

Utjecaj dodatka ekstrakta ljekovite gljive *Trametes versicolor* u sladovinu na pokazatelje kakvoće piva

Špehar, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:109:628736>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-23**

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

Karla Špehar

**UTJECAJ DODATKA EKSTRAKTA LJEKOVITE GLJIVE
Trametes versicolor U SLADOVINU NA POKAZATELJE KAKVOĆE PIVA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2019.

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

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Biotehnologija**Nastavni predmet:** Biotehnološka proizvodnja hrane**Tema rada** je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 27. lipnja 2019. godine**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Natalija Velić***Pomoć pri izradi:** -**Utjecaj dodatka ekstrakta ljekovite gljive *Trametes versicolor* u sladovinu na pokazatelje kakvoće piva**

Karla Špehar, 0113138621

Sažetak:

Cilj rada bio je istražiti kako dodatak ekstrakta ljekovite gljive *Trametes versicolor* u sladovinu prije fermentacije utječe na fermentacijsku aktivnost kvasca te na osnovna fizikalno-kemijska svojstva gotovog proizvoda – piva. Za ukomljavanje i kuhanje 20 L sladovine korišten je automatizirani sustav za kućno pivarstvo. Mikrofermentacije sladovine s dodatkom 1 mL etanolnog ekstrakta gljive (u 750 mL sladovine) te 10 i 20 mL (u 1750 mL sladovine) vodenog ekstrakta gljive su provedene u tikvicama volumena 1 i 2 L pri 18 °C u trajanju od 12 dana. Tikvice su inokulirane komercijalnim suhim kvascem gornjeg vrenja te je praćen tijek fermentacije određivanjem mase oslobođenog CO₂. U uzorcima piva dobivenog nakon provedenih mikrofermentacija određeni su osnovni pokazatelji kakvoće piva (ekstrakt u osnovnoj sladovini, prividni ekstrakt, specifična težina, volumni udjel alkohola, pH, boja, gorčina, ukupni polifenoli), kao i antioksidacijska aktivnost (DPPH) te su isti uspoređeni s kontrolnim uzorkom piva (bez dodatka ekstrakta). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako dodatak ekstrakta ljekovite gljive *T. versicolor* u količini dodanoj tijekom ovog istraživanja nije značajno utjecao na fermentacijsku aktivnost kvasca, kao niti na osnovne pokazatelje kakvoće piva. Nešto veće vrijednosti koncentracije ukupnih polifenola zabilježene su u svim uzorcima piva s dodatkom ekstrakta, u odnosu na kontrolne uzorke piva bez dodatka ekstrakta.

Ključne riječi: pivo, ljekovite gljive, *Trametes versicolor*, fermentacijska aktivnost**Rad sadrži:** 41 stranica
11 slika
2 tablica
0 priloga
31 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i> | predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | član-mentor |
| 3. dr. sc. <i>Ivana Tomac</i> , znan. sur. | član |
| 4. prof. dr. sc. <i>Vinko Krstanović</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 12. srpnja 2019. godine

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 Food 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: Biotechnology in Food Production
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 9 held on June 27, 2019.
Mentor: *Natalija Velić*, PhD, associate prof.
Technical assistance: -

Addition of Medicinal Mushroom *Trametes versicolor* Extract to Wort- the Effect on Beer Quality Parameters

Karla Špehar, 0113138621

Summary:

The study aimed to investigate how the addition of medicinal mushroom *Trametes versicolor* extract to the wort (before fermentation) affects the yeast fermentation activity, as well as the physico-chemical properties of the final product - beer. An automated home-brewing system was used for the mashing and boiling of 20 L of wort. Microfermentations of wort with the addition of 1 mL mushroom ethanol extract (750 mL wort), and 10 and 20 mL of the mushroom water extract (1750 mL wort) were carried out using 1 and 2 L flasks at 18 °C for 12 days. The flasks were inoculated with commercially available top fermenting dry yeast, and the fermentation process was monitored by CO₂ evolution. Standard beer analyses (original extract, apparent extract, alcohol by volume, specific gravity, pH, colour, bitterness and total polyphenol content), as well as antioxidant activity (DPPH), were performed in all beer samples obtained after microfermentation and compared to control samples (without the mushroom extract addition). The obtained results suggest that the addition of medicinal mushroom *T. versicolor* extract to the wort (the amount added during this study) did not significantly affect the fermentation activity of yeast neither the basic beer quality indicators. In comparison to control samples, somewhat higher concentrations of total polyphenols were recorded in all beer samples with the addition of extracts.

Key words: beer, medicinal mushrooms, *Trametes versicolor*, fermentation activity

Thesis contains: 41pages
 11 figures
 2 tables
 0 supplements
 31 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Darko Velić</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Natalija Velić</i> , PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. <i>Ivana Tomac</i> , PhD | member |
| 4. <i>Vinko Krstanović</i> , PhD, prof. | stand-in |

Defense date: July 12, 2019.

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

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PIVO	4
2.1.1. Sirovine za proizvodnju piva	5
2.1.2. Proizvodnja piva	7
2.1.3. Kemijski sastav i zdravstveni učinci piva	10
2.1.4. Pivo kao funkcionalna hrana.....	11
2.2. LJEKOVITE GLJIVE.....	13
2.2.1. Ljekovita svojstva gljiva.....	13
2.2.2. <i>Trametes versicolor</i>	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. ZADATAK	17
3.2. MATERIJALI I APARATURE.....	17
3.2.1. Materijali	17
3.2.2. Aparature.....	18
3.3. METODE	20
3.3.1. Priprema ekstrakta gljive	20
3.3.2. Proizvodnja piva	21
3.3.4. Standardne fizikalno-kemijske analize piva	23
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. UTJECAJ DODATKA EKSTRAKTA GLJIVE <i>T. versicolor</i> U SLADOVINU NA FERMENTACIJSKU AKTIVNOST KVASCA	2
4.2. UTJECAJ DODATKA EKSTRAKTA GLJIVE <i>T. versicolor</i> U SLADOVINU NA OSNOVNE POKAZATELJE KAKVOĆE PIVA	6
5. ZAKLJUČCI	11
6. LITERATURA	2

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Nataliji Velić, na strpljenju, pomoći i mnogobrojnim savjetima tijekom izrade ovog rada kao i na prenesenom znanju tijekom svih ovih godina.

Željela bih se zahvaliti i svojim prijateljima, kolegama studentima, uz koje su se i najteže prepreke prevladavale kao od šale. Bruno, Matea, Antonio, Mirjana, Ivane i Mirna uz vašu pomoć i podršku samo nebo je bilo granica.

Veliko hvala i dragom Stjepanu, čija su ljubav i vjera u mene oduvijek bili snažan vjetar u leđa.

Veliku zahvalnost dugujem i bratu Filipu, koji me je uvijek uveseljavao i usmjeravao na pravi put.

Na kraju, najveće hvala mojim divnim roditeljima na neiscrpoj podršci, ljubavi i potpori. Uz vas i nemoguće postaje moguće.

1. UVOD

Pivo možemo definirati kao pjenušavo osvježavajuće piće s malom koncentracijom alkohola i karakterističnom aromom hmelja, dobiveno vrenjem pivske sladovine s pivskim kvascem.

Posljednjih godina, provedena su brojna istraživanja koja su se bavila zdravstvenim aspektima piva. Istraživanja su potvrdila da konzumacija piva u umjerenim količinama ima blagotvorna djelovanja na ljudski organizam, kao što je smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti, smanjenje stresa, snižavanje kolesterola u krvi, regulacija inzulina, pozitivan utjecaj na kognitivne sposobnosti i prevencija demencije u starosti. Nadalje, pivo ima potencijalni antikancerogeni učinak, diuretsko djelovanje, smanjuje mogućnosti nastanka bubrežnih kamenaca te predstavlja izvor vitamina, minerala, polifenola i dr.

Gljive su od davnina poznate po svojim nutritivnim i ljekovitim svojstvima te predstavljaju vrijedan izvor prirodnih biološki aktivnih spojeva zahvaljujući kojima blagotvorno djeluju na zdravlje ljudi te ih mnogi autori svrstavaju u kategoriju funkcionalne hrane. Jestive i ljekovite gljive su se u zemljama Dalekog istoka stoljećima koristile kao dodatak raznim alkoholnim pićima te je danas moguće pronaći piva, vina, likere i jaka alkoholna pića obogaćena gljivama. Cilj ovog rada je istražiti kako dodatak ekstrakta ljekovite gljive *Trametes versicolor* u sladovinu, prije fermentacije, utječe na fermentacijsku aktivnost kvasca te na osnovna fizikalno-kemijska svojstva gotovog proizvoda - piva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PIVO

Pravilnik o pivu (Narodne novine 142/11 i 141/13) definira pivo kao proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanim vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura.

Osnovna podjela piva je prema vrsti kvasca koji se koristi u proizvodnji. Tako razlikujemo pivo donjeg vrenja ili „lager“, pivo gornjeg vrenja ili „ale“, spontano prevrelo pivo te afričko pivo.

Lager piva ili piva donjeg vrenja su najčešće konzumirana piva u svijetu, a dobivaju se vrenjem pivske sladovine pomoću različitih sojeva čiste kulture kvasca *Saccharomyces pastorianus* (prije poznat i kao *S. carlsbergensis*). Početak vrenja je pri temperaturi od 6 do 8 °C i zbog toga se naziva hladim vrenjem, a završava na temperaturi od 9 do 18 °C, pri čemu se mlado pivo hladi, a kvasac taloži na dno fermentora. Lager pivo se pije ohlađeno na temperaturu od 5 do 14 °C, daje bogatu i trajnu pjenu, punog je okusa zbog relativno velikog udjela neprevrelog ekstrakta. Izražene gorčine i arome po hmelju. U Republici Hrvatskoj se uglavnom proizvode standardna lager piva kao što su *Ožujsko*, *Karlovačko*, *Osječko*, *Pan* i čine preko 90% domaće proizvodnje i potrošnje piva (Marić, 2009.).

Ale piva ili piva gornjeg vrenja tradicionalno se proizvode u Engleskoj odnosno u sjevernoj Njemačkoj. Karakterizira ih upotreba čistih kultura pivskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji na kraju vrenja ispliva na površinu mladog piva. Vrenje započinje pri višoj temperaturi sladovine (20 °C) i završava na temperaturi od 25 °C, pa se stoga takvo vrenje naziva toplo vrenje. *Ale* piva se piju topla (20 °C), neke vrste ovog tipa piva natočene u čašu daju minimalnu i nestabilnu pjenu, dok druge tvore gustu, visoku i stabilnu pjenu. Njemački „*altbier*“ se od engleskog *ale* piva razlikuje po tome što se glavno vrenje odvija pri temperaturi od 18 do 22 °C, a odležavanje pri temperaturi od 0 do 8 °C. Posebnu skupinu ovog tipa piva čine i crna piva *Porter* i *Stout*, koja imaju izuzetnu punoću, sladnu aromu te gustu i stabilnu pjenu (Marić, 2009.).

