérő készülék segítségével végeztem. A mérés megkezdése előtt a műszert 4,0-s és 7,0-s pH-jú pufferekkel kalibráltam. A készülék a hőmérséklet korrekciót elvégzi 20 °C -ra.

#### 4.3.2 Alkohol meghatározása

A körtecefréket a Büchi Distillation lepárló berendezéssel pároltam le. A mintákat egy 100 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikba jelre töltöttem, majd beleöntöttem a lepárló csőbe. A mérőhengert 100 ml desztillált vízzel átöblítettem és ugyancsak a lepárló csőbe öntöttem. Ezután egy csepp habzásgátlót (szilikonolaj: Foamsol) tettem a mintához, majd három percig desztilláltam. A

felfogott párlatot desztillált vízzel kiegészítettem 100 cm<sup>3</sup>-re, majd az Anton Paar DMA 35N rezgőcellás sűrűségmérő készülékkel megmértem az alkoholtartalmat.

A körte párlatok alkoholtartalmát Anton Paar DMA 35N és Gibertini Super Alcomat sűrűségmérővel mértem meg.

#### 4.3.3 Szárazanyag-tartalom meghatározása

A szárazanyag-tartalom meghatározására refraktométert használtam. A refraktometria a fénytörés jelenségén alapszik. A fénysugarak egy átlátszó közeg sík határfelületére érkeznek, a fénysugarak egy része áthalad, más része visszaverődik az anyag sajátosságainak megfelelően. Az elektromos refraktométerek működési elve hasonló, azonban a fényforrást egy belső fényforrás biztosítja. Ebben az esetben a prizma felületén elterülő folyadék a prizma és a folyadék határretegén tükröként működik, és a fényforrásból jövő fényt egy, a folyadékra jellemző szögben visszaveri, amit egy lencse gyűjt össze és egy fényérzékelő lapkára koncentrálja.

#### 4.3.4 Redukáló cukortartalom meghatározása

A cefre redukáló cukortartalmának mérésére a BCA (Milton *et al.*, 1992) módszert választottam. A BCA módszer, vagyis a bikinoninsavas módszert eredetileg összfehérje mennyiség meghatározására dolgozták ki, de mivel ez a módszer is a Cu(II) ion redukciójának Cu(I) átalakításával méri az analitikus mennyiségét, így ezt a módszert is lehetett adaptálni a redukáló cukortartalom mérésre. A redukálócukor mennyiségére utaló elszíneződött Cu(I)-komplex mennyisége spektrofotometriásan mérhető.

#### 4.3.5 Titrálható savtartalom meghatározása

Azon savak összességét, amelyek lúggal indikátor jelenlétében közömbösíthetők, titrálható savaknak nevezzük. Meghatározás elve: a fenolftalein indikátor savas közegben színtelen, viszont, ha a pH lúgos tartományba lép, akkor rózsaszínű lesz. A titrálás során fogyott lúg mennyiségéből meghatározható a minta savtartalma. A pálinkák vizsgálatánál 200 ml-es lombikba 20 ml mintát pipettáztam, majd ezt követően 3-4 csepp fenolftalein indikátort adtam hozzá és 0,1 N NaOH oldattal halvány rózsaszínig titráltam.

$$\text{Titrálható sav (g/l)} = 0,1 \text{ n NaOH fogyasztás} \times f_{\text{NaOH}} \times 2$$



#### 4.3.6 Illósav-tartalom meghatározása

50 cm<sup>3</sup> mintát kimértem egy desztilláló csőbe, a minta illósav-tartalmát vízgőz desztillációval (Büchi desztilláló berendezés) elválasztottam a mátrixtól. Szedő edénynek mérőlombikot használtam. A desztillálást addig folytattam, amíg mérőlombikban 50 cm<sup>3</sup> minta össze nem gyűlt. A desztillátumot 0,1 N NaOH-al titráltam. Az illósav-tartalmat ecetsav egyenértékben határoztam meg.

A módszer részletes leírása a Szeszesital-ipari vizsgálati módszerek Súlyom és Újszászi (1980) c. módszergyűjteményben megtalálható.

#### 4.3.7 Észtertartalom meghatározása

A szeszesitalok észtertartalmát a NaOH-al elszappanosítható anyagok etilacetátban kifejezhető mennyiségével adjuk meg abszolút alkoholra vonatkoztatva (Súlyom és Újszászi, 1980). 25 cm<sup>3</sup> mintát mértem be egy 200 cm<sup>3</sup> térfogatú Erlenmeyer lombikba, a mintához fenolftalein indikátor oldatot adtam, az elegyet 0,1 N NaOH-al közömbösítettem. Ezt követően a mintához hozzáadtam 25 ml 0,1 N NaOH oldatot és visszacsepegő hűtő alatt egy órán át forraltam. Egy óra forralás után a lombikokat vízfürdőben 15 °C-ra lehűtöttem, majd a NaOH felesleget a fenolftalein indikátor vörös színének eltűnéséig 0,1 N sósavval visszatitráltam. A minták észter tartalmát etil-acetát mg/100 cm<sup>3</sup> abszolút alkoholban határoztam meg.

#### 4.3.8 Savak hatásának vizsgálata

A kísérletben használt savak erjedésre gyakorolt hatását laboratóriumú körülmények között vizsgáltam Bosk Cobak körtecefre fermentációja során. A kísérletet három párhuzamos mintason végeztem, amelyek eredményeit átlagoltam. A kísérleti cefréket erjesztőlombikokban erjesztettem. A cefrék kiindulási, vagyis természetes pH-ja 4,3 volt. Az irányított fermentációhoz pH 3-at (+/- 0,08) állítottam be foszforsavval, kénsavval és tejsavval oly módon, hogy a vizsgált élesztőtörzsekkel beoltott cefrékhez adagoltam a savat. A pH állítás szerepe az, hogy a káros mikroorganizmusok számára nem optimális környezetet hoz létre. A fermentáció során a pH értékek 2,8 és 3,2 között változtak. Az erjedő minták pH értékét naponta mértem, a kísérletet hét napon át folytattam.

#### 4.3.9 pH hatásának vizsgálata

Az erjedési pH befolyásolhatja a párlat másodlagos aromakomponenseit az élesztőre gyakorolt hatása révén. Ennek a jelenségnek az igazolására és vizsgálatára egy olyan kísérletet végeztem el, amely különböző pH értékeken fermentált körtecefrék desztillátumát vizsgálja. A

kísérletet 500 ml-es mérőlombikokban végeztem, naponta mérve a pH értékeket. A fermentáció 16 °C-on, 7 napon át zajlott. A kísérletet laboratóriumi körülmények között végeztem Pacham's Triumph körtecefréjének alkalmazásával. A kísérletet erjesztő lombikokban végeztem, a kiejedt cefréket gőzdesztillációval desztilláltam, nem választottam le frakciókat. A körtecefrék párlatát GC-MS-el analizáltam. Az GC-MS eredményeket egyutas varianciaanalízissel (ANOVA - lineáris modell) vizsgáltam. A kísérletben kénsavval és tejsavval végzett 2,5; 3,0; 3,5 és 4,0 pH beállítások hatását vizsgáltam a párlatokban legáltalánosabban előforduló aromaanyagokra. A vizsgálni kívánt pH intervallumot a cefrék fermentációjára használt intervallum határozta meg, amelyben a 2,5 és a 4,0 értékek extrém határértéknek számítanak, ezek alá, illetve fölé körtecefre pH-t nem célszerű állítani.

#### **4.3.10 Erjedés nyomon követése a tömegváltozás alapján**

Ez a mérés az etanolos fermentáció során keletkezett szén-dioxid eltávozása okozta tömegváltozáson alapszik. Könnyen mérhető és megbízható eredményt nyújt. Az alkoholos erjedés nyomon követésére eddig bizonyos szubsztrátumok fogyását és metabolitok képződését alkalmaztam. Ez azonban bizonyos mértékű adatredukciót eredményezhet, mivel a nem vizsgált komponenseken kívül egyéb molekulák is részt vehetnek az élesztő anyagcseréjében. A cukrok erjesztése során gáz termelődik, amelyet rázóasztal segítségével eltávolítottam a cefréből. A kísérletet Bosc Kobak körtecefrék használatával végeztem három párhuzamos mintasoron, amelyek eredményeit átlagoltam. A kísérleteket laboratóriumban végeztem.

A cukrok erjesztése során gáz termelődik, amelyet rázóasztal (40 fordulat/perc) segítségével eltávolítottam a cefréből. A tömegváltozás jó mutatója a felhasznált cukrok mennyiségének, ugyanis gáz más szénforrásból nem keletkezik. A kísérleti mintáim tömegét naponta kétszer mértem labormérlegen, a mért értéket kivontam az előző napi értékből, és a kapott különbségeket rögzítettem.

## **4.4 Műszeres analitikai módszerek**

### **4.4.1 HPLC**

A cukrok, az etanol és a metanol mennyiségi és minőségi meghatározásához egy Thermo Scientific gyártmányú, Surveyor típusú HPLC rendszert használtam. A HPLC rendszer négy csatornás Surveyor pumpából, auto-sampler-ből és oszloptermostátból, valamint RI és PDA detektorokból áll. A minták komponenseinek elválasztását egy Bio-Rad Aminex HPX-87H oszlop

(BioRAD, USA) végezte. Az eluálás 0,005 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mozgófázissal, izokromatikus módban 25 perc 0,5 ml/perc térfogatáram mellett. Detektor és oszlop hőmérséklete 45 °C. Injektált mintamennyiség 5 µl.

#### 4.4.2 GC-FID

Minták elemzésére Perichrom Pr 2100 GC-FID berendezést használtam. A minták injektálását autosampler végezte. A párlatban komponenseinek elválasztása egy Varian CP-WAX-57 CP kapilláris oszlopon történt, melynek paraméterei 50 m x 0,33 mm x 0,2 µm. Injektor hőmérséklete 220 °C, hidrogén vivőgáz (make up gáz nélkül) sebessége 0,7 mL/perc, split 1:50 arányban. Injektált mennyiség 1 µL. Az oszlop kezdeti hőmérséklete 40 °C, amit fokozatosan emelünk 230 °C-ig, 6 °C/perc intenzitással. FID detektor hőmérséklete 240 °C, offset 200x10 µV. A GC-FID analízisből kapott eredményeket, vagyis a csúcs alatti területeket XL-Stat v 3.0 programmal elemeztem.

#### 4.4.3 GC-MS

A pálinka alkotóinak pontosabb kvalitatív és kvantitatív meghatározásához az Agilent 6890 típusú gáz kromatográfot és a hozzákapcsolt, szintén Agilent gyártmányú, 5973 típusú tömegspektrométer detektort (monolitikus hiperbola kvadrupól) alkalmaztuk. Az injektor üvegszállal bélelt split/splitless injektor, injektált mennyiség 1 µL, 1:100 split arány beállítással. Injektor hőmérséklete 240 °C. Hélium volt a vivőgáz 1 mL/perc sebességgel izochor feltételek mellett. Oszlop típusa ZB-Wax, méretei 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. Kemence hőmérséklet programja: 40 °C hőn tartás 2,5 percig, majd 8 °C/min fűtés, míg a hőmérséklet el nem éri a 170 °C-t, ezt követően 35 °C/min meredekséggel fűtöttünk 240 °C-ig amit 3,25 percig tartottunk. Oszlop transfer line hőmérséklet programja: 170 °C hőn tartás 18.5 percig, ezt követően 35 °C/min meredekséggel 240 °C-ig fűtöttünk, amit 3.5 percen át tartottunk.

A tömegspektrométer SIM (Selective Ion Monitoring) üzemmódban működött, ionizációs energia 70 eV, ion forrás hőmérséklete 230 °C. Kvadrupól analizátor hőmérséklete 150 °C. A GC-MS analíziseket a Wessling Kft. laboratóriumában végezték, akkreditált módszert (WBSE-61:2010) adaptálva (labor akkreditáció: NAT-1-1009/2012, érvényesség 2016-04-17).

A belső standard minősége (igazodva a 2870/2000/EK RENDELET-hez): 3-pentanol (CAS: 584-02-1), mennyisége 250 mg/l. Mivel a pálinkákat minta-előkészítés nélkül, közvetlenül elemeztük, a 3-pentanol belső standard csupán injektálási standardként szolgált.

## 4.5 Statisztikai vizsgálatok

Minden kísérletet három párhuzamos mintán végeztem el, a mérések során rögzített eredményeket átlagoltam, az eredményeimben a három párhuzamos minta átlagát mutatom be, feltüntetve a standard devianciát.

### 4.5.1 Variancia analízis

Variancia analízist (Analysis Of Variance – ANOVA) kétféle kérdéskörben használtam:

- Hatással van-e a cefre pH értéke a párlat illékony komponenseinek koncentrációjára (Van-e hatása a kísérletben alkalmazott behatásoknak a célváltozóra)?
- Kimutatható-e bármilyen variancia a gázkromatográfiás eredmények között?

Feltételek ellenőrzése:

- Normalitás vizsgálat: khí-négyzet próba, Kolmogorov–Szmirnov-próba
- Szórás ellenőrzés: Bartlett-próba

A pH aromaanyagok koncentrációjára gyakorolt hatását egyutas varianciaanalízissel vizsgáltam.

### 4.5.2 Főkomponens analízis

A főkomponens analízis alkalmazásakor a következő kritériumokat ellenőriztük: Pearson korrelációs mátrix több szignifikáns korrelációs összefüggéssel, Barlett féle szférikus próba (szignifikancia  $\alpha=0,05$ ) és Kaiser-Meier-Olkin kritérium ( $KMO > 0,6$ ).

A főkomponens analízist a pálinka minták GC-MS méréseiből származó adatokon (csúcs alatti területből számolt koncentráció) végeztük el. Az adathalmazt mátrixba (M) soroltuk, amelyben a sorok jelentették az egyes pálinka mintákat (n) (2012-es Triumph körte, 2010-es Bosc Kobak körte stb.), az oszlopok meg az egyes mintákhoz tartozó komponenseket (1-butanol, i-amil-acetát, stb.). Az adathalmaz főkomponens elemzését XL-Stat Pro (Addinsoft, 28 West 27th Street, Suite 503, New York, NY 10001, USA) számítógépes software-el végeztem.

### 4.5.3 Lineáris Diszkriminancia Analízis

Az LDA módszer alkalmazásakor a következő kritériumokat ellenőriztük: normalitás vizsgálat, variancia homogenitás vizsgálat, kívülálló elemek detektálása, keresztvalidáció, véletlenszerű számokkal való validálás. A lineáris diszkriminancia analízis alapjául a GC-MS berendezés által szolgáltatott pálinkakomponensek mennyiségi adatai szolgáltak. Az adott komponensek mennyiségi meghatározása a csúcs alatti területek kiszámításával és a standardhoz való viszonyításával határozható meg. A pálinkamintákhoz tartozó komponensek koncentrációs

adatait mátrixba rendeztük, az adatokat XL-Stat Pro (Addinsoft, 28 West 27th Street, Suite 503, New York, NY 10001, USA) software-el elemeztük.

A gázkromatográfiás eredményeket LDA módszerrel értékeltem. Az analitikai és statisztikai model kombinációja alkalmazható eredetazonosításra, fajtaazonosításra, valamint évjárat azonosításra. Bár az itt bemutatott módszer csak az általunk mért körülmények mellett bizonyult hatékony csoportosítást végző eszköznek, de ennek ellenére, egy alaposabb, több paraméterrel rendelkező model alkalmas lehet a hamisított eredetvédett termékek azonosítására és kiszűrésére.

Lineáris Diszkriminancia Analízis feltételei:

- A változók közel normalitása (ferdeség, csúcsosság, Shapiro-Wilk-próba)
- Változók közti korreláció (Pearson-féle  $r$ )
- Változók száma nagyobb, mint az esetek száma (landscape)
- Csoportok elemszáma (minél kisebb eltérés)
- Szóráshomogenitás tesztelése (Box-féle M- próba)
- Maradékok normál eloszlása (Shapiro-Wilk próba)

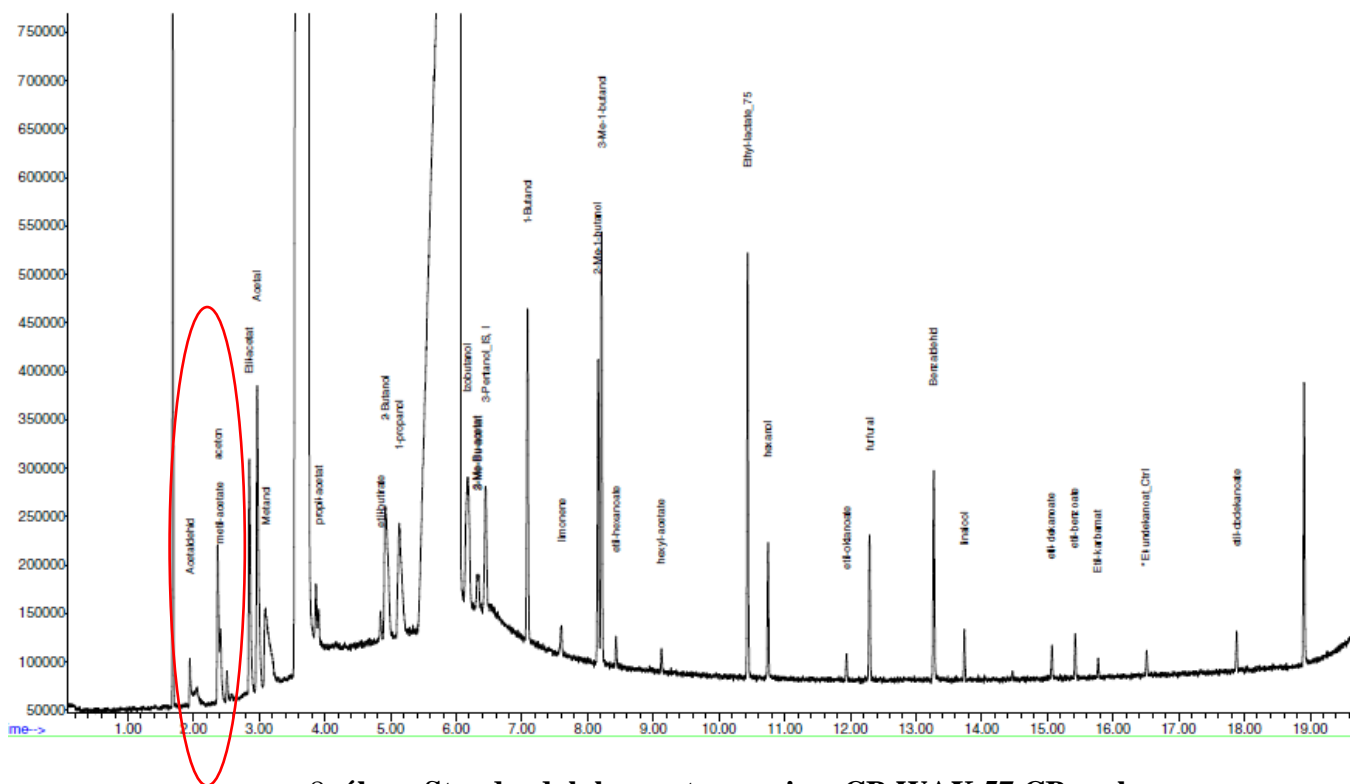
## 5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 5.1 Műszeres analitikai módszerek adaptálása

#### 5.1.1 GC-MS módszer adaptálása

Az aromaprofil vizsgálatához egy olyan átfogó mérési módszerre volt szükség, amellyel a pálinkák összetevőit a lehető legnagyobb számban be lehet azonosítani, és amellyel a komponensek mennyisége nagy pontossággal meghatározható. A feladat kivitelezése a komponensek jellegét tekintve nem képzelhető el modern műszeres analitikai módszerek nélkül. A pálinkaminták átfogó vizsgálatára a GC-MS kapcsolt analitikai rendszer a legalkalmasabb. Az eredmény az 1. mellékletben található. Molyneux és munkatársai (2007) szerint egy komponens minőségi és mennyiségi meghatározását legalább két különböző polaritású oszlopon kell elvégezni, mert a ko-elúció okozta hibákat így ki lehet szűrni, valamint a mérés pontosságát fokozni lehet, ugyanis, ha ko-elúció esete áll fenn, akkor a mennyiségi meghatározásunk is pontatlan lenne. Azonban a kísérleteim rámutattak, valamint a gyakorlati példák is azt igazolják, hogy elegendő a mintákat egy oszloppal vizsgálni. Ziółkowska és munkatársai (2016) borok eredetének és alapanyag vizsgálatához szintén GC-MS módszert használtak. Lablanquie és munkatársai (2002) párlatok aromakomponenseit gázkromatográffal határozták meg. Az általuk publikált módszerekhez hasonlóan hélium vivőgázt használtam az analizátor, a detektor és az elválasztó oszlop azonban (és így az oszlop fűtési programja is) eltérő. A Troya és munkatársai (2015), valamint a Melucci és munkatársai (2016) által használt GC-MS módszerek nagyon hasonlóak az előbbi módszerekhez, bár a gázkromatográf hőmérsékleti beállításai és az elválasztó oszlopok paraméterei eltérőek. A tömegspektrométer működési paraméterei, és a vivőgáz áramlási paraméterei hasonlóak voltak az általam választott paraméterekhez, akárcsak az injektált minta mennyisége. A fent említett módszerek, bár különböző mátrixok analízisére voltak kifejlesztve, mégis, a berendezések futtatási paraméterei nagyon hasonlítanak, így ezen módszereket adaptáltam a pálinkák aromáinak vizsgálatára.

A legtöbb csúcspár esetén megfelelő volt az oszlop felbontása. A módszerfejlesztés kezdetén a minták komponenseinek elválasztását két oszloppal is elvégeztük (CP-Wax 57 CB, 50m x 0,33mm x 0,2um és ZB-WAX 60m x 0,25 mm x 0,25 0,25  $\mu$ m). A CP-WAX 57 CB (8. ábra) oszlop használatát vettem el két ok miatt a) az aceton/metil-acetát (8. ábra) csúcspárra rosszabb volt az elválasztás, b) a korai komponensekre tailing-es csúcsok megjelenése (főleg acetaldehid és metanol esetén).

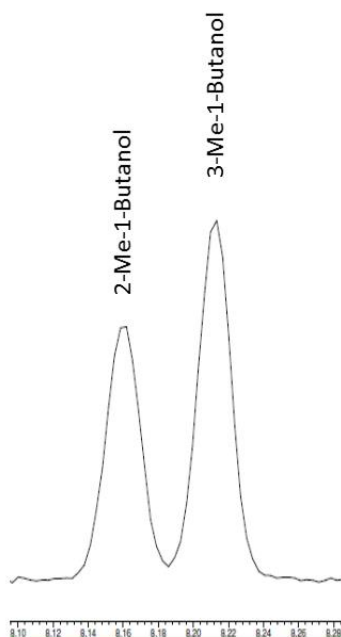


8. ábra: Standardok kromatogramja a CP-WAX 57 CB oszlopon

Ennek alapján továbbiakban ZB-Wax oszlopot használtam. A 2870/2000/EK rendelet megengedi, hogy az amilalkoholokat (2-metil-butanol és 3-metil-butanol, 9. ábra) ne szelektíven, hanem együttesen határozzuk meg, ami lángionizációs (FID) detektorral is könnyen kivitelezhető. Tömegspektrometriás detektálás esetén azonban nincs olyan ion, amely önmagában képes a két vegyületet egyforma érzékenységgel mérni, viszont három ion ( $m/z = 55, 56, 70$ ) együttes detektálásával ez megoldható (külön detektáljuk a 2-metil-butanolt, a 3-metil-butanolt és együtt a két metil-butanolt). Fontos azonban hangsúlyozni, hogy ily módon csak a két izomer együttes mennyisége mondható meg. Hasonlóan, de négy ion ( $m/z = 43, 55, 70, 73$ ) együttes detektálásával az amilalkoholok acetátjainak az együttes mennyiségét lehetett meghatározni.

A pálinka mintákat célszerű a lehető legkevesebb minta előkészítési eljárásnak kitenni, és mivel ezek desztillált termékek, amelyek semmi hozzáadott ízesítőt vagy színezéket nem tartalmaztak, így ezeket különösebb minta-előkészítés nélkül, közvetlenül elemeztük. Belső standardként 3-pentanol használtunk, azonban ez csupán injektálási standardként szolgált. Ebben az esetben a visszanyerés, mint analitikai teljesítményjellemző nem értelmezett, nem számolható. A rutinvizsgálatokat egyetlen oszlopon futtattuk. A legtöbb csúcspár esetén megfelelő volt a kromatográfias oszlop felbontása, ahol pedig nem, ott a tömegspektrométer szelektivitása segített a komponensek szelektív mérésében. Kivételek voltak az amilalkohol-pár csúcsai és az

amilalkoholok acetátjainak csúcspárja, ahol a saját response-okon kívül a kereszt response-ok figyelembevételével, számítással lehetett a szelektív mennyiségeket meghatározni.



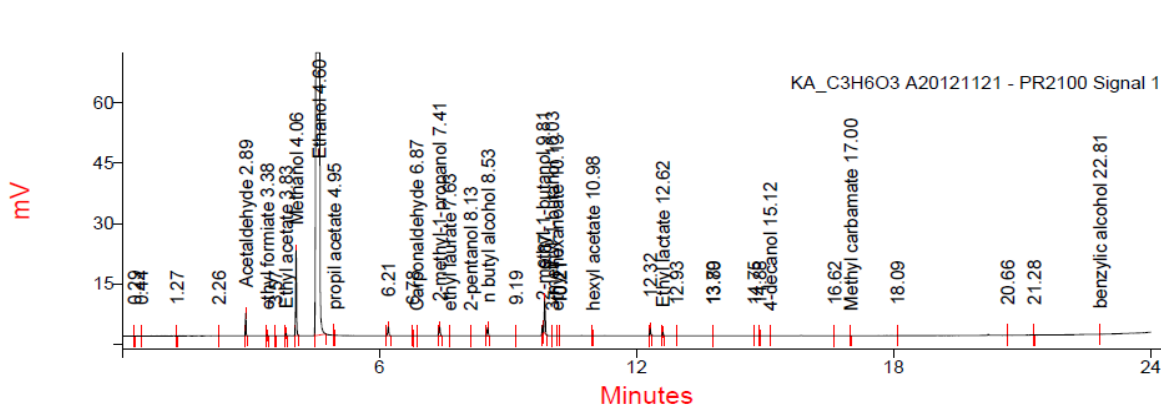
9. ábra: Amilalkoholok elválasztása CP-WAX 57 CB oszloppal

### 5.1.2 GC-FID módszer adaptálása

A GC-FID gyorsasága, robusztussága és könnyű használata miatt széles körben használt analitikai rendszer, amely nagy pontossággal képesek meghatározni egyes komponensek mennyiségét és minőségét. Jelentős hátrányuk azonban, hogy nem alkalmasak ismeretlen komponensek beazonosítására, így minden komponens kvalitatív méréséhez standard használata szükséges.

A gyártási technológiát befolyásoló tényezők vizsgálatához a kapcsolt analitikai rendszerek közül RI és PDA detektorral szerelt HPLC, valamint GC-FID eszközöket használtam. A pálinka minőségét befolyásoló gyártási technológia hatásának vizsgálatára a GC-FID berendezés elégségesnek bizonyult, amit a 10. ábra szemléltet.





