

Optimizacija metode za određivanje reaktivnih vrsta kisika (ROS) u pivu

Maslarević, Nenad

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:385070>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Nenad Maslarević

**OPTIMIZACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE REAKTIVNIH VRSTA
KISIKA (ROS) U PIVU**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, studeni, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Diplomski sveučilišni studij prehrambenog inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Biotehnoška proizvodnja hrane
Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./18 održanoj 29. lipnja 2018.
Mentor: doc. dr. sc. Kristina Mastanjević
Komentor: dr. sc. Tihomir Kovač, znanstveni savjetnik
Pomoć pri izradi: doc. dr.sc. Ante Lončarić

OPTIMIZACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE REAKTIVNIH VRSTA KISIKA (ROS) U PIVU

Nenad Maslarević, 429 - DI

Sažetak: Sadržaj reaktivnih vrsta kisika (ROS) u pivu uzrokovan je prisutnošću kisika, a jedan je od najznačajnijih pokazatelja kvalitete piva. Prema dostupnim literaturnim podacima koncentracija kisika pri procesima proizvodnje i pakiranja piva, kao i odabir ambalaže i načina skladištenja gotovog proizvoda imaju utjecaj na degradaciju biomolekula piva. Navedeno se odražava na kvalitetu gotovog proizvoda tijekom roka valjanosti naznačenog na ambalaži. Iako je u većim industrijskim pogonima za proizvodnju piva izlaganje piva kisiku smanjeno na minimalne razine, u zanatskim pivovarama kisik može predstavljati ozbiljan problem. Različiti tipovi piva, zbog različitog kemijskog sastava, različito odgovaraju na prisutnost kisika pa je i to jedan od motiva za implementaciju ove metode u istraživanju kvalitete piva. Cilj rada je na osnovi dostupne literature prikazati ulogu ROS na kvalitetu piva, eksperimentalno odrediti sadržaj ROS u pivu te odrediti potencijalne razlike u njihovom sadržaju u različitim tipovima industrijski proizvedenog piva.

Ključne riječi: ROS, pivo, starenje piva

Rad sadrži: 32 stranice
10 slika
5 tablica
0 priloga
28 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1. doc. dr. sc. <i>Bojan Šarkanj</i>	predsjednik
2. doc. dr. sc. <i>Kristina Mastanjević</i>	član-mentor
3. dr. sc. <i>Tihomir Kovač, znanstveni savjetnik</i>	Član - komentor
4. prof. dr. sc. <i>Vinko Krstanović</i>	zamjena člana

Datum obrane: 5. studeni 2018.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of of bioprocess engineering
FranjeKuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program of Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Biotechnological food production
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX. held on July 29, 2018.
Supervisor: Kristina Mastanjević, PhD, assistant prof.
Co-supervisor: Tihomir Kovač, PhD, scientific consultant
Technical assistance: doc. dr.sc. Ante Lončarić

METHOD OPTIMIZATION FOR REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) ESTIMATION IN BEER

Nenad Maslarević, 429 - DI

Summary: The content of reactive oxygen species (ROS) in beer is related to the presence of oxygen, and is one of the most significant quality indicators of beer. According to the available literature, the concentration of oxygen in beer production and packaging, as well as the choice of packaging and the way of storing the finished product, has an impact on the degradation of beer biomolecules. This reflects quality of the finished product during the validity period indicated on the packaging. Although in larger industrial plants beer exposure to oxygen has been reduced to a minimum level, in craft breweries oxygen can be a serious problem. Different types of beer, due to their different chemical composition, are differently reacting to presence of the oxygen, so that is one of the reasons to induce this method to research of beer quality.

The aim of the paper is to present the role of ROS on the quality of beer, to experimentally determine the content of ROS in beer and to determine the potential differences in their content in different types of industrial beer.

Key words: ROS, beer, beer staling

Thesis contains: 32 pages
10 figures
5 tables
0 supplements
28 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|-------------------------------------------------------|---------------|
| 1. <i>Bojan Šarkanj</i> , PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. <i>Kristina Mastanjević</i> , PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Tihomir Kovač</i> , PhD, scientific consultant | co-supervisor |
| 4. <i>Vinko Krstanović</i> , PhD, prof. | stand-in |

Defense date: November 5, 2018

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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. VRSTE I PODJELE PIVA	4
2.1.1. Podjela piva prema vrsti kvasca	4
2.1.2. Podjela piva prema masenom udjelu u ekstraktu.....	6
2.1.3. Podjela piva prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine	7
2.1.4. Podjela piva prema boji	7
2.1.5. Podjela piva prema volumnom udjelu alkohola.....	8
2.2. SASTAV PIVA	8
2.2.1. Voda	8
2.2.2. Alkohol i ekstrakt	9
2.2.3. Organski sastojci piva.....	10
2.2.4. Minerali u pivu.....	10
2.3. PROIZVODNJA PIVA	11
2.3.1. Proizvodnja slada	12
2.3.2. Proizvodnja pivske sladovine	13
2.3.3. Vrenje pivske sladovine	13
2.3.4. Odležavanje piva.....	14
2.3.5. Filtracija i punjenje u boce	14
2.4. STARENJE I ULOGA KISIKA U PIVU	15
2.4.1. Reaktivni oblici kisika i njihovo nastajanje	15
2.4.2. Oksidacija piva	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. CILJ I ZADATAK	19
3.2. MATERIJALI I METODE	19
3.2.1. Analiza sadržaja reaktivnih vrsta kisika.....	20
3.2.2. Analiza pH.....	21
3.2.3. Određivanje volumnog udjela alkohola	21
3.2.4. Određivanje oksidacijsko – redukcijskog potencijala (ORP)	21
3.2.5. Određivanje udjela kisika	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
5. ZAKLJUČCI	28
6. LITERATURA	30

Popis oznaka, kratica i simbola

DCF	Diklorofluoroscein
DCFH ₂	Diklorodihidrofluoroscein
EBC	European Brewery Convention
EDTA	Etilendiamin tetra -octena kiselina
MEBAK	Central European Commission for Brewing Analysis
MPS	Ministarstvo poljoprivrede
ORP	Oksidacijsko -redukcijski potencijal
PTF	Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
ROS	Reaktivne vrste kisika

1. UVOD

Prema pravilniku o pivu (MPS, 2011.), pivo je proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanim vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura. Tijekom proizvodnje i kuhanja sladovine kao i u procesu glavnog i naknadnog vrenja nastaju tvari koje su odgovorne za karakterističnu aromu i okus piva (Pavlečić, 2012.).

Reaktivne vrste kisika (ROS, eng. *reactive oxygen species*) nastaju kao prirodni nusprodukti metabolizma kisika te su povezani s različitim fiziološkim procesima, ali i bolestima u ljudi. ROS-ovi uključuju kisikove radikale kao što su superoksidi (O_2^-), hidroksil radikal (OH^\cdot), i hidroperoksil radikal (HO_2^\cdot), ali također uključuju neradikalne oksidanse ako što su vodikov peroksid, ozon i hipoklorna kiselina koji mogu biti prevedeni u radikale. ROS-ovi se smatraju važnim markerima i uzročnicima nekolicine bolesti i patoloških stanja, a neke od njih su rak, kardiovaskularne bolesti, upalna stanja, neurodegenerativne bolesti, oštećenje DNA, itd. (Bhattacharya i sur., 2016.).

Cilj ovog rada je na osnovi dostupne literature prikazati ulogu ROS-ova na kvalitetu piva, eksperimentalno odrediti sadržaj ROS-ova u pivu te odrediti potencijalne razlike u njihovom sadržaju u različitim tipovima industrijski proizvedenog piva. Analiza reaktivnih vrsta kisika provedena je modificiranom spektrofluorometrijskom metodom, a temelji se na sposobnostima diklorodihidrofluorosceina da lako reagira sa ROS-ovima pri čemu nastaje fluorescentni oblik diklorofluoroscein.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. VRSTE I PODJELE PIVA

Proizvodnja piva je složen proizvodni proces koji uključuje različite tehnološke operacije, no kao najbitnije mogu se izdvojiti:

- proces proizvodnje pivske sladovine od pivskog slada, neslađenih sirovina, hmelja i vode različite tvrdoće primjenom različitih tehnoloških postupaka (Schuster i sur. 1988.),
- vrenje sladovine s čistim kulturama različitih sojeva kvasca gornjeg i donjeg vrenja te „divljih kvasaca“ te
- različiti postupci dozrijevanja i dorade mladog piva.