Spontano prevrela piva. Glavnu karakteristiku ovih piva čine divlji, neselekcionirani sojevi kvasaca koji iz zraka ili sa zidova posuda i prostorija za vrenje dospijevaju u sladovinu. Premda se na ovaj način pivo proizvodilo u prošlosti, dok se još nije znalo za čiste kulture kvasaca, neki industrijski proizvođači piva u Belgiji (dolina rijeke Zenne) i danas na taj način proizvode svoja piva koja imaju specijalni *bouquet* (vinski, voćni, ponekad fenolni). Na taj način proizvode se i

čuvena *lambic* piva koja sadrže veći udjel neprevrelog ekstrakta i lakohlapljivih sastojaka (Marić, 2009.).

Afričko pivo se proizvodi od prosenog slada pomoću kvasca *Schizosaccharomyces pombe* te se fermentacija provodi pri većim temperaturama (30 - 40 °C), koje su prilagođene ekstremnim klimatskim uvjetima koji prevladavaju u Africi (Marić, 2009.).

Ostale podjele piva uključuju podjelu prema masenom udjelu suhe tvari (ekstrakta) u sladovini prije početka vrenja, pri čemu razlikujemo slaba ili laka piva (6-9% ekstrakta), standardna (10-12% ekstrakta), specijalna (više od 12% ekstrakta), dvostruko sladna (18-22% ekstrakta) i ječmena vina (preko 10 vol.% alkohola).

Prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine razlikujemo ječmena, pšenična, ražena piva. Ječmeni slad osnovna je sirovina za većinu piva donjeg i gornjeg vrenja, ali su poznata i europska tradicionalna pšenična piva u kojima je najmanje 50% ječmenog slada zamijenjeno pšeničnim sladom. To su piva gornjeg vrenja, koja kratko odležavaju, pjena im je vrlo blijeda, u usporedbi s pjenom piva gornjeg vrenja od ječmenog slada. Najpoznatije vrste *pšeničnog* piva su: *Berliner Weisse* i *Weizenbier*, koja se često konzumiraju s dodatkom sirupa maline.

Prema boji piva se dijele na svijetla, crvena, tamna i crna, ali se zapravo radi o različitim nijansama žute, crvene, crveno smeđe i crne boje.

Prema volumnom udjelu alkohola piva se dijele na bezalkoholna (manje od 0,5 vol.% alkohola), piva s malim udjelom alkohola ili tzv. *lagana piva* (manje od 3,4 vol.% alkohola), standardna piva (preko 3,5 vol.% alkohola), jaka piva (više od 5,5 vol.% alkohola) te ječmena vina (više od 10 vol.% alkohola) (Marić, 2009.).

2.1.1. Sirovine za proizvodnju piva

Za proizvodnju piva tradicionalno se koriste četiri osnovne sirovine koje uključuju vodu, slad, hmelj i kvasac. Ostali sastojci koji se mogu koristiti za proizvodnju piva, ovisno o važećim pravilnicima za pojedinu zemlju, uključuju druge izvore fermentabilnih šećera osim slada, poput neslađenih žitarica i proizvoda od žitarica, šećere i ostalih saharida, šećerne i škrobne sirupe, voćne pulpe, voćne kaše, koncentrirane voćne kaše, vodene ekstrakte voća i slično. Kvaliteta konačnog proizvoda uvelike ovisi o čistoći, kvaliteti i sastavu sirovina (Bamforth, 2017.).

Slad je osušeno, isklijalo i od klice očišćeno zrno žitarice, najčešće ječma (**Slika 1**). Pivu slad daje punoću okusa, boju, gustoću i jačinu. Proces slađenja sastoji se od 3 faze. Početnu fazu slađenja predstavlja močenje ječma vodom na temperaturi od 14 do 18 °C tijekom 48 sati. Tijekom močenja povećava se vlaga u zrnu (od 42 do 46 %), postojeći enzimi se aktiviraju, a induciraju se životne aktivnosti embrija. Druga faza, klijanje ječma, provodi se 3 do 5 dana na temperaturi od 16 do 20 °C. Prilikom klijanja dolazi do rasta klice i korjenčića, aktivacije i sinteze enzima te transformacije spojeva zrna. Sušenje traje od 24 do 30 sati i čini posljednju fazu slađenja. Sušenjem se smanjuje udio vode u zrnu, prekida se klijanje i biokemijska razgradnja zrna te se potiču kemijske reakcije između proizvoda razgradnje i nastaju obojeni i aromatični sastojci slada važni za senzorska svojstva piva (boja i primarna aroma)(Bamforth, 2011.).



Slika 1 Slad (Calagione, 2006.)

Hmelj je djevičanski, neoplođeni cvat višegodišnje biljke penjačice, latinskog imena *Humulus lupulus*. Cvat se koristi u pivarstvu pod imenom hmeljne šišarice. Često se umjesto šišarica koriste od njih dobiveni pripravci kao što su hmeljni peleti i hmeljni ekstrakt (Marić, 2009.). Hmelj ubrzava taloženje proteina i djeluje kao konzervans. Kemijski sastav suhe tvari hmelja uključuje gorke tvari (18,5%), hmeljna ulja (0,5%), proteine (20%), minerale (8%) te polifenole (3,5%). Iz hmeljnih pripravaka ekstrahiraju se: hmeljne smole ili gorke sastojci (α - i β - kiseline koje daju gorčinu i djeluju kao antiseptici), hmeljna ulja (daju aromu piva), te taninski sastojci (koaguliraju s proteinima i talože ih). α -kiseline ili humuloni netopljivi su u hladnoj vodi, te kuhanjem prelaze u vodotopljivi oblik - izohumulon. Nakon kuhanja, u sladovini zaostaje samo trećina izohumulona(ostatak je u hmeljnom tropu i proteinskim talozima). Hmeljna ulja

odgovorna za aromu piva, najviše su prisutna u sortama aromatičnog hmelja koji se dodaje pri završetku procesa kuhanja sladovine radi sprječavanja otparavanja lakohlapljivih komponenti. U procesu kuhanja sladovine nastaju i netopljivi proteinsko – taninski kompleksi koji se talože tijekom hlađenja sladovine čime povećavaju koloidnu stabilnost piva (Kunze, 2004.).

Kvasac. U proizvodnji piva koriste se sojevi pivskog kvasca koji su sposobni tijekom vrenja i doviranja brzo previrati aeriranu sladovinu do etanola i poželjne koncentracije nusproizvoda vrenja (kiseline, viši alkoholi, ketoni, aldehidi), reducirati diacetil, dobro se flokulirati i taložiti. Osim toga moraju ostati stabilni tijekom višekratne upotrebe, jer je osim sirovina (vode, slada i hmelja) kvasac također odgovoran za aromu i ukupni *bouquet* piva (Marić, 2009.).

2.1.2. Proizvodnja piva

Tehnologija piva u širem smislu može se podijeliti na dva nezavisna dijela: tehnologiju slada i tehnologiju piva (**Slika 2**).

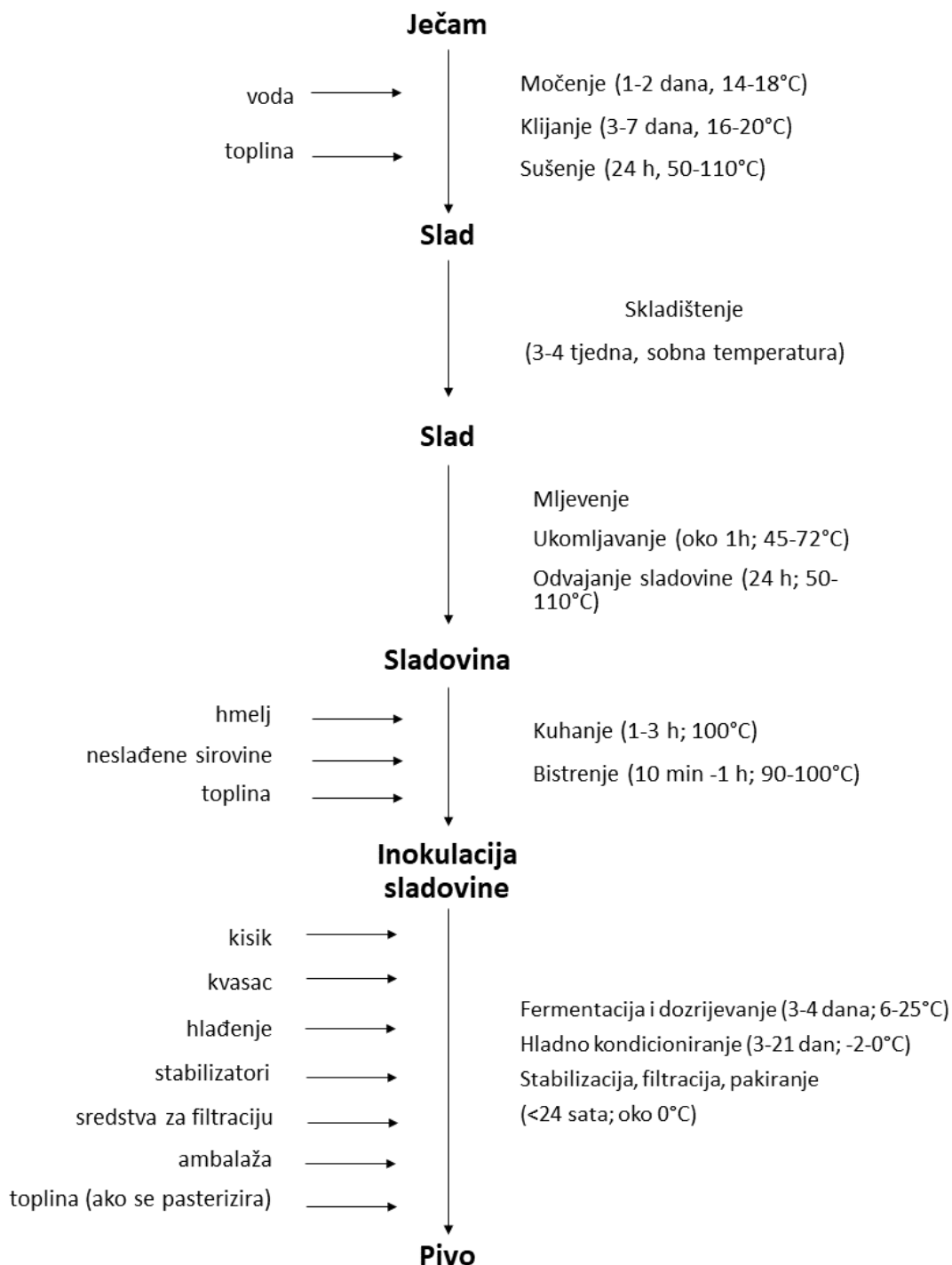
Tehnologija slada obuhvaća čišćenje i sortiranje ječma (ili neke druge žitarice, najčešće pšenice), močenje ječma, klijanje namočenog ječma, sušenje zelenog slada te doradu osušenog slada.

Tehnologija piva obuhvaća proizvodnju sladovine, glavno vrenje, naknadno vrenje mladog piva te bistrenje, doradu i punjenje piva u ambalažu (Bamforth, 2017.).

Proizvodnja sladovine se odvija u varionici, pri čemu se koriste sljedeći tehnološki postupci: drobljenje ili mljevenje slada, ukomljavanje i ošećerenje komine, cijedenje (filtracija) komine, kuhanje sladovine s hmeljem, bistrenje, aeriranje i hlađenje sladovine (Marić i Nadvornik, 1995.).