10. ábra: Bosc Kobak körte párlatának GC-FID kromatogramja

A GC-FID technikát aromaprofil vizsgálatban többen is alkalmaztak már (Coldea *et al.*, 2011; Coldea *et al.*, 2013). A két kísérletsorozatban az elválasztást egy 60 méteres ZB-WAX (0,25 mm belső átmérő, 0,25  $\mu\text{m}$  film vastagság) oszloppal végezték, a futtatási körülmények, akárcsak az oszlop, eltérőek voltak az általunk használt oszloptól és ebből adódóan a módszertől is. Kuipers és munkatársai (2010) skót whisky marker molekuláinak mérésére szintén GC-FID berendezést használtak. Kísérleteiben CP-WAX 57 típusú oszloppal végezte a whisky aroma-marker (2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, i-butanol, i-amil-acetát, valamint etilacetát és acetál) komponenseinek kvalitatív és kvantitatív mérését. A folyadékfázis intenzív kereszt kötéseinek köszönhetően az oszlop kiváló stabilitást és robusztusságot tesz lehetővé az alkohol/víz alapú minták analízisében.

GC-FID berendezéssel végzett méréseimhez én is a CP-WAX (Gyártó: Varian, paraméterei: 50 m x 0,33 mm x 0,2  $\mu\text{m}$ ) oszlop használata mellett döntöttem. Az oszlop legnagyobb hőmérsékletét 220 °C fokra, a detektor hőmérsékletét pedig 250 °C állítottam be.

## 5.2 Különböző élesztőtörzsek vizsgálata

### 5.2.1 A szerves savak hatása a fermentációra

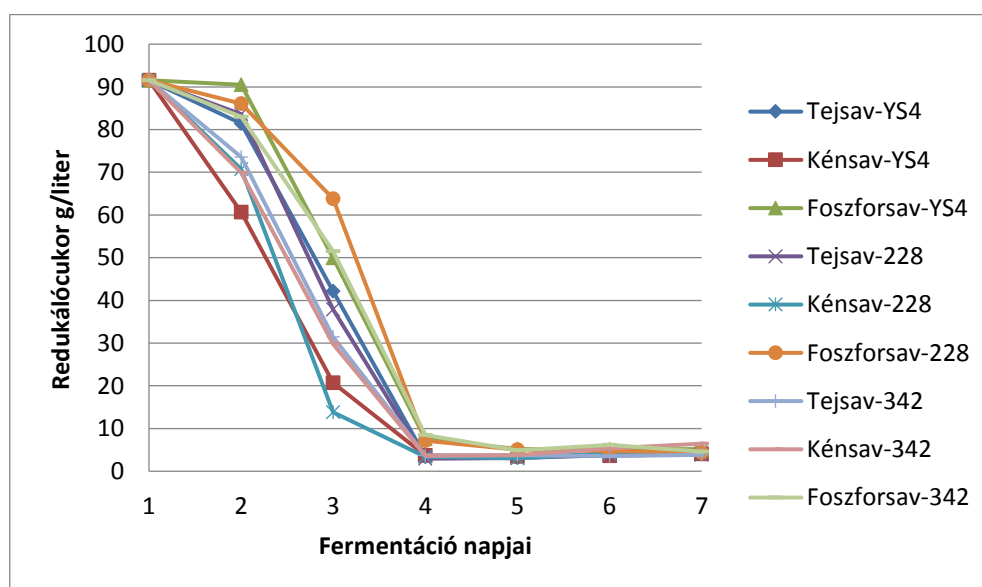
Redukáló cukrok közül a körtében leginkább a glükóz és a fruktóz van jelen, galaktóz 10 mg/100 g mennyiségben fordul elő csupán. A redukáló cukortartalom változásával jól követhető a különböző élesztő törzsek erjesztőképessége. A cefreminták redukáló cukor fogyasztását a 2. táblázat ismerteti.

#### 2. táblázat: Az YS4, 228 és 342 élesztőtörzsek 7 nap alatt felhasznált redukáló cukor

**menyisége különböző savakkal kezelt körtecefrékben**

Törzs	YS4			228			342		
	Tejsav	Kénsav	Foszforsav	Tejsav	Kénsav	Foszforsav	Tejsav	Kénsav	Foszforsav
<b>Cukor fogyasztás (g/100ml)</b>	8,2	7,9	8,7	7,7	7,96	8,28	7,28	7,8	8,3

Megállapítható, hogy a különböző savas kezelések hatással voltak a redukáló cukor mennyiségének változására. A foszforsavval kezelt cefrék intenzívebb cukorfogyást mutattak, mint a többi savval kezelt minta az alkalmazott élesztőtől függetlenül. A foszforsavas kezelés hatására az erjedés, ha kevésbé is, de elnyújtottabb dinamikát mutatott, mint a tejsavas és a kénsavas tételek esetében. Az élesztőtörzsek nem mutattak jelentős különbségeket az egyes mérési összeállítások között.



**11. ábra: A különböző élesztőtörzs és sav kombinációjának hatása a redukáló cukortartalom változására**

Az YS4 sütőipari élesztő a mért cukorfogyás alapján mind a tejsavas, mind a foszforsavas kísérletekben több cukrot hasznosított, mint a borászati vagy a szeszipari élesztő. Savak tekintetében a foszforsav bizonyult a legjobb választásnak a kénsavval és a tejsavval szemben. A redukálócukor fogyási görbéiből kiolvasható, hogy a foszforsavas kísérletek lassúbb lefutásúak, azonban alkalmazásának, a kénsavval vagy tejsavval végzett kísérleti mintákkal szemben, az eredményeim alapján nincs ipari szempontból jelentős hátránya.

Az élesztő készítmények savakkal történő kezelése az iparban gyakran alkalmazott eljárás. A pálinkákhoz hasonlóan a whiskey és söriparban is ismeretes az élesztő sejtek savas-közegben

történő mosása, kezelése (Simpson *et al.*, 1989). A savas mosáson átesett élesztőkészítmények fermentációs dinamikája nagymértékben eltér a nem kezelt élesztőtől. Savas kezeléssel hatással lehetünk a flokuláció mértékére, valamint a kis molekulájú komponensek sejten kívüli kiválasztására (pl. a foszforsavval kezelt élesztő kétszer több ATP kiválasztását eredményezi, mint azonos mennyiségű és koncentrációjú kénsav). A savas közegben levő élesztők sejtfal szerkezete megváltozik, tapadóssá válnak és láncot alkotnak. A savas kezelés hatását a hőmérséklettel enyhíthetjük vagy fokozhatjuk (Simpson *et al.*, 1989). Az egyidejű-eltucukrosítás és fermentációs (SSF – Simultaneous Saccharification and Fermentation) eljárásban a savak használata általános gyakorlat. A foszforsav és a kénsav a két leggyakrabban használt sav-katalizátor az SSF technológián alapuló fermentációs folyamatokban (Ishola *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2009)

### 5.2.2 Szénhidrát-hasznosítási képesség

Az élesztőtörzsek közötti különbség feltárására asszimilációs kísérletet végeztem az alkalmazandó *S. cerevisiae* YS4, 228 és 342 törzsekkel. A törzsek közti szénhidrát-hasznosítási képességben mutatkozó különbségek jelentős hatással lehetnek a párlatok minőségére. A következő szénhidrátokat (glükóz, fruktóz, ribóz, melibióz, laktóz, raffinóz, inulin és cellobióz) és alkoholokat (metanol és etanol) alkalmaztam. A kapott eredmények az 3. táblázatban találhatóak. Megállapítottam, hogy a kísérletekben használt *Saccharomyces cerevisiae* törzsek csekély eltérést mutattak a szénhidrátok és alkoholok asszimilációs képességei között. Jól látható, hogy a *S. cerevisiae* 342 (szeszipari élesztő) törzs képes volt a legtöbb általam vizsgált szénforrást asszimilálni. A YS4 pékélesztő és a 228 borászati élesztőtörzsek kisebb számú szénforrást asszimiláltak. Az élesztők általi metanol asszimiláció régebről ismert tulajdonsága számos élesztő fajnak és fajtának (Hazeu *et al.*, 1972), sőt e tulajdonság sok esetben alkalmas a faj illetve fajta azonosítására is. A 342-es törzs egyik ismételt mintája pozitív eredményt adott, de összességében negatívnak tekinthető. Tekintettel arra, hogy kis mennyiségű metanolt hasznosítanak az élesztők, és csak aerob körülmények között, így ez a tulajdonságuk nem jelent előnyt az alkoholos italok gyártóinak. Az etanol asszimilációja oxigén jelenlétében, diauxiás körülmények között jelentős. Ezt a tulajdonságot leginkább az élesztőgyártásban hasznosítják (Walker, 1998). Bár az alkohol kihozatal nem csak az asszimilálható szénforrások száma határozza meg, hanem más paraméterek is, pl. alkohol tolerancia. Ezért ha csak az alkohol kihozatal lenne a cél, akkor a 342-es kódjelű *S. cerevisiae* törzs a legalkalmasabb ugyanis e törzs széles tartományban mozog a szénforrás preferenciája és az alkohol toleranciája is magasabb (Meneses *et al.*, 2002). Az asszimilációs tesztből kiderült, hogy az élesztő mely szénforrásokat képes hasznosítani aerob

körülmények között, az azonban nem derül ki, hogy mely szénforrásokat képes fermentálni. A fermentálható szénforrások meghatározásához egy egyszerű fermentációs tesztet végeztem.

### 3. táblázat: Különböző élesztőtörzsek asszimilációs képességei

#### *S. cerevisiae*

Szénforrás	342	228	YS4
Glükóz	+	+	+
Fruktóz	+	+	+
Ribóz	+	-	+
Melibióz	+	-	-
Laktóz	-	-	-
Raffinóz	+	+	-
Inulin	+	+	-
Cellobióz	+	-	+
Metanol	-	-	-
Etanol	+	-	-

+ asszimilálta a szénforrást

- nem asszimilálta a szénforrást

A szénhidrátok anaerob hasznosításának vizsgálatára glükózt, fruktózt, laktózt, galaktózt, szacharózt, maltózt és xilózt alkalmaztam. A fermentációt 9 napon át (211 óra) vezettem, naponta mintavételeztem és analizáltam. Megállapítottam, hogy a *S. cerevisiae* általam vizsgált törzsei jól hasznosították az általam vizsgált szénhidrátokat (4. táblázat), kivéve a laktózt és a xilózt. Az erjesztés 9. napjára a fermentált szénhidrátok koncentrációja minimumra csökkent. Egyik élesztőtörzs sem tudta fermentálni a laktózt és a xilózt anaerob körülmények között.

### 4. táblázat: Az élesztőtörzsek szénhidrát erjesztési képessége

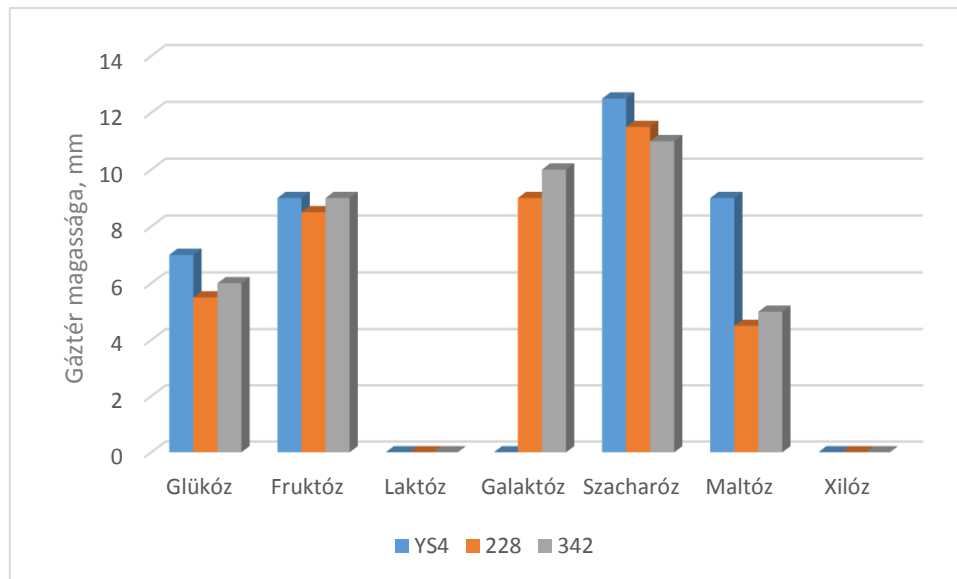
Szénhidrát	YS4	228	342
Glükóz	+	+	+
Fruktóz	+	+	+
Galaktóz	+	+	+
Sacharóz	+	+	+
Maltóz	+	+	+
Laktóz	-	-	-

Xilóz - - -

+ *hasznosította a szénforrást*

- *nem hasznosította a szénforrást*

A 12. ábra mutatja, hogy a leginkább preferált szénforrás a szacharóz volt mindhárom élesztőtörzs esetében. Az YS4 pékélesztő a fermentációs teszt szerint a galaktózt nem tudta fermentálni, azonban a többi szénhidrát hasznosításában és fermentálásában felülmúlta az 228-as és a 342-es törzseket.



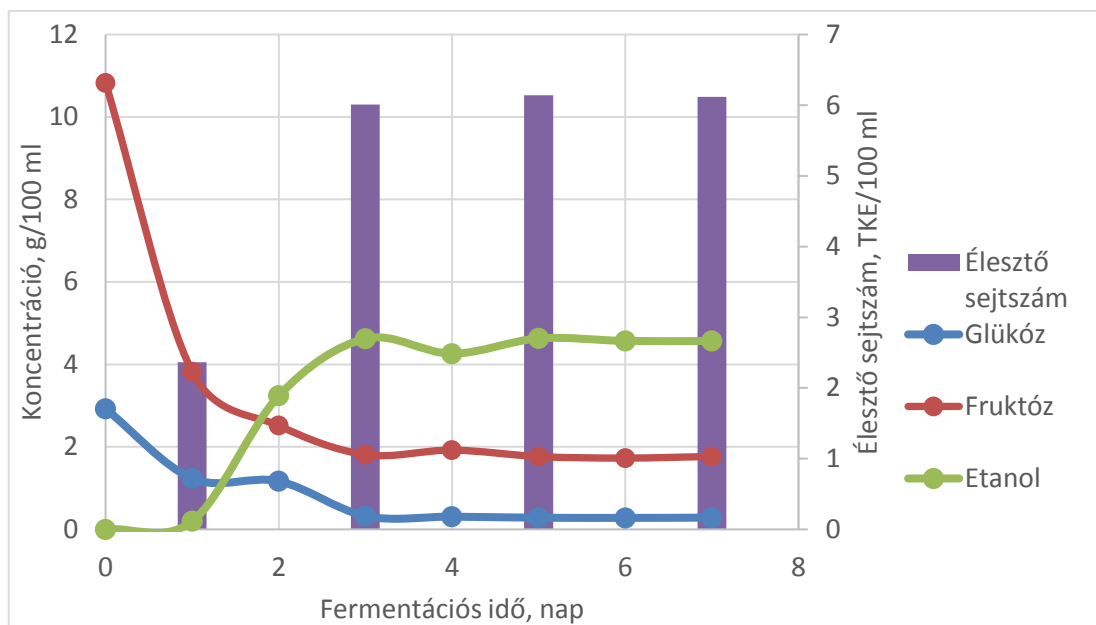
**12. ábra: A fermentációs teszt során keletkezett gáztér magassága**

Megállapítottam, hogy az általam vizsgált három különböző iparág számára szelektált élesztő asszimilációs képessége eltérő. A fermentációs teszt eredményei szerint mindhárom élesztő alkalmas a körtecefrében előforduló cukrok, a glükóz, a fruktóz, a DP2 (többnyire szacharóz) erjesztésére. A sütőipari élesztő az elvárásaim ellenére, összességében hasonlóan jó fermentációs képességet mutatott, mint a borászati és szeszipari élesztő. Továbbá megállapítottam, hogy a sütőipar számára szelektált YS4 kódjelű élesztő az általam vizsgált körülmények között hatékonyabbnak bizonyult az alkoholos fermentációban, mint a szeszipar számára szelektált élesztő. Hasonló eredményeket publikáltak melasz fermentációs kísérleteknél (Jayus *et al.*, 2016), amelyben több *S. cerevisiae* törzs fermentáció dinamikáját, és szénhidrát hasznosítási képességét hasonlították össze.

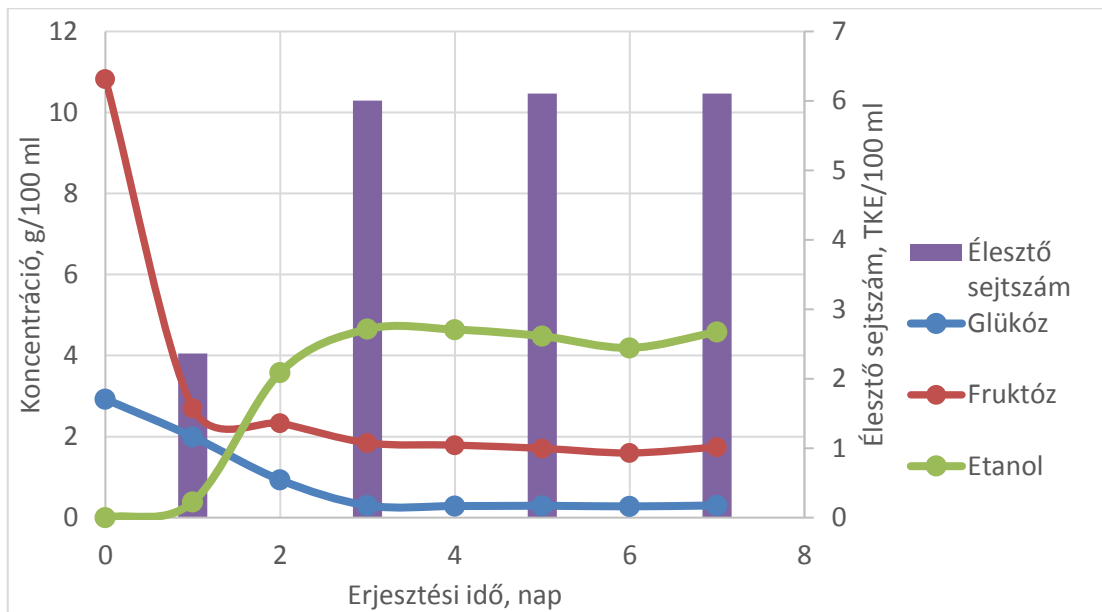
### 5.2.3 A törzsek növekedése és erjesztése körtecefrében

Az élesztő cefrére gyakorolt hatásának vizsgálatához három különböző *Saccharomyces cerevisiae* törzset alkalmaztam. A kísérletet laboratóriumi körülmények között végeztem Bosc Kobak körte cefre alkalmazásával.

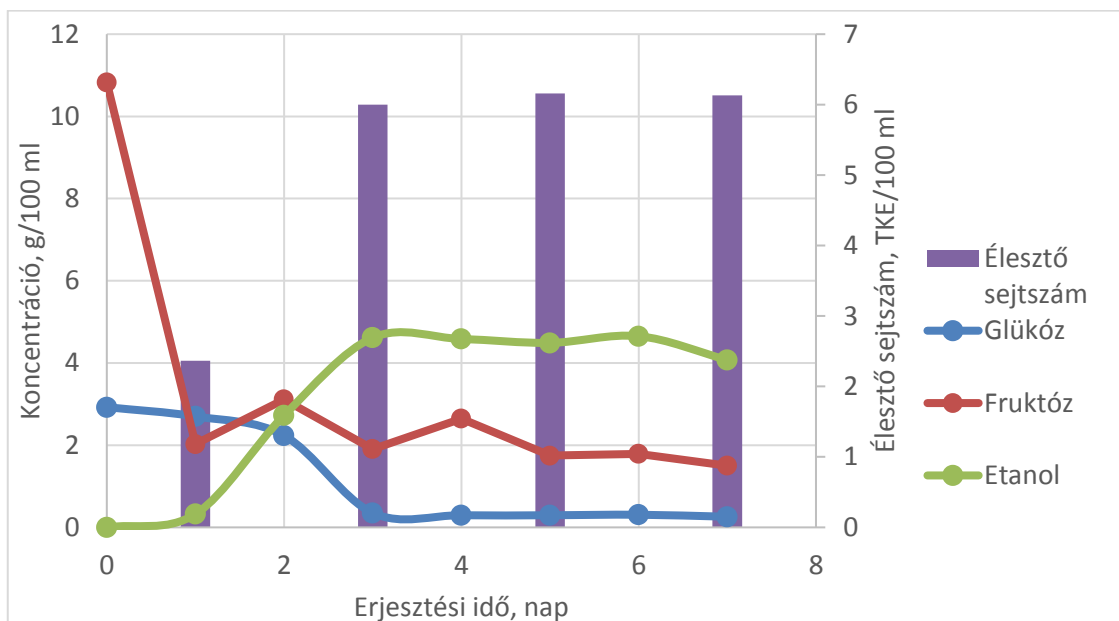
Az élesztők adalékoktól mentes (enzim, tápsó, szerves savak stb.) körtecefrében egymástól eltérő fermentáció dinamikát mutattak, ami később a párlatokban is különbségeket eredményezett. A kísérletet laboratóriumi körülmények között, három párhuzamos mintasort használva végeztem, amelyek eredményeit átlagoltam. Az élesztők által felhasznált cukor mennyiségéből megállapítható, hogy savak, tápsó és külső forrásból származó enzimek használata nélkül az élesztőtörzsek közel azonos mennyiségű cukrot képesek hasznosítani. A 13., 14. és 15. ábrák mutatják az élesztőtörzsek fermentáció dinamikáját.



13. ábra: *Saccharomyces cerevisiae* YS4 törzs fermentáció dinamikája Bosc Kobak körtecefrében



14. ábra: *Saccharomyces cerevisiae* 228 törzs fermentáció dinamikája Bosc Kobak körtecefrében



15. ábra: *Saccharomyces cerevisiae* 342 törzs fermentáció dinamikája Bosc Kobak körtecefrében

Azt tapasztaltam, hogy adalékanyagok hozzáadása nélkül, laboratóriumi körülmények között a három élesztőtörzs hasonló hatásfokkal fermentálta a rendelkezésre álló szénhidrátokat, hasonló mennyiségű etanolt termelve. Az élesztősejtek tekintetében sem mutatható ki különbség.

Megállapítottam, hogy a sütőipari élesztő 8,1 g redukáló cukrot, a 228-as borászati törzs 8,3 g redukáló cukrot, míg a szeszipari élesztő 8,5 g redukáló cukrot hasznosított 100 ml cefréből 8

nap alatt. Mindez arra utal, hogy nem csak alkohol és sejtömeg termelés tekintetében hasonló a három törzs, hanem azt is, hogy a körtecefrében található redukáló cukor hasznosítása tekintetében is hasonlóak. A szakirodalomban fellelhető megfigyelések szerint a borászati élesztő több cukrot képes felhasználni, mint a sütőipari élesztők (Fugelsang *et al.*, 2010; Kraus, 2017), valamint, a szeszipari élesztők a borászati élesztőknél is több cukrot képesek felvenni (Donalies *et al.*, 2008). Eredményeim arra engednek következtetni, hogy a Bosc Kobak körtecefrében, azonos körülmények között a három vizsgált élesztő egyforma hatásfokkal használható.

### 5.3 Különböző kezelések hatása

#### 5.3.1 Pektinbontó enzimek hatása

A pektinbontó enzimek hatását körtecefrére gyakorolt hatását laboratóriumi körülmények között vizsgáltam. A laboratóriumi kísérletben Bosc Kobak körtecefréjét kezeltem pektinbontó enzimekkel.

A Francia Oenobrand nevű cég által gyártott Rapidase Clear granulált pektolitikus enzimkészítmény. A kontroll mintához viszonyítva a Rapidase enzim használatával 3 óra elteltével tapasztaltam az elfolyósodást. Centrifugálással 24 óra elteltével 10 g cefréből 6,8 ml felülúszót tudtam összegyűjteni, amely szárazanyag tartalma 12,9 Brix% volt.

A Lallemand által forgalmazott Lallzyme EXV enzimkészítmény fahéjsav-észterázmentes készítmény. A cefrébe való adagolás után 4,5 óra után tapasztaltam szemmel látható viszkozitás csökkenést és 24 órás inkubálás után centrifugálással 10 ml körtecefréből 7,6 ml felülúszót nyertem 13,3 Brix% szárazanyag-tartalommal.

A Lallzyme HC pektolitikus enzimkészítmény használatával 24 órás inkubálás után 10 ml mintából 7,2 ml felülúszót sikerült összegyűjteni. Megjegyzem, hogy látható elfolyósodást már 5. órától tapasztaltam. A felülúszó szárazanyag tartalma 13,2 Brix% volt.

A maceráció hatásfokának növelése a borászatban is alkalmazott technika, amellyel a borok szín-, íz- és illatvilágát javítják. A gyümölcs alapú párlatoknál a pektinbontó enzimek használatának a már említettekén kívül a metanoltartalom indirekt csökkentése (Anderson *et al.*, 1998; Ohimain, 2016) és a cefre elfolyósítása a célja. A körtében megtalálható természetes pektinbontó enzimek közül a legnagyobb mennyiségben a pektin-metilészteráz enzim fordul elő, amely az észter kötést hidrolizálja és felszabadítja a metanolt. Az ipari enzimkészítmények azonban pektin liázt, poligalakturonázt és cellulázt tartalmaznak nagyobb mennyiségben, így használatukkal csökkenthető a pektin-metilészteráz aktivitást (az élesztő tevékenységgel nem kapcsolódó metanol képződése). A pektin liáz a metilészterezett poligalakturonsav lánc végén (exo enzim) hasít, így nem képződik etanol. A körtecefrékben



elkerülhetetlen a metanol képződése, de endo enzimek adagolásával csökkenthető a keletkező mennyiség. A derítésre használt enzimek készítmények pektin-metilészteráz, poligalakturonáz és pektin liáz különböző arányú keverékét tartalmazzák, az elfolyósításra használt pektinbontó enzimek készítmények a pektinbontó enzimek mellett cellulázt is tartalmaznak.

A pektinbontó enzimek készítmények hatását Romero-Cascales és munkatársai (2012) figyelték, amikor az enzimes kezelések után nyert szilárd, folyadékfázisok arányát vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy a szilárd és folyadékfázis jobban szétvált az enzimes mintában, mint a kontrol mintákban, amelyekhez nem adagoltak enzimet. Fontosnak tartom megjegyezni azt a megfigyelést, miszerint a két Lallzyme enzimek készítménnyel kezelt cefre laboratóriumi körülmények között történő desztillálás során kevésbé volt hajlamos a habzásra, mint a Rapidase Clear nevű készítménnyel kezelt cefrék. A tapasztalt eltérést véleményem szerint az enzimek készítmények eltérő összetétele okozza.

Körtepálinka gyártása során a szilárd fázist nem távolítottam el a folyékony fázistól, így a fermentáció során egyben maceráció is ment végbe. Tekintettel a kísérletekben kapott eredményre, miszerint a macerációs hatékonyságot fokozó enzimek készítmény (Lallzyme EXV) nagyobb lékihozatalt eredményezett, pálinkagyártás céljából célszerűnek tartom ezen készítmények előnyben részesítését a másik két csoport enzimeivel szemben.

