

Određivanje udjela ukupnih polifenola i flavonoida te antioksidacijske aktivnosti komercijalno dostupnih piva hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara

Pastuović, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:109:637476>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Josipa Pastuović

**ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA I FLAVONOIDA TE
ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI KOMERCIJALNO DOSTUPNIH PIVA
HRVATSKIH INDUSTRIJSKIH I ZANATSKIH PIVOVARA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za bioprocesno inženjerstvo

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Nastavni predmet: Osnove bioprocesnog inženjerstva

Tema rada je prihvaćena na I. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018. održanoj 31. listopada 2017.

Mentor: izv. prof. dr. sc. *Natalija Velić*

Komentor: izv. prof. dr. sc. *Dajana Gašo-Sokač*

Određivanje udjela ukupnih polifenola i flavonoida te antioksidacijske aktivnosti komercijalno dostupnih piva hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara

Josipa Pastuović, 319/DI

Sažetak: Pivo je jedno od najčešće konzumiranih alkoholnih pića, koje ima i nutritivnu vrijednost zbog svog sastava koji uključuje minerale, organske kiseline, vitamine, proteine te različite skupine polifenola. Polifenoli u pivu najvećim dijelom potječu od slada i hmelja. Polifenolnim spojevima, posebice flavonoidima, pripisuje se snažan antioksidacijski učinak te blagotvoran utjecaj na zdravlja čovjeka. Osim antioksidacijskog učinka, polifenoli imaju važnu ulogu u formiranju okusa, boje i gorčine piva, ali imaju i negativan utjecaj na stabilnost piva. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti udjele ukupnih polifenola i flavonoida te antioksidacijske aktivnosti 30 uzoraka hrvatskih komercijalno dostupnih industrijskih (15 uzoraka) i zanatskih (15 uzoraka) piva. Koncentracije ukupnih polifenola kretale su se u rasponu od 76,57 mg/L do 382,31 mg/L, dok su se koncentracije ukupnih flavonoida kretale u rasponu od 33,69 mg_{CTE}/L do 180,36 mg_{CTE}/L. Veće koncentracije ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida zabilježene su u pivima zanatskih pivovara. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti pokazali su da su uzorci piva uspjeli inhibirati 57,82 do 79,86 % DPPH. Usporedbom svih svijetlih i tamnih piva vidljivo je kako su koncentracije ukupnih polifenola i flavonoida te antioksidacijska aktivnost veći u uzorcima tamnih piva.

Ključne riječi: pivo, polifenoli, flavonoidi, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 38 stranica
7 slika
7 tablica
0 priloga
38 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

- | | | |
|----|---|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. <i>Vinko Krstanović</i> | Predsjednik |
| 2. | izv. prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | Član-mentor |
| 3. | izv. prof. dr. sc. <i>Dajana Gašo-Sokač</i> | Član-komentor |
| 4. | prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek</i> | Zamjena člana |

Datum obrane: 30. rujna 2020.

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 of Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

Course title: Basic of Bioprocess Engineering

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. I. held on October 31, 2017.

Mentor: *Natalija Velić, PhD*, Associate professor

Technical assistance: *Dajana Gašo-Sokač, PhD*, Associate professor

Determination of Total Polyphenolic Content, Total Flavonoids Content and Antioxidant Activity of Commercially Available Beers Produced by Croatian Industrial and Craft Breweries

Josipa Pastuović, 319/DI

Summary: Beer as one of the most commonly consumed alcoholic beverages, which also has nutritional value due to its composition which includes minerals, organic acids, vitamins, proteins and various groups of polyphenols. The polyphenols in beer come mostly from malt and hops. Polyphenolic compounds, especially flavonoids, are attributed a strong antioxidant effect and a beneficial effect on human health. In addition to antioxidant effect, polyphenols play an important role in the formation of taste, color and bitterness of beer, but they also have a negative impact on the stability of beer. The aim of this study is to determine the total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity of 30 samples of Croatian commercially available industrial (15 samples) and craft (15 samples) beers. Concentrations of total polyphenols ranged from 76,57 mg/L to 382,31 mg/L, while concentrations of total flavonoid ranged from 33,69 mg_{CTE}/L to 180,36 mg_{CTE}/L. Higher concentrations of total polyphenols and total flavonoids were recorded in craft breweries. The results of the determination of antioxidant activity showed that the beer samples were able to inhibit 57,82 to 79,86 % of DPPH. A comparison of all light and dark beers shows that the concentrations of total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity are higher in dark beers samples.

Key words: Beer, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity

Thesis contains: 38 pages
7 figures
7 tables
0 supplements
38 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | | |
|----|---|--------------|
| 1. | <i>Vinko Krstanović</i> , PhD, Full prof. | chair person |
| 2. | <i>Natalija Velić</i> , PhD, Associate prof. | supervisor |
| 3. | <i>Dajana Gašo-Sokač</i> , PhD, Associate prof. | member |
| 4. | <i>Lidija Jakobek</i> , PhD, Full prof. | stand-in |

Defense date: September 30, 2020

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	2
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. DEFINICIJA I VRSTE PIVA	4
2.2. TEHNOLOGIJA PIVA	5
2.2.1. <i>Zanatsko pivo</i>	8
2.3. KEMIJSKI SASTAV PIVA	9
2.3.1. <i>Polifenolni spojevi u pivu</i>	11
2.4. PREHRAMBENA VRIJEDNOST I ZDRAVSTVENI UČINCI PIVA	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. ZADATAK	19
3.2. UZORCI PIVA	19
3.3. KEMIKALIJE	21
3.4. APARATURA	21
3.5. METODE	22
3.5.1. <i>Određivanje udjela (koncentracije) ukupnih polifenola u pivu EBC metodom (EBC 9.11.)</i>	22
3.5.2. <i>Određivanje udjela (koncentracije) ukupnih flavonoida</i>	23
3.5.3. <i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom</i>	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
5. ZAKLJUČCI	32
6. LITERATURA	34