Ukomljavanje je postupak miješanja mljevenog slada (sladne prekrupe) i usitnjenih neslađenih žitarica s toplom vodom. Ukomljavanjem, hidrolitički enzimi (amilolitički i proteolitički) prisutni u sladu kataliziraju razgradnju netopljivog škroba do topljivih dekstrina i fermentabilnih šećera poput glukoze, maltoze i maltotrioze te razgranju proteina do peptona, polipeptida i slobodnih aminokiselina. Budući da navedeni enzimi imaju različite temperaturne optimume, ukomljavanje se uglavnom provodi u temperaturnom rasponu od 45 do 76 °C postupnim zagrijavanjem komine i njenim zadržavanjem na određenim temperaturama.

Temperatura ukomljavanja utječe na intenzitet biokemijskih reakcija tijekom ukomljavanja, sastav sladovine te na kvalitetu piva (Marić i Nadvornik, 1995.).



Slika 2 Pregled tehnologije slada i piva (Velić, 2019.)

Neposredno nakon ukomljavaanja, odnosno završetka hidrolize, potrebno je odvojiti tekuću fazu - sladovinu, od netopljivog ostatka slada – pivskog tropa, što se može provoditi, ovisno o opremi varionice, postupkom filtracije na tzv. kominskom filtru ili postupkom cijedenja sladovine kroz sloj tropa na perforiranom dnu cijednjaka. U oba postupka trop se ispiri toplom vodom nakon otjecanja sladovine kako bi se iz njega isprao zaostali ekstrakt. Ispiranjem tropa dolazi do razrjeđivanja sladovine, pa se zahtijevani udjel suhe tvari u sladovini postiže kuhanjem sladovine.

Kuhanje sladovine se provodi radi koagulacije proteina, inaktivacije enzima, uparavanja sladovine do zahtijevanog udjela suhe tvari, sterilizacije te ekstrakcije gorkih i aromatičnih sastojaka hmelja koji se dodaje tijekom kuhanja. Hmelj je sirovina koje se dodaje u vrlo maloj količini u usporedbi s vodom i sladom, ali je utjecaj hmelja na konačni okus i aromu piva od izrazitog značaja.

Završetkom kuhanja, sladovina se radi odvajanja koaguliranih proteina prebacuje u taložnik te se primjenom pločastih ili cijevnih izmjenjivača topline hladi do temperature na kojoj se provodi fermentacija. Nakon bistrenja i hlađenja, sladovina se aerira i prebacuje u fermentore.

Suvremeni postupci fermentacije uključuju vrenje i dozrijevanje (doviranje) piva u cilindrično konusnom fermentoru (CFK). U fermentorima se sladovina inokulira (nacjepljuje) čistom kulturom odabrane vrste kvasca koji provodi alkoholnu fermentaciju, pri čemu se fermentabilni šećeri prevode u alkohol i ugljični dioksid (CO₂) kao osnovne produkte te ostale produkte alkoholnog vrenja poput ketona, aldehida, estera, viših alkohola i organskih kiselina koji utječu na formiranje arome i okusa. Vrijeme dozrijevanja se razlikuje ovisno o vrsti piva, pri čemu se tijekom dozrijevanja značajnije ne povećava udjel etanola, ali dolazi do povećanja udjela estera te se razvija aroma i okus piva (Velić, 2019).

Završne tehnološke faze u proizvodnji piva uključuju koloidnu i biološku stabilizaciju piva, filtraciju te punjenje piva u ambalažu (Bamforth, 2017.).

Na tržištu se mogu, osim industrijski proizvedenih piva, pronaći i piva proizvedena u zanatskim (eng. craft) pivovarama. Zanatske pivovare možemo definirati kao neovisne pivovare (nisu dio velikih pivarskih korporacija), manjeg kapaciteta i koje svoju proizvodnju temelje na tradicionalnom načinu proizvodnje piva, ali i upotrebom netradicionalnih sirovima. Piva zanatskih pivovara obično imaju veći udjel ekstrakta i često se u boci odvija naknadno vrenje

koje traje do otvaranja piva. Mnoge zanatske pivovare ne provode filtraciju i/ili pasterizaciju konačnog proizvoda što utječe na bolje zadržavanje biološki aktivnih tvari osjetljivih na povišenu temperaturu i sklonih oksidaciji (Collin i sur., 2013.). Zanatske pivovare često pokazuju kreativnost i inovativnost u proizvodnji, ali i u ambalaži i marketingu te su povezani s lokalnom zajednicom i bliski svojim ciljanim potrošačkim skupinama (Velić, 2019).

2.1.3. Kemijski sastav i zdravstveni učinci piva

Najzastupljenija po udjelu u pivu je voda koja, ovisno o vrsti piva, čini 89 do 93%. Pivo ne sadrži masti, a sadrži tek manju količinu ugljikohidrata. Energetska vrijednost piva potječe uglavnom od alkohola (više od polovice energetske vrijednosti), koji ovisno o vrsti čini od 0,1 do 10 volumnih udjela piva. Etanol se brzo resorbira iz želuca i izravno asimilira u energiju, a energetska vrijednost 1 g etanola iznosi približno 7 kcal ili 29 kJ (Marić, 2009.).

Pivo, ovisno o vrsti, sadrži različite udjele suhe tvari, tzv. nefermentabilnog ekstrakta, koji je pretežno sastavljen od ugljikohidrata (75-80 %), dušikovitih spojeva (6-9 %) i drugih organskih (4-5 %) i anorganskih sastojaka. Ugljikohidratni dio ekstrakta sastoji se od lako razgradljivih dekstrina sastavljenih od 3 do 5 ili više glukoznih jedinica. Od 6 do 9 % ekstrakta čine dušikovi spojevi: ukupni dušik, koagulirajući dušik, magnezijev sulfatni dušik, α -amino dušik i formolni dušik (Marić, 2009.).

Glicerol, kojeg također ima u pivu, je sastojak koji daje punoću okusa, utječe na viskozitet i osjećaj slatkoće piva, slično kao i vina. β -glukan je dijetetsko vlakno podrijetlom iz staničnih membrana ječma, a korisno je za probavu.

Pivo je posebno bogato vitaminima B skupine kao što su niacin, riboflavin (vitamin B₂), piridoksin (vitamin B₆), folati (vitamin B₉) i kobalamin (vitamin B₁₂). Bogato je i mineralima poput magnezija, kalija, silicija i fosfora, a siromašno kalcijem, natrijem i nitritima (Marić, 2009.). U pivu se nalaze i različite skupine polifenola, kao što su tanini (posebno u tamnim pivima), fenolne kiseline, flavoni, flavonoli i proantocijanidi. Pri tome većina polifenolnih spojeva u pivu potječe od slada, a oko 30% iz hmelja (Collin i sur., 2013.). Svi navedeni spojevi pored snažnog antioksidacijskog potencijala imaju i važnu ulogu u formiranju okusa i arome piva, posebno gorčine i trpkosti. Polifenoli imaju značajan utjecaj i na stabilnost piva pri čemu očuvanje koloidne stabilnosti i ujednačenost okusa predstavlja veliki tehnološki izazov zbog

prisustva polifenola. Reakcije između polifenola i proteina uzrokuju koloidnu nestabilnost piva, što značajno ograničava rok trajanja piva. Koloidnu nestabilnost dodatno će potaknuti visoka temperatura, prisustvo kisika i izloženost svjetlu radi čega je pivo najbolje čuvati u tamnim staklenim bocama, zatvoreno, u hlađenim prostorijama (Velić, 2019).

Zdravstveni učinci umjerenog uživanja piva na ljudsko zdravlje uključuju smanjenje razine stresa (što pozitivno utječe na zdravlje srca), smanjeni rizik od kardiovaskularnih bolesti, smanjenje mogućnosti infekcije želučane sluznice bakterijom *Helicobacter pylori*, snižavanje kolesterola u krvi, regulacija inzulina, pozitivan utjecaj na hormonski status žena u menopauzi (zbog prisutnosti izoflavona), pozitivan utjecaj na kognitivne sposobnosti i prevencija demencije u starosti kao i potencijalni antikancerogeni učinak, diuretsko djelovanje (poticanje mokrenja i ublažavanje poteškoća u radu bubrega i mjehura), smanjenje mogućnosti nastanka bubrežnih kamenaca, poticanje lakatacije u dojilja i drugo.

Blagotvoran učinak piva na zdravlje je povezan i s gorkim tvarima hmelja, a pripisuje im se sedativni učinak, kao i s brojnim polifenolnim spojevima koji imaju dokazano protualergijsko, protuupalno i antikancerogeno djelovanje (Bamforth, 2002.).

2.1.4. Pivo kao funkcionalna hrana

U Japanu se 1980-tih prvi put počeo koristiti pojam „funkcionalna hrana“ i odnosio se na prehrambene proizvode obogaćene nutrijentima koji posjeduju korisna fiziološka svojstva (Hardy, 2000.). Godine 1991. Ministarstvo zdravstva Japana predstavilo je projekt na području hrane za specifične zdravstvene namjene poznate pod nazivom FOSHU (Food for Specified Health Uses)(Roberfroid, 2000.). Danas još uvijek ne postoji univerzalna definicije funkcionalne hrane i razlikuje se od zemlje do zemlje (Japanska FOSHU, Europska FUFOSSE (Functional Food Science in Europe), i Nizozemska SHF (Specific Health Promoting Food)). Tako na primjer FOSHU definira funkcionalnu hranu kao namirnicu koja zbog svog sastava ima specifične zdravstvene utjecaje i dobivena je dozvola za tvrdnje o specifičnom pozitivnom učinku na zdravlje. S druge strane, FUFOSSE definira funkcionalnu hranu kao hranu koja povoljno utječe na jednu ili više funkcija organizma, izvan okvira uobičajenih nutritivnih učinaka, i na način koji je važan za unaprjeđenje općeg zdravstvenog stanja ili za smanjenje rizika od bolesti (Adadi, 2018.). Europski konsenzus za funkcionalnu hranu objašnjava ovaj

pojam kao: svakodnevna hrana; hrana koja je dio uobičajene prehrane; sastavljena od prirodnih sastojaka, ponekad u većim koncentracijama od uobičajenih, ili prisutna u hrani u kojoj se inače ne bi našla; pozitivno djeluje na specifične tjelesne funkcije izvan okvira osnovne nutritivnog učinka; može dovesti do unaprjeđenja općeg zdravlja ili do smanjenja rizika od bolesti; hrana u kojoj su pojedini sastojci uklonjeni; hrana u kojoj je modificiran jedan ili više sastojaka; ima potvrđene i utemeljene zdravstvene tvrdnje. Definicija koja na najjednostavniji način objašnjava pojam funkcionalne hrane glasi: hrana koja pored svoje osnovne nutritivne vrijednosti na pozitivan i zadovoljavajući način utječe na jednu ili više tjelesnih funkcija, i to na takav način da poboljšava stanje organizma i smanjuje rizik oboljenja (Roberfroid, 2000.).