### 5.3.2 Savak hatása

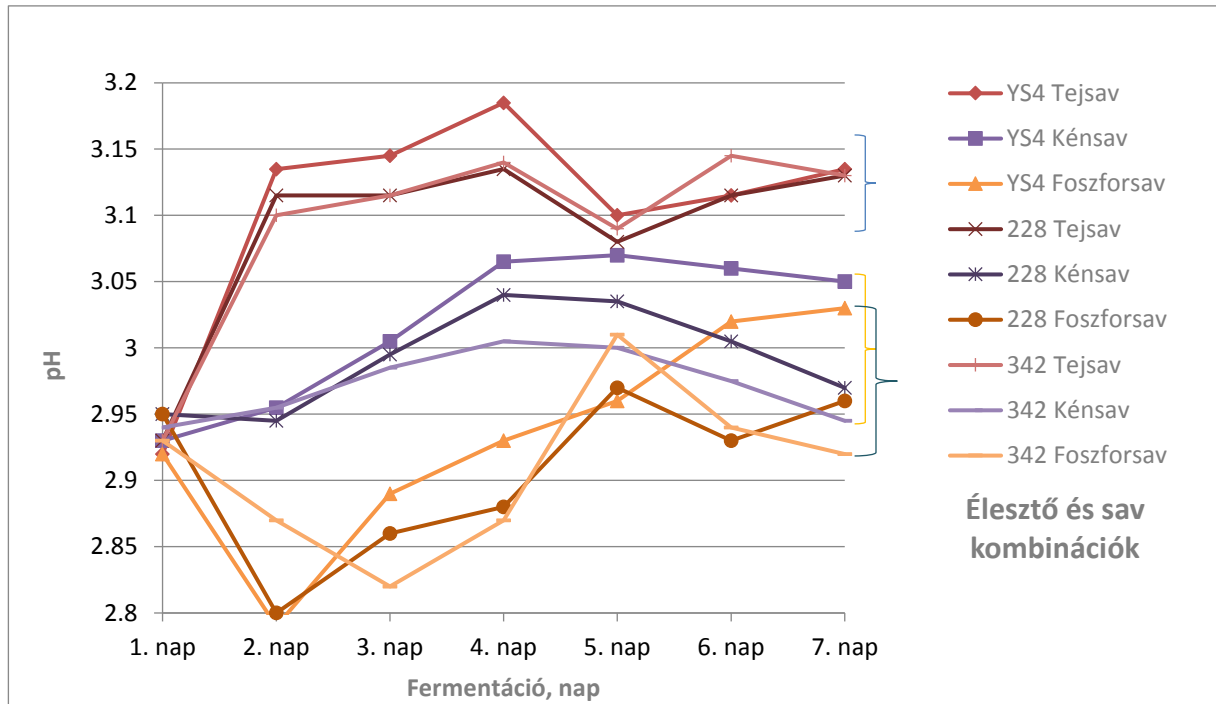
A cefre kiindulási pH-ja 4,3 volt. Az irányított fermentációhoz pH 3-at (+/- 0,08) állítottam be foszforsav, kénsav és tejsav felhasználásával. A pH állítás szerepe az, hogy a káros mikroorganizmusok számára nem optimális környezetet hoz létre. A fermentáció során a pH értékek 2,8 és 3,2 között változtak.

A 16. ábrán látható, hogy a fermentáció során előidézett pH változás nem az élesztőtörzs sajátossága, hanem maga a sav, amivel a pH-t beállítottam. A fermentáció során mért pH értékek alapján az erjedési pH profilok görbéi három csoportba sorolhatók.

Az első csoportba azok a cefreminták tartoznak, amelyeknél foszforsavval történt a pH beállítás. Ezeknél a kísérleteknél nagyobb pH csökkenés figyelhető meg a 2. és 3. napokon. A második csoportot alkotják a kénsavval kezelt cefrék. Erre a csoportra jellemző, hogy a kezdeti pH-nál jelentős változás nem történt. A tejsavas cefreminták külön csoportot képeznek, amelynél már a fermentáció kezdetétől intenzív pH emelkedés figyelhető meg.

A pH változások görbéiből jól kiolvasható, hogy a tejsav, mint gyenge szerves sav nem volt képes a cefrék kívánt pH értékének a megtartására. A pH változás görbéiből az is kiolvasható, hogy a különböző élesztőtörzsek különböző mértékben tartották a beállított pH értékeket. A

legkisebb eltérést a beállított pH értéktől a 342-es törzs produkálta kénsav hatására, a legnagyobb eltérést az YS4 kódjelű péklesztő és tejsav kombinációnál tapasztaltam.



**16. ábra: Kezelt cefrék pH változása a fermentáció során**

A fermentáció során az élesztő metabolikus tevékenységének köszönhetően számos gyenge szerves sav szintetizálódik vagy szabadul fel a cefrében. A fermentáció során szerves savak széles skálája képződik az élesztő metabolikus tevékenységének köszönhetően. Ha a cefre nem lett egy erősebb savval kezelve akkor a puffer kapacitása kisebb, így ezek a szerves savak csökkenthetik a cefre pH értékét. A kísérleteimben a cefrék pH-ja 2,8 és 3,2 között változott. Figyelembe véve az élesztőtörzsek széles pH optimumát, ez a változás még az optimum tartományon belül volt. A pH ingadozásoknak többféle oka lehet. Az egyik, hogy az élesztők nemcsak savakat termelnek, hanem szubsztrátumként fel is használhatják őket, ami csökkentheti a cefre savasságát. Tovább a megtermelt etanol vagy nitrogén hasznosításában keletkező ammónia szintén növelheti a cefre pH-ját.

A glikolízisben kulcsszerepet játszó enzimek pH optimuma közel semleges, sőt bizonyos enzimeké a lúgos tartomány irányába mutat. Mivel az etanol növeli a membrán permeabilitást, ezért a transzportfolyamatok szelektivitása csökken, ezzel magyarázható, hogy bár számottevő mennyiségű szénhidrát marad a cefrében a fermentáció végére, mégsem tudja ezeket felhasználni, még az elegendő mennyiségű és működésű enzimkészlete ellenére sem (Dombek *et al.*, 1987).

### 5.3.3 Az erjedési pH hatása az aromaanyagok képződésére

A különböző pH értékeken fermentált körtecefréket desztilláltam, majd a pH aromaanyagokra gyakorolt hatását vizsgáltam. A körtecefrék párlatát GC-MS-el analizáltam az így kapott eredményeket egyutas varianciaanalízissel (ANOVA- lineáris modell) értékeltem (5. táblázat).

#### 5. táblázat: Egyutas variancia analízis (ANOVA) a pH és az egyes aromaanyagok közötti kapcsolat vizsgálatára

	acetaldehid	etilacetát	acetal	metanol	1-propanol	i-butanol
R <sup>2</sup>	0,01575	0,6629	0	0	0,4235	0,7333
p-érték	0,332	0,008	0,470	0,593	0,047	0,004
becsült együttható/pH	-25,83	5,39	-3,83	38,8	4,21	18,67

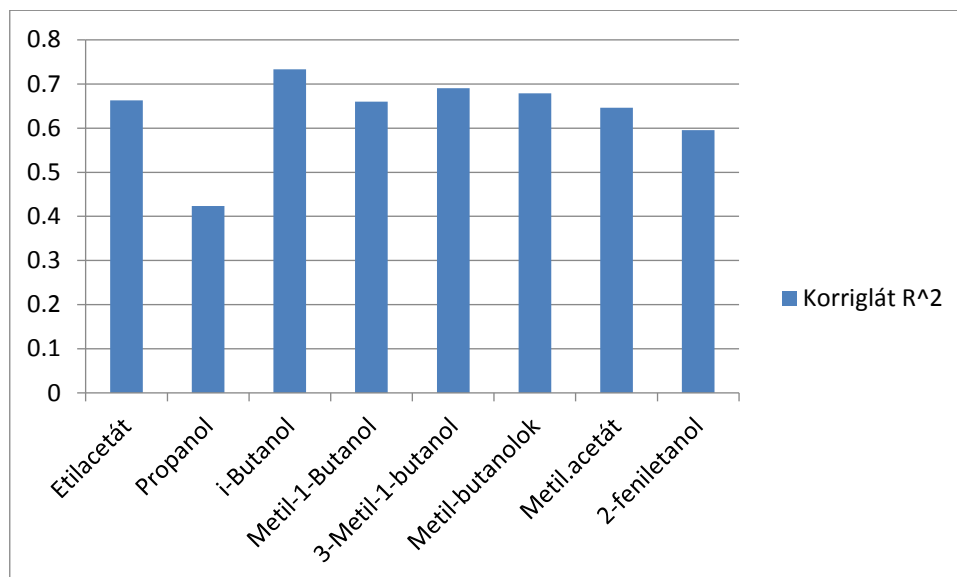
  

	2-metil-1-butanol	3-metil-1-butanol	metil-butanolok	3-metil-butil-acetát
R <sup>2</sup>	0,6598	0,6902	0,6785	0
p-érték	0,00878	0,006548	0,007354	0
becsült együttható/pH	10	43,3	50,9	0

	metil-butil-acetátok	hexil-acetát	metil-acetát	2-feniletanol	eugenol
R <sup>2</sup>	0,01575	0,6629	0,6464	0	0,4235
p- érték	0,3323	0,008536	0,009917	0,593	0,0479
becsült együttható/pH	0	5,39	0,79	38,8	4,21

A kísérletben kénsavval és tejsavval végzett 2,5; 3,0; 3,5 és 4,0 pH beállítások hatását vizsgáltam a párlatokban legáltalánosabban előforduló aromaanyagokra. Itt a hatás erőssége a Korrigált R<sup>2</sup> értékéből határozható meg olyan vegyületek esetében, ahol a hatás szignifikánsnak bizonyult (a p-érték <0,05 alapján). Az összefüggés irányát a becsült koefficiens előjele adja meg (5. táblázat), azaz, ha pozitív, akkor a pH növekedése növeli a komponens mennyiségét, ha negatív, akkor fordított arányosság van közöttük.

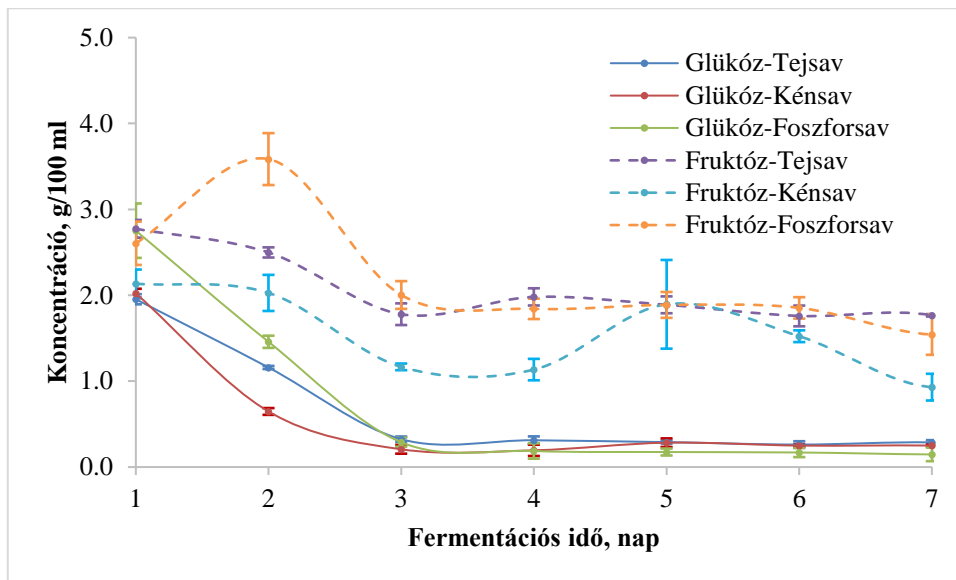


17. ábra: pH hatása egyes aromaanyagok szintézisére

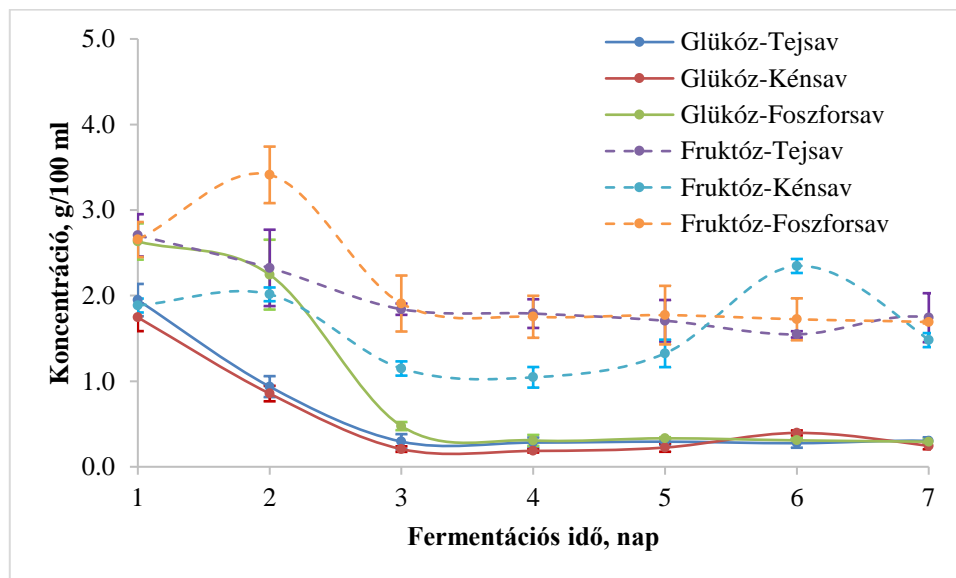
A 17. ábrán csak azon vegyületeket tüntettem fel, ahol az ANOVA szignifikáns hatást tudott kimutatni az adott tulajdonság tekintetében, vagyis amelyekre a pH valóban hatással volt. Az 5. táblázat együtthatói alapján 3 csoportot különböztethetünk meg. Az egyik csoportba a metanol, i-butanol, 3-metil-1-butanol, és a metil butanolok tartoznak. Ezen vegyületek esetében a pH növekedése jelentősen serkenti az aromaképződést. Ugyanebbe a csoportba sorolható az 1-propanol, 2-feniletanol és az etilacetát is, bár ezekre a vegyületekre a pH-nak kisebb a hatása. Az acetaldehid, és az acetál egy újabb csoportot alkotnak. Ezen vegyületek együtthatója negatív, amiből következtethető, hogy a savasabb környezetben, azaz az alacsonyabb pH-n nagyobb mennyiségben vannak jelen. Azon vegyületek esetében, ahol a koefficiens értéke nulla, semmilyen hatás nem figyelhető meg. Az acetaldehid, acetál, metanol és 1-butanol, metil-acetátok kis együtthatói miatt megállapítható, hogy a pH-nak nem volt jelentős hatása a szóbanforgó vegyületek keletkezésére, amit az 5. táblázatban szereplő „*p*” értékek is megerősítenek (ha  $p > 0,05$  akkor nem szignifikáns a pH hatása). Minden más aromakomponens esetében a pH jelentősen befolyásolta az adott komponens szintézisét.

#### 5.3.4 A szerves savak hatása a glükóz és fruktóz erjesztésére

Az etanolos fermentáció kimenetére meghatározó hatású a cefrék monoszacharid tartalma. A kísérleteket három párhuzamos mintasor használatával végeztem. A felhasznált glükóz, valamint fruktóz mennyiségét az idő függvényében YS4 élesztőtörzs esetében a 18. ábra, a 228-as törzs esetében a 19. ábra, a 342-es élesztő esetében a 20. ábra szemlélteti.



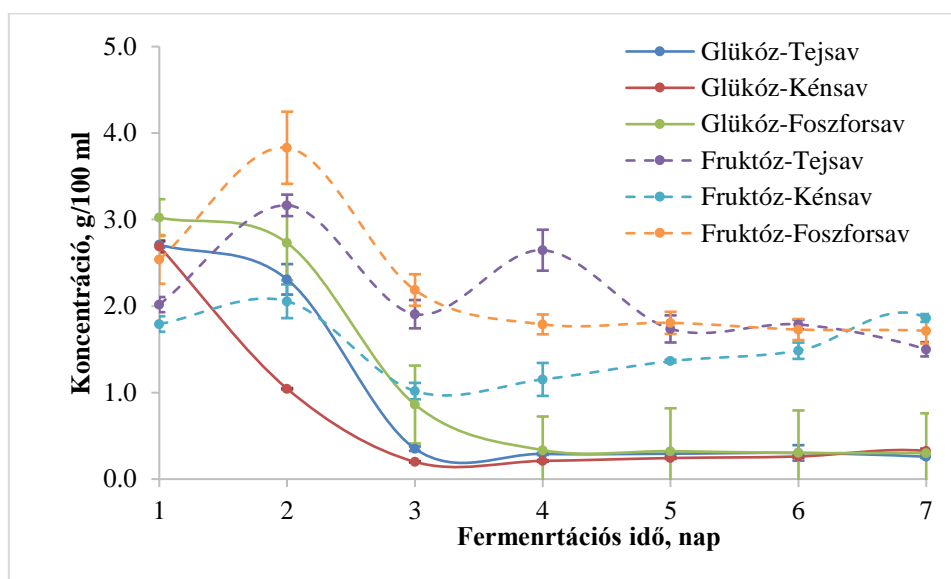
18. ábra: Sütőipari élesztő (YS4) glükóz és fruktóz hasznosítása a körtecefrében



19. ábra: A 228-as élesztőtörzs (borászati) glükóz és fruktóz hasznosítása a körtecefrében különböző savak hatására

Az 18. ábrán megfigyelhető, hogy az élesztőtörzs a foszforsavas összeállítás kivételével minden más sav esetén gyors monoszacharid csökkenést mutatott. Szintén megfigyelhető, hogy a mikroorganizmus szinte teljes mértékben elhasználta a rendelkezésre álló glükózt. A fruktóz tartalom is jelentősen csökkent, azonban csak körülbelül 2 g/100ml koncentrációig. A kénsavval kezelt minta fruktóz tartalmában jelentős ingadozást lehetett megfigyelni, viszont a hetedik napra jelentősebb csökkenést mutatott, mint a többi savval kezelt cefre.

A 228-as élesztő esetén is megfigyelhetőek jelentősebb ingadozások a glükóz és fruktóz hasznosításában (19. ábra). A glükózt ez az élesztőtörzs is szinte maradéktalanul felhasználta. A fruktóz ebben az esetben is 2 g/100 ml koncentrációig használódott fel. A kénsavval kezelt minta fruktóz tartalmában figyelhetünk meg jelentős ingadozást. Eszerint a fermentáció 6. napján magasabb volt a cefre fruktóz tartalma, mint kezdetben. A fruktóz tartalom növekedése a fermentáció kései szakaszában megfigyelhető YS4 élesztőtörzs esetében is. A jelenséget az élesztő invertáz enzime okozhatja, hiszen aktivitásával a szacharóz a fruktózzá és glükózzá alakul. Az élesztő a glükózt preferálja, így a keletkező monoszacharidokból fruktóz maradt és ez okozhatja a fruktózkoncentráció enyhe emelkedését.



20. ábra: 342-es élesztő (szeszipari) glükóz és fruktóz hasznosítása a körtecefrében

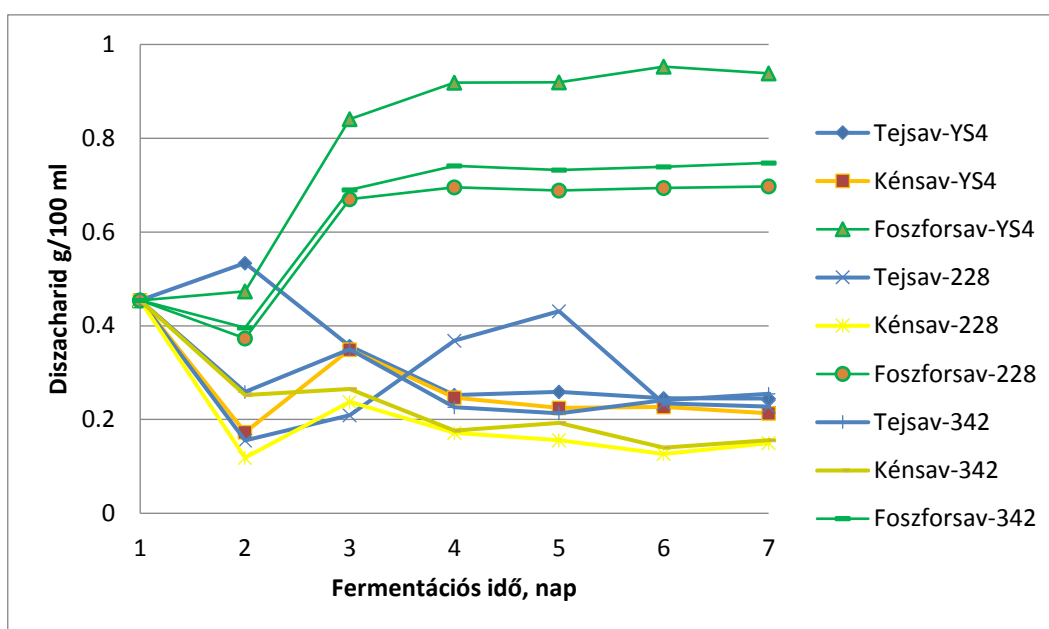
Az előzőekben megfigyelt tendenciák a 342 élesztőtörzs esetében is tapasztalhatók (20. ábra). A glükóz szinte teljes mértékben felhasználódott, valamint a cefrék fruktóz tartalma 2 g/100ml értékig csökkent. Szintén megfigyelhető volt a kénsav fruktóz hasznosulására gyakorolt hatása, ami kezdeti fogyásban majd termelődésben mutatkozott meg. A többi élesztőtől eltérően, amelyek esetében a tejsavval kezelt cefre fruktóz tartalma fokozatosan csökken, a tejsavnak megfigyelhető hatása volt a fruktóz metabolizmusára, amely a negyedik napon emelkedést mutatott, majd az ötödik napra gyors fogyásba fordult át.

Néhány tanulmány bizonyította, hogy a metabolitok akkumulációja, a tápanyag fogyása és a pH csökkenése együttesen gátolja, vagy módosítja az élesztők szénhidrát metabolizmusát (Gencer *et al.*, 1983; Park *et al.*, 1989).

### 5.3.5 A vizsgált savak hatása a diszacharidok hasznosítására

A munkám során a cefreminták diszacharid (szacharóz, maltóz) koncentráció változását is vizsgáltam. A három párhuzamos mintasor eredményeit átlagoltam, az így kapott eredményeket a 21. ábra szemlélteti.

A diszacharid (DP2) koncentráció a cefremintákban dinamikusan változott és jelentős eltérések voltak megfigyelhetők az egyes élesztő/sav összeállítások hatására (21. ábra). A legnagyobb koncentrációváltozást a foszforsavval kezelt cefrékben figyeltem meg. Minden élesztőtörzs esetében a foszforsav szignifikánsan megnövelte a diszacharidok mennyiségét a cefremintákban. A többi összeállítás esetében a kezdeti diszacharid tartalom csökkenését kismértékű növekedési szakasz követte, majd a tendencia átfordult és egy fokozottabb fogyási szakasz volt megfigyelhető.



21. ábra: Diszacharid-tartalom változás dinamikája a fermentáció során

A diszacharid koncentrációváltozás dinamikájában a tejsav és 228-as élesztőtörzs kombinációjának mintáiban (21. ábra: Tejsav-228, kék görbe) a DP2 szint kezdetben gyorsan csökken, majd nagymértékben újra képződik, míg ismételen csökkenésbe nem kezdett.

A diszacharid koncentráció változása magyarázható azzal, hogy az élesztő és a gyümölcs enzimek bontják az oligo- és poliszacharidokat, így keletkeznek az erjeszhető diszacharidok. Továbbá a jelenséget okozhatja az élesztő metabolizmusából származó trehalóz feldúsulása a cefrében (Bertrand, 1975). Ugyanakkor az élesztő invertáz és más hidroláz enzim aktivitásának köszönhetően a diszacharidok tovább bomlanak monoszacharidokra, esetleg az élesztő sejt

diszacharidként asszimilálja. A foszforsavval kezelt minták esetében jelentős diszacharid koncentrációnövekedés volt detektálható, ami a sav hidrolitikus hatásával magyarázható.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a gyümölcscefrzésében alkalmazott savaknak hatása van a diszacharidok koncentrációjának változására, végsősorban a cefre erjedésének kimenetelére. A diszacharidok mennyiségének változása azért jelentős, mert ennél komplexebb szénhidrátokat a *Saccharomyces cerevisiae* nem tud hasznosítani. Híg foszforsavat számos fermentációs és SSF (simultaneous saccharification and fermentation – szimultán elcukrosítás és fermentáció) technológiában használnak, hogy poliszacharidból erjeszthető szénhidrátot nyerjenek (Ishola *et al.*, 2014; Nair *et al.*, 2015; Negro *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Egy hosszabb időtartamú fermentáció esetén az így keletkezett diszacharid ugyancsak hasznosulhat, növelve így az etanol kihozatalát.

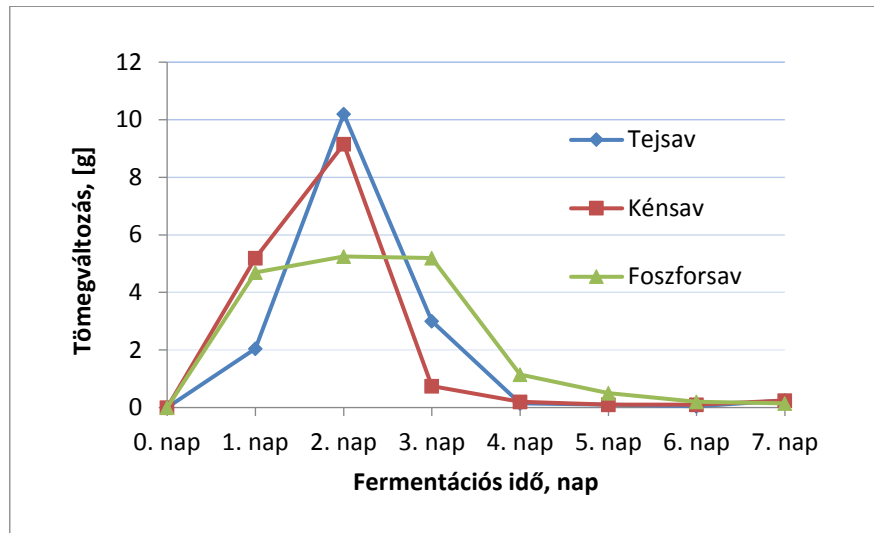
### 5.3.6 Erjedés nyomonkövetése a tömegváltozás alapján

A tömegváltozás nagyon jó mutatója a felhasznált cukor mennyiségének, ugyanis gáz más molekulából nem keletkezik, ezért a tömegváltozás sebességi görbéje jól jellemzi a fermentáció dinamikáját. Ez a mérés az etanolos fermentáció során keletkezett szén-dioxid eltávoztása okozta tömegváltozáson alapszik.

A fermentáció első napjaiban erős gázképződés volt megfigyelhető a 342 törzs tejsavval kezelt mintáinál. A beoltást követő harmadik órában a 228-as törzs mutatott erős széndioxid képződést foszforsavval történő kezelés esetén. Az YS4 törzs alkalmazásával a kénsavval kezelt tételeinél később (szemmel látható változás a beoltást követő hetedik órában) kezdődött el a megfigyelhető gázképződés. Ebből következtettem, hogy ez a beállítás eredményezte a leghosszabb lag-szakaszt a YS4 törzsnél.

A különböző élesztőtörzsek a fermentáció dinamikáját tekintve elmondható, hogy hasonlóan reagáltak az azonos savakkal történő kezelésre. Az YS4-es élesztőtörzs tömegcsökkenés eredményeit a különböző savazás hatására a 22. ábra mutatja. Megállapítható, hogy az YS4 élesztő esetében a fermentáció legaktívabb időszaka az első 3 nap volt.