1. UVOD

Smatra se kako je proizvodnja piva jedan od najstarijih fermentacijskih procesa u povijesti, pri čemu mnoge zemlje imaju svoje specifičnosti kada je riječ o proizvodnji ovog omiljenog pića. Pivo je jedno od najčešće konzumiranih alkoholnih pića na svijetu i treće najpopularnije piće poslije vode i čaja (Arnold, 2005; Nelson, 2005). Proizvodi se alkoholnim vrenjem pivske sladovine pomoću kvasaca, a sam proces proizvodnje može se podijeliti na dvije cjeline - tehnologiju slada i tehnologiju piva. U posljednje vrijeme sve je veći interes i potražnja za pivima proizvedenim u zanatskim pivovarama (tzv. zanatska ili *craft* piva), koja se najčešće odlikuju tradicionalnom proizvodnjom, ali i inovativnim sastojcima kako bi se postigla jedinstvenost okusa piva.

Pivo ima veću nutritivnu vrijednost od ostalih alkoholnih pića zbog svog kemijskog sastava koji uključuje prisutnost minerala, organskih kiselina, vitamina i bjelančevina (Mitić i sur., 2014; Bamforth, 2002). Volumni udjel alkohola (etanola) u pivu ovisi o vrsti piva, ali je taj udjel relativno mali u odnosu na neka druga alkoholna pića te ima izravan utjecaj na okus piva. Uz ugljikov(IV) oksid, koji pivu daje svježinu, alkohol ima značajnu ulogu u utvrđivanju kvalitete piva. Osim navedenog pivo je vrijedan izvora polifenolnih spojeva. Njihova prisutnost pridonosi aromi, boji i senzorskim svojstvima piva (Collin i Callemien, 2010). Tako se mnoga istraživanja provode kako bi se utvrdio utjecaj količine i vrste polifenola na gorčinu i trpkost piva. Tri su grupe polifenola posebno odgovorne za okus i stabilnost piva, a to su fenolne kiseline, flavonoli i flavan-3-oli. Na koloidnu nestabilnost piva, a vezano uz to i na skraćivanje roka trajanja poseban utjecaj imaju flavonoli i flavononi (Jurić i sur., 2015). Na njihov sadržaj kao i na sadržaj mnogih drugih polifenola piva značajno utječe vrsta i kvaliteta ulaznih sirovina i tehnološki postupak proizvodnje (Aron i Shellhammer, 2010). Kako navode Piazzon i sur. (2010) najkritičnije faze za promjenu sadržaja polifenola tijekom proizvodnje piva su filtracija, bistrenje, vrenje, fermentacija i sazrijevanje.

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji zbog svog antibakterijskog, sedativnog, antialergijskog, mutagenog, antiviralnog djelovanja imaju pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka (Kazazić, 2004). Koncentracija flavonoida značajno utječe na antioksidacijski potencijal piva (Granato, 2010).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Definicija i vrste piva

Materijalni dokazi s opisima proizvodnje piva mogu se pratiti i do 5000 godina unazad. Pivo je diljem svijeta pronašlo svoje poklonike, kojima pruža užitak, ali može i blagotvorno djelovati na njihovo zdravlje. Brojna su istraživanja pokazala kako umjerena potrošnja piva ima pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi (Kunze, 2010).

Pivo je prema Pravilniku o pivu (NN 142/2011) definirano kao proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanom vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura. Osnovne sirovine koje se tradicionalno koriste u proizvodnji piva i koje doprinose kvaliteti konačnog proizvoda su voda, ječmeni slad, hmelj i kvasac. Prema gore navedenom pravilniku u proizvodnji piva mogu se koristiti i druge sirovine poput neslađenih žitarica i proizvoda od žitarica; voćnih pulpa, voćnih kaša, vodenih ekstrakata voća, šećernih i škrobnih sirupa, ali i aroma, bilja, biljnih ekstrakata i svih drugih tvari koje mogu imati određene hranjive ili fiziološke učinke osim vitamina i minerala.

Već i pažljivo kombiniranje četiri osnovne tradicionalne pivarske sirovine osigurava proizvodnju velikog broja različitih vrsta piva, odnosno pivskih stilova. Ipak, osnovna podjela je prema vrsti glavnog vrenja i uporabljenom kvascu pa tako razlikujemo:

- piva gornjeg vrenja (*Saccharomyces cerevisiae*),
- piva donjeg vrenja (*Saccharomyces pastorianus*),
- afričko pivo (*Schizosaccharomyces pombe*),
- spontano prevrelo pivo (divlji sojevi kvasaca) (Marić, 2009).

Piva gornjeg vrenja nazivaju se još i „ale“ piva. Za njihovu proizvodnju koristi se čista kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Vrenje započinje pri temperaturi od 10 °C, a kada kvasac ispliva na površinu mladog piva pri temperaturi od 25 °C vrenje je završeno. Nakon što se odvoji kvasac pivo odležava i dozrijeva pri 20 °C. Budući da fermentacija „ale“ piva ne završava potpunom pretvorbom šećera u alkohol ovakva piva su nešto slađa i malo gušća od lagera i nisu toliko suha (Marić, 2009). Uz to, tijekom ovakva fermentacija nastaje i veliki broj drugih spojeva, koje pivu daju kompleksniju aromu. Volumni udjel alkohola u pivima gornjeg

vrenja najčešće se kreće od 3 do 7,5 % i češće je u donjoj polovici tog raspona (Bamforth, 2004).