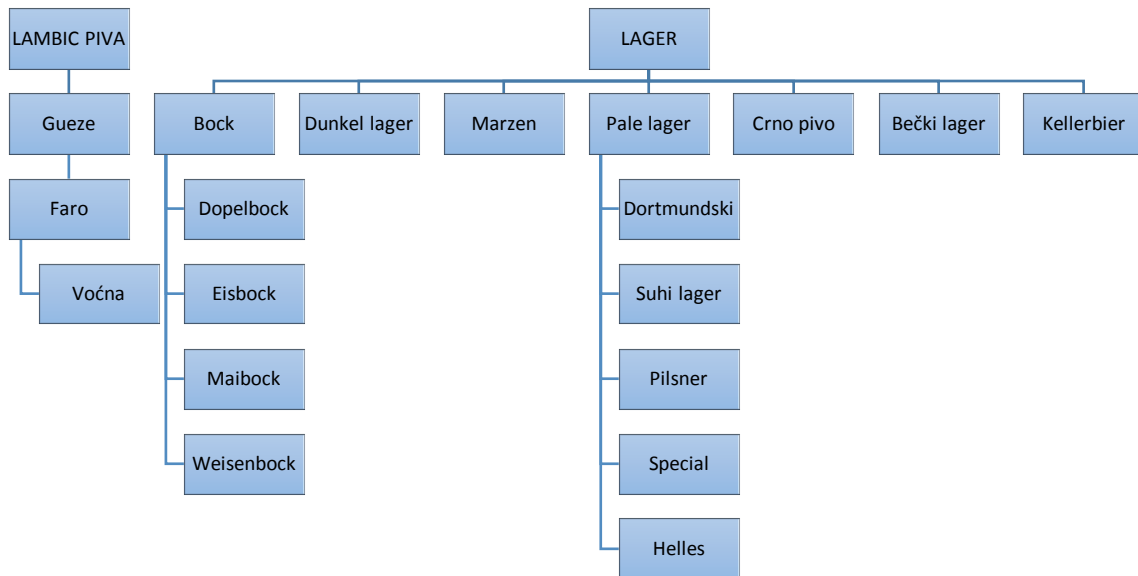
Podjela piva na tipove i vrste definirana je strogim pravilnicima (Pravilnik o pivu, MPS, 2011.) o kvaliteti piva koji su proizašli iz pivarske prakse (Marić, 2009.)

2.1.1. Podjela piva prema vrsti kvasca

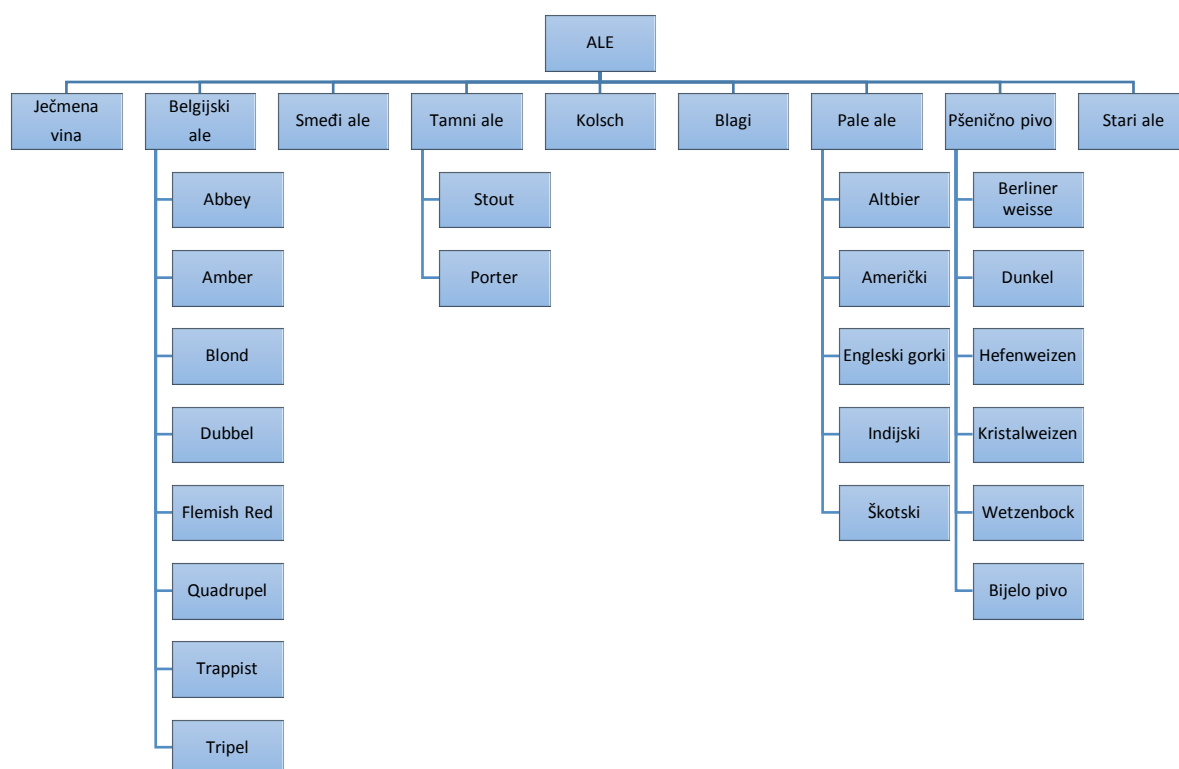
Podjela piva prema vrsti kvascu je najraširenija i najpoznatija podjela, kojom piva dijelimo na piva gornjeg vrenja (*ale*) i piva donjeg vrenja (*lager*). U svijetu, najviše se konzumiraju lager piva, a ona se dobivaju vrenjem pivske sladovine pomoću različitih sojeva čiste kulture kvasca vrste *Saccharomyces uvarum*. Vrenje započinje pri 6-8 °C te se zbog toga naziva hladnim vrenjem, a završava na 9-18 °C kad se mlado pivo hladi pri čemu se kvasac taloži na dno spremnika. Nakon izdvajanja istaloženog kvasca mlado pivo odležava u ležnim spremnicima pri 0-1 °C nekoliko tjedana. Vrste lager piva se razlikuju prema tvrdoći vode, razgrađenosti i boji slada za pripremu sladovine. Primjerice, plzensko lager pivo se proizvodi od vrlo mekane vode i vrlo svjetlog slada, a dortmundsko od tamnog slada i tvrde vode. Upravo iz tog razloga vrste lager piva se razlikuju po nijansi boje, punoći okusa i aromi (Marić, 2009.)

Drugi tip piva je prije spomenuto ale pivo. Pri proizvodnji ovog tipa piva vrenje započinje na temperaturi sladovine od 10 °C, a završava na 25 °C kada kvasac ispliva na površinu mladog piva. Za alkoholno vrenje ove vrste piva rabi se čista kultura pivskog kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Ovakav tip vrenja se naziva toplo vrenje, a proizvod pivom gornjeg vrenja. Nakon izdvajanja kvasca, mlado pivo odležava i dozrijeva pri 20 °C tijekom vremenskog perioda kraćeg nego pri proizvodnji lager piva. Postoje različite vrste ale piva, a

ovise o kakvoći vode, slada, boje, gorčine, koncentracije alkohola i izvornosti tehnološkog procesa. Razlika između kvasaca donjeg i gornjeg vrenja je sposobnost fermentacije i asimilacije melibioze. Kvasci donjeg vrenja potpuno koriste melibiozu i rafinozu, a kvasci gornjeg vrenja ne mogu koristiti melibiozu jer nemaju enzim melibiazu, te koriste samo trećinu rafinoze (Grabovac, 2016.).



Slika 1 Neke od najpoznatijih vrsta lager piva (prilagođeno iz Anonymous 1)



Slika 2 Neke od najpoznatijih vrsta ale piva (prilagođeno iz Anonymous 2)

2.1.2. Podjela piva prema masenom udjelu ekstrakta

Na osnovi masenog udjela ekstrakta u slakovini prije početka vrenja, tipovi piva dijele se na:

- slaba ili laka piva koja imaju mali udio alkohola i neprevrelog ekstrakta,
- standardna piva koja se proizvode od slakovine sa 10-12 % ekstrakta, pa je udio alkohola u tim pivima od 3,5 - 5,5 vol. %,
- specijalna piva koja se proizvode iz slakovine sa više od 12 % ekstrakta , sadrže više neprevrela ekstrakta pa se nazivaju i puna piva,
- dvostruko sladna piva se proizvode od slakovine sa 18 -22 % ekstrakta, te se nazivaju i jakim pivima jer sadrže povećan udio alkohola i neprevrelog ekstrakta te

- ječmena vina koja sadrže volumni udio alkohola od 7,5 -10 vol. %, a sadrže veliki udio neprevrelog ekstrakta, te se konzumiraju u malim količinama (Marić, 2009.).