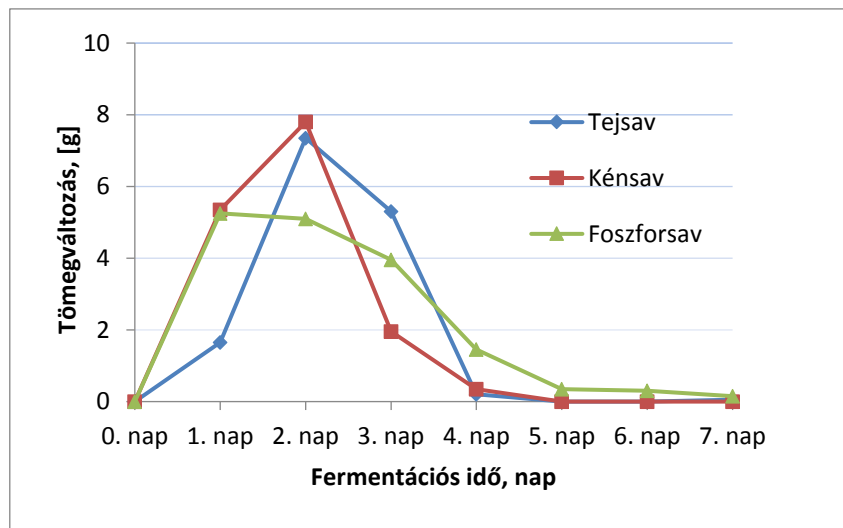




**22. ábra: YS4 (sütőipari) élesztővel beoltott Bosc Kobak körtecefre fermentációs sebességi görbéi a tejsavval, kénsavval és foszforsavval kezelt cefrékben**

A YS4 törzs esetén a tejsav és a kénsav alkalmazása viszonylag hasonló kinetikát mutatott, habár a kénsavval kezelt cefre kezdetben intenzívebb szén-dioxidtermelést mutatott. A másik két savas kezeléstől eltérően a foszforsavas minta lassúbb, elnyújtottabb fermentációt mutatott.

A 342-es élesztőtörzs tömegcsökkenés eredményeit a különböző savazás hatására a 23. ábra mutatja. Ennél az élesztőnél is megfigyelhetők voltak a savazás okozta erjedés-dinamikai változások. A tejsavval kezelt cefrékben volt a legintenzívebb a CO<sub>2</sub> termelés.

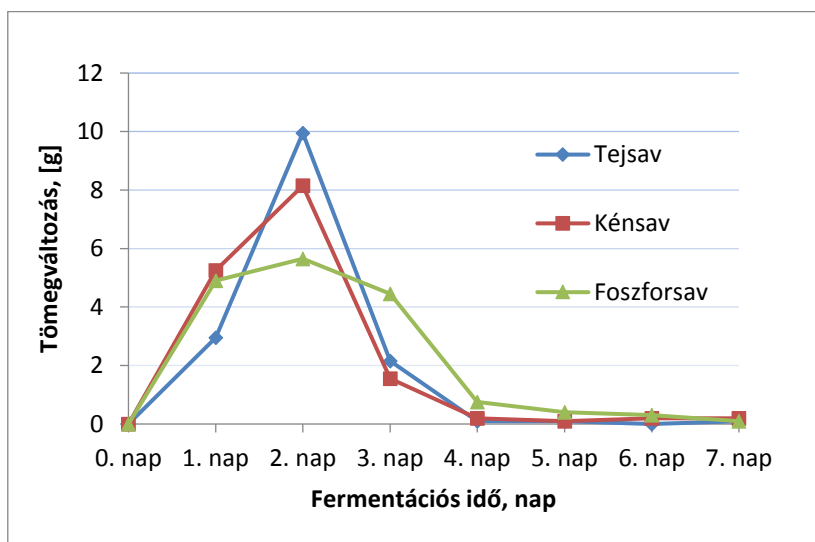


**23. ábra: 342-es (szeszipari) élesztővel beoltott Bosc Kobak körtecefre fermentációs sebességi görbéi a tejsavval, kénsavval és foszforsavval kezelt cefrékben**

A YS4-es törzshöz hasonlóan a foszforsavval kezelt cefre lassú tömegcsökkenést eredményezett, azonban a kénsavas és tejsavas cefrék nagyobb eltérést mutattak. A kénsavas kezelés szinte

teljesen azonos erjedést eredményezett, mint az YS4-es törzs esetében, azonban a tejsavnál megfigyelhető, hogy a csökkenés elnyújtottabb dinamikát mutatott.

A 228-as élesztőtörzs tömegcsökkenés eredményeit a különböző savazás hatására a 24. ábra szemlélteti. A kapott eredményei nagyon hasonlóak az YS4-es élesztő esetén szerzett eredményeihez.



**24. ábra: 228-as (borászati) élesztővel beoltott Bosc Kobak körtecefre fermentációs sebességi görbéi a tejsavval, kénsavval és foszforsavval kezelt cefrékben**

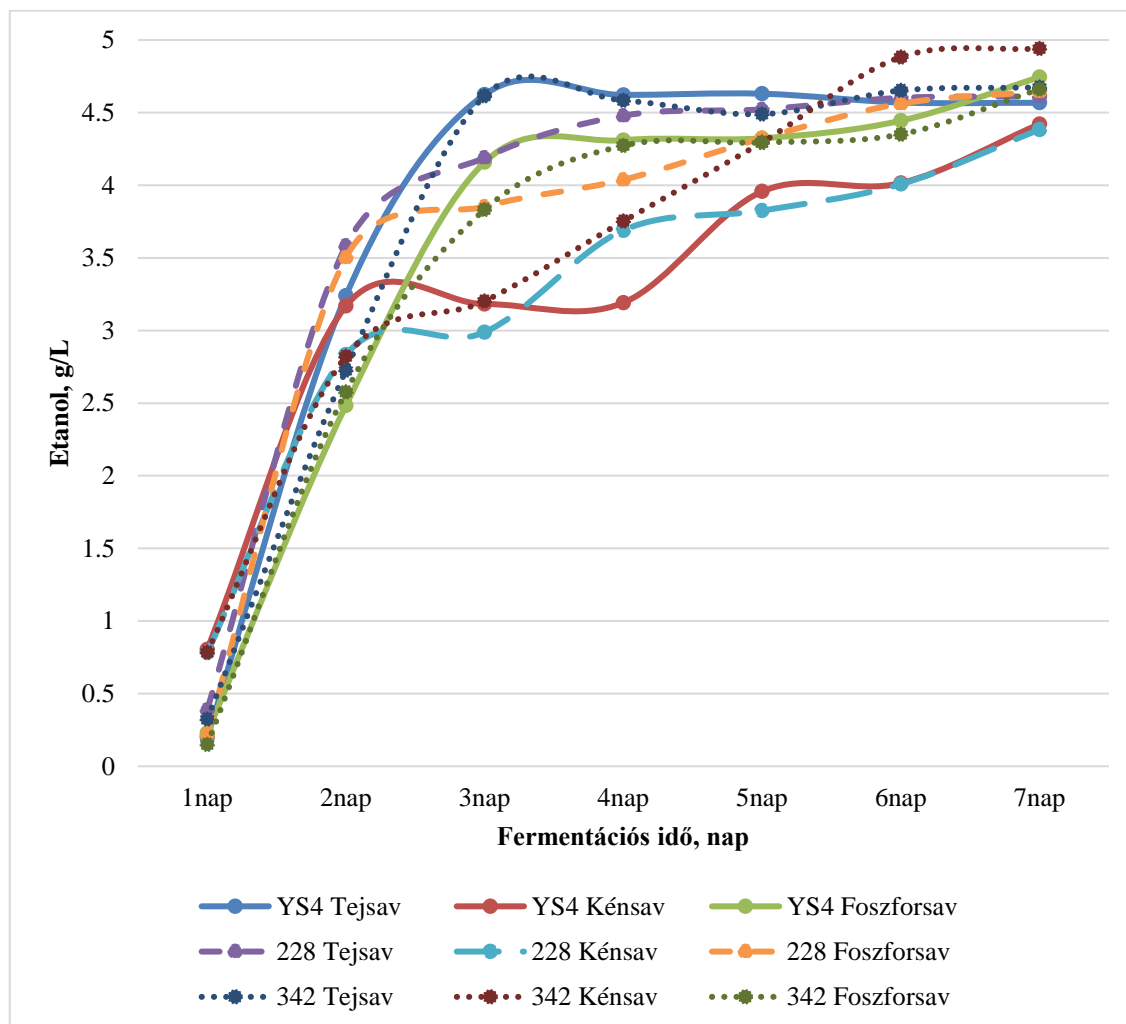
A foszforsavval kezelt cefrék esetében is hosszabb erjedési dinamikát fedezhetünk fel, valamint a kénsavas és tejsavas minták görbéi itt is közel azonos dinamikával mozognak.

Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a cefrék tömegcsökkenésének szempontjából jelentős hatása van a pH beállításhoz használt sav minőségének, valamint az alkalmazott élesztőtörzsnek. Ugyanakkor ismert tény, hogy a széndioxid negatív hatással van a fermentációra. Minél magasabb az oldott  $\text{CO}_2$  koncentráció, annál inkább gátlódik az etanol termelése. A hét napos fermentáció során a foszforsavval kezelt cefrékben volt a legkisebb a  $\text{CO}_2$  koncentráció, míg általában a tejsavas mintákban volt a legmagasabb. Az alkoholos fermentáció szempontjából célszerű tehát a foszforsavat választani a pálinkagyártásban.

Megállapítható, hogy a  $\text{CO}_2$  okozta tömegcsökkenés jó módja lehet a fermentációs folyamat becslésére és nyomonkövetésére. A szubsztrátum felhasználása, az alkohol és sejttömeg keletkezése között sztöchiometrikus kapcsolat áll fenn, ezek ismeretében megbecsülhető az élesztő aktivitása, valamint az egyik elméleti értéke kiszámítható a másiktól. A  $\text{CO}_2$  monitorozása tehát a fermentáció folyamatának a monitorozását is jelenti (Srinivasan *et al.*, 2012), amely pontossága fokozható azzal, hogy nemcsak a gázfázisú széndioxid koncentrációt figyeljük, hanem az oldott  $\text{CO}_2$ -t is.

### 5.3.7 Élesztőtörzsek és savak hatása az etanol képződésre

A kiejert cefreminták etanol tartalmát különböző módszerekkel határoztam meg, a kapott eredményeket a 25. ábra szemlélteti.



25. ábra: A különböző élesztőtörzs és savazás hatása az etanol-tartalom változására

Megfigyelhető, hogy a kénsavval végzett kísérletek etanol termelése különbözik a többi savval kezelt cefreminták eredményeitől. Az esetek többségében az etanol tartalom rövid kezdeti stagnálása után gyors növekedés kezdődött, majd telítődésben végződött. A kénsavval kezelt cefrék esetében azonban a kezdeti stagnálást és a növekedést visszaesés követte, majd újra növekedni kezdett. A fermentáció 7. napjára minden élesztő és sav összeállítása közel azonos etanol tartalmat produkált (a 342 törzs termelte a legtöbb alkoholt). A kénsavval kezelt cefrék pH ingadozása a cefre kis puffer hatása miatt jelentkezik (Costello *et al.*, 2014). A cefre pufferhatásának pontos mérését ( $\text{mol H}^+/\text{kg cefre} \cdot \text{pH}$ ) nem végeztem el, így erre vonatkozó mérési eredményeim nincsenek.

Az eredmények alapján következtethető, hogy a különböző élesztőtörzsek tolerálták a kénsavas környezetet. A cefrék etanol tartalma 48 óra után maximalizálódott, ezután minimális etanol képződés volt tapasztalható. A foszforsavval és tejsavval beállított körtecefrék esetében mátrixokban egymáshoz hasonló mennyiségű etanol képződött, az etanol képződés dinamikája is hasonló.

Stabilan optimális környezeti feltételek között az élesztőtörzsek eltérő, de jellegzetes metabolikus viselkedést mutatnak. Az optimális körülményektől való eltérés az élesztő metabolitjaira is hatással van. A különböző stresszhatások következtében az anyagcsere eltolódik, így egyes komponensek képződése előtérbe kerülhet, ezáltal a célkomponens mellett más metabolitok is szintetizálódnak (Kitagaki *et al.*, 2014; Sasano *et al.*, 2013).

Korábban bizonyítást nyert, hogy az optimumtól való eltérés mértéke kisebb jelentőséggel bír, mint a változás gyorsasága és ezáltal a rendelkezésre álló alkalmazkodási idő és képesség (Barford *et al.*, 1995). Az utóbbi pedig adott törzs karakterisztikája. Ha fokozatosan változtatjuk a feltételeket, akkor az erjesztési metabolitok termelődése is ezzel arányosan fog eltérni az optimális állapottól. A gyorsan bekövetkező változások, például a savazással előidézett pH csökkenés, vagy a szacharóz oldatos rehidratálás után a cefrébe való bekerülése, gyors környezeti változást jelent, amire az élesztők módosult metabolizmussal reagálnak. Az alacsony pH kevésbé befolyásolja az élesztők szaporodását, azonban az alkoholos fermentációra az alacsony pH negatív hatással van, amely gátlóhatás mértéke élesztőtörzs függő (Narendranath *et al.*, 2005).

Az élesztőtörzsek specifikációi szerint a 342-es törzs kiemelkedően rövid lag-szakasszal rendelkezik, a kísérleteim eredményei azonban arra engednek következtetni, hogy ez csak az optimális körülmények közt igaz, a törzsekre jellemző kezdeti adaptációs idő, a lag-szakasz sok környezeti körülmény feltétele, mint például pH, hőmérséklet, szénhidrát összetétel, alkohol koncentráció, vagy éppen a cefre biocönózisának összetétele. Elvárásaimnak megfelelően a fermentáció során az élesztőtörzsek hasonlóan viselkedtek a környezeti körülmények változásaira, hiszen a 7. napra mindegyik cefre teljesen kierjedt. Az alkoholtartalma pedig 5,1 (V/V) % és 5,5 (V/V) % között mozgott, a párlatok illata azonban jelentős eltéréseket mutatott, amit a későbbi gázkromatográfós vizsgálat eredményei is igazoltak.

### 5.3.8 Cefrék desztillálása

A laboratóriumi kísérletekkel párhuzamosan félüzemi cefrézést is végeztem. Az ipari léptékű desztillálásra azért volt szükség, hogy piaci és ipari szempontból reprezentatív mintákat tudjak előállítani, valamint, hogy a desztillálás folyamatát és annak a párlatra gyakorolt hatását reprodukálhatóvá tegyem.

Kísérleteim kivitelezéséhez egy jól meghatározott, reprodukálható desztillálási protokollt dolgoztam ki, amely munka során Packham's Triumph és Bosc Kobak körtecefréket használtam.

A kidolgozandó desztillálási módszerrel szemben támasztott elvárásom az volt, hogy a későbbi analitikai vizsgálat során mért kvalitatív és kvantitatív eltéréseket ne a különböző intenzitású fűtés, vagy a desztillálás időtartamának hossza, esetleg a deflegmátor ingadozó hőmérséklete okozza, hanem a cefrék eltérő minősége legyen az, ami majd hatással lesz a desztillálással nyert komponensek minőségére és mennyiségére.

A desztilláló berendezést vezérlő program protokollja a desztillálás folyamatát egy felfűtési szakasszal kezdi, amely során a cefrét és a berendezést üzemi hőmérsékletre emeltem. A felfűtési szakasz protokollja az alábbi sorrendben és körülményeken történt:

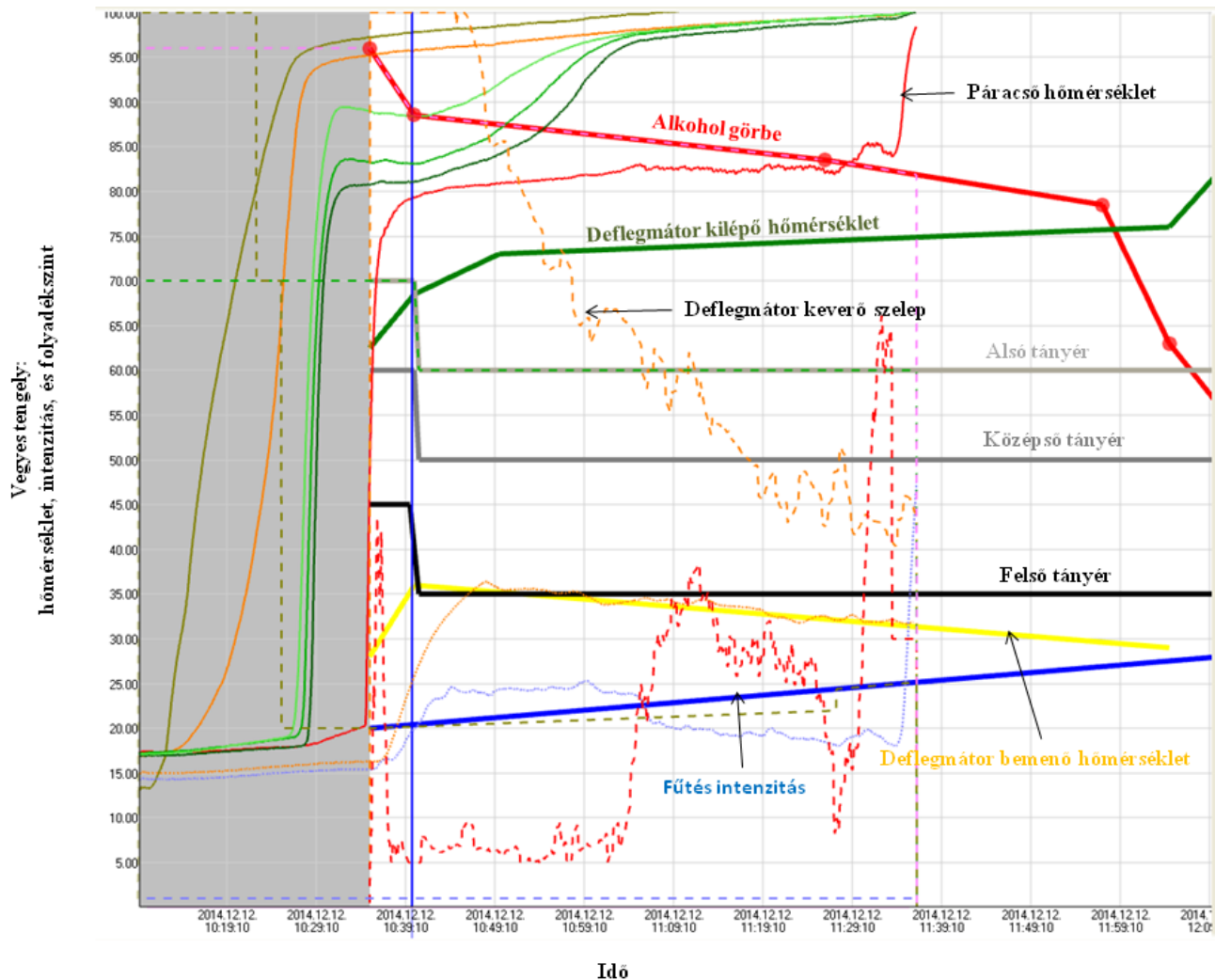
- 100% fűtés intenzitás, amíg a cefre hőmérséklete el nem éri a 80 °C fokot,
- ezt követően csökkentettem a fűtést 70%-ra és tartottam, amíg az oszlop alsó tányér-hőmérséklete 65 °C nem lesz,
- a következő lépésben a fűtés intenzitását 25%-ra csökkentettem és tartottam, amíg a páracső el nem éri a 35 °C fokot,
- ezt követően ráálltam arra a fűtés intenzitásra (20%-os intenzitás), amellyel majd a desztillálást szeretnék végezni, és ezt a hőmérsékletet tartottam amíg deflegmátorból megszökő párák fel nem melegítik a páracsővet 45 °C fokra.

A felfűtés ideje alatt a deflegmátort hidegen, azaz a hálózati hűtővíz hőmérsékletén (18 °C) tartottam. A hideg deflegmátorból megszökő gőzök adják az előpárlatot, így a protokoll végére leválaszthatjuk az előpárlati komponensek egy részét, ezek az előpárlati komponensek azonban jelentős mennyiségben a felfűtési szakasz befejezése után következő desztillálási szakasz elején koncentrálnak. A felfűtési szakaszt a desztillálás követi, amelyre egy külön protokollt dolgoztam ki:

- a desztillálási protokollt 20% fűtésintenzitással indul, amit egy óra alatt 0,041 °C/perc (számított érték) meredekséggel 22,5%-ra emeltem.
- a program indításakor a deflegmátorba belépő hűtővíz hőmérséklete 28 °C, amit 2 °C/perc meredekséggel 36 °C emeltem (4 perc).
- ezt követi egy 56 perces fokozatos hőmérséklet csökkenés 36 °C fokig, hűtés meredeksége 0,107 °C/perc (számított érték).
- alsó tányéron levő folyadékoszlop maximuma 45% négy percen át, ezt követi egy 10%/perc szintcsökkenés, majd 55% maximális folyadékszintet tartottam a középpárlati szakasz többi részében.
- a középső tányér túlfolyója 60%-ra áll be a protokoll elején, innen csökken 10%/perc meredekséggel 50%-ra, ezt az értéket tartottam a desztillálás további szakaszában.

- 70% folyadékszinttel kezdtem a felső tányéron, majd az előző két tányérhoz hasonlóan csökkentettem a szintet 60%-ra és ezt az értéket tartottam a desztillálás végéig.

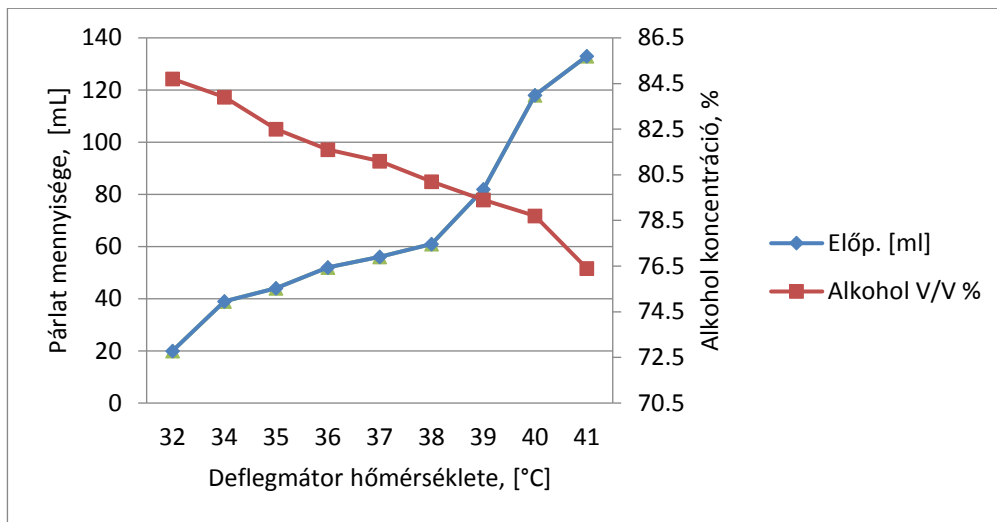
A desztillálás során mért hőmérsékletek alapján a számítógép egy összetett grafikonon (26. ábra) ábrázolja a desztillálás múltbéli eseményeit, valamint az előre beállított paramétereket.



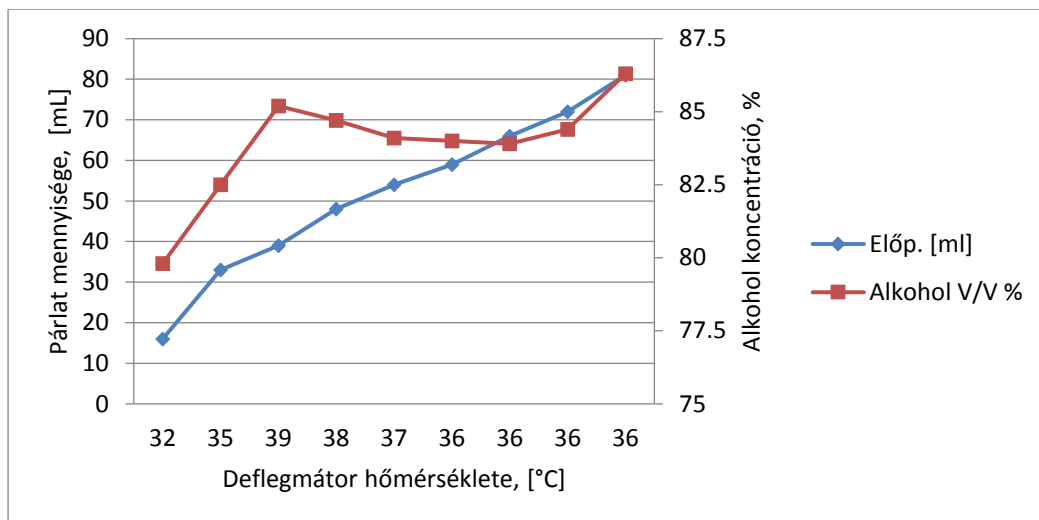
**26. ábra: A desztillálási protokoll futási görbéi**

A számítógépes szoftver az elő- és középpárlat határokat jelezte, amelyeket érzékszervileg is ellenőriztem. A cefre mennyisége mindig azonos volt, alkoholtartalma  $6\% \pm 0,4\%$ , üst hőmérséklet a betöltéskor  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ezzel a kidolgozott módszerrel a különböző sarsok közötti különbségek (mint pl. a gyümölcs fajtája, évjárata és termőterülete) nem voltak kimutatható hatással a desztilláció folyamatának minőségére.

A legkritikusabb paraméternek a deflegmátor hőmérsékleti programja bizonyult. A 27. és 28. ábrák azonos körtecefre (Packhams Triumph) előpárlat a mennyiségének és alkohol koncentrációjának az alakulását ábrázolják a deflegmátor hőmérsékletének függvényében.



27. ábra: Az előpárlati frakció mennyiségének és alkohol koncentrációjának alakulása lineáris, ekvidisztáns deflegmáció-hőmérséklet beállítással



28. ábra: Az előpárlati frakció mennyiségének és alkohol koncentrációjának alakulása emelkedő majd csökkenő hőmérsékletű deflegmátor beállítással

Az eredmények alapján egyértelmű összefüggés figyelhető meg a párlat térfogatára, alkohol koncentrációja és a deflegmátor beállításai között, amelyet a belőle kilépő hűtővíz hőmérséklete és térfogatára határoz meg. A deflegmátor hőcseréjének megfelelő beállításával (hűtővíz hőmérséklete és mennyisége) optimalizálható a párlat térfogatára (amely paraméter továbbá a desztilláció hosszára van hatással) és alkoholtartalma (a párlat minősége). Az általam optimálisnak tartott beállítás egy, a 28. ábrán bemutatott deflegmátor beállításhoz hasonló, emelkedő, majd csökkenő hőmérséklet-profil. Ennek hatására az előpárlati komponensek, kis alkohol veszteség mellett ugyan, de gyorsabban és pontosabban elválaszthatóak (a desztilláció

kezdetekor a leghidegebb a rendszer, így itt minimalizálható a veszteség), így a középpárlati szakasz ideje meghosszabítható.

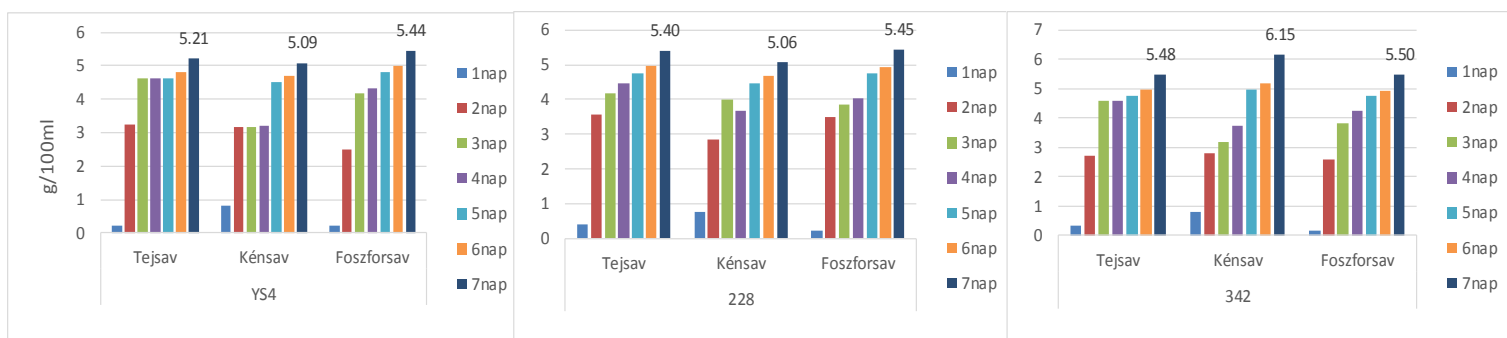
A deflegmátor minimális tehetetlenségéből adódó ingadozásokat a tányérszinteken felgyűlő folyadék réteg vastagságával lehet enyhíteni. Az illékony komponensek idő előtti távozását azzal korlátoztam, hogy az alsó és középső tányérokra vastagabb folyadék réteget állítottam be, így a molekuláknak először be kellett oldódni a folyadékba és onnan újra kioldódni, így a deflegmátornak maradt ideje lekövetni a számítógép által vezérelt változást.