Piva donjeg vrenja nazivaju se još i „lager“ pivima. Za njihovu proizvodnju koriste se različiti sojevi čiste kulture kvasca *Saccharomyces pastorianus*. Fermentacija se odvija sporo i pri nižoj temperaturi. Pri temperaturi od 6 do 9 °C započinje vrenje, a završava na 9 do 18 °C i to je razlog zašto se ovo vrenje naziva „hladnim vrenjem“. Kvasac se taloži na dnu posude, a mlado pivo odležava u ležnim tankovima jedan do tri ili više tjedana na temperaturi od 0 do 1 °C. Ovakav način fermentacije daje pivo bez ostataka šećera, što znači da je ono suho, čiste arome. Velika većina današnjih piva su upravo *lager* piva različitih podvrsta. Ova piva imaju volumni udjel alkohola od 4,8 do 5,1% i blijedo zlatnu boju (Marić, 2009).

Afričko pivo posebno je po tome što se ne proizvodi od ječmenog nego od prosenog slada i za njegovu proizvodnju koristi posebna vrsta kvasca, *Schizosaccharomyces pombe*, prilagođena ekstremnim klimatskim uvjetima (30 - 40 °C).

Spontano prevrela piva su proizvod divljih sojeva kvasaca koji dospijevaju u sladovinu iz zraka ili sa zidova prostorija i posuda.

Ostale podjele piva uključuju podjelu prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine (ječmeni, pšenični ili raženi slad), prema boji, prema volumnom udjelu alkohola, prema masenom udjelu ekstrakta (suhe tvari) u sladovini.

2.2. Tehnologija piva

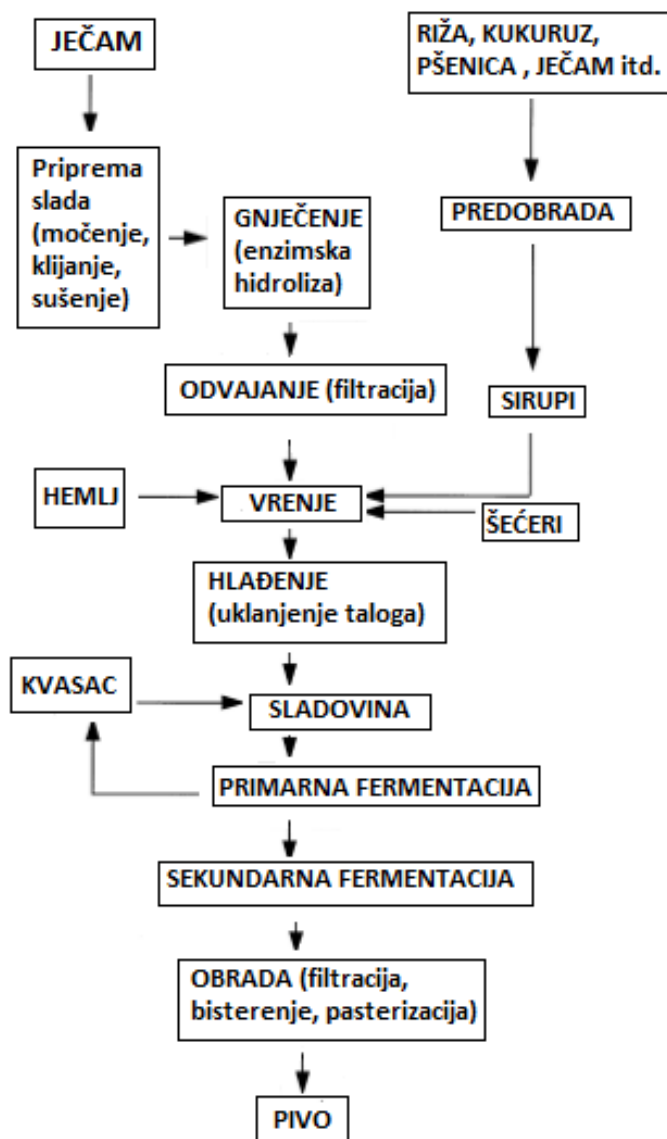
Tehnologija proizvodnje piva se može podijeliti na dva nezavisna dijela koja uključuju tehnologiju slada i tehnologiju piva. U užem smislu, tehnologija piva obuhvaća proizvodnju sladovine, glavno i naknadno vrenje mladog piva te doradu i punjenje piva u ambalažu (Marić i sur., 1995). Proizvodnji sladovine prethodi proizvodnja slada, a osnovna sirovina za njegovu proizvodnju je ječam. Osim ječma, kao tradicionalne i najčešće korištene sirovine, sladiti se može i pšenica i raž, kao i neke pseudo-žitarice. Ječam se čisti, sortira, važe, skladišti i transportira u sladaru. Tehnološki postupak proizvodnje slada u sladari započinje močenjem ječma do vlažnosti 45%, zatim slijedi klijanje te na kraju sušenje odnosno prženje kojim se zaustavlja proces klijanja čime se sadržaj vlage smanjuje na manje od 5%. U proizvodnji sladovine zatim slijedi drobljenje i mljevenje slada koje je nužno kako bi se

osiguralo optimalno djelovanje enzima. Drobljenjem slada dobije se sladna prekrupa. Ona se miješa (ukomljava) s toplom vodom u komovnjaku, a neslađene žitarice (ukoliko se koriste) u kotlu komine. Kotao komine služi za kuhanje komine neslađenih žitarica ili dijelova sladne komine radi prevođenja škroba u škrobni lijepak koji je vodotopljiv oblik podložan amilolitičkoj razgradnji (Marić, 2009). Ovaj proces odvija se na temperaturi od 65 °C jer na toj temperaturi granule škroba u procesu želatinizacije prelaze u topljivi oblik koji je podložan razgradnji uz pomoć amilaza. Ovi enzimi nastaju u procesu proizvodnje slada, ali njihovo djelovanje započinje tek kada se odvije proces želatinizacije škroba u kotlu komine. (Bamforth, 2004). Zatim slijedi filtracija i odvajanje topljivog od netopljivog dijela. Filtracija se odvija na temperaturi 75 – 80 °C, a traje otprilike 2 sata. Profiltrirana sladovina dodaje se u kotao za kuhanje te se dodaje hmelj. Za vrijeme kuhanja gorke, aromatske i taninske tvari hmelja otpuštaju se u otopinu i daju sladovini svojstven gorak okus i traženu aromu, a u isto vrijeme ju i konzerviraju (Šakić, 2005; Kunze, 2010).