2.1.3. Podjela piva prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine

Ječmeni slad je osnovna sirovina za proizvodnju većine lager i ale piva, ali moguće ga je djelomično zamijeniti s „neslađenim“ sirovinama, što mora biti naznačeno na deklaraciji piva. Zamjenom najmanje 50 % ječmenog s pšeničnim sladom dobiva se pšenično pivo. U usporedbi sa pivima od ječmenog slada pjena im je vrlo blijeda (Kunze, 1996.). Pšenica pivu daje bljeđu boju nego ječam, a tome pridonosi visok udio mliječne kiseline u pivu. Postoji i raženo pivo koje se proizvodi od raženog slada koji pivu daje vrlo karakterističan okus zbog voćnih, gorkih, pikantnih, uljasti i ljutih obilježja paprene metvice. Za proizvodnju tradicionalnog afričkog piva koristi se slad dobiven od prosa (Marić, 2009.).

2.1.4. Podjela piva prema boji

Točna nijansu boje piva može se odrediti prema EBC (European Brewing Convention) skali. Na osnovi boje piva se dijele na: svijetla (do 10 EBC jedinica), crvena ili tamna (od 16 -40 EBC jedinica) i crna (preko 40 EBC jedinica), ali se zapravo radi o različitim nijansama žute, crvene, crveno smeđe i crne boje (Marić, 2009.). Na boju piva utječu polifenoli koji se nalaze u ječmu te prilikom kuhanja slada dolazi do oslobađanja polifenolnih komponente te nastaju neke nove komponente, a dolazi i do formiranja boje. Dva glavna procesa tijekom kojih dolazi do formiranja boje u pivu su karamelizacija i Maillard-ove reakcije. Karamelizacijom mogu nastati stotine različitih kemijskih produkata sa različitim bojama, ali ih je većina smeđe obojeno. Maillard-ove reakcije doprinose boji piva tako što se tijekom njih formiraju melanoidini koji daju pivu tamniju boju. Također neki produkti Maillard-ovih reakcija, kao što su furani, furanozini, pirolini, pirazini utječu na boju piva. Povećana koncentracija ovih spojeva u pivu će uzrokovati da piva budu tamnija, dok manja količina ovih spojeva daje svjetlija piva (Spearot, 2016.).

2.1.5. Podjela piva prema volumnom udjelu alkohola

Pivo se prema udjelu volumnog alkohola dijeli na:

- bezalkoholna piva koja sadržavaju do 0,5 % vol. alkohola,
- piva s malim udjelom alkohola ili tzv. lagana piva sadrže do 3,5 % vol. alkohola,
- standardna lager piva i piva gornjeg vrenja sadrže preko 3,5 % vol. alkohola te
- jaka piva sadrže više od 5,5 % vol. Alkohola.

U svim europskim zemljama udio alkohola mora biti naznačen na etiketi. Prema udjelu alkohola određuje se visina poreza na pivo (Marić, 2009.).

2.2. SASTAV PIVA

Pivo sadrži više od 600 sastojaka, a osim vode koja sačinjava 90 % piva još je samo nekoliko komponenti koje se pronalaze u koncentraciji većoj od 1 g/L u pivu. Ti sastojci su neprevreli ekstrakt, etanol, ugljikov dioksid i glicerol. Većina komponenti piva dolazi iz samih sirovina (slad, voda, hmelj), dok neki sastojci nastaju kao nusproizvod metabolizma kvasca i promjena koje se događaju tijekom fermentacije (Kunze, 1996.).

2.2.1. Voda

Pivo se najvećim dijelom sastoji od vode. Ovisno o vrsti, udio vode u pivu iznosi 89-93 % (Marić, 2009.). Voda koja se koristi za proizvodnju piva je sigurna, mikrobiološki i kemijski ispravna jer se kontrolira suvremenim tehnološkim postupcima, te se usklađuje sa zakonskim i zdravstvenim normativima. Mineralni sastav vode je jako bitan i ključni je element za odabir vode za proizvodnju piva. U današnje vrijeme sastav mineralnih soli u vodi se korigira te je bitno često provjeravati sastav vode koja se koristi za proizvodnju piva. Dodavanje kloridne i/ili sulfatne kiseline je najjednostavniji postupak prilagođavanja vode, a najčešća metoda određivanja tvrdoće vode je titracija sa EDTA uz indikator (Grabovac, 2016.).

2.2.2. Alkohol i ekstrakt

Najvažniji alkohol koji se nalazi u pivu je etanol. Više od polovine energetske vrijednosti piva potječe upravo od etanola. Standardna piva kakva se kod nas najčešće konzumiraju (do 5,5 % vol. alkohola) imaju mali udio viših alkohola (do 60 mg/L). Viši alkoholi koji se nalaze u pivu su: n -propanol, izobutanol, amilalkohol, i 2 -feniletanol. Viši alkoholi su alkoholi koji izazivaju glavobolju, nemir i razdražljivost, te dugotrajni mamurluk (Marić, 2009.).

Tablica 1 Koncentracija alkohola u pivu (Biuatti, 2009.)

ALKOHOL	KONCENTRACIJA (mg/L)
Etanol	20000 -80000
Metanol	0,5 -3,0
1 -Propanol	3 -16
2 -Propanol	3 -6
2 -Metilbutanol	8 -30
3 -Metilbutanol	30 -70
2 -Feniletanol	8 -35
1 -Okten -3 -ol	0,03
2 -Dekanol	0,005
Glicerol	1200 -2000
Tirosol	3 -40

Udio suhe tvari ili nefermentabilni ekstrakt pretežno je sastavljen od ugljikohidrata (75 -80 %), dušikovih spojeva (6 -9 %) i ostalih organskih (4 -5 %) i anorganskih sastojaka. Ugljikohidratni dio ekstrakta se sastoji od razgradljivih dekstrina koji se sastoje od tri ili više glukoznih jedinica (maltotriosa, maltotetroza, maltopentoza). Dušikovi spojevi u ekstraktu se određuju u mg/L, to su sljedeći spojevi: ukupni dušik (700 -800), koagulirajući dušik (18 - 20), magnezijev sulfatni dušik (130 - 160), α -amino dušik (100 -120) i formolni dušik (160 -210). Litra standardnog piva sadrži preko 100 mg aminokiselina (Marić, 2009.).

Tablica 2 Koncentracija ugljikohidrata u pivu (Biuatti, 2009.)

UGLJIKOHIDRATI	KONCENTRACIJA (g/L)
Fruktoza	0 -0,19
Glukoza	0,04 -1,1
Saharoza	0 -3,3
Maltoza	0,7 -3,0
Malotrioza	0,3 -3,4

2.2.3. Organski sastojci piva

Najvažniji organski sastojci koji se nalaze u pivu su:

- glicerol (1400 -1600 mg/L) koji utiče na viskozitet i osjećaj slatkoće piva,
- β -glukan (12 -500 mg/L) je hemiceluloza, koristan za probavu, snižava razinu kolesterola, te smanjuje rizik od srčanih bolesti,
- antocijanogeni su fenolni spojevi iz slada i hmelja koji djeluju kao antioksidansi, pa imaju blagotvorni učinak na organizam,
- vicinalni diketoni su nepoželjni sastojak piva jer daje miris po medu i užglom maslacu (dobro dozrela piva ga sadrže ispod 0,1 mg/L) te
- vitamini B kompleksa, najznačajniji su niacin, riboflavin (B2), piridoksin (B6), folati (B9) i kobalamin (B12) (Marić, 2009.)

2.2.4. Minerali u pivu

Najznačajniji minerali za proces proizvodnje piva su kalcij, natrij, kalij, magnezij, sulfati, karbonati, kloridi, nitrati i bikarbonati. Neki od ovih iona mogu se istaložiti tijekom proizvodnje, a neki mogu ući u metabolizam kvasca pa se sastav iona u pivu razlikuje od sastava iona u vodi koja se koristi za proizvodnju. Najvažniji je kalcijev ion jer je on aktivator enzima koji su potrebni za razgradnju škroba u jednostavnije šećere time što povećava kiselost. Karbonati i bikarbonati povećavaju pH te nisu poželjni. Magnezij ima sličnu ulogu

kao kalcij, a natrij utječe na slatkoću u okusu. U pivu se mogu pronaći još neki elementi u tragovima, a to su željezo, cink i mangan (Biuatti, 2009.)

