

# Detekcija bisfenola A tijekom skladištenja piva pakiranih u PET boce

---

Horvat, Tina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:109:074990>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Tina Horvat**

**DETEKCIJA BISFENOLA A TIJEKOM SKLADIŠTENJA PIVA PAKIRANIH U  
PET BOCE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2023.

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 Prehrambeno inženjerstvo****Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Tehnologija i piva**Tema rada** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 17. srpnja 2023.**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Kristina Mastanjević***Pomoć pri izradi:** -**Detekcija bisfenola A tijekom skladištenja piva pakiranih u PET boce**

Tina Horvat, 0113144802

**Sažetak:** Primjena plastičnih ambalažnih materijala za pakiranje prehrambenih proizvoda donosi sa sobom niz pozitivnih svojstva. Plastični materijal je jeftiniji, lakše se oblikuje i ima manju težinu od drugih materijala pa je primarni izbor mnogih industrija za pakiranje hrane i pića. U plastičnim materijalima nalaze se dodani spojevi koji poboljšavaju svojstva plastike, ali negativno utječu na ljudsko zdravlje. Raznim čimbenicima dolazi do razgradnje plastike na manje fragmente (mikroplastika) i otpuštanja štetnih spojeva u okolinu pa tako i u prehrambene proizvode. Razvijene su metode analize određivanja ovih spojeva u hrani npr. GC-MS metoda analize (tekućinska kromatografija s masenim spektrom). U ovom radu istraživana je promjena koncentracije bisfenola A tijekom skladištenja u pivima punjenima u PET boce koje u svom sastavu nose spoj bisfenol A (BPA). Cilj ovog rada je odrediti koncentracija BPA u pivu tijekom vremena skladištenja od četiri mjeseca na dvije temperature (4 i 20 °C) korištenjem GC-MS metode te identificirati čestice mikroplastike u pivu pomoću FT-IR metode (infracrvena spektrofotometrija s Fourierovom transformacijom). Rezultati analize pokazuju da se koncentracija BPA u uzorcima povećava s vremenom, a da od čestica mikroplastike prevladavaju klorirani polietilen, mirkokristalna celuloza, akrilonitril, poli(2-3-dihidrofuran).

**Ključne riječi:** Pivo, bisfenol A, PET ambalaža, mikroplastika**Rad sadrži:** 42 stranica  
10 slika  
3 tablica  
0 priloga  
36 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |                                                   |               |
|---------------------------------------------------|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. <i>Kristina Mastanjević</i> | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. <i>Vinko Krstanović</i>          | član          |
| 3. dr. sc. <i>Brankica Kartalović, zn. sur.</i>   | član          |
| 4. doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i>           | zamjena člana |

**Datum obrane:** 29. rujna, 2023.

**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 Bioprocess engineering**  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Technology of malting and brewing

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X held on (July 17, 2023).

**Mentor:** *Kristina Mastanjević*, PhD, assistant prof.

**Technical assistance:** -

### Detection of bisphenol A during storage of beer packed in PET bottles

*Tina Horvat, 0113144802*

**Summary:** The use of plastic packaging materials for food products comes with a number of positive properties. Plastic material is cheaper, easier to shape and has less weight than other materials, so it is the primary choice of many industries for food and beverage packaging. However, many compounds that improve the properties of the plastic are added to plastic materials, and have a negative effect on human health. Various factors lead to the breakdown of plastic into smaller fragments (microplastics) and the release of harmful compounds into the environment and into food products. Analytical methods for the determination of these compounds in food have been developed, for example the GC-MS analysis method (liquid chromatography with mass spectrum). The aim of this work is to determine the concentration of BPA in beer during a storage period of four months at two temperatures (4 and 20 °C) using the GC-MS method and FT-IR method (infrared spectrophotometry with Fourier transformation) to identify microplastic particles in investigated beers. The results of the analysis show that the concentration of BPA in the samples increases with time, and that chlorinated polyethylene, microcrystalline cellulose, acrylonitrile, and poly(2-3-dihydrofuran) predominate among microplastic particles.

**Key words:** Beer, bisphenol A, PET packaging, microplastics

**Thesis contains:** 42 pages  
10 figures  
3 tables  
0 supplements  
36 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |                                                    |              |
|----------------------------------------------------|--------------|
| 1. <i>Kristina Mastanjević</i> , PhD, assoc. prof. | chair person |
| 2. <i>Vinko Krstanović</i> , PhD, full prof.       | member       |
| 3. <i>Brankica Kartalović</i> , PhD, sci. assoc.   | member       |
| 4. Krunoslav Aladić, PhD, assistant prof.          | stand-in     |

**Defense date:** September 29th 2023

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

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Mastanjević i suradnicima na pomoći, uloženom trudu i prenesenom znanju tijekom izrade diplomskog rada.*

*Hvala mojim roditeljima i obitelji što su me usmjerili na ovaj put, na žrtvi, podršci i pomoći tijekom cijelog studiranja.*

*Mom Davidu veliko hvala na ljubavi, potpori, razumijevanju, strpljenju i riječima ohrabrenja tokom svakog koraka. vt*

*Hvala prijateljima na zabavnim trenucima studiranja, učinili ste ovo razdoblje boljim.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. POVIJEST PIVA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE PIVA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. PIVO KAO PREHRAMBENI PROIZVOD .....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. SIROVINE ZA PROIZVODNJU PIVA.....</b>	<b>6</b>
2.4.1. VODA .....	6
2.4.2. SLAD.....	6
2.4.4. HMELJ .....	8
2.4.4. PIVSKI KVASAC .....	8
<b>2.5. PROCES PROIZVODNJE PIVA.....</b>	<b>9</b>
2.5.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE SLADA.....	9
2.5.2. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE PIVA .....	11
<b>2.6. PUNJENJE I NAČINI PAKIRANJA PIVA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.7. AMBALAŽA.....</b>	<b>15</b>
2.7.1. DEFINICIJA I FUNKCIJA AMBALAŽE .....	15
<b>2.8. PLASTIKA .....</b>	<b>17</b>
2.8.1. PET BOCE .....	20
2.8.2. BISFENOL A .....	22
2.8.3. MIKROPLASTIKA .....	24
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. ZADATAK.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>28</b>
3.2.1. UZORCI PIVA .....	28
3.2.2. PRIPREMA UZORAKA PIVA.....	28
3.2.3. ANALIZA UZORKA PIVA.....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1. REZULTATI GC/MS ANALIZE BISFENOLA A U PIVU.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2. REZULTATI FT-IR IDENTIFIKACIJE MIKROPLASTIKE U PIVU .....</b>	<b>35</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>39</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

AMPS	2-akrilamido-2-metilpropan sulfonska kiselina
BPA	bisfenol A
EBC	European Brewing Convention Unit
ECHA	Europska agencija za kemikalije
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane
EVA	etilen vinil acetat
EVOH	etilen vinil alkohol
FT-IR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
GC-MS	plinska kromatografija s masenim spektrom
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
LC-MS	tekućinska kromatografija s masenim spektrom
PA	poliamid
PC	polikarbonat
PE	polietilen
PEN	polietilen naftalat
PET	polietilen tereftalat
PP	polipropilen
PS	polistiren
PVC	polivinilklorid
PVD	poliviniliden klorid
SB	stiren butadien
Sp	stupanj prevrenja
Sp`	prividni stupanj prevrenja
Sp`gr	granični stupanj prevrenja

## **1. UVOD**



Globalnim povećanjem proizvodnje plastike u zadnjih nekoliko desetljeća javlja se problem zbrinjavanja ovoga materijala i onečišćenja okoliša. Također, kao posljedica neprikladnog zbrinjavanja plastike i utjecajem različitih faktora, dolazi do njene razgradnje na manje fragmente tzv. mikroplastiku. Razlaganjem plastike dolazi do oslobađanja njenih sastavnih tvari koje imaju funkciju poboljšanja svojstva plastike. Ovdje spadaju spojevi koji se dodaju kao aditivi, plastifikatori ili stabilizatori plastike te oni postaju sve veći predmet istraživanja jer oslobađanjem u okolinu mogu imati štetne utjecaje. U skupinu zabrinjavajućih tvari koje se nalaze u sastavu PET boca nalazi se i bisfenol A. U ovom istraživanju provedena je GC-MS analiza i FT-IR analiza uzoraka piva pakiranih u PET ambalažu s ciljem određivanja koncentracije bisfenola A tijekom različitog vremena i temperature skladištenja te sastav mikroplastike u uzorcima.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. POVIJEST PIVA

Prema Pravilniku o pivu (NN 142/2011) pivo se definira kao „proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanom vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura“. Jedno je od najšire upotrebljivanih alkoholnih pića diljem svijeta. Prvi zapisi o proizvodnji piva u povijesti datiraju sve do starih Babilonaca čak 7000 godina p.n.e., dok kod Egipćana proizvodnja kreće nešto kasnije, 2000 godina p.n.e.. Zapisi kažu da su ovi narodi proizvodili pivo uporabom kruha. Iz ovih zemalja znanje o proizvodnji piva se širi dalje i na Grčku, Perziju pa preko Rimskog Carstva u Španjolsku i ostatak Europe (Rak, 2018). Često se u prošlosti smatralo da su pivo i medovina ista pića. Germani su proizvodili medovinu i začinjavali je hmeljom. Ondašnji postupci proizvodnje piva ne mogu se ni mjeriti sa našom današnjom tehnologijom i industrijom. Kvaliteta piva je bila niska, podložna kvarenju. Pivo se kod Babilonaca moralo piti na slamku zbog plivajućih dijelova žitarica po površini tekućine. Nekoliko stoljeća kasnije, proizvodnja piva razvila se na razinu proizvodnje vina. Proizvodnja piva u samostanima predstavlja veliki napredak u tehnologiji. Hmelj je zamijenio gruit koji se dodavao pivu. Gruit je mješavina aromatičnih trava, najčešće pelin, glog, šafran itd. te je svaka pivovara imala pravo na proizvodnju svojeg gruita. Iako su se pivovare protivile korištenju hmelja, kasnije postaje neizostavni sastojak proizvodnje piva zbog povoljnih svojstva. Zahvaljujući kasnijim velikim znanstvenim i tehničkim dostignućima, stvorene su osnove pivarstva kakvog imamo danas (Vogel, 2006).

## 2.2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE PIVA

Pivo je blago alkoholno piće proizvedeno procesom alkoholnog vrenja. Osnovne sirovine za proizvodnju piva su slad, hmelj, voda i pivski kvasac. Najveći udio piva opada na vodu koja služi kao otapalo. Slad je osušeno i isključeno zрно žitarice, najčešće ječma. Biljka hmelja (*Humulus lupulus*) je višegodišnja biljka penjačica čiji se neoplođeni cvat koristi kod proizvodnje piva. Kemijski sastav ekstrakta ovisi o vrsti slada i načinu proizvodnje sladovine, provedbe procesa fermentacije tj. stupnju konačnog prevrenja. Koncentracija osnovnog ekstrakta piva ovisi o sastojcima ekstrakta iz slada. Sastav ekstrakta u konačnici daje punoću okusa pivu (Rak, 2018). Hmelj je konzervirajuće sredstvo i daje pivu ugodan miris i gorak okus

(Glivar, 2016). Pivski kvasac izaziva alkoholno vrenje u kome šećer prelazi u alkohol i ugljikov dioksid (Jali, 2009).