Na tržištu funkcionalnih proizvoda, veliki udio zauzimaju funkcionalni napici, oko 59%. Funkcionalni napitci mogu se grupirati u četiri kategorije: napici na bazi mlijeka, sportski napici, energetske napitke te napici na bazi voća, povrća i žitarica. Značajnu grupu funkcionalnih napitaka čine napitci dobiveni fermentacijom žitarica, posebno popularni u tropskim područjima. Najčešće žitarice koje se koriste su ječam, pšenica, kukuruz, raž, proso, zob, riža i sirak (Marsh i sur., 2014.).

Kako bi se dobilo više različitih funkcionalnih proizvoda na bazi piva, u pivo se mogu dodavati arome bilja, biljni ekstrakti, ekstrakti gljiva i sve druge tvari koje mogu imati određene hranjive ili fiziološke učinke (osim vitamina i minerala). Također je dozvoljeno miješanje piva s voćnim sokovima, voćnim nektarima, osvježavajućim bezalkoholnim pićima, vinima, voćnim vinima te alkoholnim pićima i jakim alkoholnim pićima (Pravilnik o pivu, 2008.).

2.2. LJEKOVITE GLJIVE

Gljive su od davnina poznate po svojim nutritivnim i ljekovitim svojstvima te predstavljaju vrijedan izvor prirodnih biološki aktivnih spojeva (Lo i Wasser, 2011.).

U svakodnevnom govoru pod pojmom „gljive“ često se podrazumijevaju više gljive odnosno makrofungi s karakterističnim podzemnim ili nadzemnim plodištem (plodnim tijelom) koje je dovoljno veliko da se može uočiti golim okom i ubrati rukom. Pretpostavlja se da na svijetu postoji oko 1.5 milijuna gljiva, a do danas je opisano oko 140 000 vrsta (Chang i Miles, 2004.). Prema načinu prehrane gljive su heterotrofi, što znači da uzimaju organske tvari iz prirode, po potrebi ih razgrađuju do jednostavnijih molekula i ugrađuju u svoje spojeve, a kao nusprodukt otpuštaju ugljikov dioksid. Prema načinu života gljive mogu biti saprofiti (rastu na mrtvoj organskoj tvari), paraziti (žive na račun drugog organizma) ili simbionti (mikorizne gljive koje mogu živjeti samo u zajednici s različitim biljkama). Gljive se sastoje od plodnog tijela i micelija kojeg čini splet hifa. Micelij zauzima veći dio tijela gljive, a plodno tijelo nastaje spajanjem hifa u jednu jedinstvenu cjelinu (Širić i Han, 2018.).

Možemo ih podijeliti u četiri kategorije: (1) jestive, koje se mogu konzumirati; (2) otrovne; (3) nejestive i (4) ljekovite, odnosno one za koje se pretpostavlja da imaju ljekovita svojstva. Međutim, ovakav pristup klasifikaciji nije apsolutan i isključiv, jer mnoge gljive, osim što su jestive posjeduju i ljekovita svojstva (Cheung, 2008.).

Gljive su tisućljećima cijenjene zbog svojih hranjivih i ljekovitih svojstava. Unatoč velikom broju poznatih vrsta, samo mali dio gljiva se koristi kao hrana i mali broj gljiva se komercijalno uzgaja (oko 20-ak vrsta). Gljive ljekovitih svojstava koriste se za proizvodnju dijetalne hrane, dodataka prehrani, lijekova, sredstava za zaštitu bilja, kozmetika i nutrizanata, Pretpostavlja se da preko 700 vrsta gljiva posjeduju ljekovita svojstva. Neke od ljekovitih gljiva su jestive, dok su druge nejestive zbog svoje grube teksture i gorkog okusa (Gargano i sur., 2017.).

2.2.1. Ljekovita svojstva gljiva

Upotreba lijekova i dodataka prehrani proizvedeni iz ljekovitih gljiva, pokazala se uspješnom u prevenciji i liječenju imunoloških poremećaja, osobito kod imunodeficientnih i imunosuprimiranih pacijenata. Koriste se i za pacijenata koji se liječe kemoterapijom ili radioterapijom, kod različitih tipova karcinoma, kroničnih virusnih infekcija hepatitisa B, C i D koje se prenose krvlju, virusa humane imunodeficientije / sindroma stečene

imunodeficijencije (HIV / AIDS), Herpes simplex virusa, različitih tipova anemije, sindroma kroničnog umora i Epstein-Barr virusa. Također se primjenjuju i za bolesnike s kroničnim gastritisom i čirevima želuca uzrokovanih bakterijom *Helicobacter pylori* te za pacijente s demencijom (Valverde i sur., 2015.).

Pored velikog broja biološki aktivnih tvari koje su izolirane iz različitih vrsta gljiva, posebno mjesto zauzimaju imunomodulatorni spojevi iz gljiva, koji se na osnovu kemijske strukture mogu podijeliti u četiri skupine: lektini, terpenoidi, proteini i polisaharidi (El Enshasy i Hattikau, 2013.). Polisaharidi gljiva, osobito β -(1 \rightarrow 3)-glukane, ubrajaju se u modulatore biološkog odgovora te pomažu organizmu u prilagodbi na različite stresne situacije (Petravić-Tominac i sur., 2010.). Polisaharidi iz gljiva pokazuju i antitumorsku, antivirusnu, antibakterijsku, protuupalnu, radioprotektivnu, antidijabetičku i antioksidacijsku aktivnost (Jin i sur., 2018.). Ostale biološki aktivni spojevi iz ljekovitih gljiva koji imaju antitumorsku i antikancerogenu aktivnost, osim polisaharida, su fenolni spojevi, terpeni i alkaloidi (Gargano i sur., 2018.)

Glikoproteini iz gljiva imaju primjenu u medicini, biotehnologiji i poljoprivredi zbog njihove jedinstvene biološke aktivnosti, koja uključuje antifungalnu, antibakterijsku, antiparazitsku, antivirusnu, antitumorsku, antiproliferativnu, imunomodulacijsku i insekticidnu aktivnost, nematotoksičnost te različite enzimске aktivnosti poput lignocelulolitičke, proteolitičke i inhibicije proteaza (Erjavec i sur., 2012.)

Antioksidacijska svojstva ljekovitih gljiva povezuju se s gore navedenim biološki aktivnim spojevima te s mineralima poput cinka i selena. Antioksidacijska aktivnost mnogih vrsta gljiva može se usporediti s antioksidacijskom aktivnošću različitih vrsta voća i povrća, a smanjuje se sušenjem (Gil-Ramirez i sur., 2016.).

2.2.2. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor ili šarena tvrdokoška je gljiva bijelog truljenja razreda *Basidiomycota*. Raste u redovima, nakupinama ili preklapajućim formacijama na deblima, stabljikama i otpalim granama mrtvog i raspadajućeg drveća, a ponekad i na ranama živog drveća. Razgradnja lignoceluloznih materijala (poput drveta), karakteristična za gljive bijelog truljenja, omogućena je djelovanjem enzima koji sudjeluju u razgradnji celuloze, hemiceluloze i lignina, i koje ove gljive proizvode izvanstanično. Sposobnost razgradnje lignina ima vrlo malo mikroorganizama, što ove gljive čini posebnima i one se često koriste u bioremedijaciji (za razgradnju različitih ksenobiotika). Naime, lignolitički enzimi zbog sličnosti kemijske strukture

lignina i različitih ksenobiotika, kataliziraju razgradnju ovih spojeva, koji se zbog teške biorazgradljivosti akumuliraju u okolišu.



Slika 3 Šarena tvrdokoška (*T. versicolor*) (web 1)

T. versicolor ubraja se među 25 najljekovitijih vrsta gljiva na svijetu (Hobbs, 2014.). Sadrži polisaharide koji su fiziološki aktivni (biološki aktivni spojevi), pri čemu su od izrazite važnosti polisaharid-peptid (PSP) i polisaharid-krestin (PSK). Oba polisaharida (PSP i PSK) sastoje se od β -glukana, polimera D-glukoze s β -1,3 i α -1,4 glikozidnim vezama, pri čemu neki od njih mogu sadržavati arabinozu, manozu, fukozu, galaktozu, ksilozu i glukuronsku kiselinu. PSP i PSK ekstrahirani iz *T. versicolor* obično sadrže 34-35% topljivih ugljikohidrata, 28-35% proteina, oko 7% vlage, 6-7% pepela, a ostatak čine slobodni šećeri i aminokiseline. Među 18 vrsta prisutnih aminokiselina, 70% čine kisele i neutralne aminokiseline kao što su asparaginska kiselina, treonin, alanin, serin, valin, glutaminska kiselina, glicin i leucin (Cruz i sur., 2016.). Biološki aktivni spojevi iz ove gljive pokazuju antitumorsku aktivnost, probiotičku aktivnost, antioksidacijsku aktivnost, antivirusnu aktivnost, antidijabetičku aktivnost te imunomodulacijsku aktivnost (Cruz i sur., 2016.).

Ljekovita svojstva gljive *T. versicolor* koja su tijekom godina potvrđena istraživanjima kineskih i japanskih istraživača, razlog su što se u novije vrijeme provode brojna klinička ispitivanja s ciljem procjene i identifikacije glavnih biološki aktivnih spojeva ekstrahiranih iz *T. versicolor* (Cruz i sur., 2016.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada je istražiti kako dodatak ekstrakta ljekovite gljive *T. versicolor* u sladinu, prije fermentacije, utječe na fermentacijsku aktivnost kvasca te na osnovna fizikalno-kemijska svojstva gotovog proizvoda, odnosno piva.

3.2. MATERIJALI I APARATURE

3.2.1. Materijali

Sirovine

- svijetli bazni ječmeni slad „Maris Otter“, boja 4,5-6,5 EBC (Simpsons Malt, Velika Britanija)
- svijetli bazni ječmeni slad „Pale Ale Best“, boja 4,5-6,5 EBC (Simpsons Malt, Velika Britanija)
- svijetli pšenični slad, boja 2-6 EBC (Simpsons Malt, Velika Britanija)
- hmelj „East Kent Golding“, 4% alfa kiselina (Velika Britanija)
- Protafloc sredstvo za bistrenje na bazi irske mahovine (Neal's Brewing Supplies, Velika Britanija)
- Vodeni i etanolni ekstrakt gljive *Trametes versicolor*
- komercijalni suhi kvasac gornjeg vrenja *S. cerevisiae* Safale US-05 (Fermentis, Francuska)

Kemikalije

- 80%-tna mliječna kiselina (Lactl, Vinfoferm, Belgija)
- CaSO_4 , p.a. (Sigma Aldrich, SAD)
- CaCl_2 , p.a. (Kemika, Hrvatska)
- MgSO_4 , p.a. (Kemika, Hrvatska)
- HCl (Carlo Erba Reagents, Francuska)
- Na- karboksi metil celuloza (Sigma Aldrich, SAD)
- Željezov (III) citrat (Fluka, SAD)

- Dinatrijeva sol EDTA (Sigma Aldrich, SAD)
- Koncentrirana HNO₃ (Kemika, Zagreb)
- NH₃ (Kemika, Zagreb)
- (NH₄)₅Fe(C₆H₄O₇)₂ (Kemika, Hrvatska)
- Izooktan (2,2,4-trimetil pentan) (Sigma Aldrich, SAD)
- Metanol (Sigma Aldrich, SAD)
- 2,2 Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), čistoća > 99% (Sigma Aldrich, SAD)

3.2.2. Aparature

Tijekom pripreme vodenog i etanolnog ekstrakta gljive *T. versicolor* korišteni su uređaji:

- prototipni mlin (P=5 kW)
- vaga (ABT 220-5DM, Kern),
- homogenizator (Micra D-15, Micra, Njemačka) s odgovarajućim nastavkom (Micra DS-30/P)
- nuč-filtar (promjer 280 mL, filter papir Macherey-Nagel Tip 751)
- vakuum pumpa (Vacuubrand Mz2, Njemačka)
- rotacijski otparivač (rotavapor, Büchi R-151, Büchi laborotechnik AG, Švicarska)
- rotacijski otparivač (Büchi R-205, Büchi laborotechnik AG, Švicarska)
- autoklav (Kambič, vakuumski autoklav volumena 61 L, Kambič, Slovenija)

Za ukomljavanje i kuhanje sladovine korišten je automatizirani sustav Braumeister (Speidl, Njemačka) kapaciteta 20 L (**Slika 4**).