### 5.3.9 Párlatok jellemzése

#### 5.3.9.1 Klasszikus analitika

##### 5.3.9.1.1 Alkoholtartalom

Ipari szempontból kiemelkedő fontosságú a pálinkák alkoholhiozatala. A technológiában alkalmazott különböző savak hatással vannak a fermentáció során képződő alkohol mennyiségére is. A kísérleti fermentációkban nyomon követtem az alkohol képződését. A 29. ábra oszlopdiagrammja jól megfigyelhető, ahogyan az alkoholtermelés a fermentáció második napján az első nap többszörösére fokozódik.



29. ábra: Alkohol koncentráció alakulása a körtecefrében hét napos fermentáció során

A sütőipari élesztő (*S. cerevisiae* YS4 törzs) a vizsgált savak közül a foszforsavval kezelt közegben termelte a legtöbb alkoholt. Hasonló teljesítményt nyújtott a borászati élesztő is, bár ez utóbbi esetében a foszforsavval szabályozott közeg alkoholtartalma közel azonos a tejsavval kezelt cefre alkoholtartalmával. A 29. ábrából az is kiolvasható, hogy a kénsavas közegben fermentáló borászati élesztő az első napon több alkoholt termelt, mint a másik két savval kezelt cefrében. A második naptól kezdve a fermentáció lelassult és egy hét alatt a végső alkoholtartalom így kisebb lett, mint a tejsavas és foszforsavas cefrék alkoholtartalma. Az igazi meglepetést a szeszipari élesztő okozta, ugyanis a kénsavval kezelt cefrékben ez az élesztő termelte a legtöbb alkoholt a vizsgált törzsek közül. A 29. ábrán bemutatott eredményeim alapján megállapítottam, hogy a



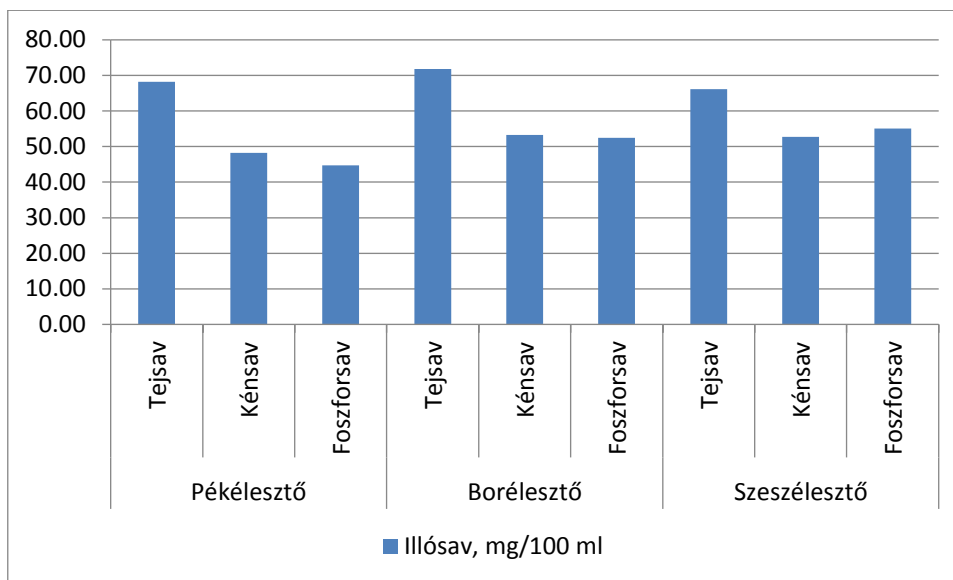
szeszipari élesztő által fermentált cefrékben több alkohol dúsult fel, mint a másik két törzs azonos savakkal kezelt cefréiben.

Az alkohol szintézisben mérhető eltéréseket egyes *S. cerevisiae* törzsek között többen vizsgálták. Comelli és munkatársai (2016) több *S. cerevisiae* törzset vizsgált etanol szintézis és szénhidrát hasznosítás szempontjából. Kutatásukat állandó pH-n végezték és megállapították, hogy a kereskedelemben kapható szeszipari élesztőkkel végzett fermentációkból nagyobb alkoholhozam érhető el, mint a hasonló körülményeken borászati élesztőkkel végzett fermentációkból. Hasonló eredményeket értem el azzal a különbséggel, hogy ezek savfüggők. A 29. ábra jól szemlélteti a borászati és szeszipari élesztők közötti hasonlóságot, csupán a kénsavval végzett kísérletekben tapasztalható számottevő eltérés. A foszforsavas és tejsavas fermentációkat összehasonlítva láthatjuk, hogy a két eltérő italtípusra szelektált élesztőtörzsek közel azonos mennyiségű alkoholt termeltek.

#### **5.3.9.1.2 Illósav tartalom**

A párlatok illósav tartalmát túlnyomó részben az ecetsav adja, de egyéb illósavak (pl. propionsav, vajsav stb.) is jelentős mértékben dúsulhatnak fel a fermentációval előállított italokban. Az illósavtartalom mérésének azért van jelentősége, mert indikátora lehet a hibás fermentációnak, továbbá a magasabb illósavtartalom gátolja a szénhidrát (glükóz) felvételt (Xiao *et al.*, 2016).

A kísérleteimben a pH beállításra használt savak egyike sem illósav, így ezek közvetlenül nem befolyásolják a kész párlatok illósavtartalmát. Közvetett módon azonban jól mérhető hatást fejtenek ki a párlatok illósavtartalmára. A 30. ábrából kiolvasható, hogy a tejsavval kezelt cefrék párlatai (pékélesztő-68,2 mg/100ml, borélesztő-71,8 mg/100ml, szeszélesztő-66,1 mg/100ml) magasabb illósavtartalommal rendelkeztek. A kénsavval (pékélesztő-48,2 mg/100ml, borélesztő-53,3 mg/100ml, szeszélesztő-52,7 mg/100ml) és foszforsavval (pékélesztő-44,7 mg/100ml, borélesztő-52,5 mg/100ml, szeszélesztő-53,1 mg/100ml) kezelt körtecefrék párlatai között nem volt lényeges különbség az illósavtartalommal illetően.



**30. ábra: Tejsavval, kénsavval és foszforsavval kezelt, különböző élesztőtörzsekkel fermentált körtepárlatok illósavtartalma**

Ha élesztőtörzsenként összeadjuk a három sav hatására termelt összes illósav mennyiséget, akkor kirajzolódik a kép, hogy mely élesztőtörzs hajlamos több illósavat termelni. A pékélesztő összesen 161,1 mg/100ml, a borélesztő 177,5 mg/100ml, míg a szeszélesztő 173,9 mg/100ml illósavat szintetizált, az értékek alapján megállapítom, hogy a kísérletben használt borélesztő általánosan több illósavat szintetizál, mint a pék- vagy szeszipari társa.

A tejsav kismennyiségű jelenléte a fermentáció során akár előnyös is lehet, bár ez élesztőfüggő. Erre példa a keményítőben gazdag cefrék fermentációjánál gyakran alkalmazott eljárás, a koinokuláció, a tejsavbaktériumok és élesztők egyidejű alkalmazása. A kevert kultúras fermentáció előnye, hogy az ily módon készített élelmiszerek a romlást okozó mikroorganizmusokkal szemben ellenállóbbak lesznek, valamint aromaviláguk gazdagabbá, teljesebbé válik. Ilyen fermentációs esetekben fontos az optimális egyensúly megtalálása és megtartása, ugyanis akár az élesztő, akár a baktérium szaporodik túl, az a másik mikroorganizmus gátlását, kipusztulását jelentheti. A tejsavbaktériumok működése elsavasítja a közeg pH-ját, aminek következtében az élesztő szaporulat leáll, sőt hanyatlásba fordul át. Az élesztő szintetizálta növekedési faktorok hiánya a tejsavbaktériumokra is negatív hatást fejt ki, így azok tejsavszeptetizáló kapacitása csökken. Ez az életben maradt (növekedett toleranciát mutató) élesztők számára egy kedvezőbb környezetet teremt, így azok újra szaporodni kezdenek. A kis mennyiségű tejsav pozitív hatással van az élesztőkre, ugyanis távol tartja a kompetitív mikroorganizmusok jelentős részét. A tejsavbaktériumok túlszaporodása negatív hatással lehet a fermentált termékek aromavilágára (Querol *et al.*, 2006). Tejsav cefréhez történő adagolásával a

tejsavbaktériumok által szintetizált nem kívánatos aromák mennyisége csökkenthető, elkerülhető, de a tejsav előnye hasznosítható.

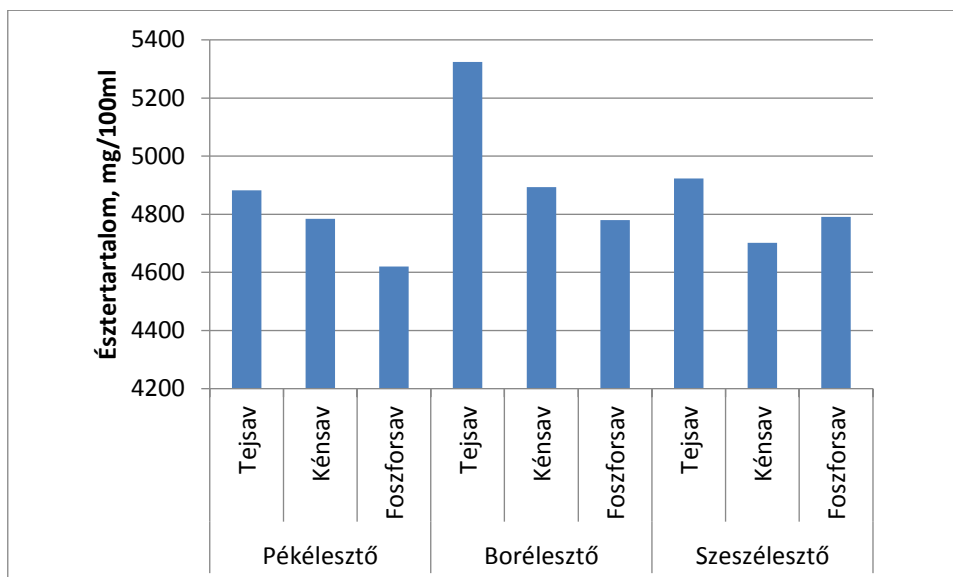
Kénsavas közegben végzett fermentációt régóta használnak a cukorgyártásból visszamaradó bagasz fermentálásához. Számos rum készül így módon, de a Brazil bio-etanol gyártása során is kénsavval szabályozott pH-n fermentálnak (és enzimatikusan bontják a lignint) (da Silva *et al.*, 2014).

A foszforsav adagolása a cefréhez pálinkás körökben ma már jól ismert eljárás. A biokémiai háttere e sav használatának abban rejlik, hogy a foszforsav molekulák az élet működéséhez elengedhetetlen ATP molekula funkcionális ligandumai. A foszforsavval szabályozott pH megfigyeléseim alapján jelentősen hatékonyabbnak bizonyult, mint a tejsav. A tejsav használatának előnye a foszforsavval szemben, hogy a tejsav kellemes aromájú észtereket képez alkoholokkal reagálva, direkt aroma-képzés szempontjából a foszforsav jelentéktelennek bizonyult. Pálinkagyártásban elterjedt módszer, hogy (a két sav pozitívumait ötvözendő) keverik a két savat és azt adják a cefréhez (5% tejsav 20% -os foszforsavban).

### 5.3.9.1.3 Észtertartalom

A párlatok összes észtertartalmát gravimetriás módszerrel határoztam meg. A fermentációval előállított gyümölcs alapú szeszesitalok összes észtertartalmának legjelentősebb forrásai a gyümölcs és a fermentáció. A fermentáció során leginkább etilacetát, i-amil-acetát, i-butil acetát, 2-fenil-etil-acetát és etil-hexamát képződik (Peddie, 1990).

A 31. ábrán jól látható, hogy a borélesztővel (*S. cerevisiae*, 228) fermentált körtecefrékben átlagosan magasabb össz-észtertartalmat mértem, mint a másik két élesztő esetében. Az eredményekből az is jól kivehető, hogy a tejsavval kezelt tételekben magasabb volt az észterkoncentráció: ezzel szemben a kénsavval és foszforsavval kezelt cefrékben viszonylag alacsony maradt az észterkoncentráció.



31. ábra: Bosc Kobak körte pálinkák észtertartalma

A pékélesztő (*S. cerevisiae*, YS4) és a foszforsav kombinációja adta a legalacsonyabb észtertartalmat. Ha figyelembe vesszük azt a tényt, hogy a körtéből származó észterek a cefrében a kezdetektől adottak voltak, akkor megállapíthatjuk, hogy a pékélesztő foszforsavval kombinálva kevesebb észtert eredményez a Bosc Kobak körte fermentációja során, mint a másik két vizsgált élesztő bármelyik vizsgált savval kombinálva.

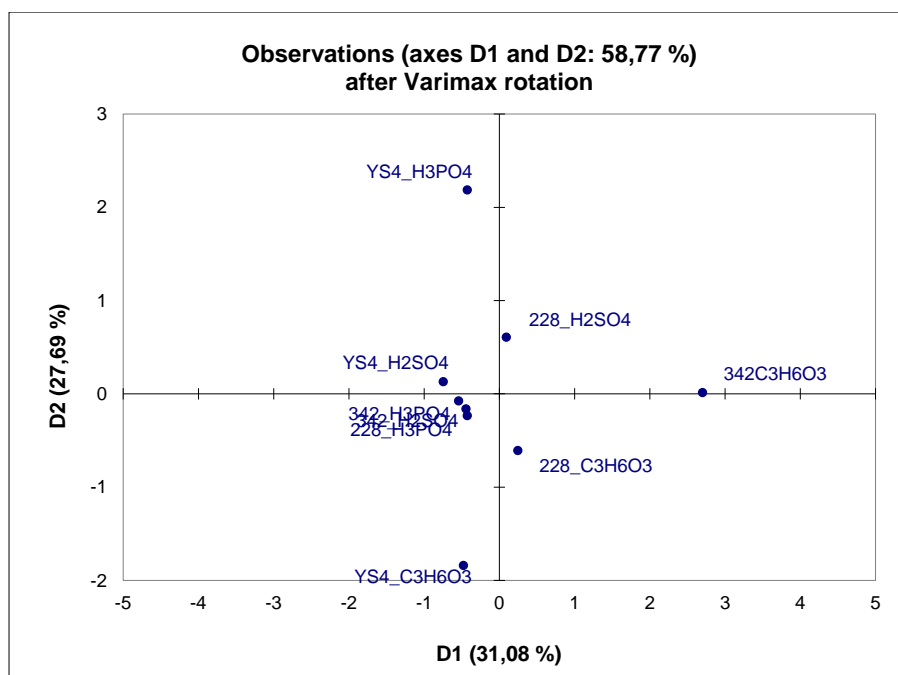
Italgyártás szempontjából az az előnyösebb, ha a párlatok észterekben gazdagok. Az észterek koncentrációján túl az is fontos tényező, hogy az adott koncentráció százalékos összetételét milyen észterek alkotják. Általában a tejsav-észterek kellemes aromájúak, így azok a pálinkák, amelyek inkább ezekben az észterekben gazdagok, kellemesebb aromaprofillal rendelkeznek, míg az ecetsav csak az öt szénatomos alkoholokkal képzett észterei (pl. i-amil acetát) járulnak pozitívan hozzá egy párlat illat kialakulásához (Peddie, 1990). A vizsgált mintáim esetében általánosan megállapítható, hogy tejsavas körtecefrékben magas észterkoncentráció volt mérhető. Bár a tejsavas közeg hátrányosan hat az alkoholkihozatalra és a fermentáció dinamikára, mégis, úgy gondolom, hogy a pálinkák gyártásánál jelentős előnnyel járhat a kis arányú alkalmazása (pl. kevert sav: tejsav + szervesetlen sav).

### 5.3.9.2 Bosc Kobak körte párlatok jellemzése

Az élesztők metabolizmusa rendkívül összetett, számos tényező befolyásolhatja a keletkező metabolitok mennyiségét és egymáshoz viszonyított arányát. Az élesztők párlatra gyakorolt hatását gázkromatográfiás vizsgálattal vizsgáltam. Főkomponens elemzés (PCA) módszerét alkalmaztam a különböző élesztőkkel és savakkal végzett kísérleti tételekből származó párlatok közti különbségek feltérképezésére és azok mértékének kimutatására. Ennek alapján a

párlatok rangsorolhatók. A 32. ábrán jól kivehetőek a savak, valamint élesztők közti különbségek. A GC-FID eredményeken végzett PCA analízis alapján a párlatok közti különbségekért a következő komponensek a felelősek (fontossági sorrend szerint): 1,1-dietoxi-etán, 2-butanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2 butanol, 2-pentanol, 2-feniletanol, 3-hidroxi-2-butanon (acetoin), 4-dekanol, benzil alkohol, dietil szukcinát, etanol, etil dekanóat, etil formiát, etil hexamát, hexil acetát, i-butyl-D-laktát, i-amil-acetát, metil-karbamát, n-butyl-alkohol, n-propil alkohol, n-heptanol, fenetil alkohol, trans-3-hexen-1-ol, uretán.

A sejtszintű metabolizmus mechanizmusai erősen összefonódtak, így bármilyen beavatkozás a metabolikus rendszerben változások láncolatát eredményezheti (pl. szénhidrát metabolizmusra hatással van a légzési lánc). Bár a kísérleteimben használt élesztőtörzsek közeli rokonságban állnak, mégis a kis genetikai különbségekből adódóan jelentős anyagcsere különbségeket figyelhetünk meg az olyan környezeti körülmények változásaira, mint a pH.



32. ábra: Bosc Kobak párlatok PCA analízise

A cefrézéshez használt szerves savak közvetlenül is hozzájárulhatnak a párlat aromáinak kialakulásához. A tejsav metanollal, etanollal, propanollal, vagy butanollal képzett észtere kis mennyiségben „gyümölcsös” aromákkal gazdagítja a párlatot, míg a szerves savak, bár közvetlen módon nem, de közvetett módon (pl. cukor-foszfitokat képezve javíthatják az élesztő tápanyag ellátását), ami így zavartalan működést eredményezhet. Kis mennyiségű tejsav a fermentáció során mindenképpen képződik piruváttól, akár csak 2-3-bután-diol, furfursav, acetyl-CoA, vajsav, ecetsav, acetoin, propionsav, almasav stb. Ezek a savak mind reakcióba lépnek az

alkohollokkal és észterek képződhetnek. Az aromaanyagok másik jelentős csoportja a zsírsavak és aminosavak metabolizmusából származik.

A különböző élesztőkkel és savakkal készített párlatok jól elkülöníthetők D1 valamint D2 diszkriminancia függvények által. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy a párlatok bizonyos szintű különbségeket mutatnak egymáshoz viszonyítva. Vagyis a cefrézésnél bevitt savak és élesztők olyan eltérő tulajdonságú párlatokat eredményeztek, amelyek különbözőségének mértéke nem függ se az alapanyagtól se a cefrézés módszerétől, ezek ugyanis teljesen azonosak voltak. Az élesztő törzsek, fajták, valamint az erjedő cefre pH értékének az aromákra gyakorolt hatásáról szóló megfigyeléseket korábban is publikáltak (Cabrera, 1988; Ramsay *et al.*, 1984a; 1984b). Megállapították, hogy azonos fajtahoz tartozó törzsek fermentumai között kisebb variancia lelhető fel, mint az eltérő törzsekkel fermentált termékek között. A 32. ábrán bemutatott eredmények megerősítették, hogy az azonos élesztőfajtaival, de eltérő törzsekkel fermentált körtecefrék párlataiban jelentős különbségek mutatkoznak meg.

## 5.4 Körtepárlatok csoportosítása

A desztillálással nyert alkoholos italok fajtájának, eredetének és évjáratának megállapítása igen összetett feladat. A kutatómunkámban körtepárlatok csoportosítását tűztem ki célul fajtájuk és eredetük, valamint évjáratuk szerint. A párlatok alapanyaga, az alapanyagok eredete, a fermentáció technikája és technológiája, valamint a desztilláló berendezés és a desztillálás paraméterei minden párlat esetében állandóak voltak minden évjáratban (2010-ben, 2011-ben és 2012-ben).

### 5.4.1 Körtefajta szerinti csoportosítás

A körtepárlat aromaprofilja nemcsak az alkalmazott élesztőtől, de nagymértékben az alapanyagként felhasznált körtefajtától is függ. A munkámban négyféle körte fajtából (Bosc Kobak, Fétel, Triumph és Vilmos) származó párlatok összetételét vizsgáltam GC-MS technikával. A lineáris diszkriminancia analízisből (LDA) kapott eredmények alapján 29 illékony komponensből 8-ra volt szükség a sikeres fajta szerinti csoportosításhoz. Ezek relevanciáját a 6. táblázat mutatja.

## 6. táblázat: A fajta szerinti csoportosításban használt standardizált kanonikus diszkriminancia függvény koefficienseinek táblázata

jelentős

kevésbé jelentős

<b>Koefficiensek</b>	<b>F1 Koeff. (súlyozott)</b>	<b>F1</b>	<b>F2 Koeff. (súlyozott)</b>	<b>F2</b>	<b>F3 Koeff. (súlyozott)</b>	<b>F3</b>
acetaldehid	6.07	0.17	0.59	-0.05	1.48	0.14
acetál	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2-butano	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1-propanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
izobutanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1-butanol	5.77	0.16	2.19	-0.17	2.71	-0.25
2-metil-1-butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3-metil-1-butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
me-butanolok_70+55+56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-propionát	2.83	0.08	0.76	-0.06	0.30	-0.03
propil-acetát	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-butanoát	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2-metil-butil-acetát	6.70	-0.19	0.12	0.01	1.65	0.15
3-metil-butil-acetát	2.71	0.08	3.59	-0.28	2.65	-0.24
metil-butil-acetátok_70+43+55+73	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
limonén	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-hexanoát	4.94	-0.14	2.72	0.21	0.24	0.02
hexil-acetát	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-laktát	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-oktanoát	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
benzaldehyd	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
linalool	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-dekanoát	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-benzoát	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-dodekanoát	2.77	0.08	1.49	0.12	1.14	0.10
2,3-butadion	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2,3-pentadion	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
allil-alkohol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2-feniletanol	3.57	0.10	1.34	-0.10	0.69	0.06
<b>Össz</b>		<b>0.34</b>		<b>-0.32</b>		<b>-0.04</b>

Megjegyzés: A táblázat az összes lehetséges változót tartalmazza, a színekkel megkülönböztetett mezők a DA faktorok, vagyis azok a változók, amelyek valóban hozzájárulnak a sikeres csoportosításhoz

Annak érdekében, hogy szemléletesebben bemutathassam az eredeti változók súlyát a DA faktorokhoz képest (színes mezők), a súlyozott koefficienseket kiegészítettem egy százalékszámítással. Az egyes változók hatását vizsgálva megállapítottam, hogy nyolc változó (acetaldehyd, 1-butanol, etil-propionát, 2-metil-butil-acetát, 3-metil-butil-acetát, etil-hexanoát, etil-dodekanoát és 2-feniletanol) a relevanciai értékük alapján (7. táblázat) kimutatható és meghatározó szerepet játszik a párlatok fajtára jellemző aromaprofiljának kialakításában.

**7. táblázat: Különböző körtepárlatok diszkriminációs faktorai**

Csoport \ változó	acetaldehid	1-butanol	etil-propionát	2-metil-butyl-acetát	3-metil-butyl-acetát	etil-hexanoát	etil-dodekanoát
Bosc Kobak	0.633	1.014	130.658	-81.198	1.252	-46.339	24.790
Fétel	0.567	0.719	113.652	-53.335	2.450	-49.646	18.063
Triumph	0.825	1.826	189.179	-102.417	12.372	-95.107	20.823
Vilmos	2.428	5.152	495.577	-312.160	27.425	-257.548	67.242

A diszkriminancia faktorok nagysága mutatja, hogy a vizsgált vegyületnek mekkora hatása van a megkülönböztetési irányra. Az érték növekedésével a hatás nagysága is növekedik (F1-re vagy F2-re, pozitív = azonos irányú). Ez alapján megállapítható, hogy fajták közti különbségekért legnagyobb mértékben az etil-propionát, 2-metil-butyl-acetát, és az etil-hexanoát felelősek. Az LDA módszer használatával kapott modell működését keresztvalidációs módszerrel ellenőriztem (8. táblázat). A validáció eredményeit a 8. táblázat szemlélteti.

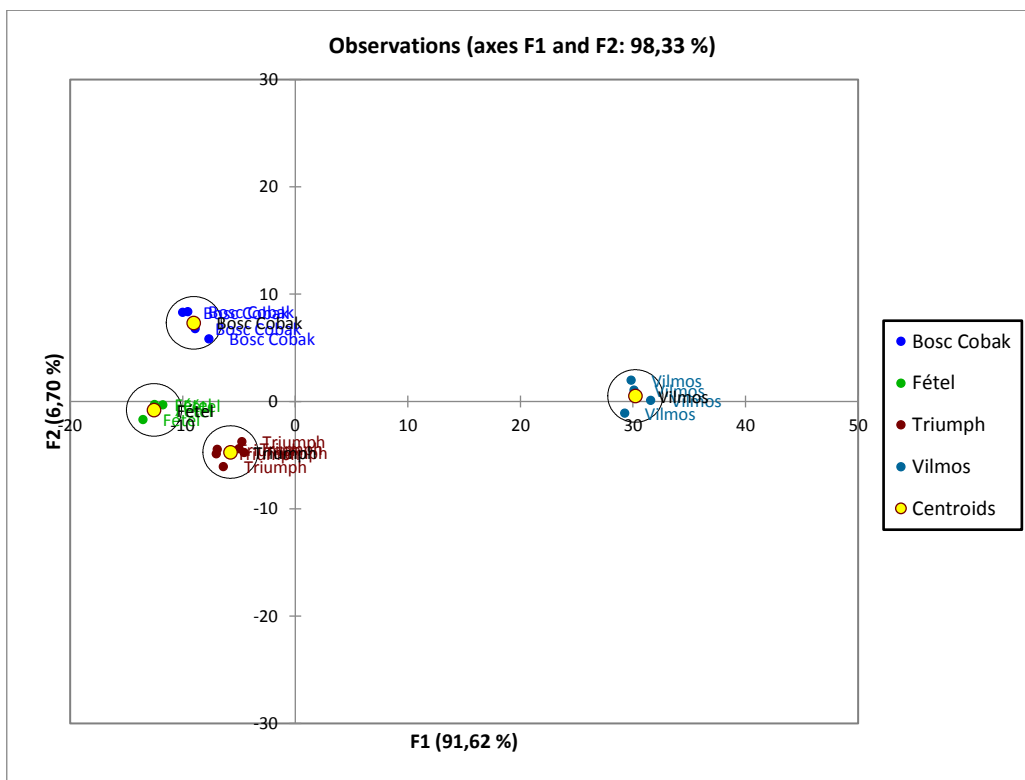
**8. táblázat: Körtepárlatok gyümölcsfajtájának keresztvalidációs igazságmátrixa**

	Bosc Kobak	Fétel	Triumph	Vilmos	Összes	% megfelelő
Bosc Kobak	4	0	0	0	4	100.00%
Fétel	0	4	0	0	4	100.00%
Triumph	0	0	6	0	6	100.00%
Vilmos	0	0	0	4	4	100.00%
Összes	4	4	6	4	18	100.00%

A GC-MS eredetű adathalmazok kemometriai módszerekkel történő elemzésével elfogadható bizonyossággal megállapíthatjuk az adott pálinka alapanyagát, fajtáját, a gyümölcs termőhelyét, valamint a termés évét.