Prema Pravilniku o pivu (NN 142/2011), za proizvodnju piva dozvoljeno je koristiti neke od sljedećih sastojaka: ječmeni i/ili pšenični slad, neslađene žitarice i proizvodi od žitarica, karamelni slad i drugi slad za bojanje, prženi ječam i pšenica i njihov pržen slad, šećeri i ostali saharidi, šećerni i škrobni sirupi, hmelj i njegovi proizvodi, voda, mikrobne kulture, prehrambeni aditivi, ugljikov dioksid i dušik te voćna pulpa ili kaša, koncentrirana voćna kaša ili vodeni ekstrakt voća. Također prema Pravilniku dozvoljeno je dodavanje aroma, bilja, biljnih ekstrakta i drugih tvari određenih hranjivih i fizioloških učinaka osim vitamina i minerala, te je dozvoljeno miješanje piva s voćnim sokovima i nektarima, osvježavajućim bezalkoholnim pićima, vinima, voćnim vinima, alkoholnim pićima i jakim alkoholnim pićima.

### 2.3. PIVO KAO PREHRAMBENI PROIZVOD

Tehnologija proizvodnje piva se kroz povijest uvelike promijenila te danas možemo govoriti o velikim industrijskim postrojenjima koji proizvode masovne količine ovog proizvoda svakodnevno. Uz velike industrije postoje i pivovare za proizvodnju craft piva te mali pivovari koji kuhaju pivo u svom domaćinstvu. Pivo kao prehrambeni proizvod može se smatrati „tekućom hranom“ zbog svojeg biološki uravnoteženog sastava i bogatog izvora biološki aktivnih sastojaka (Franović, 2016). U sebi sadrži kompleks od oko 800 ekstrahiranih kemijskih spojeva i raznih produkata reakcija koje se odvijaju tijekom procesa proizvodnje i skladištenja piva (Šibalić, 2023). Značajan je izvor vitamina, minerala i antioksidansa. Od mineralnih tvari sadržava natrij, sumpor, cink, kalcij, klor, bakar te velike količine kalija, magnezija i fosfora čijim unosom jedne litre piva se može podmiriti veliki dio preporučene dnevne potrebe. Od vitamina pretežno nalazimo vitamine B kompleksa. Energetska vrijednost 100 g lager piva iznosi 180 – 190 kJ tj. jedna litra standardnog piva ima istu vrijednost koja odgovara energetske vrijednosti jedne litre punomasnog mlijeka. Od pozitivnih djelovanja na organizam spominje se da gorke tvari hmelja imaju blago antiseptičko djelovanje tj. sprečavaju razvoj patogenih mikroorganizama, potpomažu kod izlučivanja želučanog soka i potiču apetit. Taninske tvari potiču aktivnost probavnog trakta i s nepovrelim šećerima usporavaju prelazak alkohola u krv. Prisutnost antioksidansa u pivu štiti organizam vezući slobodne radikale (Jali, 2009). Pivo kao prehrambeni proizvod koji se nalazi na tržištu prema Pravilniku o pivu (NN

142/2011) svrstava se u različite kategorije npr. specijalno, pšenično, mutno, proizvedeno s mješovitom mikrobnom kulturom, nefiltrirano, svijetlo, crveno, crno pivo itd. Ovisno o stupnju prevrenja, ima različite udjele alkohola tako da nalazimo rang od bezalkoholna piva pa sve do jakog piva.

## **2.4. SIROVINE ZA PROIZVODNJU PIVA**

Sirovine za proizvodnju piva su voda, slad, hmelj i pivski kvasac. Osim ovih osnovnih, moguće je dodavati i druge sastojke navedene u Pravilniku.

### **2.4.1. VODA**

Od sastojaka piva najveći udio čini voda u prosjeku 85 – 95%. Kvaliteta pivarske vode uvelike utječe na kvalitetu piva. Voda mora odgovarati zakonskim uvjetima za pitku vodu. Mora biti mikrobiološki ispravna, bistra, čista, bez boje i stranih mirisa ili okusa (Kontent, 2021). Utječe na biokemijske reakcije, okus i boju piva. Ovisno o količini otopljenih mineralnih soli u vodi, voda ima određenu tvrdoću. Tvrdoća vode se definira u njemačkim stupnjevima, odnosno, 1 °nj iznosi 10 mg CaO/L tj. 7,19 mg MgO/L. Kod proizvodnje piva najvažniji je udio karbonatnih iona tj. karbonatna tvrdoća vode. Ovisno o njemačkim stupnjevima za tvrdoću, voda se dijeli na meku, srednje tvrdu i tvrdu vodu. Tvrdoća vode utvrđuje tip piva pa se tako mekša voda koristi kod proizvodnje Plsenskih, svijetlih piva dok se za tamna piva koristi voda veće tvrdoće. Ako nam tvrdoća vode za proizvodnju piva ne odgovara, odnosno, tvrdoća je previsoka, smanjenje tvrdoće vode moguće je provesti mekšanjem vode dekarbonizacijom, ionskom izmjenom, odsoljavanjem elektroosmozom, zakiseljavanjem komine, dodavanjem CaSO<sub>4</sub> ili CaCl<sub>2</sub> u komovnjak ili burtonizacijom tj. dodavanjem CaSO<sub>4</sub> ili NaCl u tank vruće vode (Grba, 2010).

### **2.4.2. SLAD**

Na svjetskoj razini od žitarica se najčešće upotrebljava ječmeni slad zbog svojih povoljnih svojstva. Slađenje ječma odvija se s ciljem nastajanja hidrolitičkih enzima koji razgrađuju prvobitno prisutan škrob u fermentabilne šećere kako bi se mogao odvijati proces alkoholne fermentacije. Osim navedene sinteze hidrolitičkih enzima, dolazi i do sinteze enzima koji razgrađuju staničnu stijenku i proteine endosperma ječma čime zrno postaje mekše i lakše se provodi proces mljevenja (Bamforth, 2006). Slađenje je proces klijanja žitarica u

kontroliranim uvjetima nakon čega se termičkom obradom dobiva zeleni slad. Zeleni slad se nakon sušenja može koristiti pri proizvodnji piva (Franović, 2016). Prilikom klijanja ječma sintetiziraju se hidrolitički enzimi koji pretvaranjem škroba osiguravaju prehranu klici, te se klijanje zaustavlja sušenjem. Ovakav „zeleni slad“ se prvo mora osušiti na nižim temperaturama (50-80 °C) s velikim prolaskom zraka do udjela vode 12%, te kasnije se provodi dosušivanje ili prženje kod tamnog slada (Vogel, 2006). Ječam koji se koristi u ovoj tehnologiji naziva se i pivarski ječam. Mora biti dvoredni jari ili ozimi, zdrav, sortno čist, svjetlo žute boje, sjajnog izgleda i mirisa na slamu te krupnih, ujednačenih zrna. Poželjno je da ima veći udio škroba, a manji udio proteina s hektolitarskom masom od najmanje 66 kg/hl. Jari ječam daje specifičan i čist ukus, dok ozimi ječam daje teži okus koji je snažniji od proljetno posijanog ječma. Ovisno o stupnju dosušivanja slada, postoje: svijetli ili „plzenski“ slad (za proizvodnju svijetlih piva ili za „Lager“ i „Eksport“ piva) koji je dosušen na temperaturi 80 – 85 °C, tamni slad koji se naziva još i „bečki“ ili „bavarski“ dosušen na temperaturi 100 – 105°C koji se koristi kod proizvodnje tamnih piva i sadrži obojene i aromatične tvari. Uz pšenični slad postoje i specijalni tipovi slada npr. slad za bojenje piva („farbmalz“) te karamelni slad koji se primjenjuju kako bi poboljšali organoleptička svojstva piva (Kontent, 2021).



**Slika 1.** Slad koji se koristi pri proizvodnji piva

#### 2.4.4. HMELJ

Hmelj (*Humulus lupulus*) višegodišnja je dvodomna biljka penjačica čiji se neoplođeni cvat ženske biljke koristi za hmeljenje pivske sladovine. Naziva se i šišarica. Uloga mu je taloženje bjelančevina iz sladovine i na taj način bistri pivo, daje pivu ugodan gorki okus, produljuje vijek trajanja i pospješuje stvaranje pjene. Kemijski sastav hmelja ovisi o sorti hmelja te se najčešće s obzirom na udio gorkih i eteričnih tvari dijele na aromatične i gorke sorte. Kako bi se sačuvale ove tvari mirisa i okusa, suhe hmeljne šišarice se pretvaraju u hmeljne pripravke kao što su hmeljni prah i peleti tipa 45 i 90 te hmeljni ekstrakti. Njihovom primjenom povećava se iskorištenje tvari gorčine za 10% u odnosu na suhe hmeljne šišarice. Hmeljni pripravci imaju manji volumen i masu od izvornih suhих šišarica kod kojih udio mekih smola opada, a povećava se udio tvrdih smola i na taj način smanjuje se njihova vrijednost s vremenom. Kod proizvodnje peleta prvo se provodi postupak mljevenja suhog hmelja te prešanje praha hidrauličkim prešama kroz otvore 4-6 mm te se pakiraju u struji inertnog plina (Grba,2010; Jali,2006). Prisutne smole u hmelju imaju antimikrobna svojstva (Bamforth, 2006). Hmelj se dodaje u količini od 100 – 500 grama po hektolitr piva (Jali, 2006). Količina hmelja koja se dodaje ovisi o vrsti piva i koncentraciji, udjelu vode, konačnom okusu piva i dužini odležavanja piva, kvaliteti hmelja itd. Za proizvodnju svijetlih piva dodaje se 250-300 g/hl piva. (Kontent, 2021). Spojevi prisutni u hmelju su  $\alpha$  kiseline (humulon) i  $\beta$  kiseline (lupulon). Ovo su tvari gorčine koje se prilikom kuhanja sladovine prevode u izo-alfakiseline tj. u izo-oblike kiseline koji su topljivi u vodi i daju karakterističnu aromu piva, tj. gorčinu. Lupulon ima manju gorčinu od humulona ali posjeduje jača antiseptička svojstva (Glivar, 2016; Papaik, 2018).

#### 2.4.4. PIVSKI KVASAC

Kvasci su jednostanični mikroorganizmi koji uzrokuju alkoholno vrenje tj. pretvaranje šećera u alkohol i ugljikov dioksid. Pivski kvasac koji zadovoljava specifične tehnološke i fiziološke uvjete pri proizvodnji piva su sojevi dvije vrste kvasaca iz roda *Saccharomyces* - *S.cerevisiae* i *S.pastorianus*. Pod tehnološka svojstva podrazumijeva se sposobnost flokulacije i brzina izdvajanja iz mladog ili zrelog piva, a fiziološka svojstva proizvodnja metabolita važnih za ugodnu aromu i okus piva. Moguće je koristiti liofilizirane kulture kvasaca ili se jedna stanica kvasa izdvaja iz mladog piva pa se koristi za daljnje umnožavanje. Prednost suhих kvasaca je jednostavnost korištenja i duže vrijeme zadržavanja aktivnog oblika. Kako koncentracija

alkohola tijekom vrenja nije previsoka, kvasac ostaje zdrav i pogodan za ponovno korištenje no ne beskonačno mnogo puta već je potrebno svaku četvrtu ili petu fermentaciju inokulirati sa svježim kvascem (Bamforth, 2006; Grba, 2010; Kontent, 2021). Dva su osnovna tipa pivskog kvasca- tip gornjeg i tip donjeg vrenja. Stanice kvasca gornjeg vrenja nakon diobe ostaju u slaboj vezi i pružaju otpor mjehurićima koji ih potiskuju na površinu te se izdvaja kao smeđi masni talog pjene. Suprotno tome, stanice kvasca donjeg vrenja nakon diobe ne drže se zajedno i kao samostalne ne mogu pružiti otpor mjehurićima te padaju na dno tekućine. Danas se najviše proizvodi pivo donjeg vrenja, čak 84% od ukupno proizvedenih u Njemačkoj (Vogel,2006; Jali, 2006).

