Potencijal korištenja sirutke u proizvodnji alkoholnog pića

Kazalac, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:739552

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

POTENCIJAL KORIŠTENJA SIRUTKE U PROIZVODNJI ALKOHOLNOG PIĆA

DIPLOMSKI RAD

Josipa Kazalac

Zagreb, rujan, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mlijeka

POTENCIJAL KORIŠTENJA SIRUTKE U PROIZVODNJI ALKOHOLNOG PIĆA

DIPLOMSKI RAD

Josipa Kazalac

Mentor: prof. dr. sc. Samir Kalit

Neposredni voditelj: dr. sc. Darija Bendelja Ljoljić

Zagreb, rujan, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Josipa Kazalac**, JMBAG 0178111021, rođena 21.05.1997. u Puli, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

POTENCIJAL KORIŠTENJA SIRUTKE U PROIZVODNJI ALKOHOLNOG PIĆA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

_____

Potpis studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Josipa Kazalac**, JMBAG 0178111021, naslova

POTENCIJAL KORIŠTENJA SIRUTKE U PROIZVODNJI ALKOHOLNOG PIĆA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. Prof. dr. sc. Samir Kalit mentor _____
2. Doc. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar član _____
3. Doc. dr. sc. Marin Mihaljević Žulj član _____

Zahvala

Prvenstveno ovime zahvaljujem mentoru, prof. dr. sc. Samiru Kalitu, na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju prilikom izrade diplomskog rada. Hvala na strpljenju, pomoći i slobodi u pisanju. Još jednom veliko hvala jer ste bili uvijek na raspolaganju i prenijeli mi mnogo znanja, što pokazuje kvalitetu predavača i mentora.

Veliko hvala i dr. sc. Dariji Bendelja Ljoljić na pomoći, susretljivosti i uvijek vedroj atmosferi u proteklih pet godina studiranja.

Također, zahvaljujem doc. dr. sc. Ivi Dolenčić Špehar i doc. dr. sc. Marinu Mihaljević Žulj na izdvojenom vremenu, sugestijama i pomoći.

Neizmjerno hvala najvećem uzoru, ujaku dipl. ing. agr. Silvanu Orbaniću, na nesebičnom prenesenom znanju i vještinama te na financijskoj, tehničkoj i emocionalnoj podršci prilikom realizacije ovog projekta.

Hvala svim mojim prijateljima koji su mi bili velika podrška tijekom studiranja, dijelili sa mnom dobre i loše dane te uvijek bili spremni pomoći. Bez vas sve bi bilo mnogo drugačije.

Najviše zahvaljujem roditeljima i sestri, svojim najbližima i cijeloj velikoj obitelji. Hvala vam što ste mi omogućili bezbrižne studentske dane i hvala što ste uvijek vjerovali u mene. Najveće hvala na svakodnevnoj pruženoj ljubavi i podršci.

Ova diploma nije samo moja, nego je i vaša!

Na kraju, zahvaljujem svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ovog diplomskog rada.

Hvala Vam!

Sadržaj

1. UVOD 3

2. PREGLED LITERATURE 5

2.1. Općenito o sirutci i kemijski sastav sirutke 5

2.2. Proteini sirutke 7

2.3. Biološka i nutritivna vrijednost proteina sirutke 8

2.4. Oblici proteina sirutke 8

2.5. Funkcionalna svojstva proteina sirutke 9

2.6. Zdravstvena vrijednost sirutke 9

2.7. Ekološki značaj sirutke 10

2.8. Gospodarenje sirutkom 11

2.8.1. Fermentacija sirutke i proizvodnja alkohola 12

2.8.2. Karakteristike kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp*. marxianus* u fermentaciji sirutke 14

2.8.3. Destilacija alkohola iz fermentirane sirutke 16

2.8.4. Jaka alkoholna pića na bazi sirutke 18

3. MATERIJALI I METODE 18

3.1. Analiza sirutke prije i tijekom fermentacije 21

3.2. Analiza destilata fermentirane sirutke 21

4. REZULTATI I RASPRAVA 23

4.1. Sastav sirutke prije, tijekom i na kraju fermentacije 23

4.2. Sadržaj laktoze u sirutci prije, tijekom i nakon fermentacije 26

4.3. Kretanje vrijednost pH i SH° prije, tijekom i na kraju fermentacije.....27

4.4. Sastav destilata sirutke.....29

5. ZAKLJUČAK 21

6. POPIS LITERATURE.....22

PRILOZI 28

ŽIVOTOPIS.....29

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Josipe Kazalac**, naslova

POTENCIJAL KORIŠTENJA SIRUTKE U PROIZVODNJI ALKOHOLNOG PIĆA

U proizvodnji sira glavni nusproizvod je sirutka. Sirutka je veliki zagađivač okoliša budući da sadrži više od 6% organske tvari. Osim u proizvodnji albuminskih sireva, bioplina, laktoze i sirutke u prahu, sirutka kao sirovina se posljednjih desetak godina koristi i u proizvodnji raznih alkoholnih pića kao što je primjerice votka od sirutke. Pri tome, sastav sirutke može utjecati na sastav destilata i konačnu kvalitetu proizvoda. Cilj ovog rada bio je istražiti potencijal proizvodnje alkoholnog pića iz sirutke zaostale nakon proizvodnje istarske skute. U pokusnim uvjetima u mini sirani obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva na području Istre proizvedene su 3 šarže istarske skute. Sirutka zaostala nakon proizvodnje istarske skute povrgnuta je fermentaciji u duplikatoru korištenjem kulture kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*. Za potrebe ovoga rada provedena je destilacija fermentirane sirutke, a uzorci su potom analizirani na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Destilatu alkoholne jakosti 35% utvrđen je sastav, a dobiveni spojevi su: acetaldehid, metanol, n-propanol, i-butanol, n-butanol, 3-metil-1-ol, 2-metilbutan-1-ol te etil-laktat. Dobiveni destilat upućuje na to da postoji potencijal korištenja sirutke u proizvodnji alkohola. No, u budućnosti je potrebno provesti dodatna istraživanja u svrhu kontrole čimbenika proizvodnje i destilata, zbog mogućeg štetnog djelovanja pojedinih hlapivih spojeva na ljudsko zdravlje.

Ključne riječi: sirutka, alkoholna fermentacija, *Kluyveromyces marxianus* spp., bio-alkohol

Summary

Of the master's thesis – student **Josipa Kazalac,** entitled

POTENTIAL OF USING WHEY IN PRODUCTION OF ALCOHOLIC BEVERAGES

In cheese production the main by-product is whey. Whey is a major polluter of the environment as it contains more than 6% organic matter. In addition to the production of albumin cheeses, biogas, lactose and whey powder, whey as a raw material has been used in the production of various alcoholic beverages such as whey vodka. The composition of the whey may affect the composition of the distillate and the final quality of the product. The aim of this study was to investigate the production potential of alcoholic beverages from whey left over from the production of Istrian *skuta* cheese. In experimental conditions, 3 batches of Istrian *skuta* cheese were produced in the mini cheese factory of a family farm in Istria. Whey left over from the production was fermented in a duplicator using a culture of the yeast *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*. For the purposes of this work, fermented whey was distilled, and the samples were analyzed at the Faculty of Agriculture, University of Zagreb. The 35% alcoholic distillate was determined, and the obtained compounds were: acetaldehyde, methanol, n-propanol, i-butanol, n-butanol, 3-methyl-1-ol, 2-methylbutan-1-ol and ethyl lactate. The obtained distillate indicates that there is a potential use of whey in the production of alcohol. However, in the future it is necessary to conduct some more research in order to control the factors of production and distillates, due to the possible negative effects of some volatile compounds on human health.

Keywords: whey, fermentation, *Kluyveromyces marxianus* spp., whey-based spirits

1. Uvod

Mlijeko je od davnina prisutno u prehrani ljudi i smatra se savršenom prirodnom hranom. Proizvodnja mlijeka započela je još 6 tisuća godina prije Krista s pripitomljavanjem domaćih životinja. Mlijeko, uz ostale mliječne proizvode, pripada skupini namirnica koju većina ljudi konzumira svakodnevno. Preradom mlijeka u sir kao nusproizvod dobivamo sirutku. Sirutka ili *mliječni serum*, je tekućina zeleno-žute boje koja zaostaje nakon koagulacije i odvajanja kazeina tijekom proizvodnje sira ili koncentriranog jogurta (Chandrapala, 2018), bez obzira na vrstu mlijeka koju koristimo (kravlje, kozje, ovčje ili bivolje).

Sirutka je dugo bila zanemarena i podcijenjena, a karakterizira ju to što je glavni nus-proizvod u proizvodnji sireva. Tako se svakim proizvedenim kilogramom sira dobije 9 litara sirutke. Njezin sastav i svojstva ponajviše ovise o tehnologiji proizvodnje sira i drugih mliječnih proizvoda kao i o kakvoći korištenog mlijeka.

Zahvaljujući vrlo korisnim svojstvima sirutka se koristi u proizvodnji mnogih visokovrijednih namirnica. Proizvođači hrane koriste sirutku kao poseban sastojak i/ili dodatak. Tako sirutku kao izvor nutrijenata možemo pronaći u funkcionalnim namirnicama, ali i u trgovinama zdrave hrane kao dodatak prehrani koji je dostupan široj populaciji ljudi. Prema izvješću *European Dairy Association* iz 2016. godine, navodi se da godišnja proizvodnja sirutke u svijetu iznosi oko 190 milijuna tona, od čega je oko 6 milijuna tona sirutke proizvedeno u Europi, a svega 197 tisuća tona u Republici Hrvatskoj. Zadnjih godina prisutan je trend rasta proizvodnje sira te se količina proizvedene sirutke u svijetu povećava svake godine za 1-2% (Çelik i Yuksel, 2016.).

Od davnina, sirutkom se većinom hranila stoka, no zbog iznimno visoke biološke i nutritivne vrijednosti u zadnje vrijeme sirutka je sve više prisutna i u prehrani ljudi. Konzumira se najčešće kao napitak ili dodatak raznim jelima i desertima. Sirutka je drevni lijek koji je preporučivao i sam Hipokrat. Sirutka je namirnica iznimno niske energijske vrijednosti, otprilike 30 kcal na 100 grama.

Znanstvene studije otkrile su brojne zdravstvene dobrobiti sirutke koje se očituju u svakodnevnoj konzumaciji sirutke ili napitaka na bazi sirutke. Proteini sirutke sadrže sve esencijalne aminokiseline koje su lako probavljive i potpuno iskoristive u organizmu što ide u prilog blagodatima konzumacije sirutke. Sirutka zbog svog sastava ima veliki potencijal za daljnje iskorištavanje prvenstveno u prehrambenoj, no i drugim industrijama čime bi se smanjila količina neadekvatno zbrinute sirutke (Blažić i sur., 2018). Osim što je prisutna u prehrani ljudi i hranidbi životinja, sirutka ipak predstavlja i veliku opasnost za okoliš jer sadrži više od 6% organske tvari koju čine laktoza, proteini, mliječna mast, mineralne tvari i vitamini.

Zbog velikih količina proizvedene sirutke koju većinom nije moguće plasirati na ograničena tržišta kao sastojak u prehrani ljudi, ili hranidbi domaćih životinja potrebno je pronaći još neke načine zbrinjavanja i/ili ponovnog iskorištenja sirutke kako bi izbjegli potencijalnu opasnost njezinog nekontroliranog ispuštanja u okoliš. Sirutka je veliki zagađivač okoliša. Približno 50% sirutke iskoristi se za proizvodnju albuminskih sireva, bioplina, laktoze

ili sirutke u prahu (Tratnik, 2003.). Zbog posljedica koje sirutka ostavlja na okoliš već duže vrijeme se istražuju i razvijaju tehnološki i biotehnološki procesi iskorištavanja sirutke i proizvodnje proizvoda dodane vrijednosti (Charles Ling, 2008.). Mogućnost njezinog daljnjeg iskorištenja leži u proizvodnji bio-alkohola (bio-etanola). Tako je u posljednjih desetak godina sirutka postala sirovina za proizvodnju raznih alkoholnih pića kao što je primjerice votka (Hamilton i Wansbrough, 2017). Znanstvenici ulažu veliki napor kako bi unaprijedili tehnologiju fermentacije sirutke. Sastav sirutke može uvelike utjecati na sastav destilata i konačnu kvalitetu proizvoda što je od velike važnosti za popularizaciju takvih napitaka na tržištu.

Laktoza iz sirutke može poslužiti kvascima kao supstrat za proizvodnju bio-alkohola (Duvnjak, 1983.). Proizvodnja alkohola i alkoholnih napitaka u stalnom je porastu te je upravo fermentacija sirutke za proizvodnju alkohola zadnjih godina postala interesantna. Fermentacija sirutke može se provesti korištenjem različitim vrsta kvasaca, a obično se koriste kvasci koji se koriste i za fermentaciju druge hrane. Znanstvenici se bave što boljom optimizacijom uvjeta fermentacije kako bi se sirutka što bolje iskoristila. Bio-alkohol, osim što može biti sirovina za industriju alkoholnih pića može se iskoristiti i kao pogonsko bio-gorivo. Također dobiveni alkohol može poslužiti i kao sirovina u farmaceutskoj i industriji proizvodnje sredstava za čišćenje.

Način izvedbe samog procesa fermentacije od velike je važnosti za dobivanje visokokvalitetnih proizvoda, stoga je potrebno pratiti uvjete koji utječu na fermentaciju, kao što su temperatura, brzina miješanja, početna koncentracija inokuluma i samog supstrata te količina otopljenog kisika zbog optimalne fermentacije kvasaca u aerobnim uvjetima. Naglasak je na razvoju same tehnologije kako bi se ujedno optimizirali troškovi proizvodnje te sama proizvodnja postala prihvatljivija za ulaganje (Sansonetti i sur., 2009.).