A 33. ábra szemlélteti a különböző körtepárlatok lineáris diszkriminancia analízissel kapott eredményeket. Megállapítható, hogy a körte fajtái a párlatok két diszkriminancia-függvény, F1 (94,18%) és F2 (18,56%) szerint elválaszthatóak.





33. ábra Különböző körtepárlatok csoportosítása LDA módszerrel

A Bosc Kobak, Fétel, Packham's Triumph és a Vilmoskörte konfidencia ellipszisei jól elkülönültek (33. ábra). A két diszkriminancia függvény (két dimenzió) elégségesnek bizonyult a különböző körtepárlatok fajta szerinti csoportosításához. Az ábrából továbbá megállapítható, hogy a Triumph, Fétel és Bosc Kobak körték fajta jegyekben jobban hasonlítanak egymáshoz, mint a Vilmoskörtehez, vagyis a Vilmos karakterében teljesen elkülönül. Ezt a megállapítást a párlatok, vagy akár maguk a körték összehasonlításával is könnyedén igazolhatjuk. A Vilmoskörte nagyobb népszerűségnek is örvend, mint kevésbé karakteres társai, pálinkáját is magasabb áron értékesítik.

#### 5.4.2 Évjárat szerinti csoportosítás

A hőmérséklet és a csapadék a két legfontosabb eleme egy adott terület időjárásának, azonban a termés minőségét még számos egyéb tényező is befolyásolja, így a napsugárzás, a levegő összetétele stb. A 2010-es, 2011-es és 2012-es évjáratok klimatikus adatait a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat: A 2010-es, 2011-es és 2012-es évek jellemzői klimatikus adatai

Évjárat	2010	2011	2012
Átlagos hőmérséklet °C	9,8	10,4	11,1

Napsütéses órák száma, h	2,026	2,429	2,479
Esős napok száma	144	107	129
Csapadék mennyiség, mm	738	525	532
Hőösszeg a vegetációs időszakban, °C	1488	1689	1791
Vegetációs időszak átlag hőmérséklete, °C	18,3	19,4	20,0
Hőséggel sújtott napok száma	23	23	27
Vegetációs időszak csapadéka, mm	612	203	201

*Forrás: www.met.hu*

Az LDA (stepwise forward) módszerhez felhasznált illókomponensek és azok relevanciáját a 10. táblázat szemlélteti. A módszer a fajta szerinti csoportosítás elvégzéséhez 5 illó komponenst vett figyelembe, fontossági sorrendben ezek a következők: acetaldehid, 3-metil-1-butanol, 2-metil-butil-acetát, allil-alkohol, 2-feniletanol.

A fenti táblázatban nulla értékkel szereplő koefficienseknek nincs elválasztó hatása az évjárat szerinti csoportosításban. Az egyes változók hatását vizsgálva megállapítottam, hogy a 11. táblázatban kiemelt öt változó a relevanciái értékük alapján meghatározó és kimutatható szerepet játszik a párlatok évjáratára jellemző aromaprofiljának kialakításában. A kiemelt 5 paraméter hatását a 11. táblázat szemlélteti.

Az acetálok átlag-koncentrációja 2012-ben magasabbnak bizonyult, mint az előző években. Ezekért a különbségeikért feltehetően az adott év magas hőösszege a felelős, azonban erre csak közvetett bizonyítékok utalnak. A 2012-es év leginkább a magas hőösszegével tűnik ki az előző két évvel összehasonlítva. Az ilyen száraz körülmények között termelt gyümölcs kevés vizet tartalmaz, így a már benne lévő oldott komponensek koncentráltabban vannak jelen, tömegarányosan jelentősebben képviseltetik magukat, valamint befolyásolhatják a gyümölcs sejtjeinek az anyagcseréjét. A különbség a 2010-es és 2012-es minták között észlelhető a leginkább. Az LDA módszer során kapott modell helyességét keresztvalidációs módszerrel ellenőriztem (12. táblázat).

**10. táblázat: A fajta szerinti csoportosításban használt standardizált kanonikus diszkriminancia függvény koefficienseinek táblázata**

jelentős				
kevésbé jelentős				
<b>Koefficiensek</b>	<b>F1 Koeff.</b> (súlyozott)	<b>F1</b>	<b>F1 Koeff.</b> (súlyozott)	<b>F2</b>

acetaldehid	1.37	-0.21	0.30	0.04
acetál	0.00	0.00	0.00	0.00
2-butanol	0.00	0.00	0.00	0.00
1-propanol	0.00	0.00	0.00	0.00
izobutanol	0.00	0.00	0.00	0.00
1-butanol	0.00	0.00	0.00	0.00
2-metil-1-butanol	0.00	0.00	0.00	0.00
3-metil-1-butanol	1.15	-0.18	1.45	0.21
Me-butanolok_70+55+56	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-propionát	0.00	0.00	0.00	0.00
propil-acetát	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-butanoát	0.00	0.00	0.00	0.00
2-metil-butil-acetát	1.71	0.26	2.72	-0.40
3-metil-butil-acetát	0.00	0.00	0.00	0.00
Me-Bu-acetatok	0.00	0.00	0.00	0.00
limonén	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-hexanoát	0.00	0.00	0.00	0.00
hexil-acetát	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-laktát	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-oktanoát	0.00	0.00	0.00	0.00
benzaldehyd	0.00	0.00	0.00	0.00
linalool	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-dekanoát	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-benzoát	0.00	0.00	0.00	0.00
etil-dodekanoát	0.00	0.00	0.00	0.00
2,3-buta0ion	0.00	0.00	0.00	0.00
2,3-penta0ion	0.00	0.00	0.00	0.00
allil-alkohol	1.39	0.21	0.36	0.05
2-feniletanol	0.86	-0.13	1.94	0.29

Megjegyzés: A táblázat az összes lehetséges változót tartalmazza, a színnel megkülönböztetett mezők a DA faktorok, vagyis azok a változók, amelyek valóban hozzájárulnak a sikeres csoportosításhoz

### 11. táblázat: Körteparlatok évjárat szerinti diszkriminációs faktora

Csoport \ Változó	acetaldehyd	3-metil- 1-butanol	2-metil- butil-acetát	allil- alkohol	2-feniletanol
2010	-1.388	-0.317	448.710	3863.122	-247.647
2011	-0.476	-0.034	41.550	1729.810	24.946
2012	-0.193	-0.005	23.746	816.789	9.039

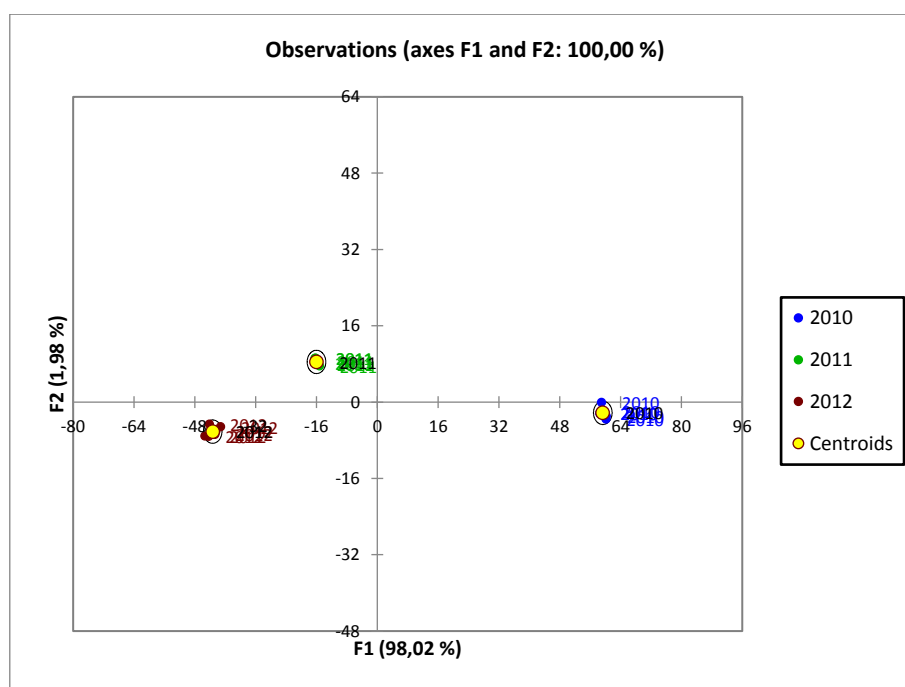
### 12. táblázat: Körteparlatok évjáratának keresztvalidációs igazságmátrixa

	2010	2011	2012	Össz	% megfelelő
2010	6	0	0	6	100.00%
2011	0	6	0	6	100.00%
2012	0	0	6	6	100.00%

Összes 6 6 6 18 100.00%

A különböző évjáratok hatékony csoportosítása leginkább az acetáloknak köszönhető, a 2012-es évjáratú mintáknál a mért acetálok össz-koncentrációja egy nagyságrenddel nagyobb, mint a 2010-es minták esetében.

A körteparlatok alapanyagának évjáratok LDA módszert alkalmazva az F1 és F2 diszkriminációs függvényekkel jól csoportosíthatóak (F1 – 98.02% és F2 – 1.98%). Az egyes évjáratok konfidencia ellipszisei átfedés nélkül csoportosulnak az F1 és F2 függvények által (34. ábra).



**34. ábra: Körteparlatok évjáratainak csoportosítása LDA (stepwise forward) módszerrel**

A 34. ábrából kitűnik, hogy a 2010-es év erősen különbözött a 2011 és 2012-es évektől, míg a 2011-es és 2012-es évjáratok pálinkái nagyobb hasonlóságot mutattak az évjárat tekintetében. Ha a 34. ábrát a 10. táblázatban bemutatott információk ismeretében értékeljük, akkor szembetűnik, hogy a 2010-es év vegetációs időszakában megközelítőleg háromszor több csapadék hullott, mint az azt követő két évben. A három év közül a 2010-es év volt a leghidegebb és a növényzet ebben az évben kapta a legkevesebb közvetlen napfényt. A 9. táblázatban ismertetett meteorológiai adatok tükrözik a 34. ábrán bemutatott LDA során kapott eredményeket.

### 5.4.3 Körteparlatok termőhely szerinti csoportosítása

A körteparlatok termőhely szerinti csoportosítása az eredetvédett termékek hamisításának kimutatása miatt jelentős. A termőhely, vagyis az eredet szerinti csoportosításhoz LDA módszert használtam. A céloom két csoport megkülönböztetése, ezért egy diszkriminációs függvény is elegendő a csoportok megkülönböztetéséhez (F1 – 100% és F2 – 0,00%, azaz F2-re nincs is szükség). Az eredet szerint elkülönült csoportok konfidenciaellipszisei F1 függvény szerint átfedés nélküliek. Az LDA (stepwise forward) módszer egy vegyületcsoportot vett figyelembe, hogy a nagykanizsai körtéből készült párlatot a göcseji párlattól megkülönböztesse, ezek az illékony összetevők a metil-butil acetátok (2-metil-butil acetát, 3-metil-butil acetát és a metil-butil acetátok (13. táblázat).

A 13. táblázatban a súlyozott koefficienseket százalékban fejeztem ki és „Fontosságként” jelöltem, ami mutatja az eredeti változók súlyát a DA faktorokhoz képest. Minél nagyobb a **Fontosság oszlop** értéke, annál erősebb a hatása az adott vegyületnek az adott DA faktorra, így a megkülönböztetési irányra (pozitív = azonos irányú). Ahol 0-val, annak a vegyületnek nincs elválasztó hatása.

A körteparlinkák gyümölcsének eredet szerinti csoportosításához használt LDA módszer helyességét keresztvalidációs módszerrel ellenőriztem (14. táblázat).

A göcseji területről származó körteparlatokban a metil-butil-acetát koncentráció jelentősen magasabb volt, mint a nagykanizsai társaikban (a göcseji párlatok 2-metil-butil acetát diszkriminációs faktora: 207.014, míg a nagykanizsai párlatoké 28.333). Ezért elmondható, hogy a göcseji körték túlérett gyümölcsös, banánszerű jellege erősebb, mint a nagykanizsai körtéké. Véleményem szerint a metil-butil acetátok csak akkor elegendők a termőhely szerinti csoportosításhoz, ha nem több mint két csoportot akarunk megkülönböztetni és mindkét csoportból több minta több évjárata áll a rendelkezésünkre, akárcsak ez az itt bemutatott módszer során is történt.

### 13. táblázat: Standardizált kanonikus diszkriminancia függvény koefficienseinek táblázata

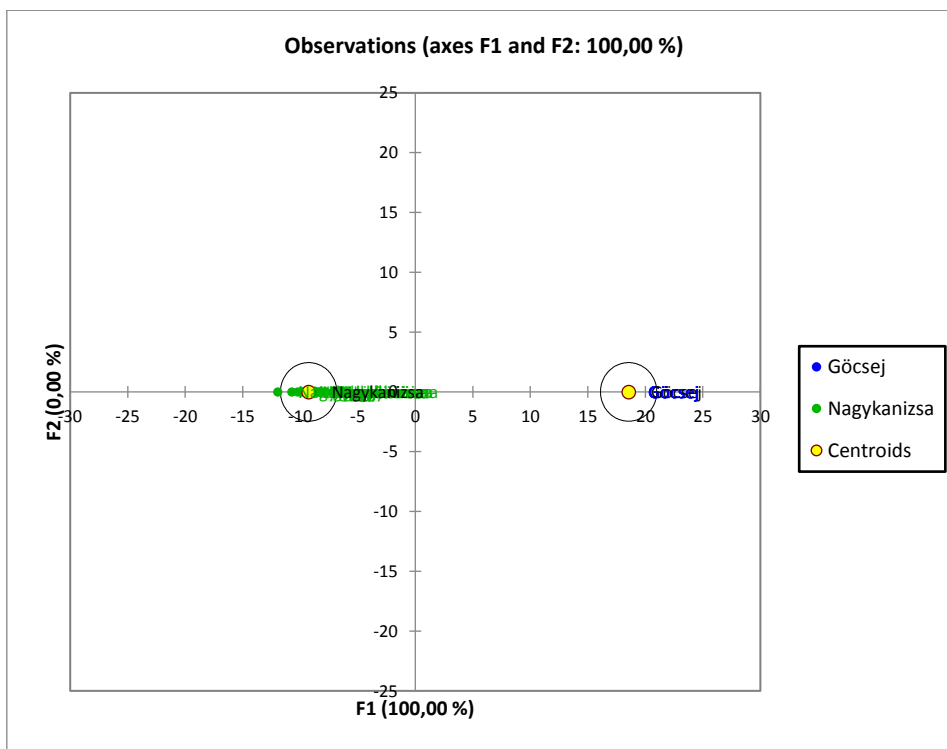
Koefficiensek	F1	Fontosság (súlyozott)	Fontosság %
acetaldehid	0.000	0.00	0.00
acetáll	0.000	0.00	0.00
2-butanoll	0.000	0.00	0.00
1-propanol	0.000	0.00	0.00
izobutanol	0.000	0.00	0.00

1-butanol	0.000	0.00	0.00
2-metil-1-butanol	0.000	0.00	0.00
3-metil-1-butanol	0.000	0.00	0.00
metil-butanolok_70+55+56	0.000	0.00	0.00
etil-propionát	0.000	0.00	0.00
propil-acetát	0.000	0.00	0.00
etil-butanoát	0.000	0.00	0.00
<u>2-metil-butil-acetát</u>	<u>3.247</u>	<u>3.25</u>	<u>0.07</u>
<u>3-metil-butil-acetát</u>	<u>19.144</u>	<u>19.14</u>	<u>0.43</u>
<u>metil-butil-acetatok_70+43+55+73</u>	<u>-22.209</u>	<u>22.21</u>	<u>-0.50</u>
limonén	0.000	0.00	0.00
etil-hexanoát	0.000	0.00	0.00
hexil-acetát	0.000	0.00	0.00
etil-laktát	0.000	0.00	0.00
etil-oktanoát	0.000	0.00	0.00
benzaldehyd	0.000	0.00	0.00
linalool	0.000	0.00	0.00
etil-dekanoát	0.000	0.00	0.00
etil-benzoát	0.000	0.00	0.00
etil-dodekanoát	0.000	0.00	0.00
2,3-buta0ion	0.000	0.00	0.00
2,3-penta0ion	0.000	0.00	0.00
allyl-alkohol	0.000	0.00	0.00
2-feniletanol	0.000	0.00	0.00

**14. táblázat: Körtepárlatok eredetének keresztvalidációs igazságmátrixa**

	<b>Göcsej</b>	<b>Nagykanizsa</b>	<b>Összes</b>	<b>Megfelelő, %</b>
Göcsej	6	0	6	100.00%
Nagykanizsa	0	12	12	100.00%
Összes	6	12	18	100.00%

A különböző területeken termelt körték párlatainak termőterület szerinti sikeres csoportosítását a 35. ábra szemlélteti. A konfidencia ellipszisek jó elkülönülést mutatnak, a csoportok egyértelműen elválnak.



**35. ábra: Körteparlatok termőhelyének csoportosítása LDA (stepwise forward) módszerrel**

A göcseji és nagykanizsai Triumph körteparlatok GC-MS adatainak elemzése alapján megállapítható, hogy a két területen termelt körtéből készült pálinkák közti különbség leginkább az eltérő metil-butil acetát koncentrációban mérhető. Így elegendő csak a marker-vegyületek koncentrációját vizsgálni az azonos technológiával készült körteparlatoknál, hogy megállapítsuk, hogy nagykanizsai vagy göcseji körteparlat az ismeretlen minta.

## 6 ÖSSZEFOGLALÁS

Az utóbbi évtizedben rohamléptekkel fejlődött a pálinkagyártásban alkalmazott technológia. Szinte minden gyártó rendelkezik rektifikáló oszlopos berendezéssel, nyersanyag feldolgozó gépekkel, és hőmérséklet szabályozott erjesztő tartályokkal. Az, hogy a meglévő eszközöket hogyan használják, meghatározza a párlatok minőségét. Mi a minőségi pálinka? Ezt sokféleképpen meg lehet fogalmazni, annál is inkább, hogy ma a pálinkák minősége, a borokhoz hasonlóan évjáratonként változik. További jelentős változó a gyártás hektikus/bizonytalan módszertanából fakad. A cefrézés során használt élesztő és sav, a beállított pH, és egyéb környezeti tényezők mind hatással vannak a pálinkák ízére, illatára. A legelfogadottabb minőségjelzők, amelyeket a palackon is feltüntetnek, és hatóságilag is elfogadottak, a pálinka alapanyagául szolgáló gyümölcs fajtája, eredete (eredetvédett területmegjelölés esetén), és évjárata. Ezeknek a minőségi követelményeknek az ellenőrzését azonban számos, a gyártásból származó változó nehezíti.

Doktori munkám célja, hogy rávilágítsak arra, hogy a pálinkagyártásban használt savak pKa értékől függően, valamint az élesztők, szelektációs céltól függően jelentős mértékben meghatározzák a keletkező párlat összetételét, így ízét, és illatát. A kutatási tevékenységem során bizonyítom, hogy állandó cefrézési módszert, fermentációs körülményeket, valamint jól meghatározott és szabályozott lepárlást alkalmazva a minőségi változók csökkenthetőek, így analitikai módszert alkalmazva kemometria módszerek segítségével a párlatok csoportosíthatóak a palackon található minőségjelzők szerint, vagyis fajta, évjárat, és termőhely szerint.

Eredményeim bizonyították, hogy a cefrézés során beállított pH érték valóban hatással van a végtermék egyes illókomponenseinek koncentrációjára. A pH emelkedésével nő a magasabb rendű alkoholok koncentrációja a párlatban, míg a pH csökkenése az egyes komponensek mennyiségi csökkenését idézheti elő. A metil-butanolok, 1-propanol, i-butanol, 1-hexanol és fenilbutanol komponensek párlatban mért koncentrációja a pH 4-en fermentált cefrék esetében magasabb volt, mint a pH 3,0 vagy pH 2,5 értéken fermentált cefrék esetében mért koncentráció értékek.

Megállapítottam, hogy a különböző savas kezelések hatással voltak a redukáló cukor mennyiségi változására. Mindhárom élesztő esetében a foszforsavval kezelt cefrék erjedése volt a legjobb hatásfokú fermentáció, ami a cefrék maradék cukortartalmának csökkenésében és a keletkezett alkoholmennyiségében is megmutatkozott. A foszforsavas kezelés hatására az erjedés, ha kevésbé is, de elnyújtottabb dinamikát mutatott, mint a tejsavas és a kénsavas tételek esetében. A fermentáció a tejsavval kezelt cefrékben volt a legintenzívebb. A kísérletek során kapott eredmények, és az azokból gyűjtött információ igazolja azt a feltételezést miszerint a gyártási technológiában alkalmazott savak minősége, valamint az élesztőtörzsek specifikus tulajdonságai erősen befolyásolják a pálinkák összetételét.



A fermentációban alkalmazott élesztőtörzsek tudatos megválasztásával igényeink szerint befolyásolhatjuk a fermentációval előállított italaink aroma-összetételét (Moreno *et al.*, 2016). Kísérleti eredményeim igazolják, hogy azonos cefréből a három vizsgált élesztő hasonló hatásokkal alkalmazható. A *S. cerevisiae* élesztő 342-es kódjelű, szeszipar számára szelektált törzse az általam vizsgált erjedési körülmények között kismértékben több etanolt termelt, mint a *S. cerevisiae* 228 törzs. A legkevesebb etanolt az YS4 kódjelű pékélesztő adta. Technológiai szempontból azonban ezek a különbségek nem jelentősek.

Annak érdekében, hogy csökkentsem a párlat minőségi változóit, kidolgoztam egy desztillálási protokollt, amely lehetővé tette, hogy minden egyes desztillálás azonos körülményeken menjen végbe. A desztillálási protokoll kidolgozása során számos deflegmátor beállítással, fűtés intenzitással és elő-, közép-, valamint utópárlat határokkal kísérleteztem. A kísérleti eredményekből arra következtetek, hogy felfűtési szakaszban célszerű teljes palást és fenék fűtést választani. A felfűtési szakasz végén azonban csökkentett (18%-os) palást-fűtésintenzitás alkalmazása előnyös az oszlopárasztás és felhabzás elkerülésére. A deflegmátor hőmérsékleti profiljának beállítására a "háztető" (emelkedő majd csökkenő) szerű profilt tartom optimálisnak, amely során az emelkedő szakasz 33 °C-tól emelkedik 39 °C-ra 1 fok/perc meredekséggel, majd onnan csökken 36 fokra (0,5 °C/perc), és ezen a hőmérsékleten tartva a deflegmátort a desztillálás végéig. Az automatizálható elő- és utópárlat leválasztás szintén segítette a változók csökkentését.

A minőségi változók sikeres csökkentésével megkíséréltem a körtepárlatokat csoportosítani fajtajuk, évjáratuk és termőhelyük szerint. Erre a célra egy rutinszerűen használható GC-MS eljárást dolgoztam ki, ugyanis ez a berendezés a legáltalánosabban használt analitikai eszköz a párlatok összetevőinek vizsgálatában. Az itt bemutatott módszert ZB-Wax típusú oszlopokon alkalmazva elegendő adathalmaz nyerhető ahhoz, hogy a körtepárlatok fajtaját, évjáratát és termőhelyét azonosítsuk.

Az adathalmazból LDA segítségével a gyümölcspárlatok marker vegyületei meghatározhatóak és így csoportosíthatóak évjárat, fajta, illetve termőhely szerint. A fajta szerinti csoportosítás lehetőségét leginkább a gyümölcsök eltérő genetikája magyarázza, amelynek okán enzimeik és metabolikus termékeik, aromaanyagaik is eltérőek. Az eltérő összetevők a gyümölcsből a fermentáción át a palackba vezetnek, így fajta szerint megállapítható, hogy melyek a fajtákra jellemző vegyületek és azok jellemző mennyiségei. Az acetaldehid, 1-butanol, etil-propionát, 2-metil-butil-acetát, 3-metil-butil-acetát, etil-hexanoát, etil-dodekanoát és 2-feniletanol olyan marker vegyületek, amelyek az általam vizsgált körték párlataiban jellegzetes mennyiségben, mintázatban voltak jelen. A párlatok alapanyagának eredetét vizsgáló módszer azonos az évjárat vagy a fajta szerinti csoportosítás módszeréhez, azonban itt meg kell jegyezni,

hogy egy ilyen csoportosítás biztonságos elvégzéséhez feltétlenül több évjárat több pálinkáját szükséges vizsgálni.

## 7 SUMMARY

During the last decade pálinka manufacturing and the industry behind it have seen a swift technology development. Today, almost every commercial manufacturer uses rectifier distillation columns in their core distillation technologies. Advanced fruit processing machinery and temperature controlled fruit mash fermenters are also very common at these distilleries. In the race of making the best quality spirit, besides the technology, an important role is played by the applied methodology that these manufacturers are using. Between the same fruit based spirits, the “Know how” and the applied methodologies are the most relevant quality distinguishers in the industry. Specific qualities of these spirits are communicated by the packaging, for example, sleek thick bottomed bottles propose premium quality. The key product attributes are shown on the labels. One of the most commonly used quality attribute that manufacturers chose to use, is the vintage of the product. Other quality attributes showed on the labels are usually the varietal and the origin of the fruit, especially in case of PDO (Protected Designation of Origin) products. But why is there such a large variation in the products of similar vintages and similar varietals? These variations are coming from the different production methodologies, practices used during the mashing, fermentation and distillation processes. Yeast has a major impact on the flavor profile, acids used to regulate pH, the set pH for fermentation and fermentation temperature all leave their marks on the flavor profile of the bottled spirit. These wide quality variations of the products originating from production methodologies are giving a hard time to the food safety and supervisory authorities to check the truthness of the labels, since there are no generally suitable and accepted standards to identify the vintage or the origin of a distilled beverage.

Scope of my PhD thesis is to prove that acids applied in the mashing process, depending on their pKa value and yeast strains, depending on their purpose of selection, have a significant impact on the aromaprofile of the spirits. In my research, I am proving that if we reduce the number of variables (different yeast strains, different acids, and non-defined distillation methodologies) coming from the production, the spirits could be separated in groups by their origin of fruit, by their vintage or by their fruit varietal.

I found that pH set in the fermenting mash has a real, measurable effect on the volatiles of the spirit that is being made of the fermented mash. Evidence is also provided to the observation that the increase of the pH during fermentation affects the concentration of the higher alcohols in the resulting product (concentration levels get higher). I also found that as pH decreases, some volatiles decrease as well, this way making the spirit poorer in the specific compound. The measured concentration of methyl butanols, 1-propanol, i-butanol, 1-hexanol and phenyl-butanol ending up in the spirits of the pear mashes fermented at pH 4 was found to be higher than in the spirits of the same pear mash fermented at pH 3,0 and 2,5.