### 2.5. PROCES PROIZVODNJE PIVA

Proces proizvodnje piva skup je biokemijskih, kemijskih i mikrobioloških procesa koji se odvijaju u svim fazama proizvodnje i skladištenja te obuhvaća tehnološke procese kao što su kuhanje sladovine, alkoholno vrenje, stabilizacija i skladištenje piva (Šibalić, 2023). Proces se sastoji od dvije tehnologije- tehnologija slada i tehnologija piva.

#### 2.5.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE SLADA

Tehnologija slada obuhvaća slijedeće operacije:

- Čišćenje i sortiranje ječma
- Močenje i klijanje ječma
- Sušenje zelenog slada
- Odvajanje slada od klice
- Poliranje

Prilikom dolaska sirovine u tvornicu za obradu ječma vrši se prijem i skladištenje sirovine, odnosno, potrebno je provesti odstranjivanje stranih primjesa, oštećenih zrna i prašine preko vibracijskih sita, aspiratora, magnetnih separatora i triera te sortiranje ječma na temelju veličine zrna, mjerenje, skladištenje na odgovarajućoj temperaturi i vlazi te transport do sladare gdje se vrše slijedeće operacije močenja i klijanja.

Močenje se odvija u očišćenim močionicima te se nakon 2 do 3 dana namakanja u vodi temperature 10 °C – 20 °C povećava sadržaj početne vlage sa 15% na 45%. Močionici moraju



osigurati dovod ječma, dovod vode, uređaj za miješanje i pranje ječma te uređaj za otpuštanje vode. U vodu se mogu dodavati i formalaldehid, vodikov peroksid, gibberelinska kiselina tj. dezinfekcijske tvari, tvari za poboljšanje klijanja ječma i kvalitete slada. Močenjem se osigurava dovoljna količina vlage za proces klijanja koje se odvija u kljaljštima koja mogu biti podna i pneumatska. Klijanje se provodi na temperaturi 12°C - 18 °C i proces traje do deset dana. Ječmena masa provodi disanje gdje nastaje ugljikov dioksid i toplina pa je potrebno zrna redovito hladiti i miješati kako bi protok zraka bio ravnomjeran u svim dijelovima mase. Kod procesa klijanja dolazi do biokemijskih reakcija nastajanja slada, sinteze i aktivacije enzima, razgradnje škroba do jednostavnijih šećera itd. Slad koji nastaje nakon klijanja naziva se zeleni slad.

Klijanje se zaustavlja sušenjem u struji zagrijanog zraka te temperatura i vrijeme trajanja procesa ovisi o tipu slada. Početna temperatura sušenja je 35 °C, a proces se odvija po fazama koje traju 18 – 48 h gdje se udio vlage smanjuje sa 42 °C na 4 °C – 5 °C. Proizvod dobiven nakon sušenja naziva se suhi slad. Za svijetla piva temperatura sušenja je oko 80 °C, dok za tamna piva može prelaziti 100 °C. Tijekom sušenja nastaju aromatične tvari i tvari boje.

Nastali korjenčići na sladu lako primaju na sebe vlagu jer su higroskopni pa ih je potrebno odstraniti. Također sadrže i gorke sastojke koji negativno utječu na organoleptička svojstva piva. Stroj za uklanjanje korjenčića je horizontalni cilindar sa rotirajućim lopaticama i ventilatorom koji služi za hvatanje prašine. Nakon oslobađanje korjenčića slad se skladišti 21 dana nakon čega se može koristiti za proizvodnju sladovine.

Prilikom procesa poliranja slada provodi se odstranjivanje ostatka sladne klice, prašine i loma sa strojem unutar kojeg su rotirajuće četke. Prašina se izdvaja strujom zraka. Poliranje se provodi prije upotrebe u proizvodnji piva te se slad isporučuje u vrećama ili u rinfuzi (Franović, 2016; Jali, 2006).



**Slika 2.** Klijalište slada

### **2.5.2. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE PIVA**

Tehnologija piva obuhvaća slijedeće operacije:

- Proizvodnja sladovine (drobljenje slada, ukomljavanje slada, filtracija sladovine, hmeljenje sladovine, hlađenje i bistrenje sladovine)
- Bistrenje i istakanje piva
- Punjenje boca

Proces proizvodnje piva započinje proizvodnjom sladovine u posebnoj dijelu pivovare koja se naziva kuhaona ili varionica i obuhvaća slijedeće tehnološke operacije: drobljenje ili meljava slada ili neslađenih žitarica, ukomljavanje sladne prekrupe i usitnjenim neslađenih sirovina, hidroliza i ekstrakcija proizvoda hidrolize, cijedenje ili filtracija komine, kuhanje sladovine (vrenje i hmeljenje), bistrenje, aeriranje i hlađenje sladovine (Grba, 2010).

Slad čuvan u silosima prije mljevenja prolazi kroz liniju za čišćenje od eventualno prisutnih metalnih predmeta, kamenčića ili prašine. Mora biti čist i ujednačene veličine zrna. Provodi se suho ili mokro usitnjavanje. Potrebno je endosperm slada što bolje usitniti, a

pljevicu sačuvati te se dobiva sladna prekrupa s velikom dodirnom površinom što utječe na efikasnost ekstrakcije. Poželjno je da endosperm bude suh, a pljevica vlažna i elastična.

Ukomljavanje je postupak miješanja sladne prekrupe s četverostrukom količinom zagrijane vode. Temperatura vode iznosi 37°C - 52°C. Smjesa vode i slada naziva se komina (Kontent, 2021). Cilj ovog postupka je prevođenje netopljivih sastojaka u topljiv oblik hidrolizom pomoću enzima sintetiziranih u fazi klijanja (slađenja). Aktivnost enzima ovisi o pH vrijednosti komine i temperaturi. Potrebno je razgraditi škrob u topljive oblike maltozu, glukozu, maltotriozu, maltodekstrine i više dekstrine pomoću amilolitičkih enzima. Ovo se odvija u tri faze: klajsterizacija, likvefakcija i ošećerenje. Proteolitički enzimi prevode proteine do jednostavnijih oblika. Temperature procesa iznose 65°C - 75 °C, a idealni pH komine iznosi 5,5 - 5,6 pri čemu se postiže dobar stupanj prevrenja sladovine, razgradnje proteina, sprječava prejako bojanje sladovine prilikom kuhanja te ubrzava cijedenje zbog manje viskoznosti (Grba, 2010; Jali, 2006).

Nakon završene ekstrakcije iz slatke tj. ošećerene komine je potrebno izdvojiti prvijenac (sladovinu), a zaostaje trop. Moguće je izdvajanje na dva načina: cijedenjem ili filtracijom. Cijedenjem se komina ostavlja u kadi za cijedenje određeno vrijeme te se trop slegne na perforirano dno posude pa služi kao filtracijski sloj kroz koji prolazi sladovina. Nakon što veći dio sladovine prođe kroz sloj, potrebno je trop isprati nekoliko puta toplom vodom, temperature oko 80°C, kako bi se isprali eventualno zaostali ostaci ekstrakta. Poželjno je postupak ispiranja provoditi što više puta jer se postiže bolje iskorištenje ekstrakta ali je onda potrebno ispariti više vode tijekom kuhanja sladovine. Najbolje je provoditi ispiranje sve dok udio ekstrakta u zadnjem naljevu vode ne iznosi 0,5 - 0,6 °C za standardno pivo. Ovaj postupak traje oko 2 - 3 sata, a može i duže. Filtracija sladovine traje kraće pa se češće koristi u proizvodnji piva jer se koriste kominski filtri. Ovi noviji filtri mogu filtrirati pod tlakom kako bi se istisnuo zaostali prvijenac pa se ispiru vodom koja se iz tropa istiskuje pomoću zraka. Sladovina nakon ispiranja mora biti bistre boje (mutnoće ispod 1 EBC, European Brewing Convention Unit - europska jedinica za boju), bez otopljenog kisika. Količina, kemijski sastav i iskorištenje ekstrakta ovise načinu i uspješnosti provođenja procesa hidrolize, ukomljavanja i ispiranja topljivih sastojaka iz tropa (Grba,2010).

Kuhanje sladovine se provodi u kotlu zajedno sa hmeljom. Prilikom kuhanja dolazi do otapanja i ekstrakcije hmeljnih smola, odnosno, alfa i beta kiselina koje prelaze u izo-oblike.

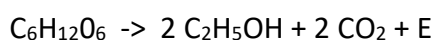
Viši pH poboljšava izomerizaciju hmeljnih kiselina dok je gorčina ujednačenija pri nižim vrijednostima pH. Inaktiviraju se enzimi koji više nisu potrebni te kod reakcija između šećera i aminokiselina nastaju produkti obojenja melanoidini pa se stupanj obojenja povećava na 3 do 5 EBC-a. Dolazi do koagulacije bjelančevina i njihovo taloženje što je bitno za bistroću piva. Vrijeme kuhanja iznosi 1 do 2 h ovisno o tipu piva i izvedbi kotla za kuhanje. Nakon završenog procesa kuhanja sladovina se prebacuje u taložnjak (Grba,2010).

U vrtložnom taložnjaku uklanja se grubi ili „topli“ talog tj. hmeljni trop i dio koaguliranih bjelančevina. Sladovini se moraju podesiti odgovarajući uvjeti za fermentaciju pa se zasićuje kisikom pomoću Venturijeve cijevi i hladi preko pločastog izmjenjivača topline. Hlađenjem sladovine dolazi do taloženja bjelančevina te se taj talog naziva fini ili „hladni“ talog i uklanja se filtracijom ili flokulacijom.

Proizvedena sladovina se nakon hlađenja, bistrenja i aeriranja prebacuje u posude za vrenje te se istovremeno dodaje pivski kvasac kako bi se započeo postupak fermentacije. Na brzinu fermentacije i kvalitetu konačnog piva utječe:

- a) kvasac - soj, specifična brzina rasta i fermentacija sladovine, taloženje, proizvodnja nusproizvoda, otpornost na visoke koncentracije etanola i CO<sub>2</sub>, fiziološko stanje stanica, količina inokuluma, raspodjela kvasca
- b) pH sladovine – optimalna vrijednost iznosi 5,3 - 5,6 na početku vrenja
- c) sastav sladovine
- d) koncentracija otopljenog kisika
- e) temperatura vrenja – hladno, toplo, ubrzano vrenje
- f) tlak - do povećanja tlaka dolazi zbog povećanja količine otopljenog CO<sub>2</sub> koji usporava vrenje.