Ideja za izradu ovoga rada proizašla je iz činjenica o vrijednostima sirutke kao sirovine te problemom onečišćenja okoliša nekontroliranim ispuštanjem većih količina sirutke u okolinu. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio istražiti potencijal proizvodnje alkoholnog pića iz sirutke zaostale nakon proizvodnje istarske skute od kravljeg mlijeka.

2. Pregled literature

2.1. Općenito o sirutci i kemijski sastav sirutke

Postoje dvije vrste sirutke. *Slatka* sirutka, nastala preradom mlijeka u različite meke, polutvrde i tvrde sireve te *kisela* sirutka koja se izdvaja prilikom mliječno- kisele fermentacije u proizvodnji svježih sireva. Slatka sirutka sadrži malu količinu mliječne kiseline jer se za koagulaciju kazeina koristi sirilo, dok se kisela sirutka dobiva precipitacijom kazeina pomoću kiselina, te shodno tomu sadrži veće količine mliječne kiseline (Risner i sur., 2019.).

Glavni način dobivanja sirutke je kroz tehnološki proces proizvodnje sira ili kazeina, pri čemu se samo 10-20% mlijeka iskoristi za proizvod, a 80-90% odlazi u sirutku (Popović-Vranješ i Vujičić, 1997.). Najveće količine sirutke zaostaju nakon proizvodnje tvrdih sireva, ali i u procesu proizvodnje nekih drugih mliječnih proizvoda možemo dobiti sirutku, npr. grčkog ili koncentriranog jogurta. Proteini sirutke pokazuju veću hidrofilnost u usporedbi s kazeinom pa su proteini sirutke stabilniji na utjecaj kiselina i/ili enzima te zbog toga zaostaju u sirutci nakon koagulacije kazeina i odvajanja sirnog gruša. Najveći udio sirutke čini voda, dok je suhe tvari oko 6%. (Tablica 2.1.). U procesu prerade u sirutku prelazi oko 50% suhe tvari mlijeka pri čemu mnogi hranjivi sastojci mlijeka zaostaju u sirutci (Matijević, 2018). Od ukupne suhe tvari sirutke laktoza čini i do 85%, proteini sirutke oko 10% te sadrži nešto minerala i mliječne masti (Blažić i sur., 2018.). Sirutka je izvrstan izvor riboflavina koji joj daje karakterističnu žuto-zelenu boju te se dnevna potreba organizma za riboflavinom može zadovoljiti jednom litrom sirutke (Slika 2.1.).

Laktoza je vrijedan sastojak sirutke te zbog toga ne smije biti zanemarena u daljnjem iskorištavanju sirutke. U mlijeku se laktoza pojavljuje u obliku otopine. Kravlje mlijeko u prosjeku sadrži oko 4,9% laktoze. Preradom mlijeka u sir, u sirutku dospijeva gotovo sva laktoza te je njezin udio u suhoj tvari sirutke oko 70%.

Tablica 2.1. Sastojci suhe tvari i njihov udio u suhoj tvari sirutke

Sastojci suhe tvari	g/100mL	% od ukupnih
Laktoza	4,66	71,7
Proteini	0,91	14,0
Minerali	0,5	7,7
Mliječna mast	0,37	5,7
Ostalo	0,06	0,9
Ukupno	6,50	100,0

Izvor: Tratnik (1998.)



Slika 2.1. Izgled sirutke

2.2. Proteini sirutke

Sirutka obiluje sirutkinim proteinima koji su najvrjedniji sastojak sirutke, a čine ih α-laktalbumin, ß-laktoglobulin, imunoglobulini, laktoferini i albumini krvnog seruma. Sirutka sadrži i slobodne aminokiseline, neke enzime te proteoze i peptone (Tablica 2.2.). Udio sirutkinih proteina u kravljem mlijeku iznosi oko 20%, dok je udio kazeina oko 80%.

Tablica 2.2. Sastav proteina kravljeg mlijeka

Proteini	Količina u mlijeku ($g\ kg^{-1}$)	Udio od ukupne količine (%)
Kazein (ukupno)	26,0	79,5
α_{s1} -kazein	10,0	30,6
α_{s2} -kazein	2,6	8,0
β-kazein	10,1	30,8
κ-kazein	3,3	10,1
Sirutkini proteini	**6,3**	**19,3**
α- laktalbumin	1,2	3,7
β- laktoglobulin	3,2	9,8
imunoglobulini	0,7	2,1
Proteoze i peptoni	0,8	2,4
Proteini ukupno	**32,7**	**100,0**

Izvor: Antunac i Havranek (2013.)

Udio ukupnih proteina u suhoj tvari mlijeka iznosi oko 30%, a ostatak otpada na mliječnu mast, mliječni šećer laktozu, vitamine i minerale. U sirutku prelazi oko 50 % ukupne suhe tvari mlijeka. Najveći dio suhe tvari sirutke, oko 70% čini laktoza. Po strukturi proteini sirutke su kompaktni globularni proteini s relativno podjednakom raspodjelom niza nepolarnih, polarnih, neutralnih te nenabijenih ili nabijenih ostataka aminokiselina. Intramolekularna struktura ovih proteina rezultat je disulfidnih veza (S-S), tj. *disulfidnih mostova*, između ostataka cisteina (Tratnik, 1998.).

2.3. Biološka i nutritivna vrijednost proteina sirutke

Proteini sirutke imaju vrlo visoku biološku vrijednost. Proteini jajeta imaju biološku vrijednost 100, što se uzima kao referentna vrijednost. Biološka vrijednost za kazein je 76, a ukupna biološka vrijednost proteina mlijeka je 88, dok proteini sirutke dosežu biološku vrijednost čak od 110. α-laktalbuminu svojim aminokiselinskim sastavom blizu je biološkog optimuma što potvrđuje činjenicu da proteini sirutke imaju veću biološku, a ujedno i nutritivnu vrijednost od kazeina (Tratnik, 2003.).

Razlog većoj biološkoj vrijednosti proteina sirutke u odnosu na proteine mlijeka proizlazi iz većeg udjela lizina i tioaminokiselina u aminokiselinskom sastavu proteina sirutke. Proteini sirutke također predstavljaju i dobar izvor razgranatih aminokiselina valina, leucina i izoleucina (Tratnik, 1998.).

Nutritivna vrijednost proteina sirutke ovisi o udjelu pojedinih aminokiselina koje se apsorbiraju u probavnom sustavu. Proteini sirutke se u velikoj mjeri koriste za povećanje nutritivne vrijednosti mliječnih, ali i ostalih prehrambenih proizvoda (Tratnik, 1998.).

2.4. Oblici proteina sirutke

Proteini sirutke, kao dodatci prehrambenim proizvodima, na tržištu se pojavljuju u obliku *izolata proteina sirutke (IPS)* i *koncentrat proteina sirutke (KPS)*. Izolat proteina sirutke sadrži veći postotak proteina (više od 90% proteina u suhoj tvari) od koncentrata proteina sirutke koji ima oko 50 do 70% proteina u suhoj tvari (Tratnik, 2003.).

Razvojem i popularizacijom *fitness* industrije*, sirutkini* proteini (eng. *whey protein*) postaju sve traženiji, a upravo je sirutka glavna sirovina za njihovu proizvodnju. Zbog toga, je zadnjih godina potražnja za sirutkom na tržištu vrlo velika te je intencija maksimalno iskoristiti sve njezine prednosti.

2.5. Funkcionalna svojstva proteina sirutke

Proteini sirutke imaju vrlo specifična funkcionalna svojstva te se upravo zbog tih svojstava često koriste kao dodaci u prehrambenoj industriji. Neka od funkcionalnih svojstava proteina sirutke potječu od sposobnosti (Tratnik, 1998.):

- bubrenja (vezivanja vode)
- emulgiranja
- želiranja
- stvaranja pjene te
- denaturiranja

Topljivost proteina sirutke vrlo je važna za osiguravanje dobrog emulgiranja i želiranja prilikom procesa proizvodnje hrane u koju se proteini sirutke dodaju. Denaturacija započinje već na temperaturama iznad 60 °C dok na temperaturama iznad 90 °C u trajanju od 10 minuta proteini sirutke potpuno denaturiraju. Svojstvo vezivanja vode važno je u mljekarskoj industriji prilikom proizvodnje fermentiranih mliječnih proizvoda.

Sposobnost želiranja usko je povezana sa sposobnošću bubrenja jer prilikom povišenja temperature sirutkini proteini vežu na sebe veliku količinu vode te tako stvaraju želatinozni gel. Emulgiranje se koristi u svrhu smanjenja površinske napetosti između hidrofobnih i hidrofilnih sastojaka hrane, kako bi se ti sastojci što bolje povezali u jednoličnu, kompaktnu smjesu.

Proteini sirutke se u mljekarskoj industriji koriste već duže vrijeme zbog prehrambenih i funkcionalnih svojstava, ali u posljednje vrijeme sve se više primjenjuju i u drugim prehrambenim industrijama, kao što su pekarska i mesna industrija te u industriji proizvodnje hrane za dojenčad (Tratnik, 2003.).

2.6. Zdravstvena vrijednost sirutke

Interes za iskorištenjem sirutke povećava se i zbog potencijalne zdravstvene dobrobiti. Naime, proteini sirutke djeluju antikancerogeno. Također, imaju i povoljan učinak na imunološki sustav, djeluju antihipertenzivno te snižavaju kolesterol u krvi. Uz navedeno, proteini sirutke mogu pomoći u regeneraciji i povećanju mišićne mase vježbanjem. Proteini sirutke mogu smanjiti krvni tlak za što su zaslužni bioaktivni peptidi kojima sirutka obiluje (Chavan i sur., 2015.).

Proteini sirutke mogu pomoći u liječenju upalnih procesa crijeva ili u kontroli dijabetesa tipa 2 te poboljšavaju antioksidativnu sposobnost organizma. Vrlo su vrlo zasitni što ih čini

korisnim dodatkom prehrani za mršavljenje jer pomažu u kontroli tjelesne težine (McGregor i Poppitt, 2013).

Imunoglobulini i nespecifični imunoaktivni sastojci sirutkinih proteina s antimikrobnim svojstvima odgovorni su za jačanje imunološkog sustava (Tratnik, 1986.). Posljednjih godina sve se više istražuje utjecaj sirutkinih proteina na inhibiciju rasta stanica tumora (Bounous i sur., 1991.). Također znanstvenici istražuju pozitivan učinak proteina sirutke na redukciju stresa i smanjenje razine hormona kortizola u organizmu. Znanstveno je dokazano i da sirutka pomaže u regeneraciji jetre i čišćenju organizma od štetnih toksina (Onwulata i Huth, 2008.).

Osim što proteini sirutke sudjeluju u poboljšavanju općeg imunološkog statusa organizma, doprinose i sintezi hormona sreće *serotonina* u mozgu, regulaciji apetita (Leidy i sur., 2011.) pa čak mogu utjecati i na *biološki sat*.

Udio mineralnih tvari u sirutki može biti vrlo promjenjiv, što je posljedica različitih biokemijskih procesa koji se odvijaju tijekom proizvodnje sira i skladištenja sirutke. Sirutka obiluje vitaminima B i C koji su važni za metabolizam energije i jačanje imunološkog sustava organizma. Udio vitamina topivih u mastima (A , D, E i K) ovisi o količini zaostale mliječne masti u sirutci (Antunac i sur., 2011.).

Uloga laktoze u sirutci je: poticanje peristaltike crijeva i pomaže u apsorpciji kalcija, magnezija i fosfora u organizmu. Također, osigurava optimalnu probavu masti i ostalih hranjivih tvari u organizmu. Laktoza iz sirutke uspostavlja blago kiselu reakciju u crijevima, te na taj način onemogućuje rast i razmnožavanje patogenih bakterija (Onwulata i Huth, 2008.).

2.7. Ekološki značaj sirutke

Samo polovina proizvedene sirutke biva ponovo iskorištena, a ostatak najčešće završi u prirodi što predstavlja veliku opasnost za okoliš. Posebno zbog kemijskog sastava i bioaktivnih tvari prisutnih u sirutci, ona predstavlja ozbiljan ekološki problem, s obzirom na visoke vrijednosti KPK (kemijska potrošnja kisika) i BPK (biološka potrošnje kisika).

Sirutkom se može onečistiti okoliš pa se u posljednje vrijeme nastoje iznaći učinkovita i trajna rješenja zbrinjavanja sirutke kako bi se očuvala prirodna staništa mnogih biljnih i životinjskih vrsta u mikro sredinama gdje se mlijeko prerađuje u sir.

Najjednostavniji način zbrinjavanja sirutke bio bi ispustiti višak u okoliš, no to za očuvanje okoliša nikako nije prihvatljivo budući da se zagađuju vodotoci i ugrožava biljni i životinjski svijet. Naime, mljekarska industrija kao i ostale industrije svakodnevno se suočavaju s problemom otpadnih materijala. Oni trebaju biti obrađeni prije ispuštanja u prirodne vodotoke ili na zemljišta, što je neisplativo za industriju i proizvodnju manjeg kapaciteta. Obrada takvih nusproizvoda može biti dosta skupa i tako znatno utjecati na cijenu samog proizvoda (Matijević, 2018.).