Tablica 3 Mineralni sastojci piva (Kunze, 1996.)

MINERALI	KONCENTRACIJA (mg/L)
Natrij	30 -32
Kalij	500 -600
Kalcij	35 -40
Magnezij	100 -110
Fosfati	300 -400
Sulfati	150 -200
Kloridi	150 -200
Nitrati	20 -30

2.3. PROIZVODNJA PIVA

Proces proizvodnje piva sastoji se od 5 faza:

1. prerade ječma u slad,
2. dobivanja pivske sladovine i hmelja,
3. previranja pivske sladovine uporabom specijalnog pivskog kvasca,
4. sazrijevanja piva te
5. filtriranja i punjenja u ambalažu.

izmjena biokemijskog sastava te nakupljanje što veće količine šećera u zrnju koja ulazi u fermentaciju. Također, bitno je da se proteini razgrade do aminokiselina te da aromatične tvari ostanu u aktivnom stanju prilikom sušenja slada. Za proizvodnju slada koriste se zrna ječma koja imaju visok postotak klijavosti, ne niži od 95 %, te prosječan sadržaj proteina od 9 -14 % (Veselov, 1966). Zrna bi trebala biti ujednačena i krupna, a iz takvih se zrna proizvodi slad sa visokom fermentativnom aktivnošću što omogućava dobivanje veće količine i kvalitetnije pивske sladovine. Sastav slada i količina ekstrakta ovise o biokemijskom sastavu ječma, posebno o koncentraciji dušikovih tvari i škroba u zrnju. Ječam sa sadržajem proteina višim od 14 % daje manje ekstrakta, a slad od takvog zrna ima tamniju boju, sadrži manje ugljikohidrata i znatnu količinu otopljenih dušikovih tvari i aminokiselina (Veselov, 1966.).

2.3.2. Proizvodnja pивske sladovine

Pивska sladovina se dobiva iz slada, neslađenih sirovina, vode i hmelja, a odvija se u nekoliko etapa. Slad se prvotno usitnjava u mlinu te se miješa s toplom vodom kako bi se aktivirali enzimi potrebni za pretvorbu škroba u fermentativne šećere. Kod ale piva preporučena temperatura je 65 °C, a za lager piva miješanje se odvija na nižim temperaturama (45° C) jer njihovi sladovi sadrže više glukana i proteina te ih na nižim temperaturama enzimi proteaza i glukanaza razgrađuju (Parker, 2012.). Zaslađena komina filtrira se u specijalnim filtracijskim posudama te se dobiva sladovina. Dobivena sladovina kuha se 1 -2 h, a tijekom kuhanja joj se dodaje hmelj. Tijekom kuhanja proteini koaguliraju, fermentirajući šećeri se inaktiviraju, tvari hmelja se otapaju, a sladovina poprima gorčinu i aromu hmelja. Kuhanje sladovine osigurava istovremenu sterilizaciju prije nacjepljivanja kvascem. Nakon završetka kuhanja iz sladovine se izdvajaju hmelj i proteinski talog (Veselov, 1966). Ohmeljena sladovina se mora ohladiti prije dodavanja kvasca. Ale piva se hlade na 16 -22 °C, a lager piva na 6 -16 °C zbog različite temperature vrenja, kao što je ranije u tekstu opisano (Grabovac, 2016).

2.3.3. Vrenje pивske sladovine

Proces vrenja pивske sladovine se odvija na niskim temperaturama pomoću specijalnog pивskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Ohlađena sirovina se cjevovodom transportira u posebne uređaje za vrenje gdje se dodaje kvasac. Proces vrenja odvija se u određenim temperaturnim uvjetima ovisno o vrsti piva koje se proizvodi. Tako se za lager piva vrenje odvija na temperaturama od 6 -18 °C, dok za ale piva vrenje se odvija na temperaturama od

10 -25 °C. U ovom procesu kvasac prevodi šećere u alkohol, ugljikov dioksid i ostale komponente koje pridonose okusu. Tijekom vrenja oslobađa se velika količina topline koja je rezultat aktivnosti kvasca, pa se radi toga provodi hlađenje pred kraj procesa na temperaturu od 4 -5 °C. Također, tijekom vrenja kvasac se razmnožava te se njegova količina poveća 2 –4 puta u odnosu na početnu količinu. Pred završetak vrenja kvasac se taloži na dno, što dovodi do bistrenja piva. Pivo nakon vrenja još nije zrelo, još je mutno, sadrži malu količinu CO₂, te ima poseban okus i aromu mladog piva (Marić, 2009.).

2.3.4. Odležavanje piva

Nakon vrenja, pivo se još naziva i „zelenim“. Proces odležavanja piva se provodi u spremnicima pri temperaturi od 1 do 3 °C pod tlakom CO₂ od 0,3 do 0,7 bar. Za vrijeme odležavanja dolazi do laganog previranja preostale količine šećere te nastajanja ugljične kiseline. Zbog stvaranja ugljične kiseline u spremniku dolazi do povećanja tlaka, a koji omogućava vezanje CO₂ tako da sadržaj ugljične kiseline pred kraj vrenja dostiže vrijednost od 0,4 do 0,5 %. Tranjanje procesa odležavanja ovisi o vrsti piva. Vrste piva sa većim udjelom alkohola zahtijevaju duži period odležavanja (Veselov, 1966.).

2.3.5. Filtracija i punjenje u boce

Ako proizvedeno pivo nema namijenjenu prodaje u mutnom stanju, ono se nakon završetka procesa odležavanja cjevovodima transportira na filtraciju. Cilj procesa filtracije je stabilizacija piva, odnosno smanjenje nepoželjne mutnoće i izdvajanje ostatka stanica kvasca koje bi se mogli pronaći u pivu, a uzrokuju kvarenje ili destabilizaciju piva. Moderna filtracija se vrši pomoću kombinacije filter ploča sastavljenih od celuloznih vlakana i *kieselgura* (dijatomejska zemlja -sitni pijesak napravljen od silikatne sedimentne stijene koja je nastala taloženjem ostataka jednostaničnih algi kremenjašica) (Zarknow, 2014.). Pri industrijskoj proizvodnji piva se radi dodatne stabilizacije piva provodi pasterizacija. Navedenim procesom se uklanjaju svi potencijalno štetni organizmi. Međutim, negativna strana pasterizacije je gubitak arome i okusa uzrokovan povišenom temperaturom. Najčešći oblik pasterizacije koji se koristi je tretman temperaturom od 62 °C tijekom 20 min, iako se sve češće koristi oblik pasterizacije pri višoj temperaturi od 72 °C i kraćem vremenu od 15 do 30 s. Također, postoji i proces hladne pasterizacije. Pri ovom procesu se ne koristi toplina kao

sredstvo neutralizacije mikroorganizama nego kemijske tvari prilikom odležavanja ili filtracije, čime se izbjegava gubitak arome i okus piva.

Proces punjenja piva u ambalažu se provodi u aseptičnim uvjetima, a preko uređaja za punjenje pod protutlakom CO₂, u svrhu očuvanja vezane ugljične kiselina koja osigurava gaziranost piva (Harrison, 2009.).