Kvasci imaju različiti afinitet previranja šećera u sladovini pa se redosljed previranja razlikuje. Na početku vrenja kvasac previre heksoze i saharozu zatim tijekom glavnog vrenja maltozu, a u naknadnom vrenju maltotriozu. Jednadžba nastajanja etanola iz heksoza glasi:



Guy Lusac prvi postavlja kemijsku jednadžbu alkoholne fermentacije te biokemijski put pretvorbe šećera u etanol počinje glikolizom do piruvata - dekarboksilacija u acetaldehid –

redukcija u etanol. Uz ove konačne produkte, nastaje i niz nusprodukata alkoholne fermentacije koji pivu daju određena svojstva. Optimalne koncentracije nusproizvoda utječu na punoću okusa piva dok previsoke koncentracije nusproizvoda djeluje negativno na okus, miris i stabilnost pjene. Pozitivni nusproizvodi koji utječu na ukupnu aromu piva su viši alkoholi i esteri dok visoke koncentracije diacetila, sumpornih spojeva i aldehida uzrokuju negativnu aromu piva.

Kako bi pivo nakon provedenog procesa vrenja i odležavanja imalo odgovarajuća svojstva konačnog proizvoda kakvog nalazimo na tržištu potrebno je provesti postupke za doradu piva, a to su filtracija i centrifugiranje (separacija). Filtracijom se pod tlakom izdvajaju veće čvrste čestice preko filtracijskog sredstva, a postupak taloženja se ubrzava primjenom separatora koji rade na principu centrifugalne sile.

## **2.6. PUNJENJE I NAČINI PAKIRANJA PIVA**

Pivo nakon provedenog procesa filtracije odlazi u tankove koji su pod tlakom na odležavanje 8 - 12 h prije punjenja. Cilj odležavanja je ohladiti pivo na temperaturu 1 °C - 2° C da se spriječi kasnije pjenušanje kod otakanja piva. Prije i nakon punjenja potrebno je provesti određene postupke. Prije punjenja potrebno je oprati i dezinficirati boce i provesti kontrolu opranih boca (Franović, 2016). Kako bi se održala kakvoća i mikrobiološka ispravnost piva tijekom procesa punjenja potrebno je onemogućiti kontakt piva i atmosferskog kisika, održati konstantan tlak te održavati odgovarajuće higijenske uvjete postrojenja za punjenje. Za punjenje se koriste visokotlačni strojevi. Oni mogu puniti na dva načina: pod istim tlakom (izobarometrijski) ili pod razlikom tlaka koji se nalazi u stroju i boci (diferencijalno). Napunjene boce potrebno je zatvoriti odgovarajućim čepovima ovisno o vrsti ambalažnog materijala. Pivo se može puniti u staklene boce, limenke, PET ambalažu i bačvice. Nakon punjenja provodi se etiketiranje (Glivar, 2016). U ovom radu baziramo se pretežito na PET ambalažni materijal, njegova svojstva i mogućnost prelaska određenih spojeva sastava (bisfenol A) u sadržaj piva.



**Slika 3.** Punjenje piva u PET boce

## **2.7. AMBALAŽA**

### **2.7.1. DEFINICIJA I FUNKCIJA AMBALAŽE**

Prema Pravilniku o ambalaži i otpadnoj ambalaži (NN 88/2015) definicija ambalaže glasi: „Ambalaža je svaki proizvod, bez obzira na prirodu materijala od kojeg je izrađen, koji se koristi za držanje, zaštitu, rukovanje, isporuku i predstavljanje robe, od sirovina do gotovih proizvoda, od proizvođača do potrošača. Ambalaža predstavlja i nepovratne predmete namijenjene za izradu ambalaže koja će se koristiti za spomenute namjene kao i pomoćna sredstva za pakiranje, koja služe za omatanje ili povezivanje robe, pakiranje, nepropusno zatvaranje, pripremu za otpremu i označavanje robe.“ Hrana na tržištu može biti u svježem ili prerađenom obliku no prije svega mora biti odgovarajuće i kvalitetno upakirana. Materijali koji se koriste za izradu ambalaže su papir, drvo, karton, polimeri, metal, staklo, tekstil te kombinirani materijali (višeslojna). Ovisno o trajnosti dijeli se na povratnu (višestruka upotreba nakon odgovarajućih procesa) i nepovratnu (samo jedno korištenje) (Muhamedbegović i sur., 2015). Ambalaža prodaje proizvod tako da ona mora pružiti najviše informacija na malom prostoru u koji se proizvod pakira (Matijašić, 2019). Sve veći zahtjevi i želje potrošača, razvoj tehnologije i konkurentnost tržišta svakodnevno mijenjaju

funkcionalnost ambalaže. Izrada ambalaže postaje sve zahtjevniji proces i uključuje stručnjake prehrambene tehnologije, marketinga, grafičkog dizajna, ekologije itd.

Funkcije ambalaže:

- Zaštitna
- Informativna
- Uporabna
- Sadržajna
- Sigurnosna
- Ekološka

Zaštitna funkcija ambalaže je održavanje kvalitete proizvoda što dulje vrijeme, štiti od faktora kvarenja u svim fazama proizvodnje, pakiranja pa sve do konačne potrošnje. Proizvodi se svejedno mogu pokvariti zbog sastava proizvoda i procesa prerade hrane te neadekvatnog pakiranja, skladištenja ili transporta proizvoda. Neki faktori koji utječu na kvarenje su: aktivitet vode, pH vrijednost, prirodno prisutni i preživjeli mikroorganizmi, redoks potencijal, sastav proizvoda i interakcija sa ambalažom (migracija spojeva). Faktori kvarenja okruženja i transporta su vrijeme, temperatura, vlaga, svjetlost, prisutnost plinova, mikroorganizmi, kukci i štetočine, rukovanje proizvodom itd.

Informativna funkcija ambalaže tj. prodajna funkcija ambalaže omogućuje informiranje potencijalnih potrošača o proizvodu pomoću vizualnih i informativnih elemenata te utječe na njegovu odluku o kupnji proizvoda. Vizualni elementi obuhvaćaju grafički dizajn, veličinu i oblik ambalaže dok informacijski elementi daju kupcu sve potrebne informacije o proizvodu, procesu proizvodnje, sastavu, načinu upotrebe i čuvanja, roku trajanja itd.

Uporabna funkcija je svojstvo ambalaže koja ju čini jednostavnom za rukovanje, lagano otvaranje („easy open“) i priprema proizvoda za uporabu te pogodnost konzumacije hrane u pokretu („on the go“), vidljivost hrane, uzimanje potrebne količine hrane i lako ponovno zatvaranje ambalaže itd. Potrebno je da ambalaža bude adekvatnih dimenzija i oblika što je čini funkcionalno prihvatljivom i prikladnom za potrošače.

Sadržajna funkcija omogućuje ambalaži držanje hrane različite prirode i oblika u različitim uvjetima okoline te sprečava rasipanje i gubitak mase zapakiranog proizvoda.

Materijal ambalaže mora biti postojan prema kemijskim, fizikalnim, mehaničkim te toplinskim svojstvima hrane. Odabir ambalažnog materijala ovisi također o obliku hrane tj. agregatnom stanju hrane koja se pakira. Unutar ambalaže ne smije biti previše slobodnog prostora te hrana ne smije biti „nagurana“ u ambalažu.

Sigurnosna funkcija ambalaže omogućuje sigurnost potrošača smanjenjem rizika od neovlaštenog otvaranja proizvoda. „Tamper“ svojstvo ambalaže rješenje je kako bi potrošači bili sigurni da proizvod nije otvaran. Tako se npr. stavlja traka kod poklopca ili tanki aluminijski i plastični slojevi preko poklopca koji prilikom otvaranja pucaju i daju vidljivi znak da je proizvod bio prethodno otvaran. Na ovaj način eliminira se mogućnost neovlaštenog otvaranja i identificira već otvaran proizvod na polici.

Ekološka funkcija ambalaže je mogućnost korištenja biorazgradivih („eco friendly“) ili recikliranih materijala. Također ambalažom se čuva hrana od polja do stola i djeluje se na ukupno smanjenje gubitka hrane tj. stvara se manji otpad hrane. Na ambalažu se stavljaju oznake o upotrijebljenom materijalu kako bi potrošači pravilno zbrinuli ambalažu nakon upotrebe (Muhamedbegović i sur., 2015).

### 2.8. PLASTIKA

Plastični materijal najmlađa je vrsta ambalaže koja se pojavila na tržištu. Sve češće zamjenjuje druge vrste ambalažnih materijala zbog svojih odličnih svojstva i povoljnih cijena. Vrlo je pogodan materijal za izradu ambalaže jer je lagan, savitljiv, trajni i povoljan materijal koji se može reciklirati. Ima manju masu, volumen i debljinu u odnosu na druge materijale te je pogodnija za transport i skladištenje gotovih proizvoda. Nisko talište omogućuje manju potrošnju energije za njezinu proizvodnju (Perić, 2008; Vukmanić, 2016).

Polimere možemo podijeliti s obzirom na: podrijetlo, obliku makromolekula, vrsti ponavljajućih jedinica, morfologiju itd. (Lončar,2022).

Podjela s obzirom na podrijetlo:

- Prirodni - ne mogu se proizvoditi, škrob, celuloza, svila, vuna
- Sintetski - nastaju procesima polimerizacije uz različite dodatke










Podjela prema obliku makromolekula:

- Ravnolančani
- Razgranati
- Umreženi

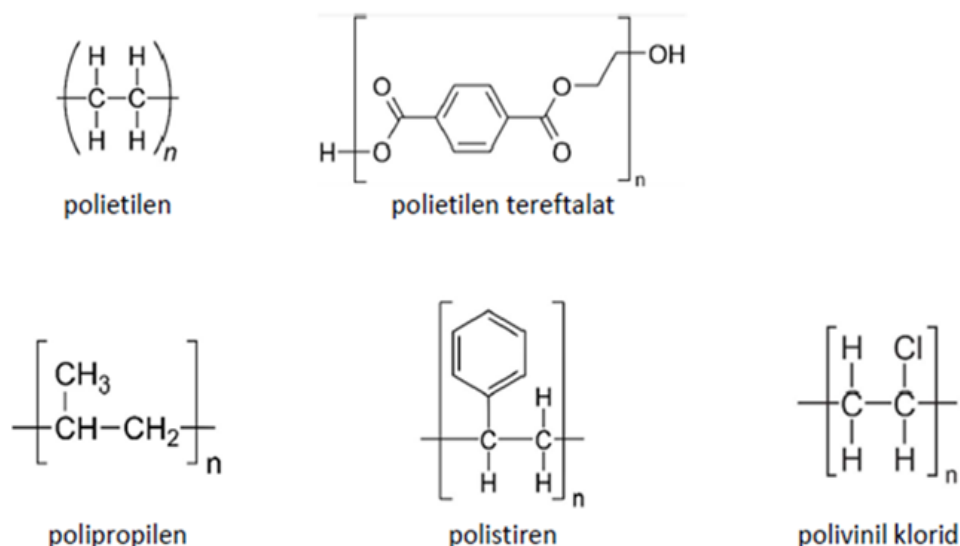
Podjela prema vrsti ponavljajućih jedinica

- Homopolimeri - jednake ponavljajuće jedinice
- Kopolimeri - dvije ili više ponavljajuće jedinice

1.	PET – polietilen tereftalat	 PET
2.	HDPE – polietilen visoke gustoće	 HDPE
3.	PVC – polivinil-klorid	 PVC
4.	LDPE – polietilen niske gustoće	 LDPE
5.	PP – polipropilen	 PP
6.	PS – polistiren	 PS
7.	O – ostali polimerni materijali	 O

**Slika 4.** Brojčana oznaka, kratica i oznaka za recikliranje plastičnih materijala

Morfologija tj. struktura osnovnog lanca polimera određuje njihova fizička, kemijska i mehanička svojstva plastike. S obzirom na stupanj središtenosti polimerni sustavi mogu biti amorfni, kristalni te kristalasti (Šačić Uranić, 2019; Šibalić, 2023).