S druge strane nesavjesno zbrinjavanje sirutke predstavlja ozbiljan gubitak sirovine. *Chemical oxygen demand (COD),* kemijska potrošnja kisika sirutke iznosi od 50 do 80 g/L, a *biochemical oxygen demand (BOD),* tj. biokemijska potrošnja kisika iznosi od 40 do 60 g/L (Lappa i sur., 2019.). Navedeno nam potvrđuje da je potrebno dodatno iskoristiti sirutku kao sirovinu, ne samo iz aspekta njezine daljnje prerade, nego i iz aspekta smanjenja otpadnog materijala iz industrije prerade mlijeka u sir. Tako proces fermentacije sirutke može smanjiti njezinu biološku potrošnju kisika za 75%. Već spomenuta visoka biološka potrošnja kisika sirutke za kisikom, uzrokuje velike probleme zagađenja okoliša ako se sirutka ispušta izravno u vodotoke (Christian-Urbina i sur. 2000.). Stoga se nastoji i kroz pokretanje proizvodnje alkohola fermentacijom sirutke smanjiti problem sirutke kao potencijalnog zagađivača okoliša.

Sirutka u količini od jedne tone ispuštena u sustav za obradu otpadnih voda prouzroči opterećenje jednako onom koje uzrokuje otprilike 470 ljudi dnevno. Neke proizvodnje dnevno mogu ispustiti i do 150 m^3 neiskorištene sirutke, što je onda ekvivalent količini otpada koju proizvedu ljudi u gradu srednje veličine. Također, za biološku je oksidaciju jednog m^3 sirutke ispuštene u prirodne vodotoke potrebno 4,500 m^3 nezagađene, aerirane vode. To može dovesti do većeg rasta algi i značajnog smanjenja razine kisika u vodotocima što u više aspekata negativno djeluje na biljni i životinjski svijet vodenog ekosustava (Tunick, 2008.).

S obzirom na vrijedne sastojke koje sirutka sadrži, ali i štetne posljedice koje može imati za okoliš, znanstvenici proučavaju različite alternativne mogućnosti ekonomski isplative prerade sirutke u vrijedne sirovine ili proizvode (Matijević, 2018.).

Osim s aspekta ekologije, višak sirutke predstavlja i ekonomski gubitak za sirarsku industriju. S procijenjenom svjetskom proizvodnjom od oko 190 milijuna tona godišnje, a zbog visokog organskog opterećenja, sirutka ima veliki potencijal za daljnje iskorištenje. Vodeći proizvođači i prerađivači sirutke su države članice Europske unije i Sjedinjene Američke Države te zajedno čine oko 70% ukupne svjetske proizvodnje (Matijević, 2018.).

2.8. Gospodarenje sirutkom

Održivo gospodarenje sirutkom usmjereno je na biotehnološke i prehrambene metode razvoja proizvoda dodane vrijednosti Tratnik (2003) navodi da se novim tehnološkim procesima mogu proizvesti različiti prehrambeni proizvodi na bazi sirutke (prije svega koncentrati i izolati proteina sirutke).

Zbog velikog udjela vode prerada sirutke u napitke je najprihvatljivija i najisplativija. Stoga se danas na tržištu može pronaći čitava paleta sirutkinih napitaka. To su napitci proizvedeni od slatke ili kisele sirutke, od deproteinizirane sirutke, svježe sirutke, fermentirane sirutke ili sirutke razrijeđene vodom, pa sve do napitaka u prahu uz dodatak raznih aroma (Jeličić i sur. 2008.).

Sirutka je zbog kemijskog sastava (70% laktoze u suhoj tvari, mineralne tvari i vitamina) vrlo dobar supstrat za uzgoj mikroorganizama, stoga se zadnjih godina pridaje velika pažnja

mogućnostima biotehnološkog iskorištavanja sirutke u proizvodnji raznih proizvoda kao što su: sirutka u prahu, koncentrati i izolati proteina sirutke, napitci na bazi sirutke, albuminski sirevi, laktoza, , mliječna kiselina, βD-galaktozidaza, vitamini, funkcionalne hrane i pića, jestivih filmova i prevlaka, bioplastike, biogoriva, bioalkohola i drugih vrijednih bioloških proizvoda (Božanić i sur., 2014.).

Mnogi znanstvenici u području hrane razvili su napitke na bazi sirutke, poput vina od sirutke, fermentirana pića od sirutke koristeći zrna kefira i/ili uz pomoć bakterija mliječne kiseline, napitci od mješavine voća i sirutke, pića od sirutke s niskim udjelom alkohola te destilirani likeri (Dragone i sur., 2009.).

Sirutka je dobra podloga za rast mnogih vrsta mikroorganizama, a može biti sirovina i za pripravu raznih probiotičkih fermentiranih napitaka. Osim toga, zadnjih godina pod povećalom je i ideja korištenja sirutke kao supstrata za proizvodnju mliječne kiseline i bio-alkohola (Matijević i sur., 2011.).

2.8.1. Fermentacija sirutke i proizvodnja alkohola

Jedna od industrijskih primjena sirutke je upravo proizvodnja bio-etanola (Parashar i sur., 2016.), no trenutno je i dalje industrijska primjena sirutke u tom vidu vrlo ograničena. Drugi načini iskorištavanja ne bi samo smanjili otpad, već bi se i proizveli proizvodi dodane vrijednosti te tako i generirali novi prihodi (Zandona i sur., 2021.)

Naime, velike mljekarske industrije uz svoje pogone za preradu mlijeka nerijetko imaju i postrojenja za proizvodnju proizvoda čija je glavna sirovina sirutka. Najčešće su to pogoni za dehidraciju sirutke i proizvodnju različitih izolata, koncentrata te proteina sirutke u prahu. No, mljekarskim pogonima srednjeg i malog kapaciteta nije prihvatljiv dodatni trošak izgradnje skupih postrojenja za preradu sirutke te tako u tim uvjetima sirutka i dalje ostaje neiskorištena. Malim i srednjim proizvođačima cilj je zbrinuti sirutku bez dodatnih troškova, a po mogućnosti kroz djelomičnu prodaju napitaka ostvariti dodatnu zaradu. Zbog ovih izazova, proizvođači malog i srednjeg kapaciteta kontinuirano traže dodatne mogućnosti zbrinjavanja sirutke. Povrh toga, sustavi pročišćavanja otpadnih voda također su skupa investicija za male proizvodnje (eng. *small artisan creameries*), stoga proizvođači nastoje pronaći idealan način zbrinjavanja sirutke (Hughes i sur., 2018.). Nažalost, najčešće i dalje sirutka završava ispuštena u kanalizaciju gdje dospijeva u obližnje vodotoke i tako postaje opasna prijetnja za okoliš. Mljekare koje proizvode manje količine sirutke dio iste prodaju ili koriste u hranidbi domaćih životinja, najčešće svinja.

Fermentacija i destilacija sirutke mogu se izvršiti kako bi se dobio bio-etanol ili pitki alkohol. Fermentacija i destilacija sirutke za proizvodnju alkoholnih pića mogu biti dodatni izvor prihoda za male i srednje proizvođače. To omogućuje proizvodnju specifičnih proizvoda dodatne vrijednosti čija je tržišna cijena visoka.

Sirutka nakon proizvodnje skute jeftina je i dostupna sirovina u velikim količinama te može biti dobra zamjena za sirovine poput šećerne trske ili šećerne repe, kao i različitih poljoprivrednih kultura iz kojih se do sada dobivao bio-etanol (Božanić i sur., 2014.). Iako velike količine sirutke i dalje ostaju neiskorištene, proizvodnja bio-etanola može postati isplativija poboljšanjem tehnologije i smanjenjem troškova proizvodnje. Posljednjih godina fokus znanstvenog interesa je u proučavanju i optimizaciji uvjeta fermentacije kako bi sam proces bio prihvatljiviji za primjenu u proizvodnim uvjetima malih i srednjih gospodarstava. Uglavnom zbog niskog prinosa alkohola, fermentacija sirutke puno je kompleksnija od fermentacije žitarica, npr. pšenice ili kukuruza. Uz to, potencijalno su veći i troškovi samog rukovanja i prerade sirutke što je mogu učiniti manje interesantnom sirovinom za fermentaciju. Također, količina dobivenog alkohola ovisi i o vrsti sirutke koja fermentira pa tako slatka sirutka lakše fermentira od kisele sirutke (Risner i sur., 2019.).

Prilikom proizvodnje koncentrata i izolata proteina sirutke ili nakon procesa proizvodnje albuminskog sira skute iz sirutke ostaje *gotovo deproteinizirana sirutka* koja sadrži laktozu i odličan je supstrat za proizvodnju bio-etanola. Laktoza može služiti kvascima za proizvodnju alkohola. Fermentacija sirutke može se provesti s nekoliko vrsta kvasaca, a obično se koriste kvasci rodova *Saccharomyces cerevisiae, Candida pseudotropicalis* i *Kluyveromyces marxianus*. Kvasci *C. pseudotropicalis* i *Kluyveromyces marxianus* mogu izravno metabolizirati laktozu, dok *Saccharomyces cerevisiae* ne može metabolizirati laktozu te je potrebno provesti enzimatsku hidrolizu laktoze prije samog procesa fermentacije (Dragone i sur., 2011).

Sirutka se mora preraditi u što kraćem vremenskom periodu nakon same proizvodnje sira jer se inače povećava rizik od rasta bakterija mliječne kiseline koje mogu proizvesti dodatne količine mliječne kiseline koja djeluje inhibitorno na rast kvasaca što može utjecati na pravilnost fermentacije. Iako upotreba sirutke kao osnove za fermentaciju nije novi koncept, nego je poznat od 40-ih godina 20. stoljeća, sada se javlja sve veći interes za eksperimentiranje sa sirutkom, posebno zbog ideje o održivosti. Naime, fermentacija sirutke u bio-alkohol mogla bi zaključiti priču samo-održivosti neke proizvodnje zbog toga što bi se dobiveni bio-alkohol koristio kao pogonsko gorivo (Asunis i sur., 2020.), a tekući dio sirutke izdvojen nakon destilacije također može poslužiti kao tehnološka voda u rashladnim ili sličnim uređajima u samoj proizvodnji.

Upotreba sirutke kao sirovine za proizvodnju destilata polako postaje sve popularnija, ali još uvijek ograničena zbog brojnih problema koji se u samom procesu pojavljuju. Male mljekare većinom sirutku koriste za hranidbu vlastitih domaćih životinja, a velike mljekare proizvode toliko velike količine da im se ne isplati ući u suradnju s malim destilerijama koje bi koristile vrlo male količine sirutke. Možda budućnost jakih alkoholnih pića na osnovi sirutke leži negdje u sredini, tj. u suradnji između malih održivih zanatskih destilerija i mljekara srednjeg i malog kapaciteta.

Znanstvenici na Oregon State University smatraju da iako je potrebno utrošiti dodatnu energiju za pretvaranje sirutke u alkoholna pića, npr. votku, i dalje je to veliki doprinos očuvanju okoliša. Navode i da je došlo do značajnog smanjenja stakleničkih plinova, a proizvođači također mogu povećati svoje prihode, što čini ovaj način gospodarenja sirutkom

iznimno zanimljivim. Smatraju da bi se fermentiranje i destiliranje sirutke za izradu alkoholnih pića moglo lakše i jeftinije provesti nego npr. pretvaranje viška sirutke u proteinski prah. Postupak destilacije mogle bi obavljati mljekare samostalno ili bi se mogle stvoriti mljekarske zadruge.

2.8.2. Karakteristike kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus* u fermentaciji sirutke

Prilikom proizvodnje raznih fermentiranih proizvoda, posebice kod proizvodnje vina ili piva, kvasci se koriste kao bio-katalizatori. Također kvasci se upotrebljavaju u proizvodnji pekarskih proizvoda, etanola i drugih alkoholnih pića. Kvasci su jednostanični eukariotski mikroorganizmi koji se razmnožavaju pupanjem (Slika 2.) i odgovorni su za alkoholno vrenje. U prisutnosti ili odsutnosti kisika, kvasci pretvaraju šećere iz supstrata u etilni alkohol, dok se istovremeno oslobađa ugljikov dioksid .

Kroz povijest se taksonomija i broj vrsta unutar roda *Kluyveromyces* mijenjao, a 2003. su Kurtzman i Robnett prema filogenetskim svojstvima odredili šest vrsta roda *Kluyveromyces* (Fonseca i sur., 2008). Rod *Kluyveromyces* čine kvasci koji su izolirani iz voća, drveća, morske vode i mliječnih proizvoda. Danski mikolog Emil C. Hansen prvi je put opisao kvasac *Kluyveromyces marxianus* 1888. godine. Vrste koje su važne za mljekarsku industriju su *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus*, čiji sojevi sudjeluju u procesu proizvodnje kefira i nekih određenih vrsta sireva.

Kluyveromyces marxianus i *Kluyveromyces lactis* najpoznatiji su članovi roda *Kluyveromyces*. Po karakteristikama vrlo su slični, izuzetak je oblik njihovih spora. Zajednička im je sposobnost fermentacije laktoze, što upućuje na to da je *Kluyveromyces lactis* sličan *Kluyveromyces fragilis* (danas *Kluyveromyces marxianus*). Neki izvori navode ih i kao podvrste, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* i var. *marxianus*. Znanstvene studije često ističu da je *Kluyveromyces fragilis* organizam sa sposobnošću fermentacije laktoze, međutim, trenutno je to sinonim za *Kluyveromyces marxianus* (Lachance, 2011.). *Kluyveromyces marxianus* je mikroorganizam koji se također koristi za proizvodnju bio-etanola i alkoholnih pića iz sirutke ili permeata sirutke. Malo je poznatih vrsta kvasca koji imaju sposobnost metabolizirati laktozu u etanol, a *Kluyveromyces marxianus* je mikroorganizam koji se u velikoj mjeri koristi za pretvorbu laktoze u etanol. Osim za proizvodnju bio-etanola, *Kluyveromyces marxianus* koristi se i za industrijsku proizvodnju enzima: inulinaza, β-galaktozidaza, β-glukozidaza te endopoligalaktorunaza.