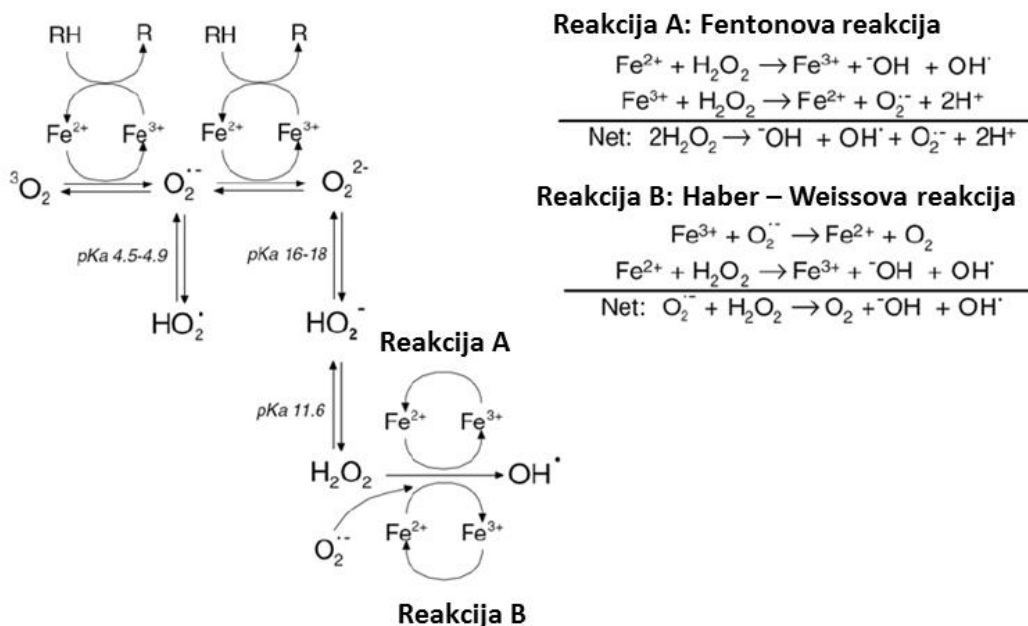
2.4. STARENJE I ULOGA KISIKA U PIVU

Zapakirano pivo je zatvoreni sustav koji je kontinuirano izložen promjenama. Te promjene dovode do promjena u stabilnosti okusa, pjene i koloida. Radikalne reakcije koje su često uzrokovane reaktivnim vrstama kisika (ROS) imaju važan doprinos kad je riječ o starenju piva, a također dovode u pitanje stabilnost piva. Oksidacija nezasićenih masnih kiselina kao i Maillard-ove reakcije dovode do nastanka stotina različitih spojeva. Degradacija kiselina iz hmelja i karotenoida, oksidacija polifenola, hidroliza glikozida i estera, ili sinteza estera, acetilacija aldehida su reakcije koje doprinose starenju piva (De Schutter i sur. 2008).

2.4.1. Reaktivni oblici kisika i njihovo nastajanje

Kisik u svom molekularnom stanju (³O₂) nije posebno reaktivan te nije za očekivati da će reagirati sa sastojcima piva nakon što je ono zapakirano. Međutim, pomoću iona metala (bakar, željezo), svjetlosti i enzimske aktivnosti on se može aktivirati te nastaju reaktivni oblici kisika kao što su singlet kisik (¹O₂), superoksid (O²⁻), hidroksiperoksilni radikal (OOH⁻), hidroksilni radikal (OH) i vodikov peroksid (H₂O₂). Kao što im samo ime govori vrlo su reaktivni i to im dozvoljava da reagiraju sa različitim komponentama. Reaktivnost kisikovih radikala raste s obzirom na redukcijski status (superoksid < hidroksiperoksilni radikal < hidroksilni radikal). Superoksid anion nastaje iz kisika tijekom skladištenja piva. Ova reakcija je katalizirana oksidacijom Fe²⁺ ili Cu⁺ iona u Fe³⁺ ili Cu²⁺, oba elementa su prisutna pivu u tragovima. Nadalje, zbog niske pH vrijednosti piva iz superoksidnog aniona nastaje hidroperoksilni radikal, ukoliko se superoksid ne reducira do peroksidnog aniona (O₂²⁻). Ukoliko se superoksid reducira do peroksidnog aniona iz njega lako nastaje H₂O₂ zbog visoke pKa vrijednosti peroksidnog aniona. Iz vodikovog peroksida može nastati hidroksilni radikal tijekom čuvanja. Koncentracija ovih slobodnih radikala se povećava s povećanjem koncentracije željeza i bakra, količine kisika i temperature. Ovi radikali reagiraju sa

komponentama iz piva kao što su polifenoli, izohumuloni i alkoholi, što dovodi do raznih promjena u samom pivu (Vanderhaegen i sur., 2006.).



Slika 4 Nastajanje reaktivnih vrsta kisika (Vanderhaegen, 2006.)

2.4.2. Oksidacija piva

Čak i mikrobiološki ispravno pivo bez ikakvih patogena stari, a glavni razlog toga je kisik koji uzrokuje nestabilnost arome i okusa piva. Smanjenjem količine kisika u pivu produžuje se njegovo trajanje pa se pokušava proizvesti konačan proizvod koji ne bi sadržavao kisik ili bi ga sadržavao u minimalnim količinama. Ciljana koncentracija kisika u gotovom pivu je 0,0 - 0,5 mg/L. Aldehidi, ketoni, heterosiklički spojevi, laktoni, sumporni spojevi samo su neki od sastojaka koji nastaju starenjem piva. Neki od najvažnijih alkohola u pivu, poput etanola, 2-metil-propanola, 2-metil -butanola, 3-metil-butanola i 2-fenil-etanola, se pomoću kisika oksidiraju u pripadajuće aldehide uz prisutnot melanoidina. Mehanizam je takav da alkoholi prenose elektron u reaktivnu karbonilnu skupinu melanoidina te bez prijenosa elektrona ne bi moglo doći do oksidacije alkohola u prisustvu kisika. Degradacijom hmeljnih kiselina poput α -kiselina, β -kiselina i izo $-\alpha$ -kiselina dolazi do nepoželjnih promjena u pivu koje rezultiraju nepoželjnim okusom. Dokazano je da se degradacijom stvaraju kisikovi i ugljikovi radikali koji mogu reducirati druge spojeve. Kako u pivu postoje prooksidansi poput iona bakra i željeza koji sudjeluju u stvaranju ROS-ova, tako postoje i tvari koje stupaju u reakciju s

njima čime smanjuju njihovu ulogu u starenju piva. Te tvari se nazivaju antioksidansima, a najznačajniji u pivu su sulfiti i polifenoli. Sulfiti nastaju iz sulfata putem metabolizma kvasaca te zahvaljujući reakcijom sa peroksidom odgađaju nastajanje slobodnih radikala. Polifenoli u pivu potječu iz ječma (70-80 %) i hmelja (20-30 %), a treba naglasiti da spojevi sa manjom molekulskom masom imaju manju antioksidativnu aktivnost. Tako polifenoli reagiraju sa slobodnim radikalom tvoreći tzv. fenoksi radikale koji su stabilni zbog delokalizacije slobodnog radikala preko aromatskog prstena (Vanderhaegen i sur., 2006.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. CILJ I ZADATAK

Cilj ovog rada bio je prikazati ulogu reaktivnih oblika kisika na kvalitetu piva, eksperimentalno odrediti sadržaj ROS-ova modificiranom spektrofluorimetrijskom metodom, oksidacijsko-redukcijski potencijal, pH te slobodni kisik u uzorcima različitih tipova industrijski proizvedenog piva te odrediti potencijalne razlike u njihovom sadržaju.

3.2. MATERIJALI I METODE

U eksperimentalnom dijelu ovog rada osim reaktivnih oblika kisika, određivani su i drugi parametri u pivu kao što su volumni udio alkohola, oksidacijsko – redukcijski potencijal (ORP) i udio kisika u gaziranim i degaziranim uzorcima piva.

Pri eksperimentalnom dijelu rada navedenim metodama objašnjenim u nastavku analizirano je 12 vrsta piva prisutnih na tržištu Republike Hrvatske, pri čemu je svaki od 12 uzoraka analiziran u triplikatu.



Slika 5 Uzorci piva korišteni za analize

Tablica 4 Korišteni uzorci piva po tipovima piva

UZORAK	TIP PIVA
1	Svijetli lager
2	Pils
3	Pils
4	Svijetli lager
5	Svijetli lager
6	Svijetli lager
7	Tamno
8	Tamno
9	Tamno
10	Crno
11	Crno
12	Crno

3.2.1. Analiza sadržaja reaktivnih vrsta kisika

Analiza reaktivnih vrsta kisika (ROS) provedena je modificiranom spektrofluorimetrijskom metodom na uređaju Cary Eclipse (Varian, SAD) prema Narasaiah i suradnicima (2006.). Metoda se temelji na sposobnosti diklorodihidrofluoresceina (DCFH_2) da lako reagira sa ROS -ovima pri čemu nastaje fluorescentni produkt diklorofluoroscein (DCF).

U plastičnu epruvetu volumena 2 mL je na 100 μL uzorka piva dodano 880 μL 100 mmol/L kalijevog fosfatnog pufera pH 5,5 i 20 μL radne otopine DCFH_2 koja je svježe pripravljena svaki dan analize (10 mmol/L DCFH_2 otopljeno je u apsolutnom etanolu te razrijeđeno s apsolutnim etanolom u omjeru 1:9). Nakon snažnog miješanja pomoću vorteks mješalice, suspenzija je inkubirana na 28 °C u tami te je točno po isteku 15 minuta od dodatka DCFH_2 izmjerena fluorescencija uz ekscitaciju pri 524/520 nm, te emisiju pri 504/490 nm (Davidson i sur., 1996.). Intenzitet fluorescencije je izražen u relativnim jedinicama fluorescencije, a

prethodno je korigiran sa intenzitetom slijepa probe koja je sadržavala 100 mmol/L kalijev fosfatnog pufera pH 5,5 (Tablica.) (Davidson i sur., 1996; Narasaiah i sur., 2006.).