Po završetku kuhanja u dekanteru se odvajaju istaloženi proteini. Ohmeljena sladovina se hladi na temperaturu bioprocesa, što ovisi o vrsti kvasca koji se koristi te se vrši aeracija prije naciepljivanja kvascem, a zatim se prebacuje u fermentacijski tank. Koriste se odabrani sojevi pivskog kvasca koji pokazuju sposobnost brzog previranja aerirane sladovine do etanola i poželjne koncentracije nusproizvoda vrenja (ketoni, aldehidi, kiseline, viši alkoholi) tijekom vrenja i doviranja, uspješno reduciraju diacetili, dobro flokuliraju i talože se te ostaju stabilni tijekom višekratne upotrebe kako bi pivu dali uvijek isti okus i miris (Marić, 2009).

Najvažnija faza u proizvodnji piva je već spomenuto vrenje i o njemu ovisi kvaliteta gotovog proizvoda. Za vrijeme glavnog vrenja dolazi do fermentacije šećera u alkohol i ugljikov(IV) oksid djelovanjem enzima iz kvasca uz oslobađanje topline. Dobije se mlado pivo koje se mora ohladiti, kako bi se prekinula alkoholna fermentacija. Zatim slijedi naknadno vrenje u kojemu se odvija potpuno previranje preostalih fermentabilnih šećera, dolazi do formiranja arome i okusa. Proces se odvija polako uz povišen tlak CO₂ i traje nekoliko dana do nekoliko tjedana. Proces je spor zbog niske temperature. Pri ovim uvjetima više proteina se izdvoji iz otopine čime pivo ima manje izgleda ostati zamućeno u pakiranju ili u čaši. Dugotrajna stabilnost piva može se postići upotrebom tvari, kao što je polivinilpirolidon, koje uklanjaju proteine ili polifenole koji uzrokuju koloidnu nestabilnost piva. Proteini se mogu ukloniti na

tri načina: adsorpcijom na silikagel, taloženjem s taninskom kiselinom ili hidrolizom s enzimom papainom (Bamforth, 2004). Nakon filtracije i bistrenja piva te postizanja biološke stabilnosti odnosno nakon provedenog procesa pasterizacije slijedi punjenje piva u odgovarajuću ambalažu.



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz proizvodnje piva (Linko i sur., 1998.)

2.2.1. Zanatsko pivo

Opisana tehnologija proizvodnje piva odnosi se u najvećoj mjeri na industrijsku proizvodnju, odnosno proizvodnju piva u industrijskim pivovarama. Posljednjih desetljeća sve veći dio tržišta zauzimaju piva proizvedena u zanatskim (*craft*) pivovarama.

Prema Brewers Association (2016) zanatske pivovare su definirane kao pivovare manjeg kapaciteta od industrijskih, neovisne (nisu dio velikih pivarskih korporacija) i tradicionalne u proizvodnom pristupu. Zanatske pivovare u SAD-u godišnje proizvedu približno 6 milijuna barela piva, što čini samo 3% ukupne proizvodnje piva u SAD-u. Manje od 25% tih pivovara u vlasništvu su ili pod kontrolom velikih pivarskih korporacija (<http://www.brewersassociation.org>, 2017).

Obilježja zanatskih piva i zanatskih pivovara mogu se sažeti kako slijedi:

- zanatske pivovare su pivovare malih kapaciteta,
- osnovno obilježje zanatskog piva i pivovara je inovacija. Pivari tumače povijesne stilove na svoj jedinstven način, ali isto tako razvijaju potpuno nove koji nemaju svoje prethodnike,
- u proizvodnji zanatskih piva obično se koriste tradicionalne pivarske sirovine, kao što je ječmeni slad, ali se često dodaju zanimljivi i ponekad netradicionalni sastojci kako bi se postigla jedinstvenost proizvedenog piva
- zanatske pivovare često aktivno sudjeluju u životu društvene zajednice kojoj pripadaju, kroz donacije proizvoda, volonterstvo, sponzoriranje raznih događanja,
- pivari imaju prepoznatljiv, individualistički pristup kako bi se što bolje povezali sa svojim kupcima (<https://www.brewersassociation.org/>, 2017).

Za razliku od velikih industrijskih pivovara koje većinom proizvode „lager“ piva, najveći dio zanatskih pivara proizvodi različita „ale“ piva specifičnih okusa i aroma, kao i druge pivske stilove. Upravo su specifični okusi i arome ono što potrošači preferiraju, a to dokazuje istraživanje koje su napravili Aquilani i suradnici (2014) u kojemu su utvrdili da je zanatsko pivo preferirano upravo zbog različitosti u okusima, a što u konačnici povećava vjerojatnost da će zanatsko pivo biti prepoznato kao pivo bolje kvalitete u odnosu na široko dostupna

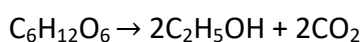
industrijska piva. Ovo istraživanje napravljeno je na skupini talijanskih potrošača koji imaju naviku konzumiranja piva u pubovima i u krugu svojih obitelji. Stalno rastući postotak tržišnog udjela i prodaje daje snažan dojam da proizvodnja zanatskog piva oživljava cijelo tržište piva (Murray i O'Neill, 2011). Tako se revolucija proizvodnje zanatskog piva iz SAD-a proširila i na druge zemlje i na Europu, a proizvodnja i potražnja za zanatskim pivom bilježi snažan rast i u Hrvatskoj. Zanatsko pivo trenutno je jedan od najbrže rastućih sektora u proizvodnji pića u Hrvatskoj, gdje trenutno postoji tridesetak aktivnih zanatskih pivovara (<https://www.hgk.hr/>, 2017).