Slika 4 Automatizirani sustav za proizvodnju sladovine Braumeister (Speidl, Njemačka)

Za pretakanje piva u boce korištena je ručna pumpa/ automatski sifon (Fermtech, Canada).

Za održavanje konstantne temperature fermentacije korišten je inkubator s mogućnošću hlađenja (Thermoanalytic) te rashladna vinska vitrina (18 °C), dok je za odležavanje piva korišten hladnjak (4 °C).

Za praćenja pH tijekom ukomljavanja korišten je pH metar (edge® HI2020, Hanna Instruments), dok je za određivanje pH piva korišten je pH metar (Lab 850, Schott).

Za mjerenje ekstrakta sladovine korišten digitalni rekraktometar (HI96800, Hanna Instruments).

Za standardne analize piva korišten je analizator piva (**Slika 5**)(Alcolyzer Beer Analyzing System, Anton Paar, Austrija).



Slika 5 Analizator piva (Alcolyzer Beer Analyzing System, Anton Paar, Austrija)

Za određivanje boje, gorčine i ukupnih polifenola korišten je spektrofotometar (Lambda 25, Perkin Elmer), za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH korišten je spektrofotometar (UV-1900, Shimadzu).

3.3. METODE

3.3.1. Priprema ekstrakta gljive

3.3.1.1 Priprema etanolnog ekstrakta gljive *T. versicolor*

Za pripremu etanolnog ekstrakta gljive *T. versicolor* korišteno je osušeno plodište gljive (gljiva iz privatne zbirke Institute for Applied Mycology and Biotechnology, Celje, Slovenija) koje je samljeveno na prototipnom mlinu, pri čemu je korišteno sito veličine 1,5 mm. Izvagano je 100 g samljevenog plodišta gljive te je dodano u 10 L etanola (94%) radi maceracije. Maceracija pri 20 °C je trajala 12 h. Nakon maceracije sadržaj je homogeniziran korištenjem homogenizatora s odgovarajućim nastavkom, prvo grubim, a zatim finim rotorom (trajanje svake od homogenizacija bilo je 20 min pri 28 600 rpm). Homogenizat je zatim profiltriran preko vakuum nuč-filtra, korištenjem vakuum boce od 20 L te vakuum pumpe s kondenzatorom i regulacijom. Nakon filtracije, filtracijska pogača isprana je još s 20 L etanola,

dok filtrat nije bio u potpunosti proziran. Dobiveni filtrat prebačen je na otparavanje otapala korištenjem rotacijskog otparivača pri sniženoj temperaturi od 50 °C, tlaku 102 mbar i temperaturi hlađenja spirale od 8 °C. Otparavanje je provedeno do volumena 1000 mL ± 20 mL. Nakon toga otparavanje je nastavljeno na rotacijskom otparivaču pri istim uvjetima do volumena od 100 mL.

3.3.1.2 Priprema vodenog ekstrakta gljive *T. versicolor*

Nakon završene ekstrakcije samljevenog plodišta gljive etanolom, kruti ostatak (filtracijska pogača) s nuč-filtra osušen je, izvagan (masa je iznosila 97g) te stavljen u 10 L destilirane vode. Nakon toga sadržaj posude je izmiješan homogenizatorom kroz 15 min pri 24 000 rpm i stavljen u autoklav, pri čemu su temperatura sterilizacije i tlak iznosili 121 °C, odnosno 1 bar (grijanje je trajalo 60 min, koliko je trajalo i hlađenje). Sadržaj posude zatim je profiltriran korištenjem filter papira sa staklenim vlaknima (veličine pora 100 µm). Dobiveni filtrat prebačen je na otparavanje u rotacijski otparivač pri temperaturi od 60 °C, te tlaku od 70 mbar i temperaturi hlađenja spirale od 10 °C do konačnog volumena od 500 mL

3.3.2. Proizvodnja piva

Za proizvodnju 20 L sladovine za usipak je korišteno: 1,55 kg svijetlog baznog ječmenog slada „Maris Otter“, 2,0 kg svijetlog baznog ječmenog slada „Pale Ale“ te 0,71 kg svijetlog pšeničnog slada. Za ukomljavanje je korišteno 23 L destilirane vode u koju je dodano 2,8 g CaSO₄, 2,0 g CaCl₂ te 1,2 g MgSO₄ kako bi se dobio odgovarajući profil vode za odabrani stil piva („Gold Ale“). Ukomljavanje je provedeno prema sljedećem programu: 63 °C početak ukomljavanja, 70 min na 63 °C, 5 min na 73 °C i 5 min na 78 °C.

pH sladovine tijekom ukomljavanja podešavan je dodatkom Lactola i održavan u pH području od 5,2 do 5,6. Nakon cijedenja i ispiranja tropa s dodatnih 5 L vode (temperature 78 °C), kuhanje sladovine trajalo je 80 min. 30 min prije kraja kuhanja dodano je 54 g hmelja „East Kent Golding“. 5 min prije kraja kuhanja dodano je sredstvo za bistrenje na bazi irske mahovine prema uputama proizvođača. Drugi dio hmelja (45 g) dodan je tijekom hlađenja sladovine na način da je sladovina ohlađena do 75 °C, sadržaj kotla je snažno izmiješan kako bi se postiglo vrtloženje sladovine (whirlpool) te je sladovina s dodanim hmeljem zadržana na navedenoj

temperaturi kroz 15 min. Nakon toga, nastavljeno je hlađenje sladovine do temperature fermentacije, odnosno inokulacije kvascem (18 °C). Ohlađena sirovina prebačena je u Erlenmeyerove tikvice od 2 L (1750 mL sladovine) i 1 L (750 mL sladovine) u koje su zatim dodani prethodno pripremljeni ekstrakti ljekovite gljive *T. versicolor*. U tikvice od 2 L dodano je 10 mL (uzorci s oznakama S10 i S10a), odnosno 20 mL (uzorci s oznakama S20 i S20a) vodenog ekstrakta ljekovite gljive, dok je u tikvice od 1 L dodano po 1 mL etanolnog ekstrakta (uzorci s oznakama S1 i S1a). Uzorci u koje nisu dodani ekstrakti poslužili su kao kontrole (uzorci označeni K10 i K20 te K1 i K1a). Nakon toga tikvice su inokulirane rehidriranim kvascem. Tikvice od 2 L inokulirane su s 1,14 g kvasca rehidriranog u 11,4 mL destilirane vode (temperature 25 °C), dok su tikvice od 1 L inokulirane s 0,5 g kvasca rehidriranog u 5 mL destilirane vode (temperature 25 °C). Tikvice za provođenje mikrofermentacije zatvorene su vrenjačama i prebačene u inkubator/rashladnu vitrinu na 18 °C kroz 12 dana. Pivo je dodatna dva dana (ukupno 14 dana fermentacije) ostavljeno fermentirati na sobnoj temperaturi radi uklanjanja moguće prisutnog diacetila. Nakon toga tikvice su stavljene na hlađenje na 4 °C, kako bi se što bolje istaložio kvasac. Mlado pivo je zatim ručnom pumpom pretočeno iz tikvica u pivske boce volumena 0,33 L s preklopnim zatvaračima te su do analiza, boce čuvane u hladnjaku na 4 °C.

3.3.3. Praćenje fermentacijske aktivnosti kvasca - određivanje mase CO₂ oslobođenog tijekom mikrofermentacija sladovine

Masa oslobođenog CO₂ tijekom mikrofermentacija izračunata je kao razlika promjene mase tikvice u kojoj se provodila fermentacija i promjena mase tikvice slijepe probe (tikvica s vodom).

$$m = m_1 - m_2$$

m - masa proizvedenog CO₂ u fermentacijskoj tikvici [g]

m_1 - gubitak mase tikvice (razlika mase tikvice između dva mjerenja) [g]

m_2 - razlika mase tikvice slijepe probe između dva mjerenja [g]

Brzina nastajanja CO₂ određena je na način da je masa oslobođenog CO₂ u određenom vremenskom intervalu podijeljena s trajanjem tog intervala i volumenom podloge:

$$\frac{d\text{CO}_2}{dt} = \frac{\Delta m}{V \times \Delta t}$$

$\frac{d\text{CO}_2}{dt}$ brzina nastajanja CO₂ [g/Lh]

Δm masa CO₂ oslobođenog u vremenskom intervalu Δt [g]

Δt vremenski interval između dva mjerenja [h]

V volumen podloge [L]

3.3.4. Standardne fizikalno-kemijske analize piva

3.3.4.1. *Određivanje alkohola, gustoće, prividnog i stvarnog ekstrakta, stupnja fermentacije (MEBAK 2.13.6.2.)*

Uzorci piva su pripremljeni za analizu na analizatoru piva filtracijom preko nabranog filter papira te otplinjavanjem (uklanjanjem CO₂). Ovako pripremljenim uzorcima napune se kivete i stavljaju u analizator piva (Alcolyzer Beer Analyzing System), kombinirani uređaj za mjerenje. Uređaj automatski uzima uzorak po uzorak i vrši mjerenje.

3.3.4.2. *Određivanje pH (MEBAK 2.17)*

Kod određivanja pH vrijednosti, potrebno je ukloniti CO₂ iz uzorka. Otplinjeni uzorak se prebacuje u čašicu u koju se uroni elektroda i očita se pH vrijednost na zaslonu uređaja.