Osnovne karakteristike koje kvascu *Kluyveromyces marxianus* daju prednost pred drugim kvascima u industrijskoj proizvodnji su brz rast, tolerantnost na visoke temperature te proizvodnja etanola uz nastajanje minimalnih količina nusprodukata fermentacije (Lane i sur., 2011.). Generacijsko vrijeme iznosi oko 70 minuta što vrstu *Kluyveromyces marxianus* svrstava u skupinu eukariota s najvećom brzinom udvostručavanja (Lane i Morrissey, 2010.).

Sposobnost *Kluyveromyces marxianus* da pretvori laktozu u etanol poznata je u znanstvenim istraživanjima koja se tiču proizvodnje bio-etanola. Sojevi unutar vrste *Kluyveromyces marxianus* imaju različite afinitete za proizvodnju etanola s obzirom na stupanj genetičke modifikacije koji imaju (Fonseca i sur., 2008.). Tolerancija *Kluyveromyces marxianus* na etanol niža je od tolerancije *S. cerevisiae* i može ograničiti proizvodnju etanola (Zoppellari i sur., 2013.). *Kluyveromyces marxianus* tolerantan je na temperature od 45–50 °C (Marcišauskas i sur., 2019.) što ga čini idealnim za korištenje u fermentacijama koje se odvijaju pri višoj temperaturi, no optimalna temperatura za proizvodnju etanola pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus* je 40 °C (Yanasa, 2010.).

Kluyveromyces marxianus je općenito prepoznat kao mikroorganizam čiji produkti metabolizma nisu štetni za ljude, što je korisno za proizvođače pitkih alkoholnih pića. Kod ostalih mikroorganizama koji se koriste u proizvodnji hrane i pića (*K. lactis, S. cerevisiae i Escherichia coli*) znanstvenici su također ispitivali njihove mogućnosti pretvaranja laktoze u bio-etanol, no istraživanja su provedena samo u eksperimentalnim uvjetima koristeći genetski modificirane organizme. Upotreba genetski modificiranih organizama za proizvodnju alkoholnih pića nije uobičajena. To je vjerojatno zbog činjenice što potrošači ne žele konzumirati genetski modificirane organizme. *Kluyveromyces marxianus* ima sposobnost rasta na laktozi, galaktozi, glukozi, fruktozi, ksilozi i inulinu u hranjivim medijima gdje su ti šećeri jedini izvor ugljika (Pentjuss i sur., 2017.). Iz tog razloga sirutka, odnosno laktoza iz sirutke, predstavlja vrlo jeftinu i učinkovitu sirovinu za rast kvasaca *Kluyveromyces marxianus* (Zafar i Owais, 2006.).



Slika 2.2. *Kluyveromyces marxianus*
Izvor : ScienceDirect
https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/kluyveromyces-marxianus - pristup: 10.7.2021.

2.8.3. Destilacija alkohola iz fermentirane sirutke

Destilacija je proces izdvajanja alkohola i tvari komponenta arome nastalih alkoholnom fermentacijom šećera. Osim alkohola i vode pojavljuju se i neki drugi hlapljivi sastojci, kao npr. aldehidi, ketoni i esteri. Destilacija se temelji na različitim temperaturama vrelišta komponenata u smjesi. Cilj destilacije je izdvojiti etanol u povoljnom omjeru s ostalim primjesama kako bi destilat ima što bolje proizvodne i senzorne karakteristike.

Nakon što se šećeri iz sirutke, prvenstveno laktoza i ostali monosaharidi pretvoreni u etanol, potrebno je koncentrirati alkohol do jačine koja je primjerena za alkoholne proizvode. Prema literaturnim navodima prinos etanola pri fermentaciji sirutke kreće se od 2 do 5% vol/vol. Složenija oprema prilikom destilacije uvjetuje čišći destilat. Proces koncentriranja i pročišćavanja alkohola u sirovom destilatu na složenijim kotlovima za destilaciju, naziva se deflegmacijom. Također, redestilacija je postupak kada se destilacija provodi nekoliko puta u svrhu pročišćavanja destilata i uklanjanja nepoželjnih tvari.

Fermentirana sirutka djelovanjem kvasaca je zapravo razrijeđena otopina etanola u vodi, a taj je etanol potrebno koncentrirati kako bi se stvorila osnova samog alkoholnog pića. Međutim, ostale prisutne hlapljive komponente, bilo iz matične sirutke ili proizvedene tijekom fermentacije kao sekundarni metaboliti, nazivaju se kongeneri. Iako su ti spojevi prisutni u relativno niskim koncentracijama, mogu doprinijeti okusu destiliranog alkoholnog pića. Osoba koja provodi destilaciju mora donijeti odluku o tome koliko tih aroma potrebno zadržati u dobivenom alkoholnom piću pa se sukladno tomu provodi postupak redestilacije čak i nekoliko puta.

Sekundarni metaboliti fermentacije sirutke, uz etanol su i brojni esteri, kratkolančane masne kiselina i metil ketoni. Njihova prisutnost utječe na konačne osjetilne karakteristike žestokog pića i stoga bi trebala biti pod kontrolom, bilo fermentacijom ili razumnom destilacijom.

Esteri su spojevi koji u najvećoj mjeri doprinose kvaliteti rakija jer su odgovorni za njihova voćna i cvjetna senzorna svojstva. Sinteza estera odvija se tijekom fermentacije i u fazi dozrijevanja (maturacije) alkohola. U procesu fermentacije dolazi do esterifikacije između etanola i acetil-CoA dobivenog razgradnjom aminokiselina ili ugljikohidrata. Ove reakcije se odvijaju zahvaljujući enzimima kvasaca iz dodane starter kulture. Nastaju procesom esterifikacije između alkohola i organskih kiselina, a za ilustraciju mliječna kiselina je glavna organska kiselina sirutke. Udio estera u konačnom proizvodu ovisi o vrsti šećera koji fermentira, uvjetima fermentacije i o opremi za destilaciju (Spaho, 2013.). No zbog izrazito niskog praga osjetljivosti esteri se u alkoholnim pićima pojavljuju u vrlo niskim koncentracijama.

Ketoni mogu nastati β-oksidacijom iz slobodnih masnih kiselina ukoliko su u sirutci prisutne slobodne masne kiseline, odnosno određena količina mliječne masti (Cao i sur., 2014.).

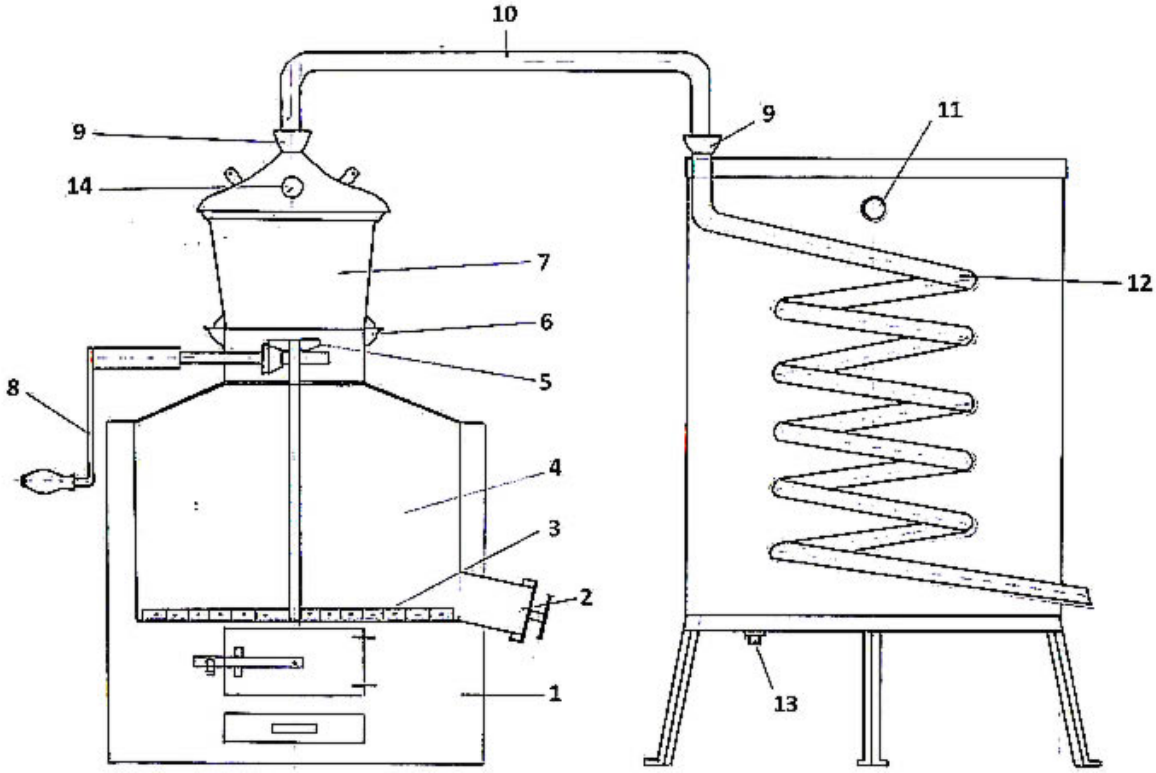
Metanol je topljiv u vodi i točka vrelišta mu iznosi 64,7 °C. U nekim studijama utvrđeno je da koncentracija metanola tijekom destilacije varira ovisno o tehnici provođenja destilacije. No, zbog njegovog toksičnog djelovanja iznimno je važno kontrolirati koncentraciju metanola u destilatu odnosno rakiji (Nikičević i Tešević, 2010.). Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/2009) maksimalna dopuštena koncentracija metanola u voćnim rakijama iznosi 1000 g/hL, preračunato na 100% vol. alkohola. Nasuprot tome, njegova dopuštena količina za alkoholna pića proizvedena destilacijom iz fermentirane sirutke nije definirana. Pri koncentraciji višoj od dopuštene, metanol uzrokuje dezorijentaciju i povraćanje, a u znatno većim koncentracijama sljepoću i smrt. Razlog tome je oksidacija metanola u otrovni formaldehid i metansku (mravlju) kiselinu.

Alkoholi s četiri i više ugljikovih atoma nazivaju se viši alkoholi i kvantitativno su najveća skupina hlapivih komponenata koje nastaju u procesu fermentacije. Pojam viši alkoholi odnosi se na alkohole kojima je temperatura vrelišta viša od vrelišta etanola (78,35 ˚C) Karakterizira ih slaba topivost u vodi. Najčešći viši alkoholi koji se pojavljuju u rakijama proizvedenim fermentacijom voćnih šećera su: 1-propanol, izobutanol, 2-metil-1-propanol, 2-butanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol i 2-metil-1-butanol. U manjim količinama daju karakter i doprinose poželjnoj aromi jakih alkoholnih pića, a ukoliko se nalaze u većim koncentracijama odgovorni su za jak i neugodan miris i okus (Dragone i sur., 2009.).

Hidrolizom laktoze na jednostavne šećere, glukoza može ući u proces fermentacije, što za posljedicu ima akumulaciju viših alkohola u destilatu fermentirane sirutke. Potrebno je kontrolirati udio viših alkohola kako njihove prevelike količine ne bi imale negativan učinak na senzorna svojstva alkohola destiliranog iz fermentirane sirutke. Tako npr. 3-metil-1-ol i 2-metilbutan-1-ol predstavljaju spojeve koji čine oko 40 do 70% svih viših alkohola sadržanih u voćnim rakijama. Zajednički ih se naziva *i-amilnim alkoholima*. Pri koncentracijama nižim od 500 g/hL daju pozitivne karakteristike destilatima i doprinose poželjnom okusu dok veće koncentracije imaju negativan učinak na senzorne karakteristike. Za primjer, povišenim se koncentracijama okus rakije senzorski opisuju kao sladak i alkoholni, što predstavlja nepoželjnu senzornu karakteristiku jakih alkoholnih pića (Dragone i sur., 2009.).

Dozrijevanje destilata provodi se u svrhu poboljšavanja senzorskih svojstava, a može trajati od nekoliko mjeseci do desetak godina. Sirovi destilat ima oštru, neharmoničnu aromu pa što je dozrijevanje duže, to će i destilat biti bolji. Starenje i dozrijevanje uzrokuje pozitivne promjene jer se razgrađuju nepoželjni sastojci prisutni u destilatu. Tijekom odležavanja destilata dolazi do bistrenja, poboljšava se okus te povećava količina aromatičnih i mirisnih tvari (Rupert, 2017.).

Za potrebe ovoga rada provedena je jednokratna destilacija fermentirane sirutke. Postupak destilacije provodi se u tri koraka. Prvi korak je zagrijavanje fermentirane sirutke do točke isparavanja, drugi korak je kondenzacija pare te na samome kraju sakupljanje ponovno kondenzirane tekućine, odnosno destilata. Slika 2.3. prikazuje shemu priručnog kotla za destilaciju u domaćinstvu korištenog u pokusu.



1. Ložište 2. Ispusni otvor 3. Miješalice 4. Kotao 5. Zupčanik 6. Vijenac – vodeni dihtung 7. Kapak od kazana
8. Mješač 9. Vodeni dihtung 10. Spojna cijev 11. Otvor za oticanje vode
12. Hladnjak – Spirala 5 navoja 13. Čep za punjenje hladnjaka 14. Termometar

Slika 2.3. Shematski prikaz kotla za destilaciju u domaćinstvu
Izvor: https://domacilek.cz/pecenje-rakije-ili-destilacija-sta-je-potrebno-da-napravimo-dobru-rakiju/ - pristup: 10.7.2021.