**Slika 5.** Struktura monomera plastike (slika preuzeta iz Šibalić, 2023)

Spektar plastičnih materijala je širok no svaki od njih ima specifična svojstva čime se razlikuje od drugih materijala ali po nekim svojstvima su i slični. Kod pakiranja prehrambenih proizvoda najčešće se koriste:

- Poliolefini - polietilen (PE), polipropilen (PP)
- Poliesteri - poli(etilen-tereftalat) (PET), polikarbonat (PC), polietilen naftalat (PEN), polistiren (PS)
- Vinilne plastične mase – poli(vinil-klorid) (PVC), poliviniliden klorid (PVDC), polivinil acetat
- Poliamid (PA)

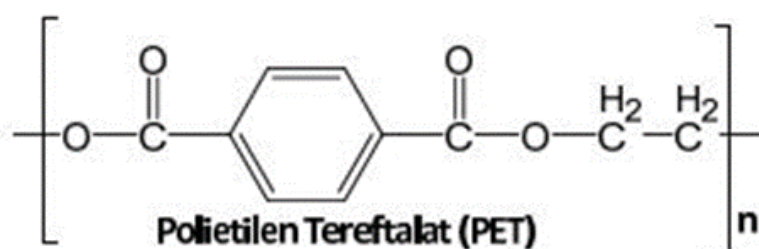
Uz ove polimere koriste se i kopolimeri u manjoj mjeri. To su etilen vinil acetat (EVA), etilen vinil alkohol (EVOH), stiren butadien (SB) itd. (Muhamedbegović i sur., 2015). Globalno gledano, najveća je proizvodnja PE i PP, a slijedi ih PET ambalaža s oko 18% globalne proizvodnje (Šibalić, 2023.). Po sastavu mogu biti komogeni ili kompozitni. Homogene polimerne materijale čini jedna vrsta polimera ili kopolimera dok su kompozitni smjese dva ili više polimera zajedno sa punilima ili anorganskim dodacima (Meglič, 2021).

Od navedenih polimernih materijala moguće je proizvesti različite vrste i oblike ambalaže različitim postupcima proizvodnje. Najčešće se izrađuju boce, posude, vrećice, čaše,

tube, poklopci i čepovi itd. Materijali u obliku folija i filmova mogu se koristiti kao slojevi u višeslojnim i kombiniranim materijalima (Vukmanić, 2016; Muhamedbegović i sur., 2015). Plastična ambalaža mora ispunjavati određene mehaničke, toplinske, kemijske, optičke i dr. zahtjeve s obzirom na njen sastav i namjenu (Perić, 2008). Polimerizat je tvar koja nastaje postupkom polimerizacije uz dodatak određenih procesnih tvari kao što su aditivi, stabilizatori, mazila ili punila. Plastična ambalaža koja se koristi u pakiranju prehrambenih proizvoda svrstava se u plastomere (termoplasti). To su tvari koje imaju linearne i/ili razgranate makromolekula, bubre i otapaju se u otapalima te prilikom zagrijavanja mekšaju i moguće je lako oblikovanje. Nakon hlađenja zadržavaju novi oblik, a ponovnim zagrijavanjem postupak oblikovanja je moguće ponoviti. Uz plastomere, polimerni materijali dijele se i na duromere i elastomere. Prednost polimernih materijala za izradu ambalažnih materijala je u tome što se ne iziskuje puno energije, rada i vremena kako bi se izvršilo oblikovanje u razne oblike, nije potrebna naknadna površinska obrada ni zaštita uz moguće bojanje materijala i svojstva inertnosti, slabe topljivosti i malene gustoće (Lončar, 2022; Šaćić Uranić, 2019). Metode proizvodnje plastične ambalaže su brizganje, injekcijsko i ekstruzijsko puhanje (Muhamedbegović B. i sur., 2015).

### 2.8.1. PET BOCE

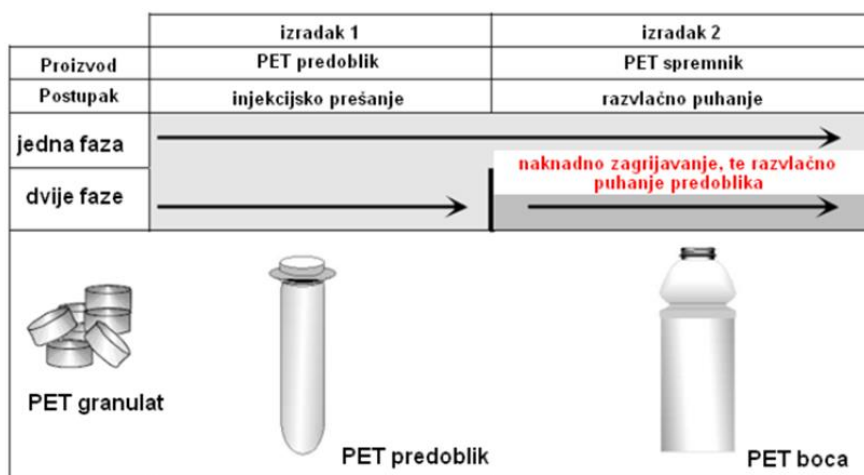
Poli(etilen-tereftalat) nastaje reakcijama polimerizacije tereftalne kiseline i etilen-glikola u dva stupnja.



Slika 6. Strukturna formula PET-a

U poliestere se dodaju stabilizatori kako bi se spriječila njihova djelomična razgradnja. Najčešće su to fosforna kiselina ili njeni esteri. Nakon procesa taljevanja se ekstrudira, hladi i oblikuje u granule. PET spremnici za piće mogu se proizvesti na dva načina: injekcijsko prešanje PET predoblika ili razvlačno puhanje PET spremnika. Prije injekcijskog prešanja granule PET-a

se tale i kao takve se ubrizgavaju u kalup koji ide na hlađenje te nastaju predoblici. Predoblici se mogu odmah preraditi u boce postupkom razvlačnog puhanja ili se mogu skladištiti. Ako se postupak razvlačnog puhanja odvija odmah nakon dobivanja predoblika štedi se na energiji vremenu izrade. Kada se nakon skladištenja predoblik ide izrađivati u konačni oblik boce, potrebno ih je prvo zagrijati te provesti razvlačno puhanje u kalupima.



**Slika 7.** Faze proizvodnje PET boce (slika preuzeta iz Perić,2008)

PET boce posjeduju svojstva žilavosti, prozirnosti i sjaja. PET je vrlo lagan materijal i postojan na naprezanja te ima svojstvo propusnosti kisika, CO<sub>2</sub> i vodene pare. Polimernim tvarima se dodaju aditivi kako bi se poboljšala svojstva čvrstoće, elastičnosti itd. Najčešće se od PET ambalaže prave spremnici za pića kao što su voda, sok, pivo, vino itd. Ovisno o slojevitosti boca, imaju različitu permeabilnost za svjetlost i kisik. Kako bi se permeabilnost spriječila ili smanjila PET se kombinira s različitim materijalima (Car, 2018.). Zbog gubitka CO<sub>2</sub> i propuštanja svjetlosti, trajnost piva u bocama je kraća nego u staklenim bocama ili limenkama. Boce proizvedene od polietilen-naftalata (PEN) imaju 10 do 15 puta veću nepropusnost za plinove od PET boca ali je njihov postupak proizvodnje skuplji (Mrzlečki, 2020). Plastične boce imaju manju inertnost od staklenih boca (Kovačić, 2019). Meglič (2021) navodi u svom radu da plastika može ispuštati teške metale i kemikalije iz svog sastava. Boce mogu biti povratne i nepovratne te su puno praktičnije od staklenih boca zbog lakog oblikovanja, fleksibilnosti i male težine. Manja težina donosi uštede u transportu te nema lomova prilikom transporta i rukovanja (Bamforth, 2006.)

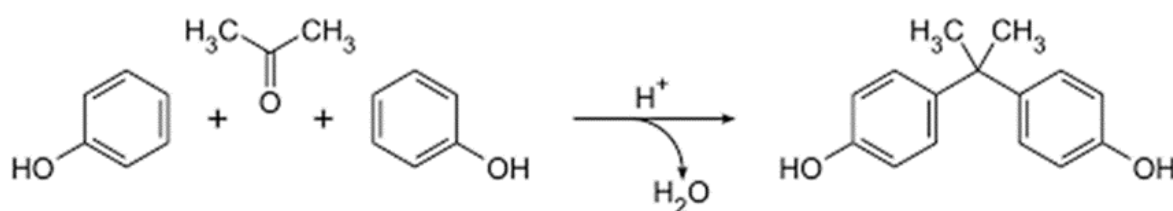
Pitanje da li komponente plastike (plastifikatori, monomeri, antioksidansi, mikroplastika) prolaze u pivo te obrnuto, apsorpcija sastojaka piva u ambalažu, obradit ćemo detaljnije u idućim poglavljima rada.



Slika 8. Primjer PET boce za pivo

### 2.8.2. BISFENOL A

Bisfenol A spada u skupinu fenolnih organskih spojeva u koju još spadaju bisfenol B, bisfenol C, bisfenol S, bisfenol F i bisfenol AF. BPA nastaje kondenzacijom dviju molekula fenola sa acetonom u suvišku. Kao nusprodukt izdvaja se voda, a reakcija može biti katalizirana klorovodičnom kiselinom. Molekulska formula BPA je  $C_{15}H_{16}O_2$  (Šiniković, 2022). BPA pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku je bijela krutina čije je talište između oko  $160^{\circ}C$ , a vrelište na  $360^{\circ}C$  (Hofer, 2019).



Slika 9. Reakcija nastajanja BPA

Ova molekula nije prirodno prirodna u okolišu već se proizvodi u velikim količinama. U prošlosti se koristio kao fungicid, a danas ključan je monomer kod proizvodnje poliepoksidnih smola i polikarbonata, koristi se kao sirovina pri proizvodnji industrijskih polimera tj. plastične ambalaže u prehrambenoj industriji, u našem slučaju PET ambalaža kod proizvodnje piva. BPA može naći i kao aditiv u proizvodima široke potrošnje kao stabilizator, antioksidans ili inhibitor polimerizacije. Nije čvrsto vezan za materijal u kojem se nalazi pa je moguće otpuštanje iz strukture u okolinu. Također, okolišni faktori kao što su zagrijavanje, nepravilno skladištenje, svijetlost, mikrovalovi itd. mogu utjecati na brzinu otpuštanja. Ljudi su svakodnevno u doticaju sa BPA preko plastične ambalaže za pakiranje hrane i pića te prehranom ulazi u njihov organizam kroz cijeli život.