3.3.4.3. *Određivanje boje (MEBAK 2.16.2.)*

Uzorak je potrebno prije mjerenja boje profiltrirati. Boja se određuje mjerenjem apsorbancije piva na 430 nm u 10 mm kvarcnoj kiveti. Kao slijepa proba koristi se destilirana voda. Vrijednost boje, izražena u EBC jedinicama izračuna se prema izrazu:

$$\text{Boja/EBC} = A_{430} \cdot 25 \cdot F$$

A_{430} - apsorbancija uzorka mjerena na 430 nm

F - faktor razrjeđenja

3.3.4.4. Određivanje gorčine (MEBAK 2.22.1.)

Za određivanje gorčine piva odpipetira se 10 mL otplinjenog uzorka (piva) u odmjernu tikvicu od 25 mL, doda se 0,5 mL otopine klorovodične kiseline (HCl), 20 mL izooktana te se dodaju dvije do tri staklene kuglice. Zatvori se odmjerna tikvica i stavi na miješalicu pri čemu se otopina miješa tijekom 15 minuta. Zatim slijedi centrifugiranje tijekom 3 min na 3000 o/min. Mjeri se apsorbancija izooktanskog sloja pri 275 nm, pri čemu se kao slijepa proba koristi izooktan. Vrijednost gorčine, izražena u BU jedinicama izračuna se prema izrazu:

$$\text{gorčina/BU} = A_{275} \cdot 100\%$$

3.3.4.5. Određivanje ukupnih polifenola (MEBAK 2.21.2.)

Pripremljena je svježa otopina CMC/EDTA reagensa koncentracije 10 g/L. Polagano je dodano 10 g CMC i 2 g EDTA u 500 mL destilirane vode i izmiješano. Nakon homogenizacije, otopina je prenesena u odmjernu tikvicu od litre i nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Otopina željezovog reagensa koncentracije 5,6 g Fe³⁺/L pripremljena je otapanjem 3,5 g zelenog amonij željezo citrata u 100 mL destilirane vode. Amonijev reagens pripremljen je otapanjem 100 mL koncentriranog amonijaka u 300 mL destilirane vode. U odmjernu tikvicu od 25 mL dodano je 10 mL uzorka piva i 8 mL CMC/EDTA reagensa te je snažno izmiješano. Zatim je dodano 0,5 mL željezovog reagensa i 0,5 mL amonijeva reagensa te snažno izmiješano. Nakon 10 minuta stajanja uzorka, očitana je apsorbancija uzorka na valnoj duljini od 600 nm. Koncentracija ukupnih polifenola izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$P = A \cdot 820 \cdot F$$

P - koncentracija ukupnih polifenola (mg/L)

A - apsorbancija uzorka mjerena na 600 nm

F - faktor razrijeđenja (1 ako je korištena odmjerna tikvica od 25 mL, 2 ako je korištena odmjerna tikvica od 50 mL).

3.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost u uzorcima piva određena je prema metodi koju su opisali Tapasya i suradnici (2015).

Pripremljena je 0,3 mmol/L otopina DPPH u metanolu. 0,5 mL ovako pripremljene otopine DPPH doda se u kivetu s 100 μ L uzorka piva te se izmiješa. Reakcijska otopina se ostavi na tamnom mjestu na 30 °C tijekom 30 minuta. Naposljetku se očita apsorbancija pri 518 nm

Postotak inhibicije DPPH izračuna se prema izrazu:

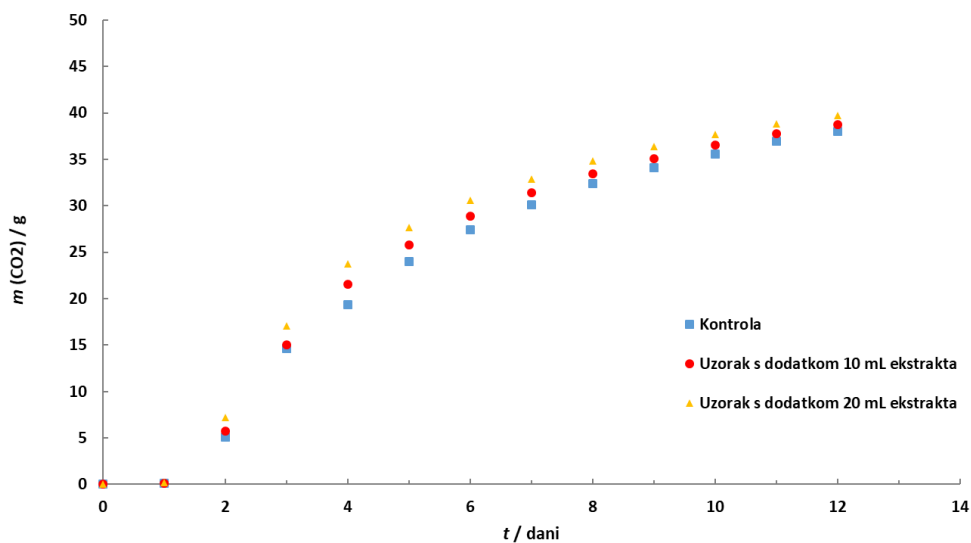
$$\% \text{ inhibicije} = \frac{\text{Apsorbancija kontrolnog uzorka} - \text{Apsorbancija uzorka piva}}{\text{Apsorbancija kontrolnog uzorka}}$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

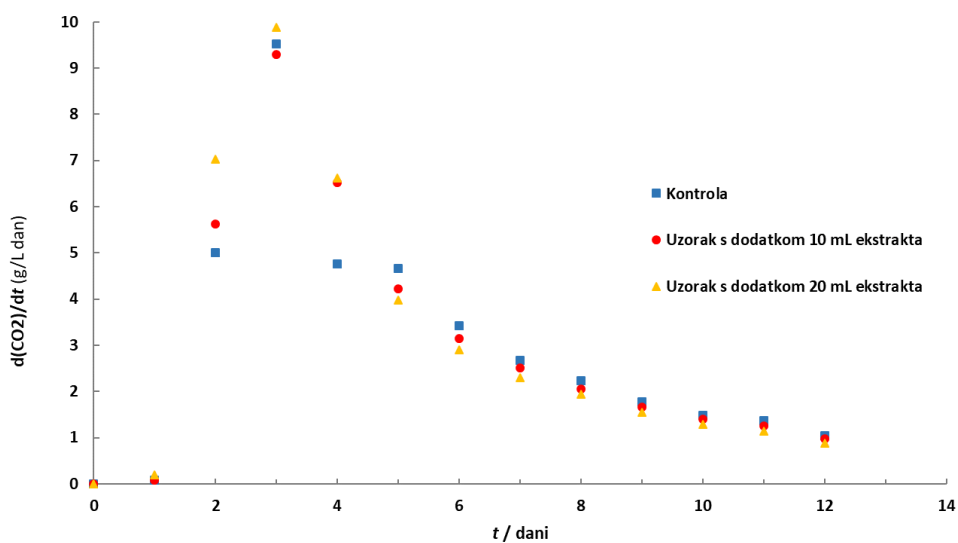
4.1. UTJECAJ DODATKA EKSTRAKTA GLJIVE *T. versicolor* U SLADOVINU NA FERMENTACIJSKU AKTIVNOST KVASCA

Nastajanje CO₂ tijekom fermentacije u stehiometrijskom je odnosu s potrošnjom šećera i proizvodnjom etanola. Stoga se tijekom fermentacije, odnosno fermentacijska aktivnost kvasca može posredno pratiti jednostavnim određivanjem mase oslobođenog CO₂ (Petraović-Tominac i sur., 2013). U ovom istraživanju praćena je fermentacijska aktivnost komercijalnog pivskog kvasca gornjeg vrenja *S. cerevisiae* Safale US-05 u sladovini s dodatkom etanolnog i vodenog ekstrakta ljekovite gljive *T. versicolor*. Provedene su mikrofermentacije u trajanju od 12 dana, kako bi se utvrdilo utječe li dodatak ekstrakta u kojem se nalaze ekstrahirani različiti biološki aktivni spojevi iz plodišta gljive na tijek fermentacije. Rezultati, izraženi kao srednja vrijednost dvije paralelne fermentacije, su prikazani na **Slikama 6 - 9**.

Temperatura tijekom fermentacije iznosila je 18 °C, što je uobičajena temperatura fermentacije za odabranu vrstu piva (Gold Ale) i odabrani kvasac (temperaturni optimum 18 – 28 °C). **Slika 6** prikazuje utjecaj dodatka vodenog ekstrakta *T. versicolor* u sladovinu na fermentacijsku aktivnost komercijalnog pivskog kvasca Safale US-05. Iz **Slike 6** je vidljivo kako je fermentacija započela između prvog i drugog dana u svim uzorcima - kako u uzorcima s dodatkom vodenog ekstrakta, tako i u kontrolnim uzorcima. Nadalje, vidljivo je kako je profil krivulje isti za sve uzorke, ali je u uzorcima s dodatkom ekstrakta nešto veća masa oslobođenog CO₂ tijekom svih 12 dana u odnosu na kontrolu, što upućuje na nešto veću fermentacijsku aktivnost kvasca u uzorcima s dodatkom vodenog ekstrakta. Iz **Slike 7** koja prikazuje promjenu specifične brzine fermentacije sladovine odabranim pivskim kvascem može se uočiti kako je najveća brzina fermentacije u svim uzorcima postignuta 3. dan fermentacije, a faza burnog vrenja trajala je oko tjedan dana, nakon čega je nastavljeno tiho vrenje. U fazi burnog vrenja od 2. do 4. dana veće promjene specifične brzine fermentacije uočene su za uzorke sladovine s dodatkom vodenog ekstrakta u odnosu na kontrolu, pri čemu promjena specifične brzine raste u nizu S20 > S10 > K. Nakon 4. dana brzine fermentacije se izjednačavaju, pri čemu rastu u nizu K > S10 > S20. Ukupna masa CO₂ oslobođena na kraju fermentacije u uzorcima s dodatkom 10 i 20 mL ekstrakta gljive iznosila je 38,74 g, odnosno 39,70 g, dok je u kontrolnim uzorcima iznosila 38,01 g, što upućuje na zaključak kako je dodatak vodenog ekstrakta u sladovinu doveo do malog povećanja fermentacijske aktivnosti odabranog kvasca.

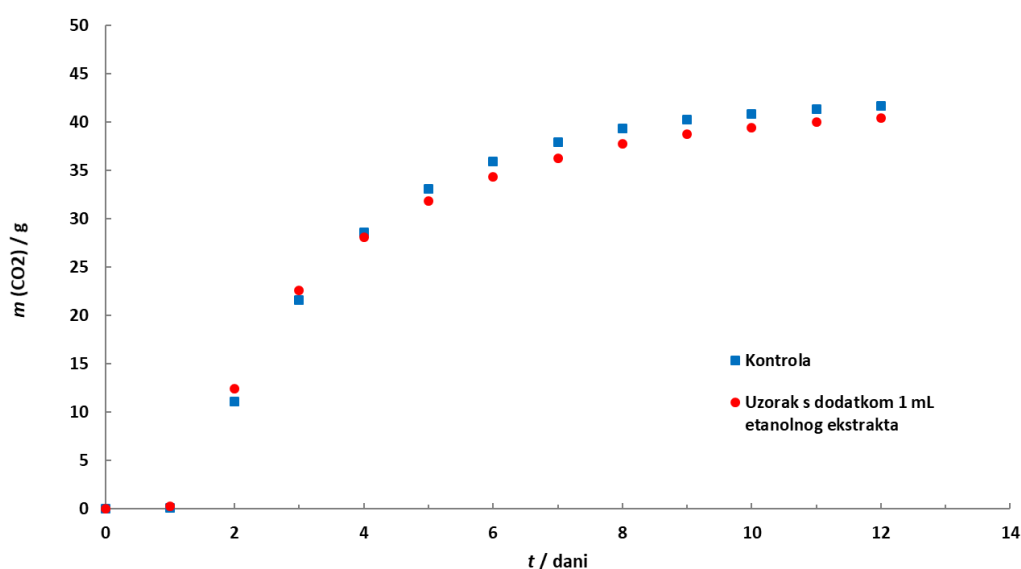


Slika 6 Utjecaj dodatka vodenog ekstrakta gljive *T. versicolor* u sladinu (10 i 20 mL u 1750 mL sladovine) na fermentacijsku aktivnost komercijalnog pivskog kvasca Safale US-05