2.8.4. Jaka alkoholna pića na bazi sirutke

Napitci od sirutke fermentirani pomoću kvasaca, tj. proizvodi s većim udjelom alkohola (npr. votka i gin) u posljednjih nekoliko godina postaju sve zanimljiviji i proizvođačima i potrošačima. Povećanje popularnosti alkoholnih pića nastalih fermentacijom sirutke javilo se kao rezultat pokušaja neškodljivog zbrinjavanja viška sirutke.

Prvo postrojenje za fermentaciju sirutke u alkohol započelo je s radom 1978. godine u jugozapadnom dijelu Irske. U novije vrijeme podignuto je još nekoliko pogona u Sjedinjenim Američkim Državama, Velikoj Britaniji i na Novom Zelandu. Za primjer, proizvođač mlijeka iz Dorseta u Engleskoj pretvara višak sirutke u votku Black Cow, a tasmanijska destilerija Hartshorn fermentira ovčju sirutku u votku, džin i liker. Njihova je votka višestruko nagrađivana svjetskim odličjima. Destilerija mliječnih proizvoda u Ontariju pretvara sirutku u profit tako što proizvodi alkoholni napitak koji nazivaju Vodkow (Slika 2.4. -2.7.).



Slika 2.4. Komercijalni alkoholni napici na bazi sirutke

Izvor: https://www.alcademics.com/2017/04/a-new-wheyve-of-milk-based-gin-and-vodka-hits-the-market.html pristup: 20.08.2021.



Slika 2.5. Gin destiliran iz sirutke

Izvor:
https://www.coppercrowdistillery.com/
pristup: 20.8.2021.



Slika 2.6. Alkoholni napitak na bazi sirutke

Izvor:
https://www.wheywardspirit.com/
pristup: 20.8.2021.



Slika 2.7. Vodka destilirana iz fermentirane sirutke

Izvor: https://tmkcreamery.com/ Pristup: 20.8.2021.

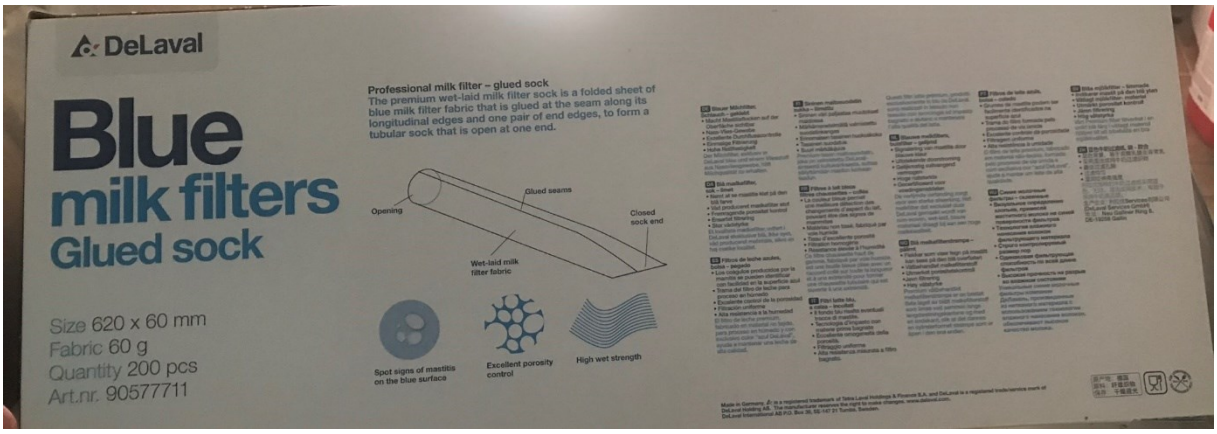
3. Materijali i metode

Istraživanje je provedeno u lipnju 2021. godine na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu koje se bavi uzgojem goveda za proizvodnju mlijeka te posjeduje vlastiti pogon za preradu mlijeka u široki asortiman mliječnih proizvoda.

U mini sirani obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva na području Istre proizvedene su tri šarže istarske kravlje skute. Sirutka kao nusprodukt proizvodnje sira, a nakon izdvajanja skute, korištena je u pokusu. Kroz tehnološki proces proizvodnje sira nisu uočena nikakva odstupanja od uobičajenih proizvodnih karakteristika sirnog gruša i sirutke. Nakon izdvajanja sirnog gruša i oblikovanja sira, sirutka se dalje koristila za proizvodnju albuminskog sira skute (Slika 3.1.). Prilikom proizvodnje skute, po recepturi u sirutku je dodano svježe sirovo mlijeko, morska sol u koncentraciji od 2% te limunska kiselina u koncentraciji < 0,2%. Prije samog dodavanja starter kulture, sirutka je profiltrirana kroz filter papir kako bi se dodatno uklonili ostaci gruša (Slika 8.).



Slika 3.1. Proizvodnja skute



Slika 3.2. Prikaz kutije korištenog filtera

Nakon proizvodnje skute, odvojeno je 100 litara sirutke koja je fermentirana u duplikatoru zapremnine 200 litara. Kultura je prethodno otopljena u dva decilitra sirutke te dodana u duplikator kako bi započela fermentacija. Korištena je kultura kvasca *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus* pri temperaturi od 35 °C kroz 5 dana (Slika 3.3.). Fermentacija je trajala ukupno 120 sati.



Slika 3.3. Kultura kvasaca korištena u fermentaciji

Prije fermentacije uzet je uzorak sirutke kako bi se odredio kemijski sastav. Također, svakih 24 sata uziman je uzorak fermentirane sirutke. U tim uzorcima praćene su promjene kemijskom sastavu fermentirane sirutke. Također, organoleptički praćene su promjene u fermentaciji svakih 24 sata. Već nakon 24 sata uočene su prve promjene u mirisu fermentirane sirutke.

Fermentirana sirutka je potom destilirana koristeći priručni kotao za destilaciju u domaćinstvu (Slika 3.4. i Slika 3.5.). Prije same fermentacije sirutka može proći proces uklanjanja bjelančevina i soli, no za potrebe ovoga rada to nije provedeno.



Slika 3.4. Priručni kotao za destilaciju u domaćinstvu (vanjski izgled)



Slika 3.5. Izgled fermentirane sirutke prije proces destilacije

3.1. Analiza sirutke prije i tijekom fermentacije

Kemijski sastav sirutke određen je iz uzorka uzetog prije dodavanja starter kulture i prije početka fermentacije i u uzorcima fermentirane sirutke na Zavodu za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu metodom infracrvene spektrometrije pomoću instrumenta MilcoScan FT120.

Provedena je i analiza pH i SH° sirutke prije fermentacije i u uzorcima fermentirane sirutke. pH vrijednost izmjerena je ionometrijskom metodom, akreditiranom prema međunarodnoj normi HRN EN ISO/IEC 17025, pomoću pH metra (Mettler Toledo Seven Multi) na Zavodu za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Analiza destilata fermentirane sirutke

U svrhu izrade ovoga rada destilat je stajao na sobnoj temperaturi u staklenim bocama dva mjeseca (60 dana) te je potom utvrđena alkoholna jakost i provedena je analiza prisutnih hlapivih komponenata destilata.

Za određivanje koncentracije alkohola u destilatu korišten je alkoholometar kojim je određena alkoholna jakost dobivenog destilata neposredno po završetku destilacije (Slika3.6.). Također, alkoholna jakost (sadržaj etanola) određena je i denzitometrijskom metodom na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Analiza hlapivih komponenata destilata sirutke provedena je na Zavodu za Kemiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Određivanje estera i viših alkohola provedeno je plinskom kromatografijom. Korišten instrument je: SRI 8610C plinski kromatograf (FID detektor).

Metoda se temelji na razdvajanju sastojaka smjese (destilata) na temelju različite raspodjele između dviju faza koje se međusobno ne miješaju. Pritom je nužno da su sastojci destilata koji se žele analizirati hlapljivi pri radnim temperaturama uređaja. Kromatograf se sastoji od injektora, kolone, termostata i detektora. Uzorak se u uređaj unio kroz injektor koji taj uzorak prevodi u plinovito stanje i miješa ga sa inertnim plinom koji služi kao mobilna faza. Korišten plin bio je helij. Kromatografska analiza provedena je na kapilarnoj koloni MXT WAX duljine 30 m, promjera 0.53 mm, te duljine stacionirane faze od 0.25 um. Za detekciju je korišten FID (Flame Ionization Detector) detektor čija je temperatura iznosila 250°C, a temperatura injektora bila je 230℃. Identifikacija pojedinih kemijskih spojeva destilata je izvršena na temelju njihova vremena zadržavanja. Nakon što je određena površina pika, izračunata je koncentracija za odgovarajuće spojeve i uzorke te su dobiveni rezultati preračunat u mg/L a.a. (apsolutnog alkohola) uzevši u obzir alkoholnu jakost (%) svakog pojedinog uzorka.



Slika 3.6. Alkoholometar i menzura za određivanje alkohola u destilatu

4. Rezultati i rasprava

4.1. Sastav sirutke prije, tijekom i na kraju fermentacije

Prosječni kemijski sastav sirutke prije fermentacije prikazan je u Tablici 4.1.

Tablica 4.1. Kemijski sastav sirutke prije fermentacije

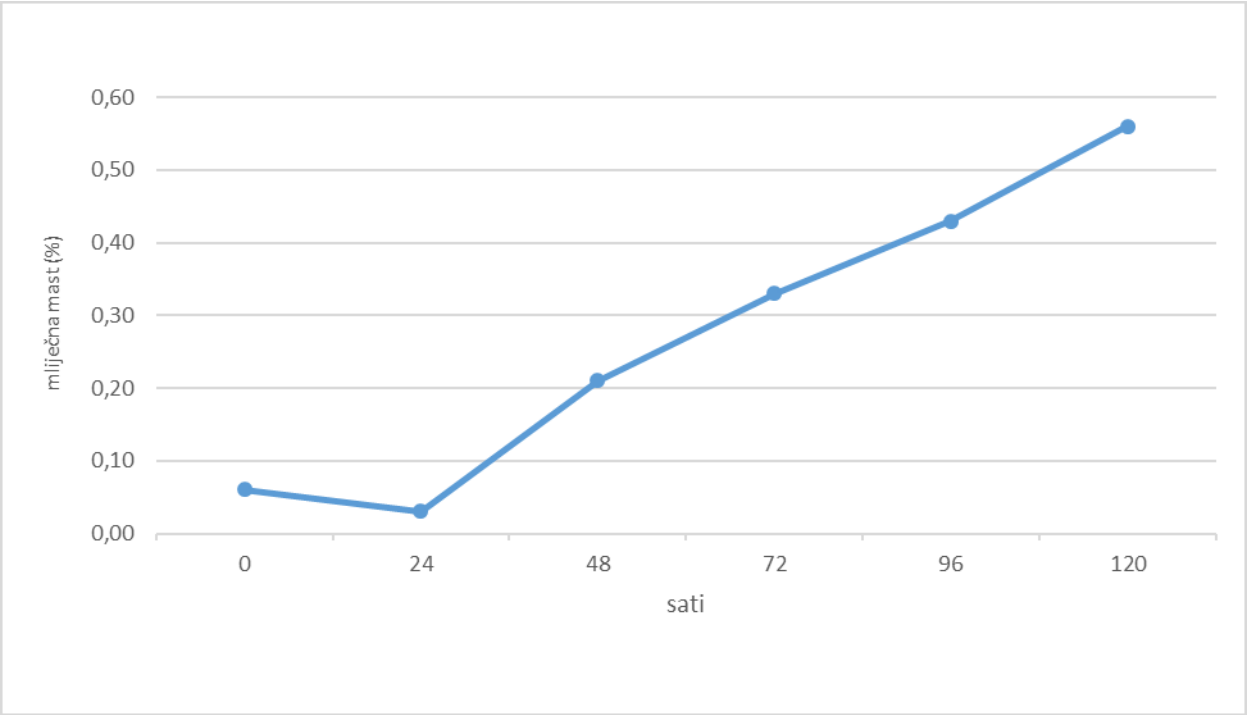
Laktoza (%)	Mliječna mast (%)	Proteini (%)	Bezmasna suha tvar (%)	Ukupna suha tvar (%)
4,84	0,06	0,50	6,16	6,25

Grafikon 4.1. prikazuje koncentraciju mliječne masti tijekom fermentacije. Temeljem pregleda dostupnih rezultata dosadašnjih istraživanja fermentacije sirutke u proizvodnji alkohola niti jedan od autora do sada nije istražio utjecaj fermentacije na sadržaj mliječne masti u fermentiranoj sirutci. Pretpostavka je da je relativni udio masti porastao kao posljedica relativnog smanjenja udjela proteina i laktoze u fermentiranoj sirutci.