Nije inertna molekula. BPA je prvi put sintetiziran 1891. godine. Njegova početna namjena bila je sintetički estrogen no nije imao dovoljnu hormonsku aktivnost da bi se upotrebljavao kao nesteroidni estrogeni lijek kao npr. dietilstilbestrol pa počinje njegova navedena uloga kod proizvodnje plastike. Kasnijim istraživanjima potvrđena je estrogenost BPA i štetno djelovanje na ljudski organizam (Hofer, 2019; Marković, 2019). BPA može ući u organizam preko probavnog sustava, inhalacijom ili se apsorbira preko kože (Šiniković 2022). Svrstan je u skupinu spojeva koji imaju utjecaj na endokrini sustav, točnije, endokrini disruptori. Narušava hormonski sustav čovjeka vezanjem na receptore hormona poput estrogena, androgena, progesterona, hormona štitnjače, djelujući na signalizacijske puteve te mogu dovesti do brojnih bolesti i poremećaja endokrinog, reproduktivnog, respiratornog i živčanog sustava. Istraživanjem je dokazano da BPA u ljudi negativno utječe na muški i ženski reproduktivni sustav, otežavanjem oplodnje, disfunkcijom jajnika, preuranjenim pubertetom, nižom porađajnom masom i uranjenim rođenjem djeteta. Različiti je utjecaj na muškarce i žene zbog razlike u anatomije i fiziologije. Tako je kod žena povećan rizik od policističnih jajnika, raka dojke i pretilosti, a kod muškaraca mogućnost raka ili smanjenje prostate te smanjena pokretljivost spermatozoida (Hofer, 2021). Dokazana je mogućnost prelaska BPA kroz posteljicu do ploda uzrokujući genetske poremećaje djeteta ili čak pobačaj. Djeluje na rad štitnjače, remeti funkciju imunološkog sustava i  $\beta$ -stanica gušterače, djeluje na razvoj inzulinske rezistentnosti, upale i šećerne bolesti, povećava rizik pretilosti, jetrene i bubrežne disfunkcije i kardiovaskularnih bolesti i hipertenzije (Blažeka, 2022; Šiniković, 2022). Europska agencija za kemikalije (engl. European Chemicals Agency, ECHA) proglasila je BPA

reprotoksinom, tvari koja uzrokuje oštećenje ploda, neplodnost i spolne malformacije (Marković, 2019). EFSA (Europska agencija za sigurnost prehrambenih proizvoda) postavlja dopuštene vrijednosti dnevnog unosa (TDI) te maksimalno prihvatljiva vrijednost da iznosi 0,05 mg BPA/kg tjelesne težine/dan (Šarkanj i sur, 2010).

Tehnike određivanja bisfenola A su:

- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)
- Tekućinska kromatografija s masenim spektrom (LC-MS)
- Plinska kromatografija s masenim spektrom (GC-MS)

Uz ambalažu prehrambenih proizvoda BFA se može naći svugdje u prirodi. Dodatno, na zagađenost utječe njegova laka sposobnost otpuštanja iz strukture i masovne proizvodnje pa je stalno prisutan u okolišu. Nalazimo ga u površinskim vodama, podzemnim vodama, spremnicima za vodu itd. Kako se nekad koristio kao fungicid zagađene su brojne zemljišne površine. Godišnje se proizvodi 2,7 milijardi kilograma BPA, a samo trećina te proizvodnje spada na SAD (Siniković, 2022.)

### 2.8.3. MIKROPLASTIKA

Mikroplastika prema definiciji Europske agencije za kemikalije (ECHA) predstavlja materijal koji se sastoji od čvrstih čestica koje sadrže polimer u koji su možda dodani i aditivi ili druge tvari i gdje je  $\geq 1$  % masene koncentracije raspona veličina od  $1 \text{ nm} \leq x \leq 5 \text{ mm}$  ili kod oblika vlakna raspona duljina od  $3 \text{ nm} \leq x \leq 15 \text{ mm}$  i omjera duljine i promjera  $> 3 \text{ mm}$ . Mikroplastiku najvećim djelom čine glavni sastojci polimera polistirena (PS), polipropilena (PP), polivinil klorida (PVC), poli(etilen-tereftalat) (PET), poliamida (PA) itd. (Ružaj, 2019).

Kategorije mikroplastike:

- primarna
- sekundarna plastika.

U primarnu mikroplastiku spadaju sve čestice plastike veličine  $\leq 5,0 \text{ mm}$  koje imaju posebnu namjenu kao što su plastične kuglice, mikrozrna, mikrovlakna iz sintetičke odjeće iz proizvoda itd. Ova mikroplastika se može naći u pilinzima za lice i tijelo, u lijekovima, odjeći i dr. Sekundarna mikroplastika nastaje razgradnjom makroplastike tj. velikih plastičnih

proizvoda ili ambalaže nastale industrijskim ili kućnim procesima. Ovdje spada ambalaža za pića, vrećice, posude, ribarske mreže itd.

Iako su plastični proizvodi teško razgradivi, tijekom vremena i uporabe i fizičkih i prirodnih čimbenika dolazi do smanjenja strukturne čvrstoće i degradacije u mikroplastiku i nanoplastiku. Nanoplastika je sav plastični materijali manji od 1  $\mu\text{m}$  (Križnjak, 2022). Degradacijom plastike i nastajanjem manjih čestica omogućava se otpuštanje tvari koje su bile prisutne u plastici npr. aditivi, produkti razgradnje polimera, nepolimerizirani monomeri itd. Tako se u okolinu otpušta veliki broj spojeva od kojih su neki toksični te čestice mikroplastike mogu vezati na sebe kemikalije iz okoliša. Fragmentacija plastike može povećati koncentraciju sintetičkih aditiva npr. bisfenola, ftalata, alkilfenola i dr. Zbog velike proizvodnje plastike danas i neadekvatnog recikliranja dolazi do kontaminacije okoliša pa se mikroplastika može naći u različitim izvorima. Kontaminacijom mora može prijeći u morske plodove, ribu, rakove, dagnje itd. putem planktona i staništa ovih organizma te njihovom konzumacijom mogu završiti u ljudskom organizmu. Pronađena je i u podzemnim vodama te z tlo dospijeva preko vode za navodnjavanje ili plastičnih poljoprivrednih materijala. Mikrogranule iz pilinga za lice završavaju u otpadnim vodama te mogu prelaziti u rijeke i oceane (Ružaj, 2019). Vlakena iz sintetičke odjeće prilikom pranja prelaze u vodu i čine čak 35% mikroplastike u morima i oceanima (Križnjak, 2022). Prehrambeni proizvodi također mogu biti kontaminirani mikroplastikom tijekom proizvodnje hrane doticajem s plastičnim uređajima ili preko ambalaže u koju se hrana pakira. U vodu za piće i vodovodnu vodu može prijeći preko spremnika u postrojenjima koji su obloženi epoksidnom smolom ili transportnim cijevima izrađenim od PVC ili PE materijala.

Kako su ljudi sve više u doticaju sa mikroplastikom javlja se potreba za njihovom analizom i istraživanjima. Razvijene su određene metode analize ovisno o analiziranoj vrsti uzorka te se one sastoje od postupaka izolacije, identifikacije, kvantifikacije i kemijske karakterizacije. Nakon analize dobe se podatci o broju identificiranih čestica, obliku, boji, veličini te kemijskom sastavu.



Tehnike koje se koriste za detekciju mikroplastike:

- mikroskopija
- infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT- IR)
- toplinska analiza
- Ramanova spektroskopija

Prilikom proizvodnje i konzumacije piva postoji mogućnost kontaminacije mikroplastikom. Kao izvor kontaminacije može biti voda koja se koristi kao sirovina u proizvodnji piva ili u tehnološkom procesu za pranje. Zabilježena je i određena količina mikroplastike u pšenici i raži. Plastična ambalaža u koje se pivo pakira s vremenom se razgrađuje i mogu otpuštati određenu količinu mikroplastike u pivo. Do kontaminacije piva mikroplastikom može doći i preko membranskih filtera i procesa filtracije piva (Šibalić, 2023).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada je provođenje GC-MS analize 11 uzoraka piva na prisutnost spoja bisfenola A tijekom skladištenja 4 mjeseca na dvije temperature (4 i 20 °C). Osim GC-MS analize, provedena je i analiza pomoću FT-IR tehnologije kojom se analizirala mikroplastika u uzorcima.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. UZORCI PIVA

Uzorci piva korišteni u ovom istraživanju su proizvedeni na PTFOS-u i pakirani u PET ambalažu od 2L. Za svaki uzorak provedene su dvije paralele. Uzorci su proizvedeni isti dan i pripadaju istoj šarži. U **Tablici 1.** nalazi se popis uzorka s odgovarajućim oznakama koji su se koristili u ovom radu.

**Tablica 1.** Popis pripremljenih uzoraka s odgovarajućim oznakama

Temperatura skladištenja (°C)	Popis uzoraka s odgovarajućim oznakama i vrijeme skladištenja (izuzimanja uzoraka)					
	0	14 dana	1 mjesec	2 mjeseca	3 mjeseca	4 mjeseca
4	0	1.1.	2.1.	3.1.	4.1.	5.1.
20		1.2.	2.2.	3.2.	4.2.	5.2.

U proizvedenom pivo određeni su parametri: polifenoli, gorčina, pH, ekstrakt (osnovne sladovine), udio alkohola, boja prema MEBAK® analitici.

#### 3.2.2. PRIPREMA UZORAKA PIVA

Postupak kuhanja piva za potrebe istraživanja proveo se kako je opisan u diplomskom radu Vuzem (2022) s tim da je postupak prilagođen kuhanju ale piva, odnosno korišteni kvasac za inokulaciju je bio Safale-US05 (Fermentis). Nakon fermentacije, pivo se stavilo na hlađenje radi taloženja proteina, inaktivacije kvasca i njegovog taloženja, gaziralo, te se nakon gaziranja punilo u PET boce zapremnine 2L. Nulti uzorak se odmah izuzeo u staklenu vialicu (5 mL) i

spremio do analize. Uzorci su skladišteni izuzimani tijekom skladištenja kako je prikazano u **Tablici 1**. Kao kontrolni uzorak korišteno je pivo iz ste šarže pakirano u staklene boce od 0,5 L. Kontrolni uzorci su skladišteni tijekom istog vremena i u istim uvjetima. Pivo skladištena na 4 °C je stavljeno u hladnjak, a pivo skladišteno na 20 °C je pohranjeno u klima komoru koja je temperaturu održavala stalnom.