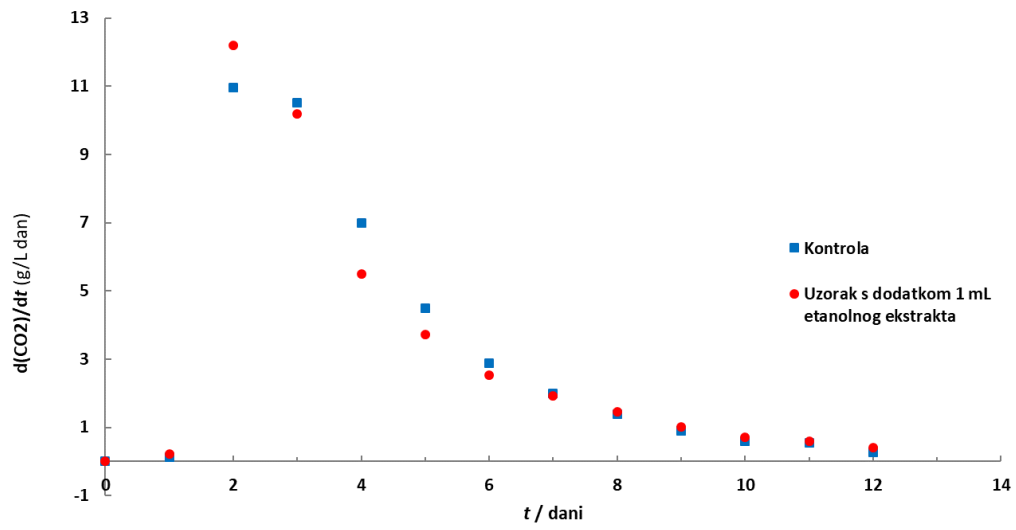


Slika 7 Utjecaj dodatka vodenog ekstrakta gljive *T. versicolor* u sladinu (10 i 20 mL u 1750 mL sladovine) na promjenu specifične brzine fermentacije sladovine komercijalnim pivskim kvascem Safale US-05

Slika 8 prikazuje utjecaj dodatka etanolnog ekstrakta gljive *T. versicolor* u sladovinu na fermentacijsku aktivnost komercijalnog pivskog kvasca Safale US-05. Iz **Slike 8** je vidljivo kako je profil krivulje sličan i za uzorak s dodatkom etanolnog ekstrakta i za kontrolni uzorak, pri čemu je masa oslobođenog CO₂ prva tri dana veća za uzorak s dodatkom etanolnog ekstrakta, dok je nakon 4. dana ta masa veća za kontrolni uzorak. Ovo upućuje na nešto veću fermentacijsku aktivnost kvasca u uzorcima s dodatkom etanolnog ekstrakta u prvih nekoliko dana fermentacije. Ukupna masa oslobođenog CO₂ u prvih četiri dana fermentacije iznosi 21,6 g za kontrolni uzorak te 22,6 g za uzorak s dodatkom etanolnog ekstrakta. Nakon 12 dana fermentacije taj se odnos mijenja te ukupna masa oslobođenog CO₂ iznosi 41,65 g za kontrolni uzorak i 40,45 g za uzorak s dodatkom etanolnog ekstrakta. Iz **Slike 9** koja prikazuje promjenu specifične brzine fermentacije sladovine odabranim pivskim kvascem može se uočiti kako je najveća brzina fermentacije u oba uzorka postignuta 2. dan fermentacije, a faza burnog vrenja trajala je oko tjedan dana, nakon čega je nastavljeno tiho vrenje. 2. dana fermentacije uočena je veća brzina fermentacije u uzorku s dodatkom etanolnog ekstrakta. Nakon 2. dana brzina fermentacije je veća u kontrolnom uzorku, a nakon završetka burne fermentacije brzine se gotovo izjednačavaju.



Slika 8 Utjecaj dodatka etanolnog ekstrakta gljive *T. versicolor* u sladovinu (1 mL u 750 mL sladovine) na fermentacijsku aktivnost komercijalnog pivskog kvasca Safale US-05



Slika 9 Utjecaj dodatka etanolnog ekstrakta gljive *T. versicolor* u sladovinu (1 mL u 750 mL sladovine) na promjenu specifične brzine fermentacije sladovine komercijalnim pivskim kvascem Safale US-05

4.2. UTJECAJ DODATKA EKSTRAKTA GLJIVE *T. versicolor* U SLADOVINU NA OSNOVNE POKAZATELJE KAKVOĆE PIVA

Kako bi se utvrdio utjecaj dodatka ekstrakta gljive *T. versicolor* u sladinu na osnovne pokazatelje kakvoće piva, provedene su fizikalno-kemijske analize uzoraka piva dobivenih nakon mikrofermentacija u tikvicama u trajanju od 12 dana. Rezultati analiza uzoraka s dodatkom vodenog ekstrakta *T. versicolor* prikazani su u **Tablici 1**, dok su rezultati analiza uzoraka s dodatkom etanolnog ekstrakta prikazani u **Tablici 2**.

Tablica 1 Fizikalno-kemijske karakteristike kontrolnih uzoraka i uzoraka s dodatkom vodenog ekstrakta gljive *T. versicolor*

Uzorak	K10	S10	S10a	K20	S20	S20a
Ekstrakt osnovne sladinine OG [% m/m]	12,61	12,63	12,61	12,51	12,50	12,51
Alkohol [% m/m]	4,16	4,18	4,19	4,12	4,21	4,15
Alkohol [% vol.]	5,32	5,34	5,36	5,26	5,37	5,30
Prividni ekstrakt Ea [% m/m]	2,66	2,64	2,58	2,65	2,43	2,58
Stvarni ekstrakt Er [% m/m]	4,57	4,56	4,51	4,54	4,37	4,49
Prividni stupanj fermentacije ADF [%]	78,93	79,10	79,53	78,84	80,56	79,38
Stvarni stupanj fermentacije RDF [%]	65,28	65,42	65,77	65,20	66,20	65,63
Specifična težina SG [20°/20°]	1,01036	1,01029	1,01006	1,01032	1,00947	1,01005
Kalorijska vrijednost [Kcal/100mL]	45,51	45,58	45,51	45,13	45,09	45,11
pH	4,25	4,29	4,28	4,28	4,29	4,27
Boja [EBC]	8,78	9,22	9,33	8,66	9,65	9,72
Gorčina [EBU]	27,65	26,14	25,99	25,32	28,12	25,18

Tablica 2 Fizikalno-kemijske karakteristike kontrolnih uzoraka i uzoraka s dodatkom etanolnog ekstrakta gljive *T. versicolor*

Uzorak	K1	K1a	S1	S1a
Ekstrakt osnovne sladovine OG [% m/m]	12,72	12,75	12,79	12,76
Alkohol [% m/m]	4,50	4,51	4,49	4,50
Alkohol [% vol.]	6,74	5,75	5,72	5,74
Prividni ekstrakt Ea [% m/m]	1,91	1,98	2,07	2,00
Stvarni ekstrakt Er [% m/m]	4,03	4,05	4,13	4,07
Prividni stupanj fermentacije ADF [%]	84,55	84,45	83,83	84,32
Stvarni stupanj fermentacije RDF [%]	69,77	69,70	69,21	69,60
Specifična težina SG [20°/20°]	1,00765	1,00772	1,00805	1,00779
Kalorijska vrijednost [Kcal/100mL]	45,87	46,00	46,15	46,04
pH	4,28	4,26	4,25	4,27
Boja [EBC]	9,10	9,03	9,11	9,06
Gorčina [IBU]	22,43	22,17	25,06	25,33

Iz rezultata prikazanih u obje tablice vidljivo je kako dodatak vodenog i etanolnog ekstrakta u sladovinu nije imao značajnijeg utjecaja na osnovne pokazatelje kakvoće piva.

Ovo je u skladu s istraživanjem koje su proveli Belščak-Cvitanović i suradnici (2017.) koji su istraživali kako dodatak mikroinkapsuliranih biološki aktivnih spojeva iz zelenog čaja i ljekovite gljive *Ganoderma lucidum*, ali i običnog etanolnog ekstrakta iste gljive, utječe na osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje kakvoće piva te zaključili kako se dobiveni rezultati ne razlikuju u odnosu na kontrolni uzorak - pivo bez ikakvih dodataka.

Nešto malo veće vrijednosti za boju piva s dodatkom vodenog ekstrakta (vrijednost boje raste u nizu $S20 > S10 > K$) je očekivana, s obzirom na tamnu boju vodenog ekstrakta koji je dodan u sladovinu. Etanolni ekstrakt dodan je u vrlo maloj količini te nije utjecao na promjenu boje sladovine.

4.3. UTJECAJ DODATKA EKSTRAKTA GLJIVE *T. versicolor* U SLADOVINU NA KONCENTRACIJU UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST PIVA

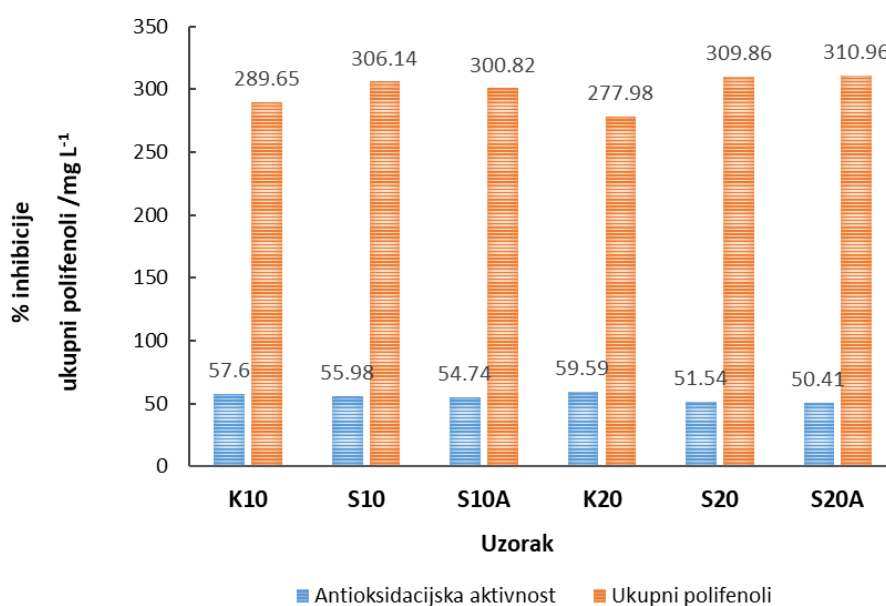
U uzorcima piva dobivenim nakon mikrofermentacije u tikvicama određena je koncentracija ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost. Rezultati su prikazani na **Slikama 10 i 11**.

Koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima piva kretala se u rasponu od 277,98 do 310,96 mg/L. Ove vrijednosti su u skladu s vrijednostima koje navode drugi autori i koje se, ovisno o vrsti piva, kreću od 120 do preko 500 mg/L (Tapasya i sur., 2015., Granato i sur., 2010.).