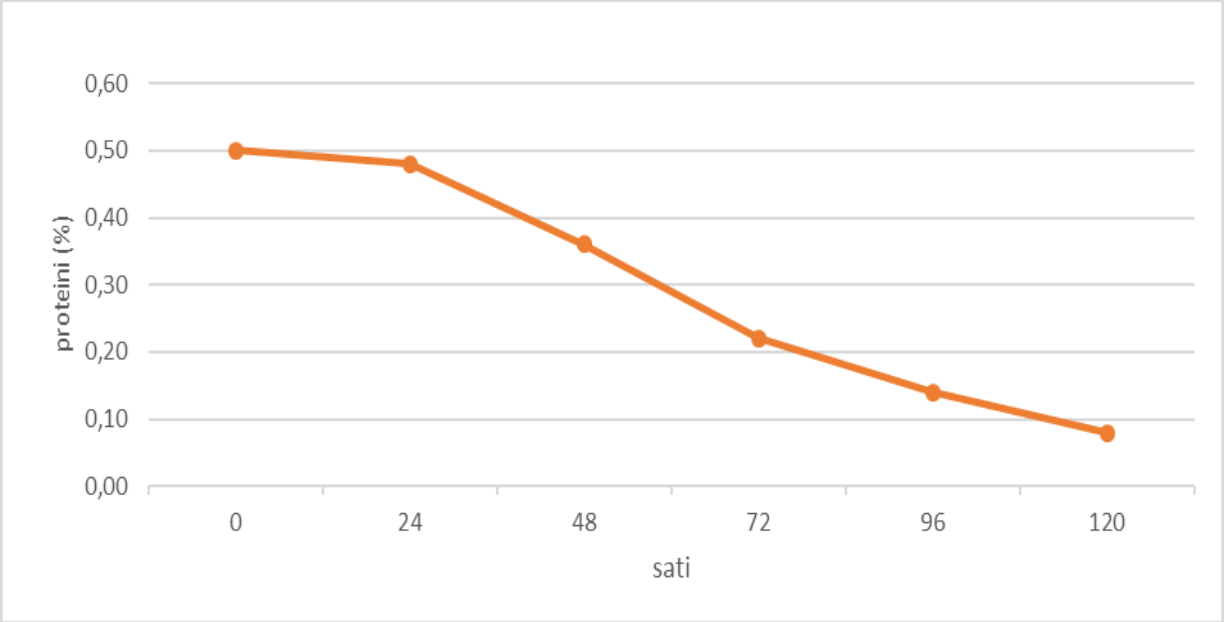
Grafikon 4.2. prikazuje koncentraciju proteina tijekom fermentacije. Pregledom dostupnih rezultata dosadašnjih istraživanja niti jedan od autora do sada nije istražio utjecaj fermentacije na sadržaj proteina u fermentiranoj sirutci. Pretpostavka je da je do smanjenja sadržaja proteina došlo kao posljedica precipitacije (taloženja) denaturiranih proteina sirutke uslijed pada pH vrijednosti, odnosno dosezanja izoelektrične točke proteina sirutke.

Grafikon 4.3. prikazuje kretanje ukupne suhe tvari i bezmasne suhe tvari tijekom fermentacije. Fermentacijom sirutke dobivene nakon proizvodnje skute od istarskog kravljeg sira došlo je do smanjenja ukupne suhe tvari, sukladno tomu pretvorba laktoze u produkte fermentacije za posljedicu ima smanjenje bezmasne suhe tvari.

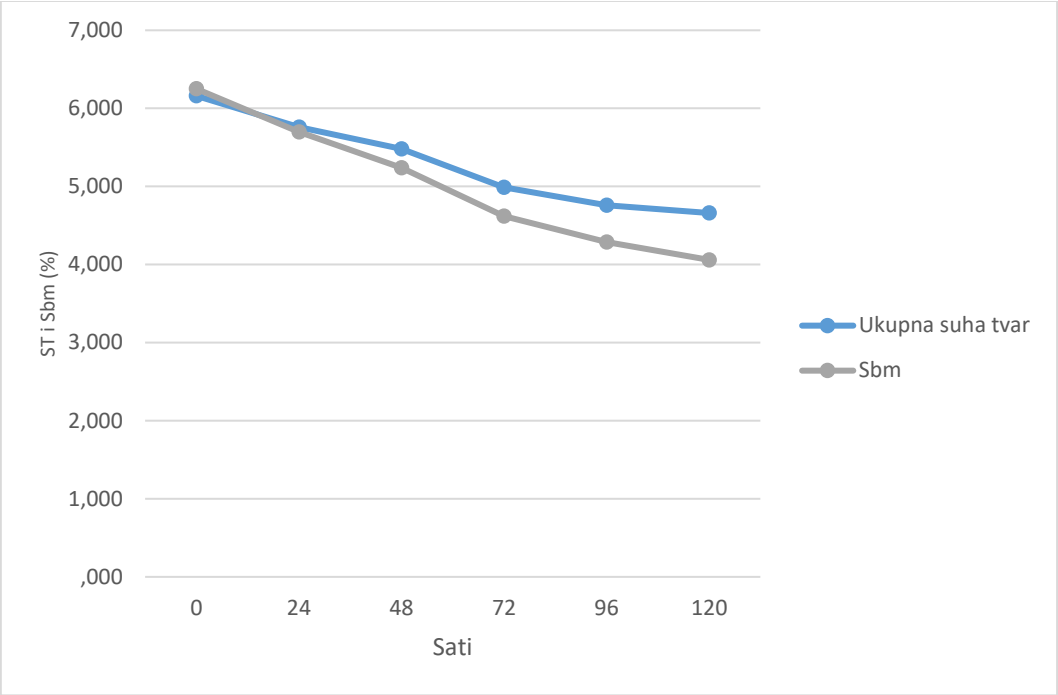
Mikroorganizam *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus* uslijed iskorištavanja laktoze u fermentaciji doprinosi smanjenju ukupne suhe tvari i suhe bezmasne tvari u fermentiranoj sirutci. No, pregledom trenutno dostupnih istraživanja nije moguće utvrditi koji su ostali čimbenici odgovorni za smanjenje udjela ukupne suhe tvari i bezmasne suhe tvari prilikom fermentacije.



Grafikon 4.1. Kretanje udjela mliječne masti tijekom fermentacije sirutke dobivene nakon proizvodnje istarske skute djelovanjem kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*



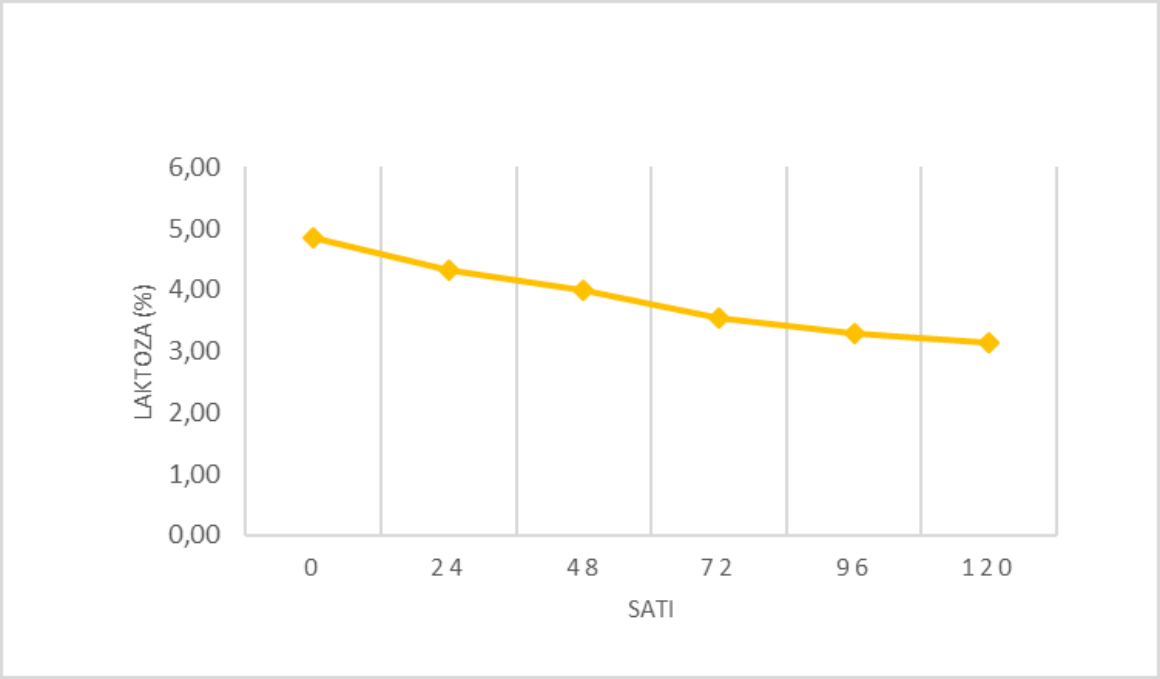
Grafikon 4.2. Kretanje udjela proteina tijekom fermentacije sirutke dobivene nakon proizvodnje istarske skute djelovanjem kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*



Grafikon 4.3. Kretanje udjela ukupne suhe tvari i bezmasne suhe (Sbm) tvari tijekom fermentacije sirutke dobivene nakon proizvodnje istarske skute djelovanjem kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*

4.2. Sadržaj laktoze u sirutci prije, tijekom i nakon fermentacije

Grafikon 4.4. prikazuje koncentraciju laktoze tijekom fermentacije. Vidljivo je da se odmicanjem fermentacije udio laktoze smanjivao. Smanjenje udjela laktoze u skladu je s rezultatima prethodnih istraživanja (Christensen i sur., 2011.). Korištena mikrobna kultura kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus* je za rast i razmnožavanje koristila laktozu iz supstrata te se posljedično tomu udio laktoze fermentacijom smanjio. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja Dragone i sur. (2009) koji su također utvrdili smanjenje koncentracije laktoze u sirutku uslijed djelovanja kulture kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus.*

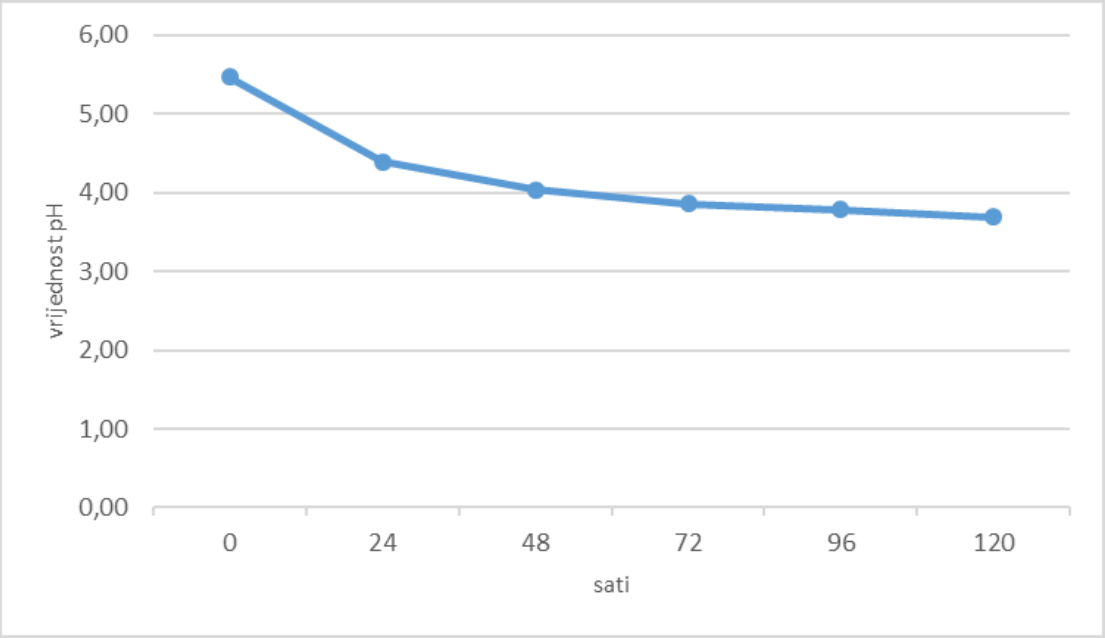


Grafikon 4.4. Kretanje udjela laktoze tijekom fermentacije sirutke dobivene nakon proizvodnje istarske skute djelovanjem kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*

4.3. Kretanje vrijednost pH i SH° prije, tijekom i na kraju fermentacije

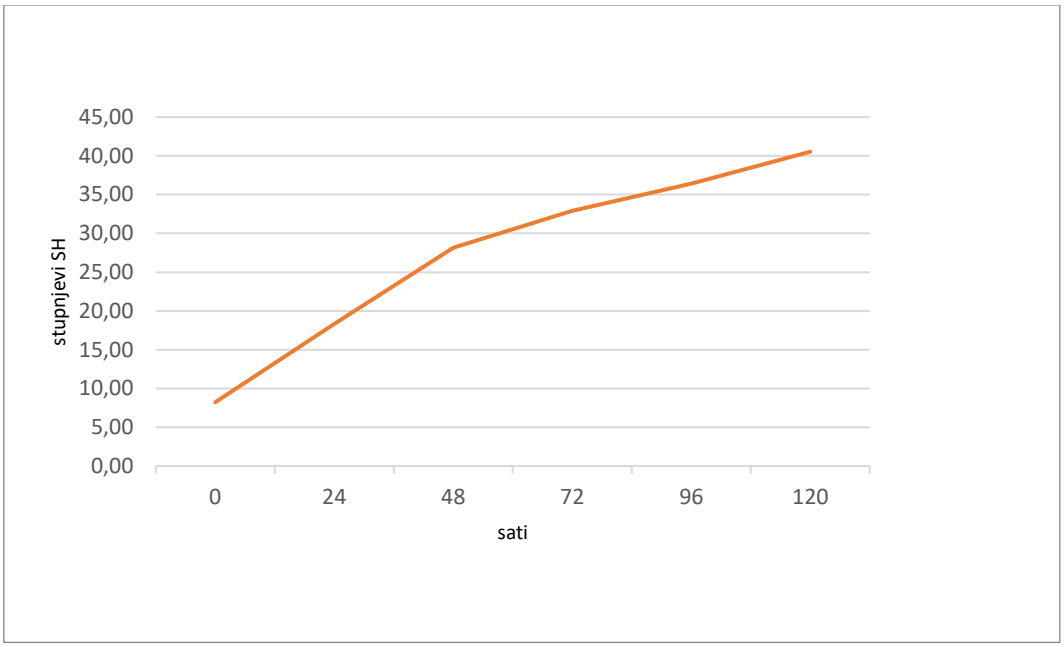
Vrijednost pH tijekom fermentacije se smanjivala, dok je vrijednost SH rasla. Grafikon 4.5. prikazuje vrijednost pH po satima fermentacije, a grafikon 4.6. prikazuje vrijednost SH po satima fermentacije. pH sirutke prije fermentacije iznosio je 5,46, dok je vrijednost SH bila je 8,20. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima prethodnih istraživanja (Coote i Kirsop, 1976.).