### 3.2.3. ANALIZA UZORKA PIVA

GC-MS analiza:

U ovom istraživanju korištena je otopina standardna bisfenola A (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Validacija metode uključivala je određivanje retencije i kvalitativno i kvantitativno praćenje iona. Korišteni n-heksan je HPLC čistoće (Carlo Erba, Milano, Italija). Otopina BPA pripremljena je u koncentraciji od 1 mg/mL. Otopina BPA u različitim koncentracijama (0,005, 0,01, 0,1, 0,05, 0,5 µg/mL) pripremljena je razrjeđivanjem u n-heksanu, a zatim pohranjena u bočicama na -20 °C. Kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija reagensima, materijalima i laboratorijskom opremom, proveden je postupak temeljitog čišćenja: stakleno posuđe namočeno je i oprano u acetonu, sušeno na 140 °C najmanje 4 sata. Sva otapala korištena u analizi testirana su kako bi se provjerila potencijalna prisutnost BPA kontaminacije pomoću GC-MS (Agilent instrument 7890B/5977A MSD) analize. Ultra čista voda proizvedena je Milli-Q sustavom (Millipore, Bedford, SAD).

Obrada uzoraka:

Količina od 5 ml uzorka prebačena je u staklenu epruvetu uz dodatak 5 ml acetonitrila i 5 ml vode. Smjesa je snažno trešena 1 minutu, a zatim nakon dodatka 3 g bezvodnog MgSO<sub>4</sub> i 1 g NaCl, uzorak je ponovno protrešen i potom centrifugiran 5 minuta.

1 ml ekstrakta prebačeno je u epruvetu od 15 ml koja sadrži 150 mg bezvodnog MgSO<sub>4</sub>, 50 mg PSA i 50 mg C18, zatim mučkana 1 minutu i centrifugirana sljedećih 5 minuta (5000 o/min).

Čisti ekstrakt acetonitrila prenesen je u GC bočicu i ubrizgan za analizu.

Identifikacija BPA temeljila se na usporedbi vremena zadržavanja vršnih vrijednosti i ciljnih iona s onima dobivenim iz standardne mješavine BPA (standard koje je dostavio

proizvođač instrumenta). Kvantifikacija se temeljila na vanjskim kalibracijskim krivuljama pripremljenim iz standardne otopine svakog od ispitivanih BPA.

Provjera vršnih vrijednosti je provedena na temelju retencijskih vremena, a ciljni ion uspoređen je s onima vanjskog BPA. Slijepe probe otapala su analizirane i kvantificirane. Količina BPA u slijepim probama je bila niža od LOQ.

Određivanje je provedeno u splitless modu. Plin nosač bio je helij, brzina: 35,698 cm/sek; tlak: 7,0 psi. Određivanje je obavljeno pri konstantnom protoku.

FT-IR analiza:

Svih 11 uzoraka piva bilo je podvrgnuto filtraciji u 2 paralele kroz celulozni filter papir promjera 70 mm s veličinom pora od 11  $\mu\text{m}$  (GE Whatman). Za postupak filtracije korišteni su stakleni lijevci, laboratorijske čaše od 500 ml za skupljanje uzorka, te celulozni filter papir za zadržavanje čestica. Kako bi spriječili vanjsku kontaminaciju laboratorijsko posuđe (stakleni lijevci laboratorijske čaše) prije početka filtracije isprani su acetonom. Nakon završene filtracije sterilnom pincetom korišteni filter papiri su prebačeni u Petrijeve prethodno isprane acetonom. Petrijeve posude odmah su zatvorene nakon postavljanja filter papira. Jedan čisti, neiskorišteni filter papir postavljen je kao slijepa kontrola za FT-IR.

Za analizu mikroplastike u pivu korišten je uređaj FT-IR (Spectrum 80 Two, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Prije početka analize izvor svjetlosti (kristal) na FT-IR uređaju potrebno je prebrisati metanolom. Kao slijepu probu korišten je jedan čisti, neiskorišteni filter papir koji se sterilnom pincetom stavlja na izvor svjetlosti kako bi se snimio spektar pozadine (eng. background). Uzorak se sterilnom pincetom stavlja na izvor svjetlosti (ZnSe) te se pričvršćuje pomoću poluge kako bi se osigurao dobar kontakt uzorka i kristala. Po završetku snimanja potrebno je popustiti polugu te ukloniti uzorak. Nakon svakog uzorka potrebno je prebrisati izvor svjetlosti metanolom (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) HPLC čistoće 99,9%. Mjerenja su provedena u ventiliranoj prostoriji pri temperaturi od 25 °C. Kako bi se kontrolirale promjene u atmosferskim razinama CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O, uključena je značajka kompenzacije atmosferske pare stroja. FT-IR očitavanja analizirana su softverom Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, SAD) Spectrum 10. Svi uzorci su analizirani u duplikatu.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. REZULTATI GC/MS ANALIZE BISFENOLA A U PIVU

**Tablica 2.** prikazuje određene fizikalno-kemijske parametre proizvedenog piva tijekom vremena skladištenja 4 mjeseca.

**Tablica 2.** Fizikalno-kemijski parametri proizvedenog piva tijekom vremena skladištenja

Svojstvo		OE / °Plato	AL / mL in 100 mL	pH	CL / EBC	BI / BU	PY / mg/L
<b>Vrijeme skladištenja</b>	Uzorak						
<b>0</b>	0	10,97	4,4	4,3	6,4	22	84
<b>14 dana</b>	1.1	10,97	4,4	4,3	7,2	22	89
	1.2.	10,97	4,4	4,3	7.3	22	90
<b>1 mjesec</b>	2.1.	10,97	4,4	4,3	7,8	21	90
	2.2.	10,97	4,4	4,3	8.0	22	90
<b>2 mjeseca</b>	3.1.	10,97	4,4	4,3	8,4	20	91
	3.2.	10,97	4,4	4,3	8.9	20	91
<b>3 mjeseca</b>	4.1.	10,97	4,4	4,3	9,5	20	91
	4.2.	10,97	4,4	4,3	11.0	19	92
<b>4 mjeseca</b>	5.1.	10,97	4,4	4,3	10,0	19	91
	5.2.	10,97	4,4	4,3	12.0	19	92

OE (ekstrakt osnovne sladovine), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli)

Rezultati iz tablice 2 pokazuju promjenu fizikalno-kemijskih parametara tijekom skladištenja piva. Vidi se da se parametar važan za ovo istraživanje, pH nije mijenjao tijekom vremena. pH je važan zbog toga što kiselost piva može utjecati na količinu i brzinu otpuštanja mikroplastike, odnosno kemikalija povezanih sa mikroplastikom u pivo tako da je konstantnost ovog parametra značajan pokazatelj stabilnosti sustava. Može se zaključiti da pH nije bio faktor koji je tijekom vremena utjecao na eksperiment. Ostali fizikalno-kemijski parametri također se nisu značajno mijenjali sa vremenom skladištenja. To je također važno i za parametar količine etanola koji se nije mijenjao tijekom vremena što znači da nije utjecao na tijek eksperimenta.

Dobiveni rezultati koncentracije BPA u analiziranim uzorcima piva kroz različito vrijeme skladištenja u PET bocama navedeni su u **Tablici 3**.

**Tablica 3.** Dobiveni rezultati koncentracije BPA u analiziranim uzorcima

Temperatura skladištenja °C	UZORAK	Koncentracija BFA u pivima pakiranim u PET (µg/L)	Koncentracija BFA u pivima pakiranim u staklenu bocu (µg/L)
-	0	0,020	0,020
4	1.1.	0,033	0,022
20	1.2.	0,029	0,022
4	2.1.	0,042	0,0023
20	2.2.	0,060	0,025
4	3.1.	0,052	0,023
20	3.2.	0,061	0,024
4	4.1.	0,065	0,022
20	4.2.	0,066	0,026
4	5.1.	0,068	0,025
20	5.2.	0,087	0,026

Iz **Tablice 3.** se vidi da se koncentracije bisfenola A mijenjale tijekom vremena skladištenja i pri različitim temperaturama u pivima pakiranim u PET boce. Naime, u početnom uzorku je koncentracije bisfenola bila 0,020 µg/L, a već tijekom prva dva tjedna skladištenja na obje temperature je porasla na oko 0,030 µg/L, odnosno u uzorku skladištenom na 4 °C je nakon 14 dana koncentracija BFA bila 0,33 µg/L, a u pivima skladištenima na 20 °C koncentracija je iznosila 0,029 µg/L. Tijekom sljedeća dva tjedna, odnosno nakon mjesec dana skladištenja, koncentracije su se povećavale na 0,042 µg/L za pivo skladišteno na 4 °C i 0,060 µg/L. Za uzorak 2.2., skladišten na 20 °C to je značajno povećanje od 100%. Uzorci analizirani



nakon dva mjeseca skladištenja dana također pokazuju povećanje koncentracije bisfenola A u uzorcima, i to na obje temperature skladištenja. Povećanje koncentracije BFA se nastavlja i tijekom sljedeća dva mjeseca (ukupno nakon 4 mjeseca) skladištenja pri čemu je najviša koncentracija zabilježena u uzorku 5.2. koji je izuzet nakon 4 mjeseca skladištenja, a čuvan je na temperaturi 20 °C.

Promjene u kontrolnim uzorcima koji su čuvani u staklenim bocama su bile značajno manje u odnosu na uzorke u PET bocama.

Ovo istraživanje je potaknuto činjenicom da je pakiranje piva u PET boce uobičajeno u Republici Hrvatskoj. U drugim državama to nije tako često, pa nedostaju literaturni podaci o količinama BFA u pivima pakiranim u PET boce. BFA je često detektiran u pivima pakiranim u aluminijske limenke pri čemu su glavni razlog za njegovu koncentraciju u pivima polimerni premazi kojima se premazuje unutrašnjost limenke da bi se spriječio kontakt pivo-aluminij. Istraživanje koje su proveli Habschied i sur. (2023) pokazalo je da su u pivima na tržištu prisutni ftalati. Neka istraživanja su potvrdila prisustvo BFA u pivima pakiranim u aluminijske limenke i to u niskim koncentracijama (50–400 ng/L) što je u korespondenciji, iako nije riječ o istom pakiranju, sa rezultatima u ovom istraživanju. Prema nekim autorima, iako se BPA ne dodaje u plastiku od koje se proizvodi PET boca (Fan i sur., 2014; Dreolin i sur., 2019) , u PET bocama se nalaze određene količine bisfenola A. Također, u pića pakirana u boce napravljene od reciklirane plastike BFA migrira lakše (Dreolin i sur., 2019). Ono što je zabrinjavajuće, a potvrđeno je i u ovom istraživanju, je da BFA migrira u piće brže i u većim koncentracijama pri višim temperaturama. Naime, povećanje trajanja i temperature skladištenja, iznad 40 °C može povećati migraciju BPA iz PET boca (Aneck-Hahn i sur., 2018). Ovaj podatak je bitan jer se pivo transportira i u većini slučajeva skladišti u uvjetima visokih temperatura što očito značajno utječe na migraciju BPA u pivo.

Obzirom da je pivo otopina u kojoj ima alkohola u količini oko 5%, vjerojatno je da će u njemu prijelaz BFA biti značajni nego u samoj vodi. Dreolin i sur. (2019) su dokazali da je prijelaz BFA iz boca u alkoholnu otopinu (20% EtOH i 3% octene kiseline) raste sa povećanjem stupa reciklacije.