Sve boce otvarane su neposredno prije analize da bi se minimalizirao kontakt sa kisikom.

Tablica 5 Protokol za određivanje sadržaja reaktivnih oblika kisika u pivu

Komponente reakcijske smjese	Volumen (μL)	
	Glavna proba	Slijepa proba
Uzorak	100 μL	-
100 mM Kpi pH 5,5	880 μL	1000
Radna otopina DCFH ₂	20 μL	-

Inkubacija 15 minuta pri 28 °C
Mjerenje fluorescencije pri 524;504/520;490 nm

3.2.2. Analiza pH

Analiza pH uzoraka piva odrađena je prema standardnoj metodi opisanoj u MEBAK-u (1997), a upotrebom uređaja HANNA HI-2020 edge® Hybrid Multiparameter i pH elektrode (Hanna Instruments Ltd., SAD).

3.2.3. Određivanje volumnog udjela alkohola

Volumni udio alkohola određen je pomoću Beer Analyser uređaja (Anton Paar, Austrija) prema standardnoj MEBAK metodi.

3.2.4. Određivanje oksidacijsko – reduksijskog potencijala (ORP)

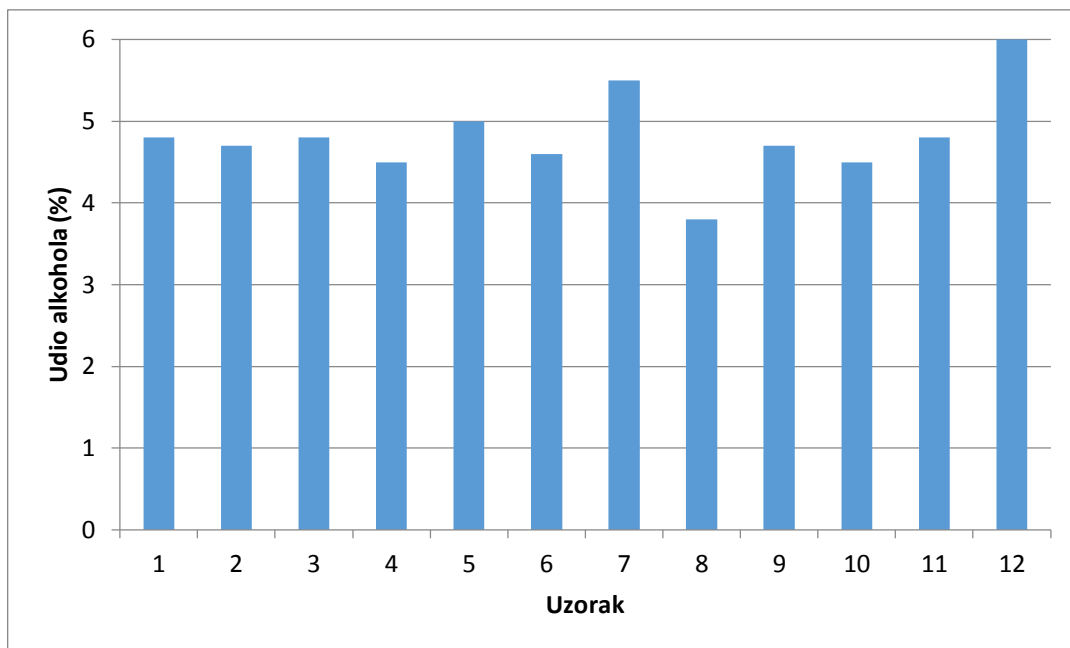
Oksidacijsko reduksijski potencijal određivan je pomoću uređaja Mettler Toledo, FiveEasy FE20 (Mettler Toledo, Švicarska) izravnim uranjanjem u uzorak. Rezultat je očitao nakon što se vrijednost na ekranu uređaja ustalila.

3.2.5. Određivanje udjela kisika

Udio kisika određivan je u gaziranim uzorcima piva pomoću kisikove elektrode uređajem HANNA HI-2020 edge® Hybrid Multiparameter i kisikove elektrode (Hanna Instruments Ltd., SAD) izravnim uranjanjem u uzorak. Rezultat je očitao nakon što se vrijednost na ekranu uređaja ustalila.

4. REZULTATI I RASPRAVA

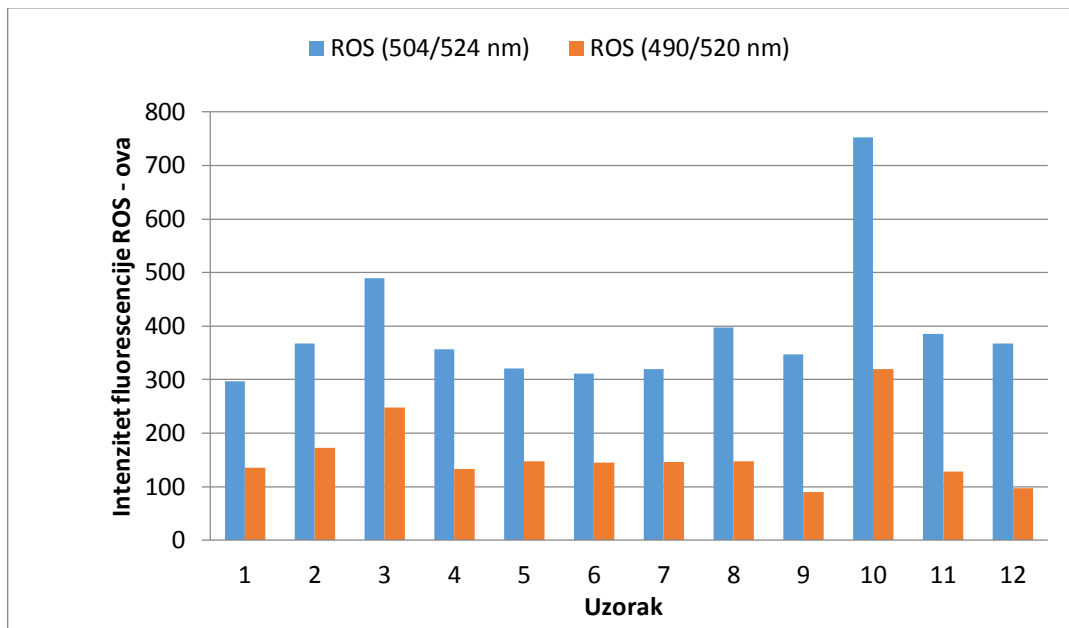
Rezultati dobiveni u ovom istraživanju prikazani su na Slikama 6-10. Na Slici 6. prikazan je volumni udio alkohola u gaziranim uzorcima piva. Vidljivo je kako količina alkohola ne ovisi o tipu piva u značajnijoj mjeri. Najveći udio alkohola, u vrijednosti 6% alk., utvrđen je u uzorku 12, a koji pripada crnom tipu piva. Slijedi ga uzorak 7 sa 5,5 % alk. koji je deklariran kao tamno pivo. Svijetla lager i pils piva imala su udio alkohola u rasponu od 4,5 do 5,0 % . Tamno lager pivo, uzorak 8, sadrži najnižu količinu alkohola (nešto više od 3,5 %).