Do smanjenja pH vjerojatni došlo je kao posljedica nastajanja organskih kiselina tijekom alkoholne fermentacije. Dokazano je da *Kluyveromyces marxianus subsp. marxianus* proizvodi octenu, propionsku, jantarnu, jabučnu i limunsku kiselinu tijekom fermentacije laktoze (Wilkowska i sur., 2015.). Kada se pH približava 4,6 (izoelektričnoj točki proteina sirutke) dolazi do dodatnog puferiranja, što smanjuje daljnji utjecaj porasta koncentracije organskih kiselina na daljnje smanjenje pH vrijednosti sirutke (Morand i sur., 2012).



Grafikon 4.5. Vrijednost pH fermentirane sirutke dobivene nakon proizvodnje istarske skute djelovanjem kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp*. marxianus*

Christensen i sur. (2011.) iznose da vrijednost pH ukazuje na količinu slobodnih vodikovih iona u otopini, većinom podrijetlom iz mliječne kiseline, ali i ostalih kiselih sastojaka sirutke. Isti autori navode kako je *Kluyveromyces marxianus* subsp*. marxianus* vrlo prilagodljiv mikroorganizam na razlike pH vrijednosti u okolini u kojoj se nalazi. Tolerantan je na niske vrijednosti pH što može biti vrlo učinkovito u fermentaciji laktoze u alkohol.



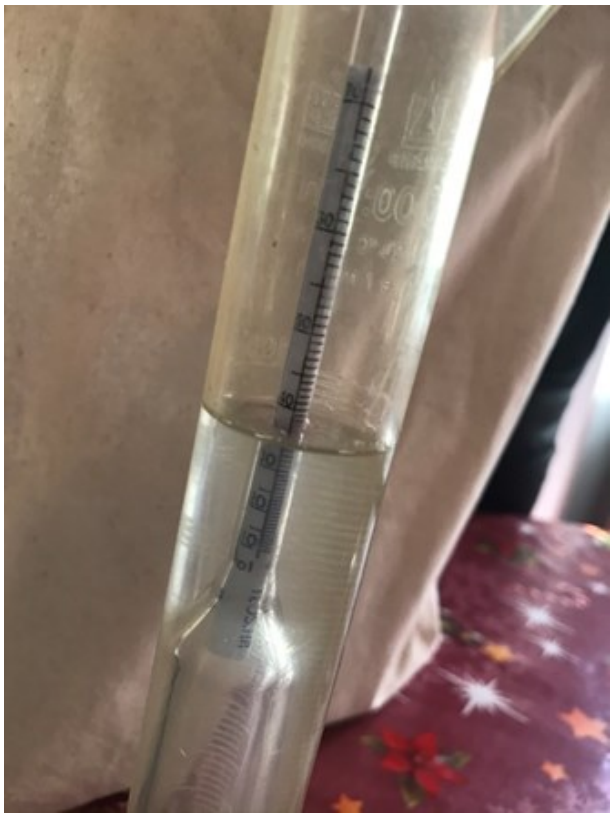
Grafikon 4.6. Vrijednost SH fermentirane sirutke nakon proizvodnje istarske skute djelovanjem kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp*. marxianus*

4.4. Sastav destilata sirutke

Slika 4.1. prikazuje istjecanje *prvog mlaza* destilata fermentirane sirutke (*prvijenac*), alkoholne jakosti 35% (Slika 4.2.)



Slika 4.1. Prvi mlaz destilata



Slika 4.2. Alkoholna jakost dobivenog destilata

Dobiveni destilat fermentirane sirutke u usporedbi s rezultatima Dragone i sur. (2009.) potvrđuje mogućnost dobivanja alkohola iz sirutke nakon proizvodnje istarske skute djelovanjem kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp*. marxianus.* Spomenuti autori su dobiveni 35,4%-tni destilat fermentirane sirutke, također ispitivali s ciljem utvrđivanja koncentracije hlapivih komponenata destilata.

U destilatu je utvrđen acetaldehida, metanola, n-propanola, i-butanola, n-butanola, 3-metil-1-ola, 2-metilbutan-1-ola, etil-laktata, dok dietil-sukcinat nije utvrđen u uzorku. Dobiveni rezultati u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja koji navode da koncentracija ovih spojeva ovisi o kvaliteti i vrsti sirovine, kao i o uvjetima samog procesa fermentacije (Plutowska i Wardencki, 2008.).

Tablica 4.2. Hlapivi spojevi u destilatu fermentirane sirutke nakon proizvodnje istarske skute djelovanjem kvasaca *Kluyveromyces marxianus* subsp*. marxianus*

	Mg/L apsolutnog alkohola		
Spoj	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
Acetaldehid	88,72	87,34	88,91
Metanol	128,93	125,76	124,97
n-propanol	64,57	71,12	69,32
i-butanol	54,29	51,79	49,77
n-butanol	0,78	1,12	0,65
3-metil-1-ol 2-metilbutan-1-ol	384,06	376,25	381,34
Etil laktat	62,97	61,78	59,21

Dobiveni spoj acetaldehid obično se nalazi u alkoholnim pićima kao nusprodukt fermentacije kvasca i rezultat oksidacije alkohola u različitim fazama proizvodnje pića. Ipak, Wardencki i sur. (2003.) navode da prisutnost spojeva niske molekularne mase, kao što su aldehidi i ketoni, nije poželjna jer su neki od njih odgovorni za neugodna organoleptička svojstva alkoholnog pića.

U ovome istraživanju, acetaldehid je bio jedini takav identificiran kemijski spoj među glavnim hlapljivim spojevima destilata. Koncentracija acetaldehida u prvom uzorku iznosila je 88,72 mg/L a.a., u drugom uzorku vrijednost je bila niža i iznosila je 87,34 mg/L a.a., dok se u trećem uzorku vrijednost pokazala višom i iznosila je 88,91 mg/L a.a.

U uzorcima je detektiran alkohol metanol u prosječnoj koncentraciji od 126,55 mg/L apsolutnog alkohola.

Alkoholnom fermentacijom nastaje i niz drugih spojeva pored glavnog produkta - etanola, uključujući karbonilne spojeve, ostale alkohole, estere, kiseline i acetale, a svi oni utječu na kvalitetu gotovog proizvoda. Sastav i koncentracija tih spojeva mogu se razlikovati i tako utjecati na organoleptička svojstva destilata (Dragone i sur., 2009.).

Viši alkoholi su kvantitativno najzastupljenija skupina aromatskih spojeva u destilatima i pridonose aromi i esencijalnom karakteru destilata (Ferreira i sur., 1999.). Od viših alkohola u ispitanim uzorcima utvrđeni su: i-butanol i n-butanol.

Amilni alkohol 2-metilbutan-1-ol nastaje tijekom fermentacije u reakcijama deaminacije i dekarboksilacije iz izoleucina i leucina (Boulton i sur., 1996.), a njegova koncentracija u uzorcima zajedno sa alkoholom 3-metil-1-olom iznosi prosječno 380,55 mg/L apsolutnog alkohola.

U uzorku destilata fermentirane sirutke detektiran je i ester etil-laktat, dok ester dietil-sukcinat nije pronađen. Esteri imaju nisku točku vrelišta pa tijekom destilacije ispare prvi. Zbog toga je potrebno kontrolirati u kojem će se trenutku prekinuti destilacije kako bi se esteri zadržali u poželjnim koncentracijama (Nikičević i sur., 2010.).

Prema Mingorance-Cazorla i sur. (2003.) kvasac koji se koristi u procesu fermentacije ima veliki utjecaj na nastajanje estera. Etilni esteri općenito su spojevi povezani s ugodnim voćnim okusima i cvjetnom aromom, a otkriveni su i u drugim alkoholnim pićima poput tekile, meskala, moura, vina, piva i drugih (León-Rodríguez i sur., 2006.). Ester etil-laktat može stabilizirati okus destilata i omekšati oštre karakteristike okusa kada je prisutan u niskim koncentracijama (Apostolopoulou i sur., 2005.).

Tijekom dozrijevanja alkohola esteri se sintetiziraju u procesu esterifikacije viših kiselina i etanola ili viših alkohola. Koncentracija estera raste s produljenjem trajanja dozrijevanja. Nastanak estera može se pripisati metabolizmu masnih kiselina *Kluyveromyces. marxianus* (Lam i Proctor, 2002.), kao i drugim mikrobnim metaboličkim procesima. Prema nekim autorima (Apostolopoulou i sur., 2005; León-Rodríguez i sur., 2006.) etilni esteri, alkoholi s tri ili više ugljikovih atoma te acetaldehid glavni su spojevi odgovorni za aromu alkoholnih pića, a njihove količine određuju kvalitetu samog destilata.

Općenito, okus jakih alkoholnih pića ovisi o koncentraciji i vrsti prisutnih hlapljivih komponenti.

5. Zaključak

S obzirom na to da proizvodnja mlijeka i sira raste na globalnoj razini, to ukazuje da će se količina sirutke nastaviti povećavati u sljedećim godinama. Velike količine proizvedene sirutke mogu uvelike narušiti prirodni ekosustav ako se u nekontroliranim uvjetima ispuštaju u okoliš.

Osim što je sirutka veliki zagađivač ujedno je i vrlo vrijedna sirovina koja ima potencijal za daljnje iskorištenje. Proizvodnja sirutke može biti gospodarski i ekološki problem mljekarske industrije. Razvoj održivih metoda postupanja s sirutkom od velike je potrebe. U zadnje vrijeme ogromna je potražnja za proteinima sirutke, međutim, potrebno je mnogo rada kako bi se doista iskoristio sav potencijal sirutke.

Proizvodnja alkohola za piće iz sirutke trenutno se još uvijek odvija u industrijskim razmjerima, ali potrebno je uložiti dodatne napore u uspostavu tehnologije proizvodnje alkoholnih napitaka na bazi sirutke (eng. *whey- based spirits)* u uvjetima malih kapaciteta što se ovim radom dokazalo kroz potvrdu mogućnost korištenja sirutke u proizvodnji destilata u uvjetima malog pogona.

Proizvodnja alkoholnih pića iz sirutke u malim pogonima može smanjiti negativan utjecaj sirutke na okoliš u uvjetima malog kapaciteta, a ujedno i generirati dodatne prihode kroz proizvodnju proizvoda dodane vrijednosti (votka, gin, likeri).

Kultura kvasaca *Kluyveromyces marxianus* spp. pokazala se učinkovitom u pretvorbi laktoze u alkohol i u uvjetima malog pogona, no potrebno je provesti još istraživanja kako bi se dodatno kontrolirali parametri i optimizirali procesi fermentacije i destilacije.

6. Popis literature

1. Antunac N. i sur. (2011). Proizvodnja i kemijski sastav Istarske i Paške skute. Mljekarstvo 61 (4): 326-335
2. Antunac N., Havranek J. (2013). Mlijeko – kemija, fizika i mikrobiologija, udžbenici Sveučilišta u Zagrebu
3. Apostolopoulou A. A., Flouros A. I., Demertzis P. G., Akrida-Demertzi K. (2005). Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. Food Control, 16, 157–164
4. Asunis F., De Gioannis G., Dessì P., Isipato M., Lens Piet N.L., Muntoni A., Polettini A., Pomi R., Rossi A., Spiga D. (2020). The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation. Journal of Environmental Management. 276
5. Blažić M., Zavladav S., Kralj, E., Šarić, G. (2018). Production of whey protein as nutritional valuable foods. Croatian Journal of Food Science and Technology. 10(2): 255-260
6. Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R. E. (1996). Principles and practices of winemaking
7. Bounous G., Batist G., Gold P. (1991). Whey proteins in cancer prevention. Cancer Lett. 57 (2): 91-4
8. Božanić R., Barukčić I., Jakopović Lisak K. i Tratnik L. (2014). Possibilities of whey utilisation. Austin journal of nutrition and food sciences. 2(7)
9. C. I. Onwulata, P. J. Huth (2008). Whey protein production and utilization: A brief history, Whey Processing, Functionality and Health Benefits. Blackwell Publishing and Institute of Food Technologists, Iowa https://download.e-bookshelf.de/download/0000/5874/88/L-G-0000587488-0002309267.pdf - pristup: 10.04.2021.
10. Cao Y., Liu W., Xu X., Zhang H., Wang J., Xian M. (2014). Production of free monounsaturated fatty acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. Biotechnol. Biofuels 7:59
11. Çelik K., Yuksel Z. (2016). Whey every aspect. Sonçağ Matbaacılık