Zanatska piva često se odlikuju nešto većim udjelom ekstrakta od industrijskih piva, a zbog činjenice da mnoge zanatske pivovare ne filtriraju i ne pasteriziraju pivo u boci se nakon punjena još odvija naknadno vrenje koje traje do otvaranja piva. Izostanak filtracije i pasterizacije piva dovodi do većeg zadržavanja biološki aktivnih tvari (poput polifenola), koji su inače osjetljivi na povišenu temperaturu i skloni oksidaciji (Collin i sur., 2013).

2.3. Kemijski sastav piva

Kao i kod mnogih drugih alkoholnih pića, ključni sastojak piva je etanol, a njegov udio ovisi o stupnju prevrenja i koncentraciji suhe tvari u sladovini. Etanol izravno doprinosi okusu piva. Osim na okus, etanol ima utjecaj i na stvaranje pjene. Smanjuje površinsku napetost i time potiče stvaranje mjehurića. U odnosu na druga alkohola pića pivo sadrži relativno mali volumni postotak etanola (Bamforth, 2000).

Ugljikov(IV) oksid nastaje uz etanol tijekom fermentacije glukoze uz pomoć pivskog kvasca prema bruto jednadžbi:



Pivu daje svježinu i pruža ugodan osjećaj „boli“ (trpkost) kroz interakciju s trigeminalnim živcima. Poput etanola ima značajnu ulogu u utvrđivanju kvalitete pića i utječe na pjenušavost (određuje stupanj pjenjenja). Većina konzervi ili boca piva sadrži između 2,2 i 2,8 cm³ CO₂ otopljenog u 1 cm³ piva (Bamforth, 2000).

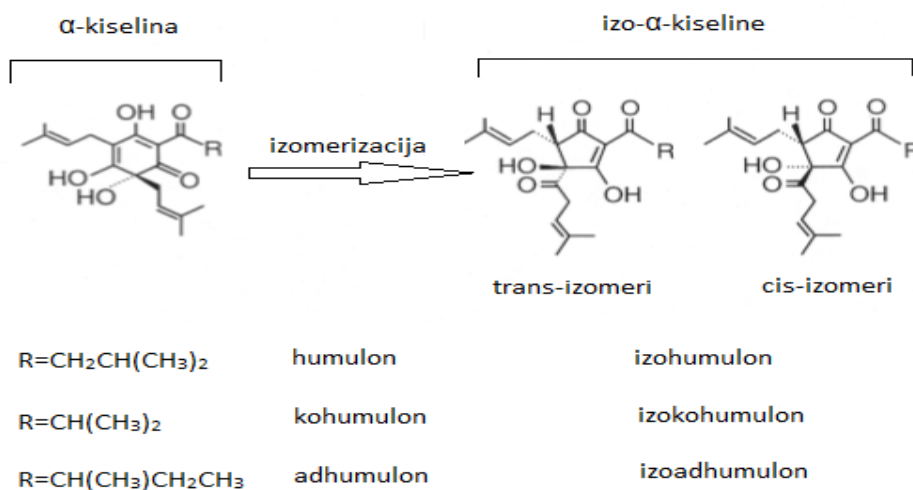
Još dva plina iz zraka se mogu naći u pivu. Jedan od njih je kisik, koji u pivo može doći pri prijenosu piva iz jednog spremnika u drugi ili u procesu pakiranja, osim ako se ne poduzmu

mjere opreza. Prisutnost kisika jako je štetna za kvalitetu piva, jer on izazva oksidaciju određenih sastojaka, što dovodi do zamućenja. Najlakše oksidirajući sastojci piva su polifenoli, stoga se koncentracija polifenola kontrolira i po potrebi smanjuje, primjerice adsorpcijom na polivinilpirolidinu nakon filtracije. Suvremene tehnike pakiranja olakšavaju održavanje koncentracije kisika manje od 0,1 mg/L u svježem pivu (Bamforth, 2000).

Osim kisika u pivu može biti prisutan i dušik. On se dodaje za postizanje stabilnosti pjene. Pjena koju proizvodi N₂ ima puno manje mjehuriće od one koju proizvodi CO₂ te je zbog toga takva pjena stabilnija (Bamforth, 2000).

Većina šećera prisutnih u sladovini kvasci fermentiraju do etanola, ali neki zaostaju u pivu. Osim toga, šećeri se mogu dodati za zaslađivanje konačnog produkta. Šećeri u pivu su nefermentirani dekstrini i neki polisaharidni materijali. Dekstrini su ostaci razgradnje škroba, dok polisaharidi vuku porijeklo iz stanične stjenke ječma (Bamforth, 2000). Većina škroba je relativno otporna na enzimsku hidrolizu pa „preživljava“ proces proizvodnje slada. Međutim, ako je škrob želatiniziran toplinskom obradom onda njegove sastavnice, amiloza i amilopektin, postaju lako dostupne amilolitičkim enzimima za razgradnju. Zato početak proizvodnje piva obično uključuje želatinizaciju škroba na temperaturi od 65 °C. Prema Kunze (2010) udio ugljikohidrata u pivu iznosi 27-30 g/L. Oni zajedno s manjom količinom proteina, aminokiselina, glicerina te spojeva ekstrahiranih iz hmelja čine ekstrakt piva o čijem sastavu ovisi punoća okusa piva. U pivu nema masti i kolesterola, jer jako malo lipida prelazi iz ječma u pivo.