Slika 6 Prikaz volumnog udjela alkohola u gaziranim uzorcima piva

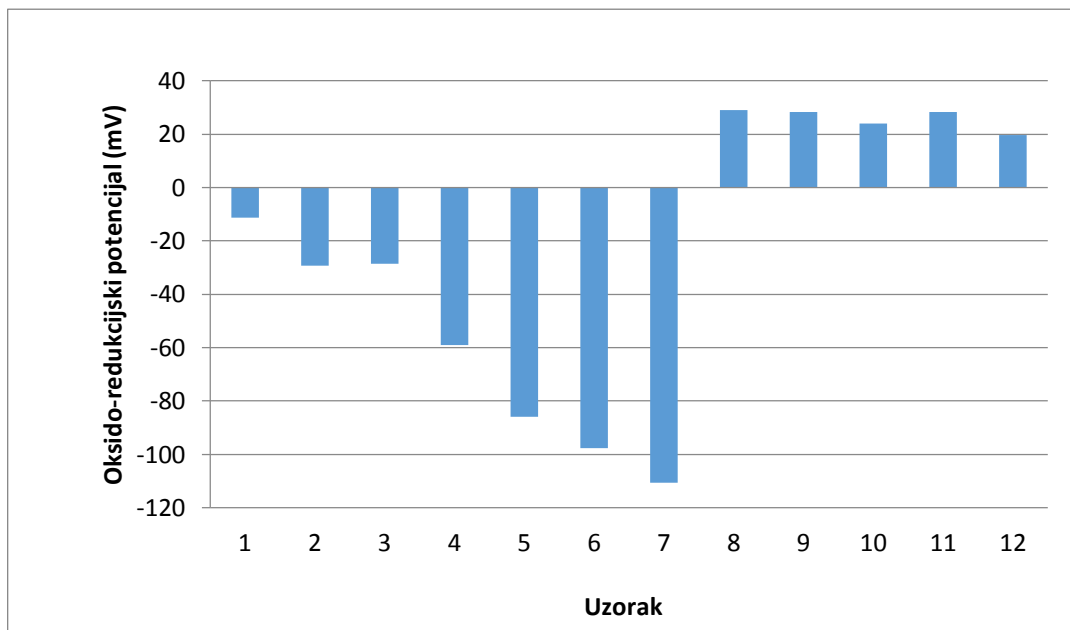
Reaktivni oblici kisika značajno utječu na kvalitetu piva, njegov okus, miris i cjelokupni dojam. Primjena ove metode na uzorke piva, odnosno njeno optimiranje može dati vrlo jednostavan uvid u procese starenja piva. Slika 7. prikazuje usporedbu intenziteta fluorescencije reaktivnih oblika kisika izmjerenih uz ekscitaciju pri 524/520 nm, te emisiju pri 504/490 nm u gaziranim uzorcima piva. Vidljivo je da su uzorci analizirani na 504/524 nm pokazali veće vrijednosti fluorescencije nego uzorci izloženi valnim duljinama 524/520 nm. Najveća odstupanja pokazali su uzorci 10 i 3, pri čemu je uzorak 10 deklariran kao crno pivo, dok je uzorak 3 deklariran kao svijetlo pils pivo. Ostali uzorci, iako pokazuju određene razlike, nisu pokazali velika odstupanja, ukoliko se u obzir uzme njihova podjela prema deklaraciji na lager, pils, crna i tamna piva. Obzirom da novija dostupna znanstvena literatura često opisuje tamna i crna piva kao ona sa većom antioksidativnom vrijednošću (Granato i sur., 2011; Baiano Terracone, 2013), očekivano je da je i količina ROS-ova manja u takvim pivima. Kao

najvjerojatniji razlog za takvo ponašanje navodi se veća količina polifenola u pils pivima, dok se za tamna piva odgovornima za antioksidativnu aktivnost smatraju produkti Maillard-ovih reakcija (Coghe i sur., 2003). Međutim, neka istraživanja su pokazala da tamni specijalni sladovi mogu imati prooksidativna svojstva (Ames, 2000.; Woffenden i sur., 2002.), dok su Nøddekær i Mogens (2007.) slične rezultate dobili prilikom dodatka karamelne boje u lager pivo.



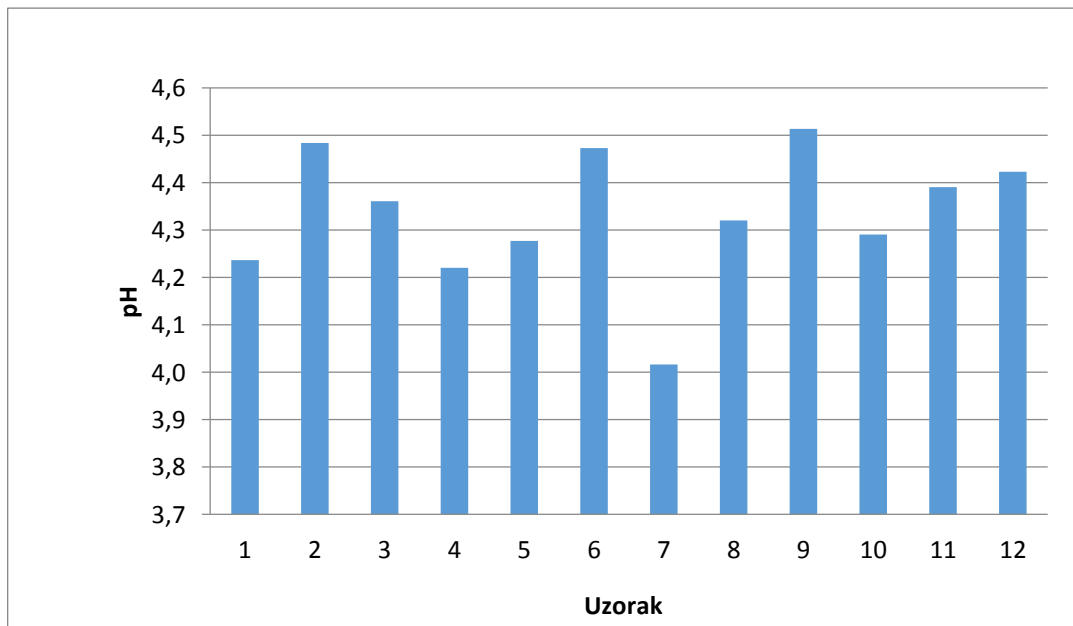
Slika 7 Prikaz intenziteta fluorescencije reaktivnih oblika kisika izmjerenih uz ekscitaciju pri 524/520 nm, te emisiju pri 504/490 nm u gaziranim uzorcima piva

Na Slici 8. prikazane su promjene oksido-redukcijskog potencijala (ORP) gaziranih uzoraka piva. Vidljivo je da se oksido-redukcijski potencijal mijenja u tamnim i crnim pivima prema pozitivnim vrijednostima. Prema dostupnoj literaturi, što je niži ORP, to je redukcijski potencijal niži (Siebel i Singruen, 1935.). U istraživanju koje su objavili Nøddekær i Mogens (2007.), dodatak karamelne boje ili stout piva u lager pivo smanjila je oksidativnu stabilnost lager piva. Prema njihovim rezultatima Maillard-ove reakcije daju produkte koji negativno utječu na oksidativnu stabilnost piva. Cantrell i Griggs (1996) objavili su da prženi slad ili ječam pridonose povećanju reducirajućeg potencijala u pivima napravljenima od takvog slada. Međutim, rezultati sa Slike 8. pokazuju da su ORP vrijednosti kod lager i pils (svijetlo) tipova piva niske. Također, tamna i crna piva posjeduju veću antioksidacijsku vrijednost nego svijetla piva. Štoviše, lager piva su se pokazala kako najveći potencijalni prooksidativni kapacitet.

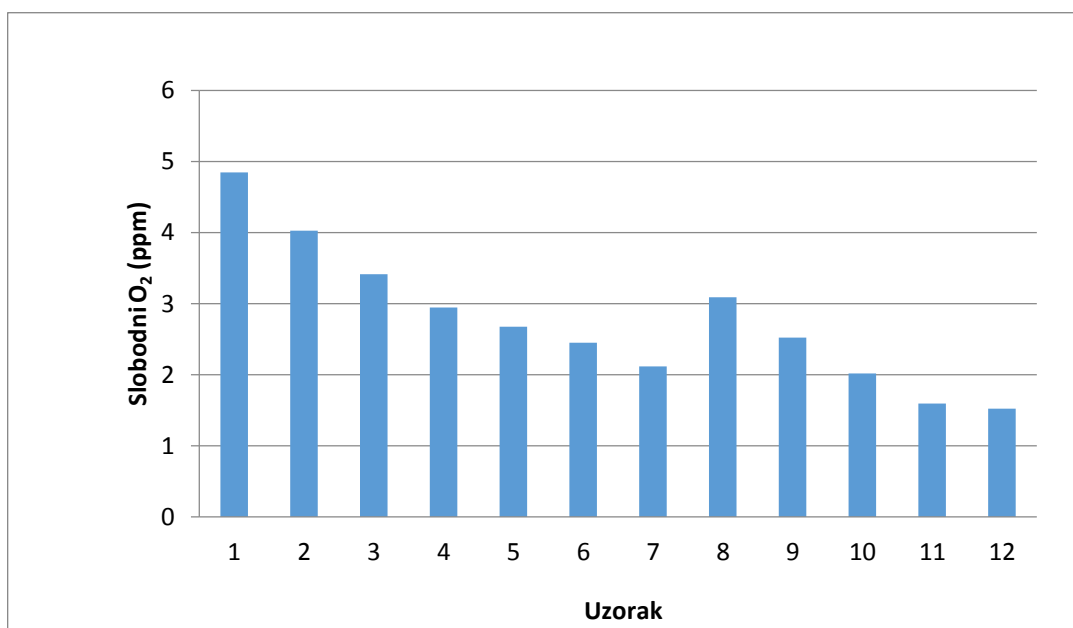


Slika 8 Prikaz oksido-redukcijskog potencijala izmjerenih u gaziranim uzorcima piva

Brojni faktori utječu na pH piva: količina alkohola, CO₂, hmeljne komponente, vrsta slada, tip kvaca i sl. pH vrijednost piva općenito se kreće od 4 do 5 za lager piva, dok su vrijednosti za tamna piva nešto niže. Prema važećem Pravilniku o pivu (MPS, 2011.) pH vrijednosti piva na tržištu Republike Hrvatske mora biti između 2,8 i 4,8. Analizom piva utvrđeno je da postoji razlika između različitih tipova analiziranih piva. Naime, analiza se radila na gaziranim uzorcima jer su se i druge analize provodile bez degaziranja, da se smanji utjecaj kisika na uzorak.