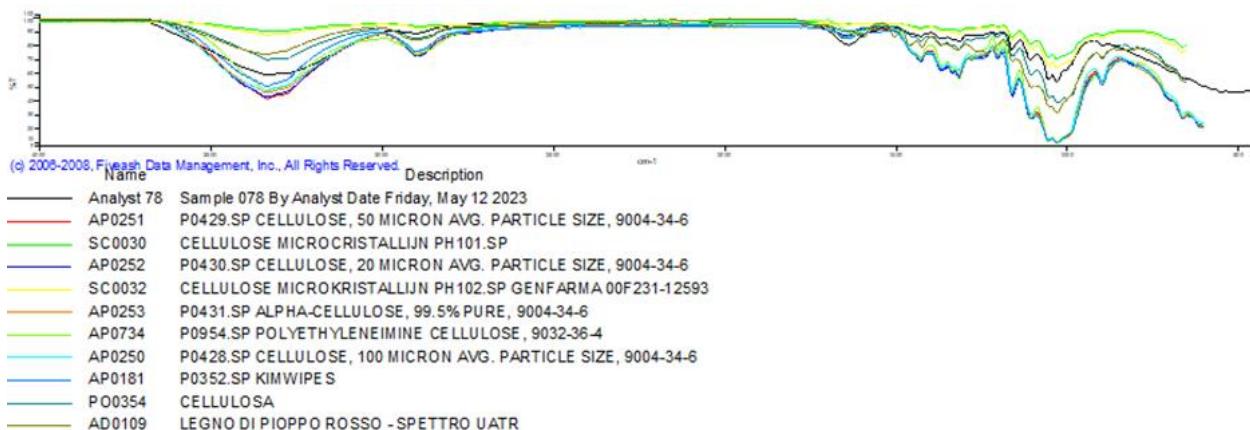
## 4.2. REZULTATI FT-IR IDENTIFIKACIJE MIKROPLASTIKE U PIVU

Analize uzoraka provedene na FT-IR uređaju rezultirale su također zanimljivim podacima. Naime, od zabilježenih kemikalija isticale su se sljedeće:

- Klorirani polietilen
- Mikrokristalna celuloza – različitih veličina (npr. 20,50,100 mikrona)
- Polietilenimin celuloza
- Akrlonitril
- Poli(2,3-dihidrofuran)
- Etoksilirani polietilenimin
- 2-akrilamido-2-metilpropan sulfonska kiselina (AMPS)

Neke od ovih kemikalija su direktno povezane sa mikroplastikom (npr. klorirani polietilen, polietilenimin celuloza), a neke kemikalije iako se čine nepovezane vjerojatno potječu od raspadanja ili prelaza PET polimera tijekom skladištenja. U većini uzoraka zabilježena je prisutnost neke mikroplastike. Ovo istraživanje bi svakako trebalo proširiti i produbiti da bi se dobila potpunija slika.

Osim mikroplastike, na FT-IR uređaju je zabilježena i prisutnost drugih kemikalija, kao što su boje za drvo, lijekovi za šizofreniju, vlažne maramice za čišćenje, i sl. Primjer analiziranog uzorka na FT-IR uređaju, odnosno grafički prikaz dobivenih rezultata može se vidjeti na **Slici 12.**



**Slika 10.** Primjer dobivenih rezultata analize u grafičkom obliku

Iako se koncentracije BFA dobivene u ovom istraživanju čine male, i minimalna, ali dugotrajna izloženost ovoj kemikaliji može izazvati ozbiljne posljedice po zdravlje. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) 2023. je provela reevaluaciju regulacije ukupnog dnevnog unosa BFA sa dosadašnjih 4 µg/kg tj. mase na 2 ng/kg tj. mase. Od 2018. godine BFA je zabranjena u ambalaži u koju se pakira hrana za djecu ispod 3 godine i novorođenčad.

Svakako se moraju aktivirati nadležne institucije koje će strože djelovati na minimalizaciju ili čak potpunu zabranu korištenja BFA u ambalaži koja se koristi za pakiranje hrane ili pića, odnosno koja je u direktnom dodiru sa istim.

## **5. ZAKLJUČCI**

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

- ✓ S vremenom skladištenja i povećanom temperaturom tijekom skladištenja dolazi do povećanja koncentracije BFA u uzorcima piva.
- ✓ Iako se detektirane količine u uzorcima čine male, najveća zabilježena koncentracija je bila 0,087 µg/L u uzorku skladištenom 4 mjeseca na 20 °C, svakodnevna dugotrajna izloženost ovoj kemikaliji može rezultirati ozbiljnijim posljedicama na zdravlje ljudi.
- ✓ Zabilježena je prisutnost kemikalija povezanih sa mikroplastikom u uzorcima.
- ✓ Daljnja istraživanja su potrebna da bi se dobila cjelovita slika koliko BFA se može očekivati u raznim uzorcima piva, izloženim varijacijama u temperaturi i vremena skladištenja.

## **6. LITERATURA**

- Bamforth C.W. *Brewing: New technologies*. Woodhead Publishing Limited, 2006.  
[https://www.academia.edu/34914369/Bamforth\\_Brewing\\_New\\_Tehnologies](https://www.academia.edu/34914369/Bamforth_Brewing_New_Tehnologies) [24.8.2023.]
- Blažeka K: Utjecaj bisfenola A na parametre oksidacijskog stresa i korjenčićima luka (*Allium cepa* L.). *Diplomski rad*. Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Zagreb, 2022.
- Car A: Promjena sastojaka okusa i arome piva donjeg vrenja tijekom čuvanja u različitoj ambalaži. *Diplomski rad*. Prehrambeno - biotehnološki fakultet, Zagreb, 2018.
- EFSA, European Food Safety Authority: Summary Report Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 21(4), 6857.
- Franović K: Tehnološki proces proizvodnje piva. *Završni rad*. Stručni studij sigurnosti i zaštite, Karlovac, 2016.
- Glivar V: Tehnološki proces proizvodnje piva i zaštita na radu u tvornici „Heiniken Hrvatska“. *Završni rad*. Stručni studij sigurnosti i zaštite, Karlovac, 2016.
- Habschied K, Kartalović B, Lazić D, Krstanović V, Mastanjević K. Survey on Phthalates in Beer Packaged in Aluminum Cans, PET and Glass Bottles. *Fermentation*. 2023, 9:125.
- Hofer R: Bisfenol A i njegov utjecaj na okoliš. *Završni rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2021.
- Jali V: Proizvodni brendovi pivovare Carlsberg Croatia d.o.o. *Završni rad*. Prehrambeno - tehnološki fakultet, Osijek, 2009.
- Kontent K: Tehnologija mikro pivovare Veleučilišta u Karlovcu. *Završni rad*. Stručni studij sigurnosti i zaštite, Karlovac, 2021.
- Kovačić L: Migracija aluminija u sustav svijetlo pivo - ambalaža. *Završni rad*. Stručni studij prehrambena tehnologija, Karlovac 2019.
- Križnjak I: Utjecaj mikroplastike na prirodu i okoliš. *Diplomski rad*. Sveučilišni diplomski studij Ambalaža, recikliranje i zaštita okoliša, Koprivnica, 2022.
- Lončar K: Uporaba poli(etilen-tereftalata). *Završni rad*. Kemijsko -tehnološki fakultet, Split, 2022.
- Marić, V: Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji. Plejada, Zagreb, 2010.
- Marković D: Epigenetski učinci bisfenola – A (BPA) u čovjeka. *Završni rad*. Prirodoslovno – matematički fakultet, Split, 2019.
- Matijašić I: Utjecaj dizajna ambalaže na ponašanje potrošača. *Specijalistički završni rad*. Specijalistički diplomski stručni studij Poduzetništvo, Rijeka, 2019.
- MEBAK®: Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission (MEBAK®) e.V., Freising, BY, Germany.

- Meglić L: Plastična ambalaža - kružno gospodarenje otpadom. *Diplomski rad*. Sveučilišni diplomski studij Ambalaža, Koprivnica, 2021.
- MPRRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o pivu*. Narodne novine 142/2011, 2011.
- Mrzlečki K: Utjecaj dizajna ambalaže na prodaju piva. *Diplomski rad*. Sveučilišni diplomski studij Ambalaža, Koprivnica, 2020.
- Muhamedbegović B, Juul NV, Jašić M: Ambalaža i pakiranje hrane. Tehnološki fakultet Tuzla, Tuzla i Trondheim, 2015.
- MZOP, Ministarstvo zaštite okoliša i prirode: *Pravilnik o ambalaži i otpadnoj ambalaži*. Narodne novine 88/2015, 2015.
- Dreolin N, Aznar M, Moret S, Nerin C. Development and validation of a LC–MS/MS method for the analysis of bisphenol a in polyethylene terephthalate. *Food Chemistry*, 274:246-253, 2019.
- Aneck-Hahn N-H, Van Zijl MC, Swart P, Truebody B, Genthe B, Charmier J, Jager CD. Estrogenic activity, selected plasticizers and potential health risks associated with bottled water in South Africa. *Journal of Water Health*, 16:253-262, 2018.
- Papaik I: Usporedba parametara kakvoće različitih vrsta piva tijekom vrenja i odležavanja. *Diplomski rad*. Prehrambeno - biotehnološki fakultet, Zagreb, 2018.
- Perić P: Primjena poli(etilen-tereftalata) za pakiranje napitaka osjetljivih na kisik. *Diplomski rad*. Fakultet Strojarsva i brodogradnje, Zagreb, 2008.
- Rak M: Inovacije u promociji piva. *Diplomski rad*. Specijalistički diplomski stručni studij Menadžment, Šibenik, 2018.
- Ružaj L: Mikroplastika u okolišu. *Doktorska dizertacija*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2019.
- Šačić Uranić M: Zaštitni zadaci ambalaže. *Diplomski rad*. Sveučilišni diplomski studij Ambalaža, Koprivnica, 2019.
- Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klapac T: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu, 2010.  
[https://www.hah.hr/pdf/Knjiga\\_kemijske\\_i\\_fizikalne\\_opasnosti.pdf](https://www.hah.hr/pdf/Knjiga_kemijske_i_fizikalne_opasnosti.pdf) [11.9.2023.]
- Šibalić M: Primjena infracrvene spektroskopije Fourierovom transformacijom u detekciji mikroplastike u pivu. *Diplomski rad*. Prehrambeno - tehnološki fakultet, Osijek, 2023.
- Šiniković M: Određivanje fitotoksičnosti i genotoksičnosti bisfenola A na luku (*Allium cepa* L.). *Diplomski rad*. Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Zagreb, 2022.
- Vogel W: *Pivo iz vlastitog podruma*. Požega, IDT Gaudeamus d.o.o., 2006.



Vukmanić M: Utjecaj prerade na debljinu valovitog kartona. *Završni rad*. Grafički fakultet, Zagreb, 2016.

Vuzem M: Proizvodnja i karakteristike lager piva proizvedenog kveik kvascem. *Diplomski rad*. Prehrambeno – tehnološki fakultet, Osijek, 2022.

Fan Y-Y, Zheng J-L, Ren J-H, Luo J, Cui X-Y, Ma LQ. Effects of storage temperature and duration on release of antimony and bisphenol a from polyethylene terephthalate drinking water bottles of China. *Environmental Pollution*, 192:113-120, 2014.