Hmelj je izvor gorčine (iz smola) i arome (iz esencijalnih ulja) piva. Kemijski sastav njegovih smola je kompleksan no najvažnije su α -kiseline koje čine 5 do 12% suhe tvari hmelja, ovisno i o vrsti i o podrijetlu. Što je njihov sadržaj veći to je veća potencijalna gorčina. U hmelju se mogu pronaći tri različite α -kiseline koje se razlikuju po strukturi bočnih lanaca. Pri kuhanju piva α -kiseline se izomeriziraju u izo- α -kiseline koje su lakše topljive i gorče su od α -kiselina (slika 2.).



Slika 2. Izomerizacija α -kiselina u hmelju (Bamforth, 2000).

Glicerol je u pivu prisutan u koncentracijama od 1400 mg/L do 1600 mg/L i odgovoran je za punoću okusa, slatkoću i viskozitet piva.

Vlakna su prisutna u koncentracijama od 1520 mg/L do 1530 mg/L, a imaju pozitivan utjecaj na probavu i apsorpciju hrane te snižavaju razinu kolesterola u krvi (Jurková i sur., 2012).

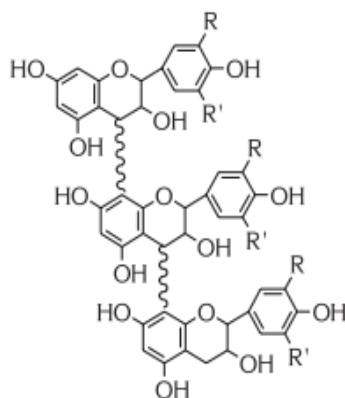
Pivo je bogat izvor vitamina B skupine kao što su riboflavin (B2), niacin, piridoksin (B6), folati (B9), kobalamin (B12) te folna kiselina (B9).

Osim vitaminima bogato je i mineralima kao što su magnezij, kalij, silicij, fosfor, a siromašno je kalcijem, natrijem i nitratima.

2.3.1. Polifenolni spojevi u pivu

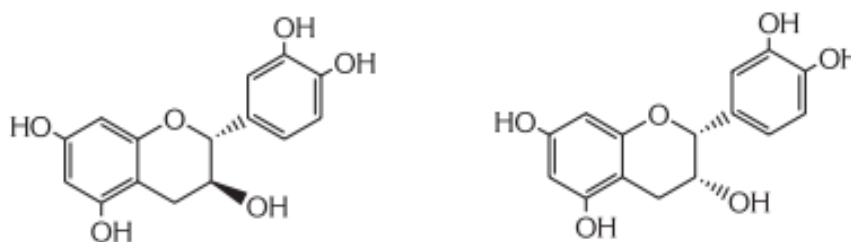
Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji su široko rasprostranjeni i predstavljaju važnu grupu prirodnih antioksidansa. Pivo sadrži čitav niz polifenolnih spojeva koji su važni za njegovu kemijsku stabilnost i trajnost, a to su prenilirani flavonoidi, fenolne kiseline, flavonoli, hidroksikumarini, flavoni, proantocijanidini, tanini i amino fenolni spojevi (Zhao, 2009; Pai i sur., 2015). Fenolni spojevi kao prirodni oksidansi dolaze iz sirovina, hmelja i slada tijekom postupka proizvodnje. Jurková i suradnici (2012) navode da oko 70-80% polifenola u pivu potječe od slada, a oko 30% od hmelja. Osim što imaju velik antioksidacijski potencijal, polifenolni spojevi igraju važnu ulogu u formiranju okusa, arome (gorčina, trpkost, oštrina) i

boje piva, a isto tako značajan je i njihov utjecaj na koloidnu nestabilnost piva. Kompleksiranjem polifenola i proteina nastaje koloidna suspenzija (sumaglica) odgovorna za vidljivo zamućenje piva. Iako je u pivu utvrđeno približno 80 poznatih fenolnih spojeva, nemaju svi utjecaj na koloidnu nestabilnost. Najznačajniju ulogu u stvaranju koloidne nestabilnosti imaju proantocijanidini (slika 3.) jer posjeduju dva ili više mjesta vezanja unutar iste molekule što im omogućuje umrežavanje proteina (Aron i Shellhammer, 2010). Stabilizacija piva može se postići upotrebom ranije spomenutog polivinilpirolidina koji će stvoriti netopljive komplekse s polifenolima posebice proantocijanidinima.



Slika 3. Proantocijanidini (kondenzirani tanini) (Kazazić, 2004).

Za nestabilnost boje piva smatra se da su odgovorni flavonoidi, odnosno njihova oksidacija. Boja piva se narušava dugim skladištenjem, posebno u prisutnosti kisika i na visokim temperaturama. Dolazi do Maillardovih reakcija i nastajanja melanoidinskih spojeva (Calleminen i Collin, 2009). Isto tako, tijekom sazrijevanja i skladištenja piva dolazi do promjena u okusu, jer se odležavanjem gube gorčina i trpkost, a do izražaja dolazi slatkast karamelni okus. Ovo se događa kao posljedica oksidacije *trans*-masnih kiselina i karboksilnih spojeva koji nastaju, a koji se u pivu nalaze u malim koncentracijama. Osim ranije spomenutih kiselina, za trpkost i gorčinu piva odgovorni su i monomeri flavan-3-ola poput (+)-katehina i (-)-epikatehina (slika 4.) (Aron i Shellhammer, 2010).