In my research results I found that the acid type (lactic-, phosphoric- and sulfuric acid) used to regulate pH in the fermenting mash was affecting the concentration variations at the reducing sugar. It was observed that all the three yeasts tested in the trials had a more linear fermentation dynamic and they also had a higher degree of fermentation by the end of the seven days trial when the mash was treated with phosphoric acid. I found that under the influence of phosphoric acid the fermentation slows down and becomes more balanced with less fluctuations compared to the mashes regulated with sulfuric and lactic acids, where the first two days I recorded high sugar concentration drops, followed by an increase, then a decrease again on the following days, due to the invertase activity and sugar uptake. The fermentation reached its maximum the fastest with the lactic acid regulated mashes. These results prove that the acids and the selected yeasts used in spirit manufacturing have a great impact on the fermentation dynamics and through the distillation, this affects the spirit as well.

By selecting the right yeast for the fermentation we can gain control on the formation of the aroma profile of the resulting spirit (Moreno *et al.*, 2016). According to my findings the three *S. cerevisiae* varieties, though they were selected for different purposes (wine, spirit and bakery), can all be applied with similar success rates in the production of pear spirits. Minor differences were detected during the research trials regarding the fermentation capacities of the three yeasts. *S. cerevisiae* 342, selected for the spirit industry, was found to produce more alcohol than the *S. cerevisiae* 228 wine yeast. The least alcohol was synthesized by the *S. cerevisiae* YS4 baker's yeast, though these differences are irrelevant in terms of product yields.

To reduce the variables coming from the different distillation methodologies and parameters, I made a distillation protocol, a computer driven program, that guarantees similar parameters for each distillation batch. The computer was controlling the heating intensity and hysteresis, the deflegmator temperature, the liquid quantity on each bubble cap tray (physical stage), the vapor pipe temperature and the condenser's temperature. The computer was signaling when heads, hearts and tails fractions needed to be separated. It was found that in the warm-up phase of distillation the best is to use mantle and bottom heating to get the mash to the temperature of the low boilers. After reaching the temperature of the low boiling compounds, only mantle heating should be applied to avoid over bubbling and foam-flooding the column (heating intensity should not be higher than 18%). During the setup and finetuning trials I found that the optimal dephlegmator temperature profile is not a constantly rising or constantly decreasing profile, nor a fixed value, but a curve that starts at 33 °C (temperature of low boilers in the pear mash 76 °C) which steadily increases to 39 °C (speed of heat up is 1 °C/min) where it tops (98 °C at the boiling mash) then it gradually drops (0,5 °C/min) to 36 °C. In the tail fraction phase of the distillation the 36 °C was

held until the spirit at the condenser outlet reached 50 % alcohol by volume (ABV%), then dephlegmator cooling was turned off. The rest of the distillate was discarded.

By reducing the number of the variables originating from different methodologies and technologies affecting the spirit's quality, I could measure the volatiles whose quantity and quality were affected only by the fruit and other pre-selected variables, like origin of pear, vintage of fruit, or varietal of the fruit. To be able to analyse these volatiles, a high-resolution GC-MS method was adapted to the purpose of pálinka analysis since GC-MS is a commonly applied hyphenated method in the volatile analysis. In the adopted method I was using a ZB-Wax column to have a sufficient resolution. On the gathered data matrix by using LDA I could collect sufficient qualitative and quantitative data to group my pear pálinka samples by their vintage, origin of pear or by their varietal. The successful classification of the different varietals is due to the genomic differences rather than to the fruit processing methodologies. Due to the genetical differences, these different pear varietals have different enzymatic tool-sets that lead to differences in aroma compounds as well impacting the spirit's aroma profile. These differences can be measured in the spirits made of these different pear varietals. I found that acetaldehyde, 1-butanol, ethyl-propionate, 2-methyl-butyl acetate, 3-methyl-butyl acetate, ethyl-hexanoate, ethyl-dodecanoate and 2-phenyl-ethanol are marker molecules that have specific relative concentration, resulting a varietal specific pattern. Pear spirits were classified by their vintages and by their origin of fruit with the similar approach. It needs to be mentioned that the classification method used in this study to classify pear spirits by their vintage, should be applied on a larger sample size containing more vintages.

## 8 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Megállapítottam a fermentációs pH és az illékony komponensek képzése közötti összefüggést. Az alacsony pH (pH 3,0 körüli) értéken vezetett fermentáció gátolta az acetaldehid és acetál képződését, a magasabb pH-án (pH 3,2-3,8) történő erjesztés serkentette az metilacetátok, 2-feniletanol, etilacetát, 1-propanol, i-butanol, metil-1-butanol, és a 3-metil-1-butanol szintézisét.
2. Desztillálási eljárást dolgoztam ki a körtecefrék lepárlására, amely lehetővé teszi az egyenletes minőségű pálinka előállítását. Optimaltam a desztilláló berendezés deflegmátor hőmérséklet profilját. Ezzel elérhetővé válik az előpárlat frakció mennyiségének csökkentése, miközben növekedik a középpárlat frakció mennyisége változatlan minőség mellett.
3. Meghatároztam különböző élesztőtörzsek alkalmazásával, azonos protokoll szerint előállított körtepálinka jellemző tulajdonságait mind klasszikus, mind modern műszeres analitikai módszerekkel. Körtepálinkai adatbázist hoztam létre, amely nemcsak a párlatok kémiai, fizikai tulajdonságait, hanem az előállítási technológiával, gyümölcstermő területével és érettségi állapotával, évjáráttal, meteorológiai és talajtani információkkal stb. kapcsolatos adatokat is tartalmazza.
4. Szoros kapcsolatot igazoltam a körtepárlatok és a felhasznált alapanyag fajtája között az acetaldehid, 1-butanol, etil-propionát, 2-metil-butil-acetát, 3-metil-butil-acetát, etil-hexanoát, etil-dodekanoát és 2-feniletanol relatív mennyiségeinek alapján.
5. Megállapítottam, hogy a körtepárlatokban található 5 komponens: acetaldehid, 3-metil-1-butanol, 2-metil-butil-acetát, allil-alkohol, 2-feniletanol mennyisége markerként felhasználható a körtepárlatok évjáratú csoportosítására. E módszer alkalmazásával azonosítottam a 3 különböző évjáratú (2010, 2011, 2012) körtepárlatot. Továbbá a 2-metil-butil-acetát és 3-metil-butil-acetát mennyiségből nagy valószínűséggel következtetni lehet a körtepárlatok, a gyümölcsök termő területének földrajzi helyére. Ennek megbízható igazolására azonban további adatok begyűjtése és feldolgozása szükséges.

## 9 IRODALOMJEGYZÉK

- ABBOTT, D. A., SUIR, E., VAN MARIS, A. J. A., PRONK, J. T. (2008). Physiological and transcriptional responses to high concentrations of lactic acid in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5759-5768. Doi: 10.1128/aem.01030-08
- ALLEWELDT, G., EIBACK, R., RUEHL, E. (1982). Untersuchungen zum Gaswechsel der Rebe I. Einfluss von Temperatur, Blattalter und Tageszeit auf Nettphotosynthese und Transpiration. *Vitis*, 21, 313-324.
- AMERINE, M. A., BERG, H. W., CRUESS, W. V. (1972): *The technology of wine making*. The Avi Publishing Company, 15-48
- <sup>A</sup>MORANDI, B., LOSCIALE, P., MANFRINI, L., ZIBORDI, M., ANCONELLI, S., PIERPAOLI, E., CORELLI GRAPPADELLI, L. (2014). Leaf gas exchanges and water relations affect the daily patterns of fruit growth and vascular flows in Abbé Fétel pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Scientia Horticulturae*, 178(0), 106-113. Doi: 10.1016/j.scienta.2014.08.009
- AN, J.-U., JOO, Y.-C., OH, D.-K. (2013). New Biotransformation Process for Production of the Fragrant Compound  $\gamma$ -Dodecalactone from 10-Hydroxystearate by Permeabilized *Waltomyces lipofer* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2636-2641. Doi: 10.1128/aem.02602-12
- ANDERSON, E. M., LARSSON, K. M., KIRK, O. (1998). One Biocatalyst–Many Applications: The Use of *Candida Antarctica B*-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16(3), 181-204. Doi: 10.3109/10242429809003198
- ANDRIOT, N. P. (2001). Etymological dictionary of Modern Greek (3 ed.): *Institute of Modern Greek Studies*
- APOSTOLOPOULOU, A. A., FLOUROS, A. I., DEMERTZIS, P. G., AKRIDA-DEMERTZI, K. (2005). Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. [Article]. *Food Control*, 16(2), 157-164. Doi: 10.1016/j.foodcont.2004.01.005
- ASENSIO, L., GONZALEZ, I., GARCIA, T., MARTIN, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). [Review]. *Food Control*, 19(1), 1-8. Doi: 10.1016/j.foodcont.2007.02.010
- ATF (1992). *The standards of identity*. Title 27. *Justia*, C.F.R. § 5.22, p., Doi:
- AYLOTT, R. (2013). *Analytical Strategies Supporting Protected Designations of Origin for Alcoholic Beverages*, *Food Protected Designation of Origin*. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, 60, 409–438 p.
- BALÁZS, G. (2013). *Párlat- és pálinkatörténet*. Egyetemi jegyzet. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszermérnöki kar, 11-31.
- BALDWIN, I. T., KESSLER, A., HALITSCHKE, R. (2002). Volatile signaling in plant-plant-herbivore interactions: what is real? [Review]. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 351-354. Doi: 10.1016/s1369-5266(02)00263-7

BARFORD, J. P., JOHNSTON, J. H., MWESIGYE, P. K. (1995). Continuous culture study of transient behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sucrose and fructose. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(2), 158-162. Doi:10.1016/0922-338X(95)94084-5

BARKER, J., KHAN, M. A. A., SOLOMOS, T. (1964). Mechanism of the Pasteur Effect. [10.1038/2011126a0]. *Nature*, 201(4924), 1126-1127.

BAUTISTA-BAÑOS, S. (2014). *Postharvest Decay* (1 ed.), Academic Press, 1-44, 131-146 p.

BECK, H. C., HANSEN, A. M., LAURITSEN, F. R. (2002). Metabolite production and kinetics of branched-chain aldehyde oxidation in *Staphylococcus xylosus*. [Article]. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1-2), 94-101. Doi: 10.1016/s0141-0229(02)00067-4

BÉKÉSI, Z., CSARNAI, E. (2010). *Házi Pálinkafőzés*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 43-104.

BÉKÉSI, Z., PÁNDI, F. (2005). *Pálinkafőzés*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 22-58.

BELL, P. J. L., HIGGINS, V. J., ATTFIELD, P. V. (2001). Comparison of fermentative capacities of industrial baking and wild-type yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in different sugar media. *Letters in Applied Microbiology*, 32(4), 224-229. Doi: 10.1046/j.1472-765X.2001.00894.x

BELTON, P. S., COLQUHOUN, I. J., KEMSLEY, E. K., DELGADILLO, I., ROMA, P., DENNIS, M. J., SHARMAN, M., HOLMES, E., NICHOLSON, J. K., SPRAUL, M. (1998). Application of chemometrics to the H-1 NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. *Food Chemistry*, 61(1-2), 207-213. Doi: 10.1016/s0308-8146(97)00103-9

BERNÁT, A., DONÁT, B., JENŐ, C., KÁROLY, C., KORNÉL, D., IGNÁC, G., LORÁND, E., JÓZSEF, K., HENRIK, M., FERENC, N., LÁSZLÓ, N., PASTEINER GYULA, P. J., PETRIK LAJOS, SZINNYEI JÓZSEF, THIRRING GUSZTÁV, VADAS JENŐ, VÁMBÉRY ÁRMIN (1893): *Égett bor. A Pallas nagy lexikona. Pallas Irodalmi és Nyomdai Rt., 197 p*

BERTRAND A, D. M. O., RIBEREAU-GAYON P. (1975). Trehalose, the principle disaccharide of wine. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 280 p.

BEUERLE, T., SCHWAB, W. (1997). Octane-1,3-diol and its derivatives from pear fruits. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology*, 205(3), 215-217. Doi: 10.1007/s002170050153

BIBLIOMATA, E. (2014): *Alambic à double fond pour la distillation des marcs de raisin. Wikimedia Commons, 13-15.*

BLANKENSHIP, S. M., RICHARDSON, D. G. (1985). Development of ethylene biosynthesis and ethylene-induced ripening in 'd'Anjou' pears during the cold requirement for ripening. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 110, 38-42.

<sup>B</sup>MORANDI, B., LOSCIALE, P., MANFRINI, L., ZIBORDI, M., ANCONELLI, S., GALLI, F., PIERPAOLI, E., CORELLI GRAPPADDELLI, L. (2014). Increasing water stress negatively affects pear fruit growth by reducing first its xylem and then its phloem inflow. *Journal of Plant Physiology*, 171(16), 1500-1509. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2014.07.005>

BOOTH, I. R., STRATFORD, M. (2003): *Acidulants and low pH. Food Preservatives. Springer US*, 25-47 p., Doi: 10.1007/978-0-387-30042-9\_3

BOYER, J. S. (1982). Plant Productivity and Environment. *Science*, 218(4571), 443.



- CACHO, J., MONCAYO, L., CARLOS PALMA, J., FERREIRA, V., CULLERE, L. (2012). Characterization of the aromatic profile of the Italia variety of Peruvian pisco by gas chromatography-olfactometry and gas chromatography coupled with flame ionization and mass spectrometry detection systems. *Food Research International*, 49(1), 117-125. Doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.065
- CACHO, J., MONCAYO, L., PALMA, J. C., FERREIRA, V., CULLERÉ, L. (2013). The impact of grape variety on the aromatic chemical composition of non-aromatic Peruvian pisco. *Food Research International*, 54(1), 373-381. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.019>
- CANDAN, N., TARHAN, L. (2003). The correlation between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in *Mentha pulegium* organs grown in Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> stress conditions. *Plant Science*, 165(4), 769-776. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00269-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00269-3)
- CHEN, E. C. H. (1978). The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 36 (39), 39-43.
- CHEN, P. M., MELLENTHIN, W. M. (1981). Effects of harvest date on ripening capacity and postharvest life *Journal of American Society for Horticultural Science*, 106, 38-42.
- CIESA, F., DALLA VIA, J., WISTHALER, A., ZANELLA, A., GUERRA, W., MIKOVINY, T., MÄRK, T. D., OBERHUBER, M. (2013). Discrimination of four different postharvest treatments of 'Red Delicious' apples based on their volatile organic compound (VOC) emissions during shelf-life measured by proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS). *Postharvest Biology and Technology*, 86, 329-336. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.036>
- COCOLIN, L., ERCOLINI, D. (2015). Zooming into food-associated microbial consortia: a 'cultural' evolution. *Current Opinion in Food Science*, 2, 43-50. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.01.003>
- COLDEA, T., MUDURA, E., RANTA, N., HADAREAN, D. (2013). Safety Evaluation of the Grape Marc Spirit by GC-FID Analysis. [grape marc spirit, food safety, methanol, furfural, acetaldehyde]. *Bulletin UASVM Food Science and Technology* 70(1), 33-37, Doi: 10.15835/buasvmcn-fst:9370
- COMELLI, R. N., SELUY, L. G., ISLA, M. A. (2016). Performance of several *Saccharomyces* strains for the alcoholic fermentation of sugar-sweetened high-strength wastewaters: Comparative analysis and kinetic modelling. *New Biotechnology*, 33(6), 874-882. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.09.007>
- COSTA, F., CAPPELLIN, L., FONTANARI, M., LONGHI, S., GUERRA, W., MAGNAGO, P., GASPERI, F., BIASIOLI, F. (2012). Texture dynamics during postharvest cold storage ripening in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Postharvest Biology and Technology*, 69, 54-63. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.03.003>
- COSTELLO, R. C., SULLIVAN, D. M. (2014). Determining the pH Buffering Capacity of Compost Via Titration with Dilute Sulfuric Acid. *Waste and Biomass Valorization*, 5(3), 505-513. Doi: 10.1007/s12649-013-9279-y
- CSAPÓ, J. (2004). Biokémia. *Scientia, Kolozsvár*, 58-201.

- CUNY, M., VIGNEAU, E., LE GALL, G., COLQUHOUN, I., LEES, M., RUTLEDGE, D. N. (2008). Fruit juice authentication by H-1 NMR spectroscopy in combination with different chemometrics tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(1), 419-427. Doi: 10.1007/s00216-007-1708-y
- DA SILVA, S. S., CHANDEL, A. K. (2014). *Biofuels in Brazil: Fundamental Aspects, Recent Developments, and Future Perspectives*: Springer International Publishing.
- DEÁK, E., GYEPES, A., STEFANOVITS-BANYAI, E., DERNOVICS, M. (2010). Determination of ethyl carbamate in palinka spirits by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry after derivatization. *Food Research International*, 43(10), 2452-2455. Doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.014
- DEÁK, T. (2006). *Élelmiszer-mikrobiológia*. Mezőgazda kiadó, Budapest, 32-154.
- DEÁK, T., KISKÓ, G., MARÁZ, A., MOHÁCSINÉ FARKAS, C. (2006): *Élelmiszer-mikrobiológia*. *Mezőgazda kiadó*, 35-78.
- DERRICK, S., LARGE, P. (1993). Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *J Gen Microbiol.*, 139(11), 83-92.
- DES GACHONS, C. P., VAN LEEUWEN, C., TOMINAGA, T., SOYER, J. P., GAUDILLERE, J. P., DUBOURDIEU, D. (2005). Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc in field conditions. [Article]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 73-85. Doi: 10.1002/jsfa.1919
- DIAMANTIDIS, G., THOMAI, T., GENITSARIOTIS, M., NANOS, G., BOLLA, N., SFAKIOTAKIS, E. (2002). Scald susceptibility and biochemical/physiological changes in respect to low preharvest temperature in 'Starking Delicious' apple fruit. [Article]. *Scientia Horticulturae*, 92(3-4), 361-366. Doi: 10.1016/s0304-4238(01)00298-9
- DICKINSON, J. R., LANTERMAN, M. M., DANNER, D. J., PEARSON, B. M., SANZ, P., HARRISON, S. J., HEWLINS, M. J. E. (1997). A C-13 nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), 26871-26878. Doi: 10.1074/jbc.272.43.26871
- DOMBEK, K. M., INGRAM, L. O. (1987). Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1286-1291.
- DONALIES, U. E., NGUYEN, H. T., STAHL, U., NEVOIGT, E. (2008). Improvement of *Saccharomyces* yeast strains used in brewing, wine making and baking. [Review]. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*(111), 67-98. Doi: 10.1007/10\_2008\_099.
- DUARTE, I., BARROS, A., BELTON, P. S., RIGHELATO, R., SPRAUL, M., HUMPFER, E., GIL, A. M. (2002). High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2475-2481. Doi: 10.1021/jf011345j
- DUDAREVA, N., PICHERSKY, E., GERSHENZON, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. [Review]. *Plant Physiology*, 135(4), 1893-1902. Doi: 10.1104/pp.104.049981

- ECHVERRIA, G., GRAELL, J., LARA, I., LOPEZ, M. L. (2008). Physicochemical measurements in 'Mondial Gala (R)' apples stored at different atmospheres: Influence on consumer acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 50(2-3), 135-144. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.05.002
- EDEN, A., SIMCHEN, G., BENVENISTY, N. (1996). Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20242-20245.
- EHRlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 40(1), 1027–1047.
- EISENREICH, W., SCHWARZ, M., CARTAYRADE, A., ARIGONI, D., ZENK, M. H., BACHER, A. (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & Biology*, 5(9), 221-233. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90002-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90002-3)
- EU-PARLAMENT, TANÁCS (2008). *A szeszese italok földrajzi eredete*. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=LEGISSUM:l67006>
- EURÓPAI PARLAMENT, A. E. U. T. (2008). *Az Európai Parlament és a Tanács 110/2008/EK rendelete (2008. január 15.) a szeszese italok meghatározásáról, megnevezéséről, kiszerezéséről, címkézéséről és földrajzi árujelzőinek oltalmáról, valamint az 1576/89/EK tanácsi rendelet hatályon kívül helyezéséről*.
- FERNANDEZ-TRUJILLO, J. P., NOCK, J. F., WATKINS, C. B. (2001). Superficial scald, carbon dioxide injury, and changes of fermentation products and organic acids in 'Cortland' and 'Law Rome' apples after high carbon dioxide stress treatment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(2), 235-241.
- FERON, V. J., TIL, H. P., DEVRIJER, F., WOUTERSEN, R. A., CASSEE, F. R., VANBLADEREN, P. J. (1991). Aldehydes - Occurrence, Carcinogenic Potential, Mechanism of Action and Risk Assessment. *Mutation Research*, 259(3-4), 363-385. Doi: 10.1016/0165-1218(91)90128-9
- FERREIRA, J., TOIT, M. D., TOIT, W. J. D. (2006). The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(1), 50-56. Doi: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00043.x
- FRYLINCK, L., DUBERY, I. A. (1998). Protein kinase activities in ripening mango, *Mangifera indica* L., fruit tissue III. Purification and characterisation of a calcium-regulated protein kinase. [Article]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1387(1-2), 342-354. Doi: 10.1016/s0167-4838(98)00149-6
- FUGELSANG, K., EDWARDS, C. (2010). *Wine Microbiology* (Second Edition ed.). New York: Springer Science and Business Media.
- GANDINI, A. (1973). Influenza dell' infezione botritica delle uve sulla blastoflora dei mosti e sulla composizione dei vini dolci da questi ottenuti *Vini d' Italia*, 15, 7-36, 153-167.
- GANG, D. R. (2005). Evolution of flavors and scents. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 301-325. Doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144128
- GANGULY, J. (1960). Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 40, 110-118. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)91320-2](http://dx.doi.org/10.1016/0006-3002(60)91320-2)

- GARCÍA-SALINAS, C., RAMOS-PARRA, P. A., DÍAZ DE LA GARZA, R. I. (2016). Ethylene treatment induces changes in folate profiles in climacteric fruit during postharvest ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 118, 43-50. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.03.011>
- GASCÓN, S., LAMPEN, J. O. (1968). Purification of the internal invertase of yeast. *J. Biol Chem.*, 243(10), 1567-1572.
- GENCER, M. A., MUTHARASAN, R. (1983). Ethanol fermentation in a yeast immobilized tubular fermenter. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(9), 2243-2262. Doi: 10.1002/bit.260250910
- GIANNONE, V., LONGO, C., DAMIGELLA, A., RASPAGLIESI, D., SPINA, A., PALUMBO, M. (2010). Technological properties of bakers' yeasts in durum wheat semolina dough. [journal article]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(4), 371-379. Doi: 10.1007/s10295-009-0682-0
- GOFF, S. A., KLEE, H. J. (2006). Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value [Review]. *Science*, 311(5762), 815-819. Doi: 10.1126/science.1112614
- GYIMESI, J., SÓLYMOS, L. (1979). *Az élesztő és szeszgyártás mikrobiológiája*. Mezőgazdasági Könyvkiadó, Debrecen, 41-73.
- HAGMAN, A., SÄLL, T., PIŠKUR, J. (2014). Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin. *The Febs Journal*, 281(21), 4805-4814. Doi: 10.1111/febs.13019
- HAHN, F., CRUZ, J., BARRIENTOS, A., PEREZ, R., VALLE, S. (2016). Optimal pressure and temperature parameters for prickly pear cauterization and infrared imaging detection for proper sealing. *Journal of Food Engineering*, 191, 131-138. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.013>
- HANSEN, E., MELLENTHIN, W. M. (1979). Commercial handling and storage practices for winter pears. *Oregon Agricultural Experiment Station*. Corvallis, OR(550).
- HAZELWOOD, L. A., DARAN, J.-M., VAN MARIS, A. J. A., PRONK, J. T., DICKINSON, J. R. (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2259-2266. Doi: 10.1128/aem.02625-07
- HAZELWOOD, L. A., DARAN, J.-M., VAN MARIS, A. J. A., PRONK, J. T., DICKINSON, J. R. (2008). The ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism (vol 74, pg 2259, 2008). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3920-3920. Doi: 10.1128/aem.00934-08
- HAZEU, W., DE BRUYN, J. C., BOS, P. (1972). Methanol assimilation by yeasts. [journal article]. *Archiv für Mikrobiologie*, 87(2), 185-188. Doi: 10.1007/bf00425000
- HUAN, C., JIANG, L., AN, X., KANG, R., YU, M., MA, R., YU, Z. (2016). Potential role of glutathione peroxidase gene family in peach fruit ripening under combined postharvest treatment with heat and 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 175-184. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.016>
- ISHOLA, M. M., ISROI, TAHERZADEH, M. J. (2014). Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB). *Bioresource Technology*, 165, 9-12. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.053>

- ISMERETLEN, (2007). *The rising power of yeast genomics*. European baker, 30-33.
- JACQUES, K. A., LYONS, T. P., KELSALL, D. R. (2003). *The Alcohol Textbook* (4th ed.). NOTTINGHAM: Nottingham University Press, 102-284.
- JARRARD, K. (2005). *Cognac: The Seductive Saga of the World's Most Coveted Spirit*. Wiley publishing, John Wiley & Sons; 1 edition, 8-39.
- JAYUS, NURHAYATI, MAYZUHROH, A., ARINDHANI, S., CAROENCHAI, C. (2016). Studies on Bioethanol Production of Commercial Baker's and Alcohol Yeast under Aerated Culture Using Sugarcane Molasses as the Media. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 493-499. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.168>
- KAHLE, K., PRESTON, C., RICHLING, E., HECKEL, F., SCHREIER, P. (2005). On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of major volatiles from pear fruit (*Pyrus communis*) and pear products. *Food Chemistry*, 91(3), 449-455. Doi: 10.1016/j.foodchem.2004.06.026
- KAMO, K. I., TAKABATAKE, A., INOUE, Y., IZAWA, S. (2012). Temperature dependent N-glycosylation of plasma membrane heat shock protein Hsp30p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(1), 119-123. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.126>
- KÁRPÁTI, E. (1979). *A magyarországi alkoholizmus elleni küzdelem múltjából*. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 5-19.
- KATZEN, R., MADSON, P. W., MOON, G. D. J. (2003): *Alcohol distillation: the fundamentals*. *The Alcohol Textbook*. Nottingham University Press, 81-104
- KIM, J.-H., ROY, A., JOUANDOT II, D., CHO, K. H. (2013). The glucose signaling network in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(11), 5204-5210. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.025>
- KITAGAKI, H., TAKAGI, H. (2014). Mitochondrial metabolism and stress response of yeast: Applications in fermentation technologies. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(4), 383-393. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.011>
- KLIEWER, W. M. (1973). Berry composition of *Vitis Vinifera* cultivars as influenced by photo and nycto-temperatures during maturation. [Journal article]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 98, 153-159.
- KLOSOWSKI, G., CZUPRYNSKI, B. (2006). Kinetics of acetals and esters formation during alcoholic fermentation of various starchy raw materials with application of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 242-246. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.12.001
- KOBDORFF, K. (2015). *Spirituosen*. Codex Alimentarius B 23, Wirtschaftskammer Österreich, [www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/) (02.04.2015)
- KOWALSKI, J. (2009). *Daje krzepę, krasi lica nielegalna sliwowica*. Gazeta Wyborcza. [http://wyborcza.pl/1,75398,7063605,Daje\\_krzepa\\_\\_krasi\\_lica\\_nielegalna\\_sliwowica.html?disableRedirects=true](http://wyborcza.pl/1,75398,7063605,Daje_krzepa__krasi_lica_nielegalna_sliwowica.html?disableRedirects=true) (2017. 02. 11.)
- KRAUS, E. C. (2017). *Is Wine Yeast And Baking Yeast The Same?* <http://blog.eckraus.com/is-wine-yeast-and-baking-yeast-the-same>, (2017.02. 11.)