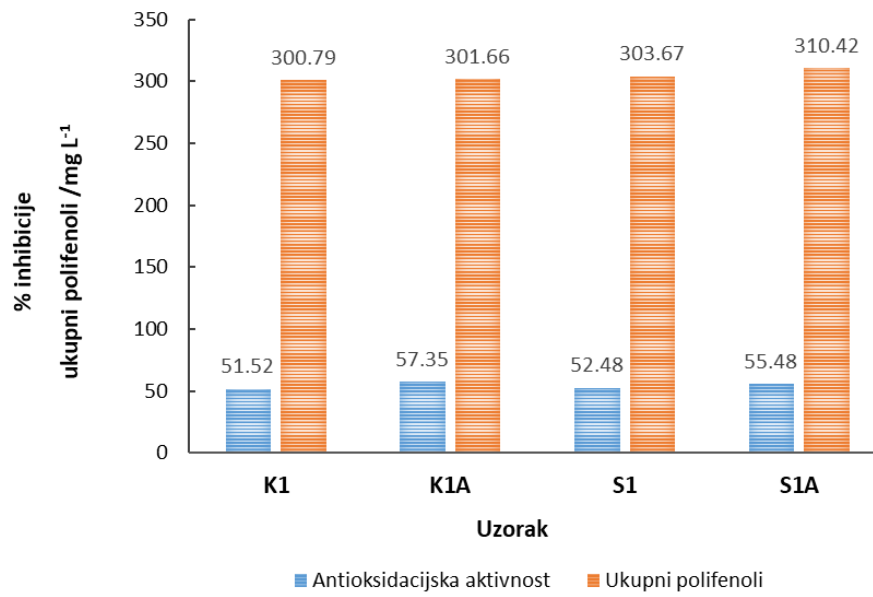
Svi uzorci s dodatkom ekstrakta gljive imali su nešto veću koncentraciju ukupnih polifenola u odnosu na pripadajuće kontrolne uzorke, pri čemu je razlika između uzoraka s dodatkom ekstrakta gljiva u odnosu na kontrole uzorke bila izraženija u slučaju uzoraka s dodatkom vodenog ekstrakta. Uzorak koji je imao najveću koncentracijom ukupnih polifenola koja je iznosila 310,96 mg/L je uzorak S20a s dodatkom 20 mL vodenog ekstrakta gljive. Uzorak s najmanjom koncentracijom ukupnih polifenola, koja je iznosila 277,98 mg/L je kontrolni uzorak K20. Ipak, dodatak ekstrakta gljive u sladovinu nije doveo do značajnog povećanja koncentracije ukupnih polifenola u pivu. Ovo je također u skladu s već spomenutim istraživanjem koje su proveli Belščak-Cvitanović i suradnici (2017.), koji navode kako dodatak ekstrakta gljive *G. lucidum* u pivo nije rezultirao značajnijim povećanjem koncentracije ukupnih polifenola u konačnom proizvodu.

Skupinama polifenola, flavonoidima i fenolnim kiselinama, pripisuje se antioksidacijski potencijal (Lee i sur., 2003.). S obzirom na navedeno, moglo se je očekivati da je antioksidacijska aktivnost uzoraka piva s dodatkom ekstrakta gljiva veća od kontrolnih uzoraka, zbog veće koncentracije ukupnih polifenola koja je određena u navedenim uzorcima. Ipak, kontrolni uzorci pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na S uzorke (**Slike 10 i 11**). Antioksidacijska aktivnost raste u nizu $K20 > K10 > K1 > S10 > S1 > S20$.

Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak K20 (59,59 % inhibicije DPPH), dok je najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak S20A (50,41 % inhibicije DPPH). Ovo su nešto manje vrijednosti od onih koje su dali Tapasya i sur. (2015) za 15 uzoraka piva koja su analizirali, pri čemu je najmanju antioksidacijski aktivnost pokazao uzorak koji je pokazao 71,11% inhibicije DPPH).



Slika 10 Utjecaj dodatka vodenog ekstrakta gljive *T. versicolor* u sladovinu (10 i 20 mL u 1750 mL sladovine) na koncentraciju ukupnih polifenola i antioksidacijsku aktivnost piva.



Slika 11 Utjecaj dodatka etanolnog ekstrakta gljive *T. versicolor* u sladovinu (1 mL u 750 mL sladovine) na koncentraciju ukupnih polifenola i antioksidacijsku aktivnost piva.

5. ZAKLJUČCI

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

Nakon provedenih mikrofermentacija sladovine s dodatkom ekstrakta ljekovite gljive *T. versicolor* može se zaključiti kako dodatak vodenog i etanolnog ekstrakta u sladovinu prije fermentacije nije značajno utjecao na tijek fermentacije, odnosno fermentacijsku aktivnost kvasca.

Ukupna masa CO₂ oslobođena na kraju fermentacije u uzorcima s dodatkom 10 i 20 mL ekstrakta gljive iznosila je 38,74 g, odnosno 39,70 g, dok je u kontrolnim uzorcima iznosila 38,01 g, što upućuje na zaključak kako je dodatak vodenog ekstrakta u sladovinu doveo do malog povećanja fermentacijske aktivnosti odabranog kvasca. Ukupna masa CO₂ oslobođena na kraju fermentacije u uzorcima s dodatkom etanolnog ekstrakta iznosila je 41,65 g za kontrolni uzorak i 40,45 g za uzorak s dodatkom etanolnog ekstrakta

Dodatak vodenog i etanolnog ekstrakta *T. versicolor* u sladovinu nije imao značajnijeg utjecaja na osnovne pokazatelje kakvoće piva.

Koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima piva kretala se u rasponu od 277,98 do 310,96 mg/L, pri čemu su svi uzorci s dodatkom ekstrakta gljive imali su nešto veću koncentraciju ukupnih polifenola u odnosu na pripadajuće kontrolne uzorke. Dodatak ekstrakta gljive u sladovinu nije doveo do značajnog povećanja koncentracije ukupnih polifenola u pivu.

Iako je za očekivati da je antioksidacijska aktivnost uzoraka piva s dodatkom ekstrakta gljiva veća od kontrolnih uzoraka (veće koncentracije ukupnih polifenola), antioksidacijska aktivnost raste u nizu K20 > K10 > K1 > S10 > S1 > S20. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je kontrolni uzorak K20 (59,59 % inhibicije DPPH), dok je najmanju antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak s dodatkom 20 mL vodenog ekstrakta S20a (50,41 % inhibicije DPPH).

6. LITERATURA

- Bamforth CW: Nutrition aspects of beer. *Nutrition Research*, 22:227-237, 2002.
- Bamforth CW: Food, Fermentation and Micro-organisms. *Blackwell Science Ltd*, Iowa, 2005.
- Bamforth CW: Beer Is Proof God Loves Us: Reaching for the Soul of Beer and Brewing. *Pearson Education*, New Jersey, 2011.
- Bamforth CW: Progress in Brewing Science and Beer Production. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 8: 161-176, 2017.
- Belščak-Cvitanović A, Nedović V, Salević A, Despotović S, Komes D, Nikšić M, Bugarski B, Leskošek Ćukalovič I: Modification of functional quality of beer by using microencapsulated green tea (*Camellia sinensis L.*) and gaoderma mushroom (*Gaoderma lucidum L.*) bioactive compounds. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 23(4):457-471, 2017.
- Calagione S: Extreme Brewing: An Introduction to Brewing Craft Beer at Home. *Quarry Books*, Massachusetts, 2006.
- Chang ST i Miles PG: Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. *CRC Press*, New York, 2004.
- Cheung PC: Mushrooms as functional foods. *John Wiley and Stones*, 2008.
- Collin S, Jerkovic V, Bröhan M, Callemien D: Polyphenols and Beer Quality. U: Ramawat K, Merillom JM,(eds) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013.
- Cruz A, Pimentel L, Rodriguez-Alcala LM, Fernandes T i Pintado M: Health Benefits of Edible Mushrooms Focused on *Coriolus versicolor*: A Review. *Journal of Food and Nutrition Research*, 4(12): 773-781, 2016.
- El Enshasy HA, Hatti-Kaul R: Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trend sin Biotechnology*, 31:668-677, 2013.
- Erjavec J, Kos J, Ravnikar M, Dreo T, Sabotič J: Review- Proteins of higher fungi- from forest to application. *Trend sin Biotechnology*, 30:259-273. 2012.

- Gargano ML, van Griensven L, Omoanghe SI, Lindequist U, Venturella G, Wasser SP i Zervakis GI: Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Official Journal of the Societa Botanica Italiana*, 3(151): 548-565, 2017.
- Gil-Ramirez A, Pavao-Caballero C, Baeza E, Baenas N, Garcia-Viguera C, Marin FR, Soler-Rivas C: Mushrooms do not contain flavonoids. *Journal of Functional Foods*, 25:1-13, 2016.
- Granato D, Favalli Branco G, Fonseca Faria J, Gomes Cruz A (2011.) Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color , phenolic compounds , and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 563–571
- Hardy G: Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. *Nutrition*, 16:688-697, 2000.
- Hobbs CR: Medicinal Value of Turkey Tail Fungus *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilat (Aphyllophoromycetidae).A literature Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6: 195-218, 2004.
- Hughes G: Home Brew Beer. *Dorling Kindersley Limited*, London, 2013.
- Kunze W: Technology Brewing and Malting. *Deutsche Bibliothek*, Berlin, 2010.
- Lee K, Kim Y, Kim D, Lee H, Lee C: Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 6516-6520, 2003.
- Lo HC, Wasser SP: Medicinal mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus: History, current status, future perspective, and unsolved problems (review). *International journal of medicinal mushrooms*, 13(5), 2011.
- Marić V: Tehnologija piva. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2009.
- Marić V, Nadvornik Z: Pivo – tekuća hrana, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Znanstveno-stručna biblioteka, Zagreb, 1995.
- Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission. (1993) Brautechnische Analysenmethoden, Bd. II, Freising-Weihenstephan: MEBAK e. 3.

MPRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH: Pravilnik o pivu. Narodne novine 142/11 i 141/13, 2008.

Petravić-Tominac V, Zechner-Krpan V, Grba S, Srećec S, Panjkota-Krbavčić I, Vidović L: Biological effects of yeast β -glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 75:149-158, 2010.

Petravić-Tominac V, Mesihović A, Mujadžić S, Lisičar J, Oros D, Velić D, Velić N, Srećec S: Production of Blackberry Wine by Microfermentation using Commercial Yeasts Fermol Rouge® and Fermol Mediterranee®. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 78(1):49-55, 2013.

Tapasya VP, Siddhi YS, Arindam AG, Palak AC, Arpita MG, Neetin SD: Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3):1414-1423, 2015.

Velić N: Veličanstveno pivo. *Reaktor ideja*, 3(7):13-15, 2019.

Velvedere ME, Hernandez-Perez T, Paredes-Lopez O: Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 2015.

Širić I, Han L: Ljekovita svojstva gljiva. Pregledni znanstveni rad, *Glasnik zaštite bilja*, 6/2018

Web 1: <https://i.pinimg.com/564x/6f/26/6a/6f266ab6636d56adddd8b2ea2f88901c.jpg>;