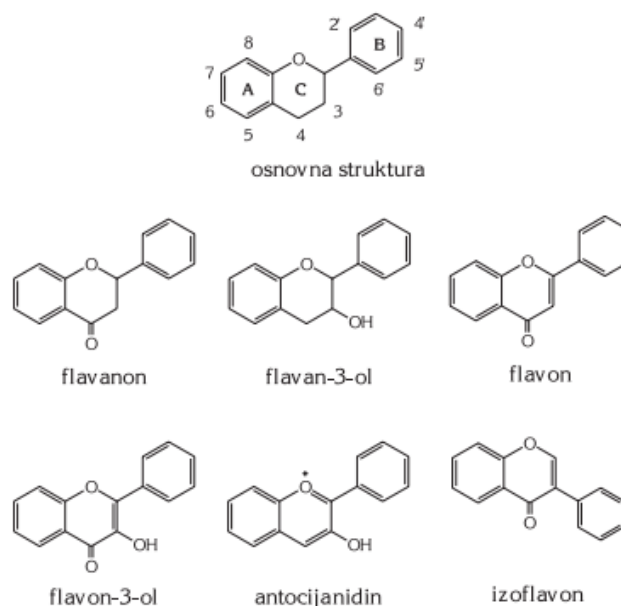
Slika 4. (+)-catehin i (-)-epikatehin (Kazazić, 2004).

Polifenoli imaju izrazito izraženu antioksidacijsku aktivnost. Epidemiološke studije sugeriraju povezanost između konzumacije hrane obogaćene fenolima i prevencije određenih bolesti povezanih s oksidativnim stresom. Oksidativni stres dio je patologije bolesti poput ateroskleroze, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, raka (Piazzon i sur., 2010). Antioksidacijska aktivnost je značajan aspekt kvalitete piva, a njegova procjena je važna bilo u odnosu na optimizaciju procesa proizvodnje ili prodaju na tržištu (Gorjanović i sur., 2009).

Općenito polifenolni spojevi, kao antioksidansi, mogu značajno zaštititi sirovine od antioksidacijske degradacije tijekom cijelog procesa proizvodnje piva (Callemien i Collin, 2009), ali je isto tako važno okarakterizirati fenolnu vrstu koja je u većoj mjeri odgovorna za antioksidativno djelovanje kako bi pivari mogli selektivno povećavati određeni sadržaj polifenola radi poboljšanja antioksidativnog djelovanja, ali i poboljšanja stabilnosti okusa finalnog proizvoda (Zhao i sur., 2009).

Flavonoidi su široko rasprostranjena skupina polifenolnih spojeva, a poznato je njihovo antibakterijsko, sedativno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno svojstvo i druga djelovanja. Osim toga puno pozornosti privlače zbog svoje izvanredne antiradikalne i antioksidacijske aktivnosti. Istraživanja pokazuju da su dobri „hvatači“ slobodnih radikala, a time imaju važnu ulogu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao antioksidansi u sastavu različitih lijekova i dodataka prehrani (Kazazić, 2004). Osnovna struktura flavonoida sastoji se od difenilpropana ($C_6C_3C_6$) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil) propan-1-ola iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena nastaje flavan od kojeg se izvodi određeni broj osnovnih struktura (slika 5.): flavanoni, flavan-3-oli (katehini), flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i izoflavoni (Harborne 1999). Monomeri flavan-3-ola i oligomeri proantocijanidina važni su jer utječu na parametre kvalitete piva poput okusa, pjene, boje i

koloidne stabilnosti. Osim njih veliku pozornost imaju i flavonoli zbog svoje uloge u kelaciji metala i poticanja formiranja reaktivnih kisikovih spojeva (Aron i Shellhammer, 2010).

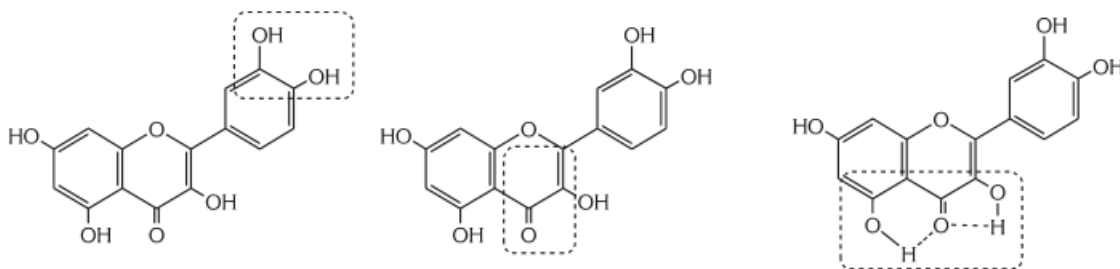


Slika 5. Osnovna struktura i skupine flavonoida (Kazazić, 2004).

Flavonoidi djeluju kao antioksidansi na nekoliko načina, a najznačajnije je njihovo djelovanje kao hvatači slobodnih radikala. Dva su uvjeta koje flavonoid mora zadovoljiti kao antioksidans. Prvi je da kada je prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, treba značajno usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije, a drugi uvjet je da iz njega nastali radikal mora biti stabilan kako ne bi započeo novu lančanu reakciju (Kazazić, 2004; Halliwell, 1995).

Za sposobnost hvatanja slobodnih radikala flavonoid mora imati sljedeće strukturne značajke:

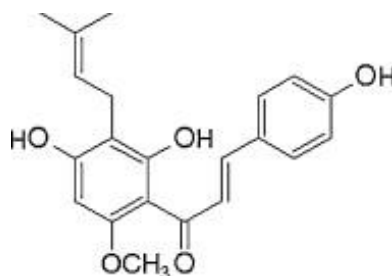
- *o*-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja stabilizira radikal i omogućuje delokalizaciju elektrona,
- 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto-skupinom koja omogućuje delokalizaciju elektrona B-prstena,
- na položaju 3- i 5- moraju se nalaziti hidroksilne skupine koje će osigurati vodikovu vezu s keto-skupinom (slika 6.).



Slika 6. Strukturne značajke flavonoida važne za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004).