KUIPERS, J. (2010): *Authentication of Scotch Whisky by GC Analysis Using an Agilent J&W CP-Wax 57 CB Basic Column*. Agilent Technologies, Inc., 3-9. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/SI-02165.pdf>

KUNDIYANA, D. K., BELLMER, D. D., HUHNKE, R. L., WILKINS, M. R., CLAYPOOL, P. L. (2010). Influence of temperature, pH and yeast on in-field production of ethanol from unsterilized sweet sorghum juice. *Biomass and Bioenergy*, 34(10), 1481-1486. Doi: 10.1016/j.biombioe.2010.04.022

KURTZMAN, C. P., FELL, J. W. (1998): *Chapter 1 - Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. The Yeasts (Fourth Edition)*. Elsevier, 3-5 p., Doi: 10.1016/B978-044481312-1/50004-6

KUTASI, J. (2007). Fermentációs biotechnológia. *Glia Kft.*, 7-35

LABLANQUIE, O., SNAKKERS, G., CANTAGREL, R., FERRARI, G. (2002). Characterisation of young Cognac spirit aromatic quality. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 191-196. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01563-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01563-X)

LACHENMEIER, D. (2005). Rapid screening for ethyl carbamate in stone-fruit spirits using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(6), 1407-1412. Doi: 10.1007/s00216-005-3285-2

LAFON-LAFOURCADE, S. (1983). Wine and brandy. *Heidelberg Verlag Chemie*, 23-33.

LAIRD, C. *An American Classic Since 1780*. 2 p., <http://320main.blogspot.fr/2011/11/lairds-apple-brandy-truly-american.html> (2017. 02. 21.)

LAMMERTYN, J., SCHEERLINCK, N., JANCOSK, P., VERLINDEN, B. E., NICOLAI, B. M. (2003). A respiration-diffusion model for 'Conference' pears I: model development and validation. [Article]. *Postharvest Biology and Technology*, 30(1), 29-42. Doi: 10.1016/s0925-5214(03)00061-9

LEPELLEY, R. (1990). Calvados Qui es-tu, d'où viens-tu? *Annales de Normandie*, 40(1), 71-72

LI, H., KIM, N.-J., JIANG, M., KANG, J. W., CHANG, H. N. (2009). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 100(13), 3245-3251. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.021>

LI, M., HU, C., ZHU, Q., CHEN, L., KONG, Z., LIU, Z. (2006). Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere*, 62(4), 565-572. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.06.029

LUYTEN, K., RIOU, C., BLONDIN, B. (2002). The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. *Yeast* (19), 713-726.

M. J. CABRERA, J. J. M., J. M. ORTEGA, M. MEDINA. (1988). Formation of ethanol, higher alcohols, esters and terpenes by five yeast strain in musts from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39(4), 283-287.

MAGYAR, I. (2010). Borászati Mikrobiológia (Vol. 3). Budapest, *Mezőgazda kiadó*, 65-126.

MAJOROS, E. L., CSOKA, M., KORANY, K. (2006). Sárgabarack-gyümölcs, -pálinka és -szeszestál aromatulajdonságainak feltérképezése GC-MS vizsgálatokkal. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*, 52(2), 77-84.

- MARCONE, M. F., WANG, S., ALBABISH, W., NIE, S., SOMNARAIN, D., HILL, A. (2013). Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food Research International*, 51(2), 729-747. Doi: 10.1016/j.foodres.2012.12.046
- MASTALERZ, P. (1986). *Chemia organiczna*. Varsó, PWN Kiadó, 682 p.
- MAURICIO, J. C., MORENO, J., ZEA, L., ORTEGA, J. M., MEDINA, M. (1997). The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(2), 155-160. Doi: 10.1002/(sici)1097-0010(199710)75:2<155::aid-jsfa853>3.0.co;2-s
- MELUCCI, D., BENDINI, A., TESINI, F., BARBIERI, S., ZAPPI, A., VICHI, S., CONTE, L., GALLINA TOSCHI, T. (2016). Rapid direct analysis to discriminate geographic origin of extra virgin olive oils by flash gas chromatography electronic nose and chemometrics. *Food Chemistry*, 204, 263-273. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.131
- MENESES, F. J., HENSCHKE, P. A., JIRANEK, V. (2002). A Survey of Industrial Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Numerous Altered Patterns of Maltose and Sucrose Utilisation. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(3), 310-321. Doi: 10.1002/j.2050-0416.2002.tb00556.x
- MILTON, J. D., MULLEN, P. J. (1992). The effect of reducing and non-reducing sugars on the bicinchoninic acid reaction for protein determination. *Clinica Chimica Acta*, 208(1), 141-143. Doi: 0.1016/0009-8981(92)90034-N
- MIRA, N. P., TEIXEIRA, M. C., SA-CORREIA, I. (2010). Adaptive Response and Tolerance to Weak Acids in *Saccharomyces cerevisiae*: A Genome-Wide View. *Omics-a Journal of Integrative Biology*, 14(5), 525-540. Doi: 10.1089/omi.2010.0072
- MITCHAM, E. J., ELKINS, R., B. (2007): Pear Production of Handling Manual. Postharvest handling of winter pears. *University of California, Agriculture and Natural Resources*
- MIYAKE, T., SHIBAMOTO, T. (1993). Quantitative-Analysis of Acetaldehyde in Foods and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 1968-1970. Doi: 10.1021/jf00035a028
- MOLLAPOUR, M., PIPER, P. W. (2007). Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Molecular Cell Biology*, 18(64), 46-56. Doi: 10.1128/MCB.02205-06
- MOLYNEUX, R. J., SCHIEBERLE, P. (2007). Compound Identification: A Journal of Agricultural and Food Chemistry Perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4625-4629. Doi: 10.1021/jf070242j
- MONCAYO, L., CULLERÉ, L., FERREIRA, V., CACHO, J. (2014): *Chapter 42 - Gas Chromatography-Olfactometric Profiles of Eight Different Varieties of Peruvian Pisco Spirits*. *Flavour Science*. Academic Press, 221-226 p., Doi: 10.1016/B978-0-12-398549-1.00042-8
- MORENO, J., MORENO-GARCÍA, J., LÓPEZ-MUÑOZ, B., MAURICIO, J. C., GARCÍA-MARTÍNEZ, T. (2016). Use of a flor velum yeast for modulating colour, ethanol and major aroma compound contents in red wine. *Food Chemistry*, 213, 90-97. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.06.062
- MORETTI, C. L., MATTOS, L. M., CALBO, A. G., SARGENT, S. A. (2010). Climate changes and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: A review. [Review]. *Food Research International*, 43(7), 1824-1832. Doi: 10.1016/j.foodres.2009.10.013

- MORRISON, R. T., BOYD, R. M. (1990). *Chemia organiczna*. Varsó, *PWN Kiadó*, 312-335 p.
- MUJTABA, I. M. (2004). *Batch Distillation, Design and Operation* (Vol. 3). London, *Imperial College Press*, 65-106
- NAIR, R. B., LUNDIN, M., BRANDBERG, T., LENNARTSSON, P. R., TAHERZADEH, M. J. (2015). Dilute phosphoric acid pretreatment of wheat bran for enzymatic hydrolysis and subsequent ethanol production by edible fungi *Neurospora intermedia*. *Industrial Crops and Products*, 69, 314-323. Doi: 10.1016/j.indcrop.2015.02.038
- NARENDRANATH, N. V., POWER, R. (2005). Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2239-2243. Doi: 10.1128/aem.71.5.2239-2243.2005
- NEGRO, M. J., ALVAREZ, C., BALLESTEROS, I., ROMERO, I., BALLESTEROS, M., CASTRO, E., MANZANARES, P., MOYA, M., OLIVA, J. M. (2014). Ethanol production from glucose and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyist. *Bioresource Technology*, 153, 101-107. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.079
- NEUMANN, N. P., LAMPEN, J. O. (1967). Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry*(2), 468-475.
- NGUYEN, Q. D., PANYIK, G., NAGYGYÖRGY, L., HOSCHKE, Á. (2013). Development of Methods for Trace of Pálinkas. *Hungarian Agricultural research*, 22(1), 10 - 13.
- NOUT, M. J. R. (1994). Fermented Foods and Food Safety. *Food Research International*, 27(3), 291-298. Doi: 10.1016/0963-9969(94)90097-3
- NYKÄNEN, L., SUOMALAINEN, H. (1983). *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages* (Vol. 3). *Springer*.
- OHIMAIN, E. I. (2016). Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension. *Springer Plus Open Access*, 5(1607), 10.
- OLASZ-TÖRVÉNYHOZÁS (2008): *Attuazione dell'articolo 17 del Regolamento (CE) n. 110/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 gennaio 2008, concernente la definizione, la designazione, la presentazione, l'etichettatura e la protezione delle indicazioni geografiche delle bevande spiritose - Scheda tecnica della. 11A12466.*
- ORTIZ, A., ECHEVERRÍA, G., GRAELL, J., LARA, I. (2010). The emission of flavour-contributing volatile esters by 'Golden Reinders' apples is improved after mid-term storage by postharvest calcium treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 57(2), 114-123. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.03.006
- OTHMER, K. (2007). *Food and Feed Technology* (Vol. 2). *John Wiley & Sons*. 647-702
- PAIANO, V., BIANCHI, G., DAVOLI, E., NEGRI, E., FANELLI, R., FATTORE, E. (2014). Risk assessment for the Italian population of acetaldehyde in alcoholic and non-alcoholic beverages. *Food Chemistry*(154), 26-31. Doi: 10.1016/j.foodchem
- PAILLARD, N. M. M. (1990). Food flavours. The flavour of apples, pears and quinces. in: Morton IE, Macleod AJ, editors. *Food Flavours, Part C. The flavour of fruits*. Amsterdam, *Elsevier Science* pp. 1-41.



- PANYIK-LANSZKI, I., BÉLI, G. (2008). *A gyümölcspálinka gyártása, jövedéki ismeretek*. Budapest, FVM VKSZI.
- PANYIK, G. (2006). Minőségi párlatkészítés: a minőségi párlatkészítés technológiája, a párlatok, pálinkák minősítésének elsajátítása. Budapest, *Mezőgazda Kiadó*, 51-60
- PANYIK, G. (2013). *Pálinkafőzés, Ágyas pálinka és likőr készítése*. Budapest, Cser Kiadó
- PARK, C. H., OKOS, M. R., WANKAT, P. C. (1989). Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation in an immobilized cell trickle bed reactor. [Article]. *Biotechnology and Bioengineering*, 34(1), 18-29. Doi: 10.1002/bit.260340104
- PASULA, S., JOUANDOT II, D., KIM, J.-H. (2007). Biochemical evidence for glucose-independent induction of HXT expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 581(17), 3230-3234. Doi: 0.1016/j.febslet.2007.06.013
- PEDDIE, H. A. B. (1990). ESTER FORMATION IN BREWERY FERMENTATIONS. *Journal of the Institute of Brewing*, 96(5), 327-331. Doi: 10.1002/j.2050-0416.1990.tb01039.x
- PERES, B., BARLET, N., LOISEAU, G., MONTET, D. (2007). Review of the current methods of analytical traceability allowing determination of the origin of foodstuffs. *Food Control*, 18(3), 228-235. Doi: 10.1016/j.foodcont.2005.09.018
- PEREZ, A. G., RIOS, J. J., SANZ, C., OLIAS, J. M. (1992). Aroma components and free amino acids in strawberry variety Chandler during ripening. [Article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11), 2232-2235. Doi: 10.1021/jf00023a036
- PEREZ, M., LUYTEN, K., MICHEL, R., RIOU, C., BLONDIN, B. (2005). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Research*, 5(4-5), 351-361. Doi: 10.1016/j.femsyr.2004.09.005
- PETRAKIS, P., TOURIS, I., LIOUNI, M., ZERVOU, M., KYRIKOU, I., KOKKINOFTA, R., THEOCHARIS, C. R., MAVROMOUSTAKOS, T. M. (2005). Authenticity of the traditional cypriot spirit "zivania" on the basis of H-1 NMR spectroscopy diagnostic parameters and statistical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5293-5303. Doi: 10.1021/jf0495800
- PIGGOT, R. (2003): *From pot stills to continuous stills: flavor modification by distillation*. *The Alcohol Textbook*. 259-270 p., Doi:
- PIGGOTT, J. R., SHARP, R., DUNCAN, R. E. B., BRONSKY, A. J., SCHUMANN, R. W., BATHGATE, G. N. (1989). *The science and technology of whiskies*. Harlow/GB: Longman Scientific and Technical (Pearson Education).
- QUARTERMAN, J., SKERKER, J. M., FENG, X., LIU, I. Y., ZHAO, H., ARKIN, A. P., JIN, Y.-S. (2016). Rapid and efficient galactose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 229, 13-21. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.041
- QUEROL, A., FLEET, G. H. (2006). *Yeasts in Food and Beverages*: Springer Berlin Heidelberg.
- QUIRÓS, M., ROJAS, V., GONZALEZ, R., MORALES, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 85-91. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024

- RAJKÓ, R. (2011): *Kemometria (többváltozós, többdimenziós adatelemzés)*. SZTE JGYPK,
- RAMSAY, C. M., BERRY, D. R. (1984). The effect of inoculum level on the formation of higher alcohols, fatty acids and esters in the malt whisky fermentation. *Food Microbiology*, 1(2), 111-115. Doi: 10.1016/0740-0020(84)90020-0
- RAMSAY, C. M., BERRY, D. R. (1984). Effect of temperature and pH on the formation of higher alcohols, fatty acids and esters in the malt whisky fermentation. *Food Microbiology*, 1(2), 117-121. Doi: 10.1016/0740-0020(84)90021-2
- RANDEZ-GIL, F., SANZ, P. (1994). Construction of industrial baker's yeast strains able to assimilate maltose under catabolite repression conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(4), 581-586. Doi: 10.1007/bf00173924
- RANKINE, B. C. (1967). Influence of yeast strain and pH on pyruvic acid content of wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18(2), 41-44. Doi: 10.1002/jsfa.2740180201
- RANKINE, B. C., POCOCK, K. F. (1969). Influence of yeast strain on binding of sulphur dioxide in wines, and on its formation during fermentation. *Science of food and Agriculture*, 20(2). Doi: 10.1002/jsfa.2740200210
- RAPPARINI, F., PREDIERI, S. (2010): *Pear Fruit Volatiles*. *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., 237-324 p., Doi: 10.1002/9780470650851.ch5
- REINERS, S. (2001): *Preventing damage from an early frost*. *Cornell University Consumer News Service*, 173-184 p.
- RHEDER, A. (1940). *Manual of Cultivated Trees and Shrubs Hardy in North America*. Oregon: The Macmillan Company.
- ROBIN, H. G. (2012). *Traditional Distillation - Art and Passion*: White Mule Press, 43-78 p
- RODRIGUES, F., LUDOVICO, P., LEÃO, C. (2006): *Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism*. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer Berlin Heidelberg, 101-121 p., Doi: 10.1007/3-540-30985-3\_6
- ROMERO-CASCALES, I., ROS-GARCÍA, J. M., LÓPEZ-ROCA, J. M., GÓMEZ-PLAZA, E. (2012). The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chemistry*, 130(3), 626-631. Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.091
- ROWAN, D. D., LANE, H. P., ALLEN, J. M., FIELDER, S., HUNT, M. B. (1996). Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled substrates. [Article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 3276-3285. Doi: 10.1021/jf9508209
- RUSU COLDEA, T. E., SOCACIU C., PÂRV, M., VODNAR, D. (2011). Gas-Chromatographic Analysis of Major Volatile Compounds Found in Traditional Fruit Brandies from Transylvania, Romania. *Not Bot Horti Agrobo*, 39(2), 7.
- RYWIŃSKA, A., JUSZCZYK, P., WOJTATOWICZ, M., ROBAK, M., LAZAR, Z., TOMASZEWSKA, L., RYMOWICZ, W. (2013). Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and Bioenergy*, 48, 148-166. Doi: 10.1016/j.biombioe.2012.11.021

SADOUDI, M., TOURDOT-MARÉCHAL, R., ROUSSEAU, S., STEYER, D., GALLARDO-CHACÓN, J.-J., BALLESTER, J., VICHI, S., GUÉRIN-SCHNEIDER, R., CAIXACH, J., ALEXANDRE, H. (2012). Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiology*, 32(2), 243-253. Doi: 10.1016/j.fm.2012.06.006

SALAS, N. A., MOLINA-CORRAL, F. J., GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A., OTERO, A., SEPULVEDA, D. R., OLIVAS, G. I. (2011). Volatile production by ‘Golden Delicious’ apples is affected by preharvest application of aminoethoxyvinylglycine. *Scientia Horticulturae*, 130(2), 436-444. Doi: 10.1016/j.scienta.2011.07.017

SANZ, C., OLIAS, J. M., PEREZ, A. G. (1997): *Aroma biochemistry of fruits and vegetables. Phytochemistry of Fruits and Vegetables. Oxford University Press Inc.*, p.,

SARKADI, L. (2011). *Biokémia*. Budapest: Typotex. 28-119 p

SASANO, Y., HAITANI, Y., HASHIDA, K., OSHIRO, S., SHIMA, J., TAKAGI, H. (2013). Improvement of fermentation ability under baking-associated stress conditions by altering the POG1 gene expression in baker's yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 241-245. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.015

SATORA, P., SROKA, P., DUDA-CHODAK, A., TARKO, T., TUSZYŃSKI, T. (2008). The profile of volatile compounds and polyphenols in wines produced from dessert varieties of apples. *Food Chemistry*, 111(2), 513-519. Doi: 10.1016/j.foodchem.2008.04.007

SCACCO, A., OLIVA, D., DI MAIO, S., POLIZZOTTO, G., GENNA, G., TRIPODI, G., LANZA, C. M., VERZERA, A. (2012). Indigenous Saccharomyces cerevisiae strains and their influence on the quality of Cataratto, Inzolia and Grillo white wines. *Food Research International*, 46(1), 1-9. Doi: 10.1016/j.foodres.2011.10.038

SCHEER, F. M. (1993). Fermentation by-products (Gerungsnebenprodukte). *Brauwelt*, 133(19), 831–832.

SCHEFFERS, W. A. (1966). Stimulation of Fermentation in Yeasts by Acetoin and Oxygen. [10.1038/210533a0]. *Nature*, 210(5035), 533-534.

SCHWARZ, M., RODRÍGUEZ, M., MARTÍNEZ, C., BOSQUET, V., GUILLÉN, D., BARROSO, C. G. (2009). Antioxidant activity of Brandy de Jerez and other aged distillates, and correlation with their polyphenolic content. *Food Chemistry*, 116(1), 29-33. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.096

SEPULVEDA, G., KLIEWER, W. M. (1986). Stomatal Response of three grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L) to high temperature. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 77-83.

SILVEIRA, C. P., PIFFER, A. C., KMETZSCH, L., FONSECA, F. L., SOARES, D. A., STAATS, C. C., RODRIGUES, M. L., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H. (2013). The heat shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 53-63. Doi: 10.1016/j.fgb.2013.08.005

SIMPSON, W. J., HAMMOND, J. R. M. (1989). THE RESPONSE OF BREWING YEASTS TO ACID WASHING. *Journal of the Institute of Brewing*, 95(5), 347-354. Doi: 10.1002/j.2050-0416.1989.tb04642.x

SISKIN, N. (2010): *Etymology Bank*. <http://etymologiebank.nl/>, 2016

- SOLTÉSZ, M. (2001). *Gyümölcsfajta-ismeret és -használata*. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 46-66p
- SONG, J., BANGERTH, F. (2003). Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 30(2), 113-121. Doi: 10.1016/s0925-5214(03)00098-x
- SRINIVASAN, S., FENG, S., LIN, Y.-H. (2012). Dissolved carbon dioxide concentration profiles during very-high-gravity ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 69, 41-47. Doi: 10.1016/j.bej.2012.07.019
- STRATFORD, M., STEELS, H., NEBE-VON-CARON, G., NOVODVORSKA, M., HAYER, K., ARCHER, D. B. (2013). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 126-134. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.025
- SUN, S. Y., GONG, H. S., JIANG, X. M., ZHAO, Y. P. (2014). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. *Food Microbiology*, 44, 15-23. Doi: 10.1016/j.fm.2014.05.007
- SUN, S. Y., JIANG, W. G., ZHAO, Y. P. (2011). Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains on the profile of volatile compounds and polyphenols in cherry wines. *Food Chemistry*, 127(2), 547-555. Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.039
- SUWANAGUL, A., RICHARDSON, D. G. (1998). Identification of Headspace Volatile Compounds from Different Pear. *Acta Horticulturae*, 475, 605-624.
- SZEP, S., LUCIAN, G. (2008). *Transzportfolyamatok a kémiai és biokémiai rendszerekben*: Cermi Iasi. 188-243 p.
- TAN, P.-N., STEINBACH, M., KUMAR, V. (2012): *Bevezetés az Adatbányászatba*. Panem Kft., 832 p.
- TASNÁDI, P., SKRAPITS, L., GYÖRGY, B. (2013). *Mechanika I*. Budapest: Dialóg Campus Kiadó.
- TAVARIA, F. K., DAHL, S., CARBALLO, F. J., MALCATA, F. X. (2002). Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. [Article]. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2462-2470. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74328-2
- TÖRVÉNYHOZÁS, M. (2008): *2008. évi LXXIII. törvény a pálinkáról, a törkölypálinkáról és a Pálinka Nemzeti Tanácsról*. Magyar Közlöny- és Lapkiadó Kft, p.,
- TÓTH, E., SURÁNYI, D. (1980). *Szilva*. Budapest: Mezőgazda Kiadó.
- TÓTH, M. (1997). *Gyümölcsészet* (1 ed.). Nyíregyháza: Primom Kiadó.
- TÓTH, M. (2001). *Gyümölcsészet* (2 ed.). Nyíregyháza: Primom Kiadó.
- TÓTH, M. (2009). *Gyümölcsfaj- és fajtaismeret*: Budapesti Corvinus Egyetem, Gyümölcstermő Növények Tanszék.
- TÓTH, M., FICZEK, G. (2013): *Nyersanyagismeret. Gyümölcsfajták*. Budapesti Corvinus Egyetem, Gyümölcstermő Növények Tanszék, 145 p., Doi:

- TÓTHNÉ, P. L. (2011): *A kutatómódszertan matematikai alapjai. Eszterházy Károly Főiskola*, p., Doi:
- TROYA, F., LERMA-GARCÍA, M. J., HERRERO-MARTÍNEZ, J. M., SIMÓ-ALFONSO, E. F. (2015). Classification of vegetable oils according to their botanical origin using n-alkane profiles established by GC–MS. *Food Chemistry*, 167, 36-39. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.116
- UEBELACKER, M., LACHENMEIER, D. W. (2011). Quantitative Determination of Acetaldehyde in Foods Using Automated Digestion with Simulated Gastric Fluid Followed by Headspace Gas Chromatography. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2011, 907317. Doi: 10.1155/2011/907317
- URSO, R., RANTSIU, K., DOLCI, P., ROLLE, L., COMI, G., COCOLIN, L. (2008). Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1053-1062. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00364.x
- VARARU, F., MORENO-GARCÍA, J., ZAMFIR, C.-I., COTEA, V. V., MORENO, J. (2016). Selection of aroma compounds for the differentiation of wines obtained by fermenting musts with starter cultures of commercial yeast strains. *Food Chemistry*, 197, Part A, 373-381. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.111
- VILLALOBOS-ACUÑA, M., MITCHAM, E. J. (2008). Ripening of European pears: The chilling dilemma. *Postharvest Biology and Technology*, 49(2), 187-200. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.03.003
- VILLALOBOS-ACUÑA, M. G., BIASI, W. V., FLORES, S., JIANG, C.-Z., REID, M. S., WILLITS, N. H., MITCHAM, E. J. (2011). Effect of maturity and cold storage on ethylene biosynthesis and ripening in ‘Bartlett’ pears treated after harvest with 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology*, 59(1), 1-9. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.08.001
- VILLAMIEL, M., POLO, M. C., MORENO-ARRIBAS, M. V. (2008). Nitrogen compounds and polysaccharides changes during the biological ageing of sherry wines. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1842-1846. Doi: 10.1016/j.lwt.2008.02.012
- WALKER, G. M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester, England: John Wiley and Sons.
- WANG, H., CHENG, X., SHI, Y., LE, G. (2015). Preparation and structural characterization of poly-mannose synthesized by phosphoric acid catalyzation under microwave irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 121, 355-361. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.046>
- WARTH, A. D. (1989). Relations among cell-size, membrane-permeability, and preservative resistance in yeast species. [Article]. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2995-2999.
- WARTH, A. D. (1989). Relationships Between The Resistance of Yeasts to Acetic Acid, Propanoic acid, and benzoic Acids and to Methyl Parababen and pH [Article]. *International Journal of Food Microbiology*, 8(4), 343-349. Doi: 10.1016/0168-1605(89)90005-6
- WEBER, J. V., SHARYPOV, V. I. (2009). Ethyl carbamate in foods and beverages: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 7, 233–247.

- WEI, S., TAO, S., QIN, G., WANG, S., TAO, J., WU, J., WU, J., ZHANG, S. (2016). Transcriptome profiling reveals the candidate genes associated with aroma metabolites and emission of pear (*Pyrus ussuriensis* cv.). *Scientia Horticulturae*, 206, 33-42. Doi: 10.1016/j.scienta.2016.04.019
- WIKIPEDIA, S. (2013). *Brandies: Brandy, Cognac, Calvados, Pisco, Slivovitz, Pálinka, Rakia, Brandy de Jerez, Tuica, Eau de Vie, Tsipouro, Cîroc, Mendis Brandy, Ararat, Dama*: University-Press Org.
- WYLLIE, S. G., FELLMAN, J. K. (2000). Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). [Article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3493-3496. Doi: 10.1021/jf0001841
- XIAO, K., ZHOU, Y., GUO, C., MASPOLIM, Y., NG, W. J. (2016). Impact of undissociated volatile fatty acids on acidogenesis in a two-phase anaerobic system. *Journal of Environmental Sciences*, 42, 196-201. Doi: 10.1016/j.jes.2015.06.015
- YANG, J., CHENG, Q. (2015). A comparative study of independent component analysis with principal component analysis in geological objects identification. Part II: A case study of Pinghe District, Fujian, China. *Journal of Geochemical Exploration*, 149, 136-146. Doi: 10.1016/j.gexplo.2014.11.014
- YI, X.-K., LIU, G.-F., RANA, M. M., ZHU, L.-W., JIANG, S.-L., HUANG, Y.-F., LU, W.-M., WEI, S. (2016). Volatile profiling of two pear genotypes with different potential for white pear aroma improvement. *Scientia Horticulturae*, 209, 221-228. Doi: 10.1016/j.scienta.2016.06.034
- YOUNG, H., GILBERT, J. M., MURRAY, S. H., BALL, R. D. (1996). Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71(3), 329-336.
- ZHU, Z., ZHANG, S., LIU, H., SHEN, H., LIN, X., YANG, F., ZHOU, Y. J., JIN, G., YE, M., ZOU, H., ZHAO, Z. K. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodosporidium toruloides*. [Article]. *Nat Commun*, 3, 1112. Doi: 10.1038/ncomms2112
- ZIÓLKOWSKA, A., WAŚOWICZ, E., JELEŃ, H. H. (2016). Differentiation of wines according to grape variety and geographical origin based on volatiles profiling using SPME-MS and SPME-GC/MS methods. *Food Chemistry*, 213, 714-720. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.06.120
- ZLATIC, E., ZADNIK, V., FELLMAN, J., DEMŠAR, L., HRIBAR, J., ČEJČ, Ž., VIDRIH, R. (2016). Comparative analysis of aroma compounds in 'Bartlett' pear in relation to harvest date, storage conditions, and shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 117, 71-80. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2016.02.004