12. Charles Ling K. (2008). Whey to Ethanol: A Biofuel Role for Dairy Cooperatives? https://www.rd.usda.gov/sites/default/files/RR214.pdf
13. Chavan R.S., Shradda R., Kumar A., Nalawade T. (2015). Whey based beverage: its functionality, formulations, health benefits and applications. J Food Process Technol 6:10
14. Christensen A.D., Kádár Z:, Oleskowicz-Popiel P., Hedegaard Thomsen M. (2011). Production of bioethanol from organic whey using Kluyveromyces marxianus. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 38(2): 283–289
15. Coote N., Kirsop B.H. (1976). Factors responsible for the decrease in ph during beer fermentations. Journal of the Institute of Brewing. 82: 149-153.
16. Cristiani-Urbina E., Netzahuatl-Munoz A.R., Manriquez-Rojas F.J., Juarez-Ramirez C., Ruiz-Ordaz N., Galindez-Mayer J. (2000). Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed cultures. Process Biochemistry 35 (7): 649-657
17. De León-Rodríguez A., González-Hernández L., Barba de la Rosa A.P., Escalante-Minakata P., López M.G. (2006). Characterization of volatile compounds of Mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from Agave salmiana. J Agric Food Chem. 54(4): 1337-1341
18. Dragone G., Mussatto S.I., Oliveira J.M., Teixeira J.A. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. Food Chemistry. 112(1): 929–935
19. Duvnjak Z. (1983). Sirutka i njeno korištenje u prehrambenoj i fermentacijskoj industriji. Mljekarstvo. 33(2)
20. EDA- European dairy association, Economic report 2016/17. http://eda.euromilk.org/fileadmin/user_upload/Public_Documents/Facts_and_Figures/EDA_EWPA_Economic_Report_2016.pdf pristup: 15.04.2021.
21. Ferreira V., Hernandez-Orte P., Escudero A., Lopez R., Cacho, J. (1999). Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. Journal of Chromatography A, 864, 77–88
22. Fonseca G. G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79(3), 339–354

23. Hamilton R., Wansbrough H. (2017). The manufacture of ethanol from whey. https://nzic.org.nz/app/uploads/2017/10/3H.pdf pristup: 12.04.2021.
24. Hughes P., Risner D., Meunier Goddik L. (2018). Whey to vodka. https://www.intechopen.com/chapters/64282 pristup: 15.04.2021.
25. Jeličić I., Božanić R., Tratnik Lj. (2008). Whey-based beverages- a new generation of diary products. Mljekarstvo. 58 (3): 257-274
26. Joshi Y., Senatore B., Poletto M. (2011). Kluyveromyces Marxianus Biofilm in Cheese Whey Fermentation for Bioethanol Production. Dipartimento di Ingegneria Chimica e Alimentare, University of Salerno, and Prodal Scarl https://folk.ntnu.no/skoge/prost/proceedings/pres2011-and-icheap10/ICheaP10/421Joshi.pdf pristup: 20.04.2021.
27. Koushki M., Jafari M., M. Azizi. (2012). Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. J Food Sci Technol. 49(5): 614–619
28. Kurtzman C. P., Robnett C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. FEMS Yeast Res. 3, 417–432
29. Lachance M.A. (2011). Current status of Kluyveromyces systematics. https://www.researchgate.net/publication/6568532_Current_status_of_Kluyveromyces_systematics
30. Lam H.S., Proctor A. (2002). Kinetics and mechanism of free fatty acid formation on the surface of milled rice. . Agric. Food Chem., 50, 7161-7163
31. Lane M. M., Burke N., Karreman R. (2011). Physiological and metabolic diversity in the yeast Kluyveromyces marxianus. A. van Leeuwen. J. Microb. 100: 507–519
32. Lane M. M., Morrissey J. P. (2010). Kluyveromyces marxianus: a yeast emerging from its sister's shadow. Fungal Biol. Rev. 24: 17–26
33. Lappa I.K., Papadaki A., Kachrimanidou V., Terpou A., Koulougliotis D., Eriotou E., Kopsahelis N. (2019). Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications. Foods. 8(8): 347
34. Leidy H.J., Tang M., Armstrong C.L., Martin C.B., Campbell W.W. (2011). The effects of consuming frequent, higher protein meals on appetite and satiety during weight loss in overweight/obese men. Obesity 19 (4): 818-824.

35. Marcišauskas S., Ji B. Nielsen J. (2019). Reconstruction and analysis of a Kluyveromyces marxianus genome-scale metabolic model. BMC Bioinformatics, 20 (551)
36. Matijević B. (2018). Mogućnosti iskorištavanja i upotrebe sirutke. Veleučilište u Karlovcu
37. Matijević B., Lisak K., Božanić R., Tratnik LJ. (2011). Impact of enzymatic hydrolyzed lactose on fermentation and growth of probiotic bacteria in whey. Mljekarstvo. 61 (2): 154 - 160.
38. McGregor R.A., Poppitt S.D. (2013). Milk Protein for Improved Metabolic Health: A Review of the Evidence. Nutrition & Metabolism. 10: 46
39. Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jiménez J., Martínez-Rodríguez S., Las Heras Vázquez F., Rodriguez-Vico F. (2003). Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 297-304
40. Morand M., Dekkari A., Guyomarc'h F., Famelart M. (2012). Increasing the hydrophobicity of the heat-induced whey protein complexes improves the acid gelation of skim milk. International Dairy Journal. 25 (2): 103-111,
41. Nikićević N., Tešević V. (2010). Proizvodnja voćnih rakija vrhunskog kvaliteta NIKPRESS, Beograd
42. Parashar A., Jin Y., Mason B., Chae M., Bressler D.C. (2016). Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. American Dairy Science Association. J. Dairy Sci. 99: 1859–1867
43. Pentjuss A., Stalidzans E., Liepins J. (2017). Model-based biotechnological potential analysis of Kluyveromyces marxianus central metabolism. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 44: 1177–1190
44. Plutowska B., Wardencki W. (2008). Application of gas chromatography-olfactometry (GC–O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review. Food Chemistry, 107, 449–463
45. Popović-Vranješ A., Vujičić I. (1997). Tehnologija surutke. Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Novi Sad

46. Risner D., Shayevitz A., Haapala K., Meunier-Goddik L., Hughes P. (2018). Fermentation and distillation of cheese whey: Carbon dioxide-equivalent emissions and water use in the production of whey spirits and white whiskey. Journal of Dairy Science. 101(4): 2963-2973
47. Risner D., Tomasino E., Hughes P., Meunier-Goddik L. (2019). Volatile aroma composition of distillates produced from fermented sweet and acid whey. Journal of Dairy Science 102 (1): 202-210
48. Sansonetti S., Curcio S., Calabro` V., Iorio G. (2009). Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. biomas and bioenergy. 33(1): 1687-1692
49. Silva M., Zisu B., Chandrapala J. (2018:). Influence of low-frequency ultrasound on the physico-chemical and structural characteristics of milk systems with varying casein to whey protein ratios. Ultrason Sonochem. 49: 268-276
50. Spaho N., Durr P., Grba S., Velagić-Habul E., Blesić M. (2013). Effects of distillation cut on the distribution of higher alcohols and ester sin brandy produced from three plum varieties. Institute of Brewing & Distilling
51. Tratnik LJ. (1986). ultrafiltracija sirutke. Mljekarstvo. 36 (10): 291—297
52. Tratnik LJ. (1998). Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija, HMU, Zagreb
53. Tratnik LJ. (2003). Uloga sirutke u proizvodnji funkcionalne mliječne hrane. Mljekarstvo 53 (4): 325-352
54. Tunick M.H. (2008). Whey protein production and utilization: A brief history, Whey Processing, Functionality and Health Benefits. Blackwell Publishing and Institute of Food Technologists, Ames, Iowa, 2008, pp. 1 – 15
55. Wardencki W., Sowinski P., Curylo J. (2003). Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. Journal of Chromatography A, 984, 89–96
56. Wilkowska A., Kregiel D., Guneser O., Karagul Yuceer Y. (2015). Growth and by-product profiles of Kluyveromyces marxianus cells immobilized in foamed alginate. Yeast, 32 (2015): 217-225
57. Yanase S. (2010). Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast. Biotechnol J. 5(5): 449-55

58. Zafar S., Owais M. (2006). Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. Biochem Eng J 27: 295–298
59. Zandona E., Blažić M., Režek Jambrak A. (2021). Whey Utilisation: Sustainable Uses and Environmental Approach. FTB- Food technology & biotechnology. 59 (2): 147-161
60. Zoppellari F., Bardi L. (2013). Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by Kluyveromyces marxianus. New biotechnology. 30(6): 607-613

Pristupljene mrežne stranice:

- https://gospodarski.hr/rubrike/tehnika-destilacije-vocnih-rakija/ pristup: 10.6.2021.
- https://www.healthline.com/nutrition/10-health-benefits-of-whey-protein#TOC_TITLE_HDR_1 pristup: 10.6.2021.
- https://vitamini.hr/hrana-i-zivot/hrana/sirutka-je-izvanredan-izvor-visokovrijednih-proteina-1860/ pristup: 10.4.2021.
- https://www.nezavisne.com/zivot-stil/zdravlje/Sirutka-lijek-za-sve-bolesti-i-dug-zivot/332790 pristup: 12.04.2021.
- https://gospodarski.hr/casopis/izdanja-2020-casopis/broj-9-od-15-05-2020/zasto-je-dobro-redovito-koristiti-sirutku/?gclid=CjwKCAjwxuuCBhATEiwAIIIz0TQMRhbaOSaRrEbOs0Qx-2BbdOA2mbLKu1najZ2AvZofrPTU7quTZBoC5SQQAvD_BwE pristup: 20.06.2021.
- https://daily.sevenfifty.com/making-a-case-for-whey-based-spirits/ pristup: 25.06.2021.
- https://www.foodingredientsfirst.com/news/turning-whey-waste-into-spirits-researchers-explore-whey-based-vodka.html pristup: 24.06.2021.
- https://www.forbes.com/sites/jeffkart/2018/12/27/startup-turns-cheese-waste-into-vodka-like-wheyward-spirit/?sh=3dbb79e935ee pristup: 15.04.2021.
- https://today.oregonstate.edu/news/%E2%80%9Cwhey%E2%80%9D-make-vodka-could-add-value-creameries-lessen-environmental-impact pristup 02.04.2021.
- https://www.youtube.com/watch?v=fQdhJHOH9CM pristup 01.05.2021.
- http://www.fao.org/faostat/en/#home pristup: 20.04.2021.

Prilozi

Prilog 1. specifikacija korištene starter kulture

CHR. HANSEN
Improving food & health

LAF-5

Product Information
Version: 13 PI EU EN 11-11-2019

Description

Cheese
Selected yeast single strain with origin in traditional French cheese making. SWING® LAF cultures are an important tool in cheese making since they may be used to affect curd neutralization, texture and flavor. Yeasts are common in traditional raw milk cheeses but are rarely found in industrially produced cheeses. Therefore adding selected and controlled yeast cultures to the cheese may improve quality.

Culture composition:
Kluyveromyces marxianus subsp. marxianus

Material No:	201016	**Color:**	White
Size	10 U	**Format:**	SWING
Type	Pouch(es) in box	**Form:**	Powder

Storage and handling

< -18 °C / < 0 °F

Shelf life

At least 5 months from date of manufacture when stored according to recommendations.

Application

Usage
Yeast cultures may be used in white mold soft cheese and smeared and mixed rind cheese. The yeast will grow in the milk as well as in the curd. Its function is
- to give flavor
- to prevent bitter taste (by aminopeptidase activity)
- to inhibit contaminants.

Suggested dosage
1U to 2U/1000 l milk or 100 kg fresh cheese.

Designed for optimal performance, the composition and recommended inoculation rate for this culture were carefully developed by use of unique microbial strains, advanced biotechnological principles and more than 140 years of accumulated experience from the dairy industry.

Warning: Applying lower than recommended inoculation rate may cause undesired variation in product quality, lower production efficiency, product yield losses, potential fermentation failures and an increased risk of bacteriophage attacks.

Directions for Use
Add the culture to the milk before renneting and/or apply to the surface of the cheese a few hours after salting, by spraying or washing. For direct milk inoculation, no particular cautions are required.
For surface application:
1) Suspend the content of the pouch in 1 litre of sterile water.
2) Shake well before use.
A prepared suspension using one litre of water is sufficient for about 250 kg of cheese, and should be used on the day of preparation.

For Kefir type products: Add to the milk along with the DVS® lactic acid bacteria while filling the tank.

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. All rights reserved.

Životopis

Josipa Kazalac rođena je 21.05.1997. godine u gradu Puli. Pohađala je smjer opće gimnazije u Gimnaziji i strukovnoj školi Jurja Dobrile u Pazinu u razdoblju od 2012. do 2016. godine. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelovala je 2016. godine na ljetnoj školi SEMEP-a u gradu Komiži na otoku Visu te natjecanjem „Čitanjem do zvijezda“ dvije godine zaredom dostignula državnu razinu. 2015. godine surađivala je sa stručnjacima iz Centra za istraživanje mora u Rovinju (CIM) Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu za potrebe izrade znanstveno-istraživačkog rada iz predmeta biologija. Bila je dugogodišnji član crkvenog zbora „Marijine zvijezdice“ gdje je nastupala na raznim županijskim natjecanjima, smotrama i koncertima. 2016. godine upisala je smjer animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te u srpnju 2019. godine stekla zvanje prvostupnika agronomije. U akademskim godinama 2017./2018. i 2018./2019. primala je državnu stipendiju za izvrsnost iz STEM područja znanosti. 2018. Godine volontirala je u Dubrovniku na događaju *69th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science*, i primila certifikat za sudjelovanje. Također, sudjelovala je na *International Symposium of Agriculture 2020*. godine u Vodicama te dobila certifikat za sudjelovanje. U slobodno vrijeme bavi se poslovima na obiteljskoj farmi te poznaje praktične vještine iz područja sirarstva.