Slika 9 Prikaz pH vrijednosti izmjerenih u gaziranim uzorcima piva



Slika 10 Prikaz vrijednosti slobodnog kisika u gaziranim uzorcima piva

Slobodni kisik u gaziranim uzorcima piva služi kao pokazatelj kolika je količina kisika „zarobljena“ u tekućini, odnosno pivu po otvaranju ambalaže. Naime, što je količina kisika veća, povećava se i vjerojatnost oksidacije sastojaka piva koji uzrokuju ustajali okus i miris. Prema rezultatima prikazanim na Slici 10., najveća izmjerena koncentracija kisika

zabilježena je u svijetlim pivima, dok su tamna i crna piva sadržavala manje koncentracije slobodnog kisika, vjerojatno zbog većeg antioksidativnog potencijala. Ovi rezultati su u skladu sa dobivenim rezultatima za ROS-ove (Slika 7.) i ORP vrijednosti (Slika 8.) gdje se jasno vidi da tamnija piva imaju veću antioksidativnu vrijednost.

5. ZAKLJUČCI

1. Optimirana metoda za određivanje ROS-ova u pivu pokazala se pouzdanom i prikladnom za praćenje promjena tijekom starenja piva te određivanje starosti piva. Metoda je optimirana tako što je umjesto DCFH₂ –DA korišten DCFH₂ jer je razina ROS-ova mjerena u uzorku piva, a ne u stanici. Također, podešena je količina uzorka koja je dodavana u reakcijsku smjesu, te vrijeme inkubacije u tami. Uzorak nije centrifugiran prije mjerenja intenziteta fluorescence jer nije sadržavao stanične dijelove koji bi se trebali istaložiti. Sve ovo je napravljeno kako bi u uzorku odredili razinu intenziteta fluorescence pri točnim valnim duljinama, a da pri tome vrijednosti budu u rasponu od 100 do 1000.
2. Oksido-redukcijski potencijal pokazao je pozitivne vrijednosti za tamna i crna piva, dok su svjetla piva, lager i pils, pokazala negativne vrijednosti. Iz tih podataka se može zaključiti da tamna piva imaju veći antioksidativni potencijal u odnosu na svjetla piva.
3. Utvrđene vrijednosti koncentracija slobodnog kisika u uzorcima piva su u skladu sa utvrđenim vrijednostima ROS-ova i ORP-a. Pri tome tamna i crna piva sadrže manje koncentracije prisutnog kisika u uzorcima.
4. Svjetla piva sadržavala su više ROS-ova nego tamna piva, što je očekivano zbog većeg sadržaja polifenola u tamnim pivima.

6. LITERATURA

- Ames J. M.: Melanoidins as pro- or antioxidants. *Cerevisia* 26: 210-216, 2001.
- Anonymous 1: *Povijest piva V*, 2012. https://pivskamushica.wordpress.com/povijest-piva/povijest-piva-v/?fbclid=IwAR1BYQYUoPFdsoexppEcVUJv7zg1NhtySiDc-WIKoSyAAZqv40FCV25_q58 [4.10.2018.]
- Anonymous 2: *Povijest piva V*, 2012. https://pivskamushica.wordpress.com/povijest-piva/povijest-piva-v/?fbclid=IwAR1BYQYUoPFdsoexppEcVUJv7zg1NhtySiDc-WIKoSyAAZqv40FCV25_q58 [4.10.2018]
- Anonymous 3: *How beer is made –Industrial brewing process*, 2016. <https://moonshiners.club/beer-made-industrial-brewing-process/> [8.10.2018.]
- Baiano A, Terracone C: Physico –chemical indices, iso –alpha –acid, phenolic contents and antioxidant activity of commercial beers. *Journal of Food Research* 2: 107-120, 2013.
- Bhattacharya S, Sarkar R, Nandi S, Porgador A, Jelinek R: Detection of reactive oxygen species (ROS) by a carbon –dot –ascorbic acid hydrogel, *Analytical Chemistry* 89: 830-836, 2016.
- Buiatti S: Beer composition: An overview. U *Beer in Health and Disease Prevention*, str. 213 - 225, Academic Press Elsevier, London, 2009.
- Cantrell I.C, Griggs D.L: Malt: its role in oxidation. *Technical Quarterly Master Brewers Association of Americans* 33: 82 -86, 1996.
- Coghe S, Vanderhaegen B, Pelgrims B, Basteyns A, Delvaux F: Characterization of dark speciality malts: New insights in color evaluation and pro- and antioxidative activity. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 61: 125 -132, 2003.
- Davidson J, Whyte B, Bissinger P, Schiestl R: Oxidative stress is involved in heat –induced cell death in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 5116-5121, 1996.
- De Schutter D.P, Saison D, Delvaux F, Derdenlickx G, Delvaux F.R: Chemistry of aging beer. U *Beer in Health and Disease Prevention*. str. 373-388, Academic Press Elsevier, London 2009.
- Grabovac D: Određivanje udjela otopljenog kisika u različitim fazama proizvodnje sladovine i piva. *Završni rad*, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2016.
- Granato T, Valkaj K, Wittine O, Margeta K, Katović A, Zrnčević S: Phenol oxidation with hydrogen peroxide using Cu/ZSM5 and CuY5 catalysts. *Polish Journal of Chemical Technology* 13: 28-36, 2011.
- Harrison M.A: Beer/brewing. U *Encyclopedia of microbiology*, Academic Press, str. 23 -33, Oxford, 2009.
- Kunze W: *Brewing and malting*. VLB Berlin, Berlin, 1996.

- Marić, V: *Tehnologija piva*. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2009.
- MPS, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o pivu*. Narodne novine 142/2011, 2011.
- Narasaiah R, Kolliputi V, Sashidhar R.B, Subramanyam C: Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia* 162: 179-189, 2006.
- Nøddekær T, Andersen M: Effects of Maillard and caramelization products on oxidative reactions in lager beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 65: 15-20, 2007.
- Parker D.K: Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis. U *Alcoholic Beverages*, str. 133 -158, Woodhead Elsevier, Cambridge, 2012.
- Pavlečić M, Tepalović D, Ivančić Šantek M, Rezić T, Šantek B: Utjecaj ukupne koncentracije kisika u boci na kakvoću piva tijekom skladištenja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 7: 118-125, 2012.
- Schuster K, Weinfurtner F, Narzis L: *Tehnologija proizvodnje sladovine*. Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd, 2009.
- Siebel F.P, Singruen E: Industrial and engineering chemistry. U *Chemistry of alcoholic fermentation*, str. 1042 -1045, 1935.
- Spearot J.W: Influence of Beer Color on Perception of Bitterness. *Master rad*, Drexel University, Philadelphia, 2016.
- Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H, Derdelinckx G: The chemistry of beer aging. *Food Chemistry* 95: 357-381, 2006.
- Veselov I.J, Čukmasova M.A: *Tehnologija piva*. Poslovno udruženje industrije piva, Beograd, 1966.
- Zarnkow M: *Beer*. U *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, str. 209 -215 Poland, 2014.
- Woffenden H.M, Ames J.M, Chandra G.S, Anese M, Nicoli M.C: Effect of kilning on the antioxidant and pro –oxidant activities of pale malts. *Journal of agriculture and food chemistry* 50: 4925-4933, 2002.