Dakle, aktivnost flavonoida kao antioksidansa ovisi o njihovoj molekularnoj strukturi. Spojevi s flavonoidnom strukturom poput katehina općenito pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost od spojeva koji nisu flavonoidi, a to su npr. fenolna kiselina, stilben, lignan, kumarin i dr. Kao najjači antioksidansi piva pokazali su se upravo spojevi iz skupine flavonoida. Minimalno osamnaest flavonoida, od svih do sada otkrivenih, pokazuje veću antioksidacijsku aktivnost od vitamina C ili E (Berend i Grabarić, 2008). Flavonoidi mogu djelovati antioksidativno i u interakciji s navedenim vitaminima, a njihov sinergijski efekt očituje se u povećanju antiproliferativnog učinka kvercetina u interakciji s vitaminom C, što je povezano sa sposobnošću vitamina C da zaštiti flavonoid od oksidativne degradacije (Kandaswami i sur., 1993). Kao još jedan dobar primjer pozitivnog učinka pojedinačnih flavonoida može se uzeti ksantohumol (slika 7.) koji je prenilirani flavonoid izveden iz hmelja i nalazi se u pivu. Istraživanja pokazuju da ima obećavajuća kemoprevencijska svojstva i štiti stanice od oštećenja DNA karcinogenima putem inhibicije njihove aktivacije. Nadalje, otkriveno je da inhibira sintezu DNA i proliferaciju stanica karcinoma, inaktivira kisikove radikale i inducira apoptozu (Ferk i sur., 2010).

Duthie i suradnici (2002) navode da su brojna istraživanja pokazala kako upravo flavonoidi sadržani u pivu pokazuju antiproliferativne učinke protiv stanica raka jajnika, leukemije, raka crijeva, pluća, dojke i mokraćnog mjehura.



Slika 7. Kemijska struktura ksantohumola (Ferk i sur., 2010).

2.4. Prehrambena vrijednost i zdravstveni učinci piva

Pivo sadrži niz lako probavljivih tvari i supstanci koje imaju pozitivan učinak na zdravlje i ima smirujući i opuštajući učinak na osobu koja ga umjereno konzumira.

Umjerena konzumacija piva ima brojne pozitivne učinke na zdravlje, pa tako smanjuje sadržaj masti u tijelu, jer alkohol utječe na metabolizam masti. Isto tako umjerena konzumacija ima pozitivan utjecaj na zgrušavanje krvi i regulaciju krvnog tlaka. Ljudi koji piju umjerene količine piva imaju niži krvni tlak od onih koji ga ne piju. Posljedica toga je promjena u ravnoteži hormona, vode i elektrolita. Podiže razinu lipoproteina visoke gustoće u krvi tzv. „dobri“ kolesterol (HDL) te se smanjuje količina „lošeg“ kolesterola (LDL) u žilama (uzrokuje aterosklerozu). Ove promjene najvjerojatnije će se dogoditi kod ljudi koji njeguju aktivan životni stil i u ovom slučaju umjerena konzumacija piva smanjuje rizik od srčanog udara. Veliki broj istraživanja ukazuje na to da ljudi koji konzumiraju male količine alkohola oboljevaju manje od kardiovaskularnih bolesti ili umiru do njih za razliku od ljudi koji uopće ne piju alkohol. Nakon konzumiranja umjerene količine piva razina šećera u krvi opada, što rezultira povećanjem inzulina i odazivom na inzulin, a o ovome ovisi i ravnoteža šećera i masti. Pivo potiče mokrenje što rezultira izlučivanjem povećane količine soli, dok se izlučivanje kalija i magnezija sprječava. Naravno, neumjerena konzumacija ima suprotan učinak (Kunze, 2010). Umjerena konzumacija slabijih alkoholnih pića pa tako i piva pozitivno utječe na zdravlja želudca jer se smanjuje mogućnost infekcije sluznice želudca bakterijom *Helicobacter pylori* (Bamforth, 2002).

Zbog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti umjerena konzumacija piva pozitivno utječe na kognitivne sposobnosti i smanjuje mogućnost javljanja demencije u starosti. Na rad

bubrega pozitivno utječe silicijska kiselina koja je isto tako u malim količinama prisutna u pivu (Bamforth, 2002). Stevens i Page (2004) navode kako flavonoidi u pivu imaju inhibitorni učinak na osteoporozu, uz to pivo je dobar izvor silicija čija prisutnost može smanjiti rizik od osteoporoze. Nadalje, utvrđeno je da humulon (gorka kiselina iz piva) izoliran iz ekstrakta hmelja snažno inhibira razgradnju kostiju (Sohrabvandi i sur., 2012).

Pretjerana konzumacija piva djeluje štetno na zdravlje, povećava se rizik od mnogih bolesti, povezana je sa značajnim društvenim problemima kao što su ovisnost, nasilje, nesreće, zločini, no podaci navedeni u ovom poglavlju pokazuju da nema štete od umjerene konzumacije piva. Umjerenom konzumacijom piva smatra se količina od 1 do 3 čaše (0,33 L), što znači u prosjeku dva puta po 0,33 L piva sa sadržajem alkohola 40 g ili 50 mL po litri piva (Kunze, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog diplomskog rada bio je odrediti udjele (koncentracije) ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida te odrediti antioksidacijsku aktivnost u 30 uzoraka komercijalno dostupnih piva hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara.

3.2. Uzorci piva

Uzorci komercijalno dostupnih piva u boci prikupljeni su direktno od proizvođača ili kupljeni. Od svake vrste piva prikupljene su po tri boce volumena 330 mL ili 500 mL, ovisno o dostupnosti. Opis uzoraka prikazan je u tablici 1. Reprezentativni uzorci piva za analize pripremljeni su na način da je sadržaj triju boca od svakog uzorka izmiješan i homogeniziran. Nadalje, kako bi se uklonio ugljikov(IV) oksid koji smeta prilikom daljnjih analiza, ovako pripremljeni uzorci dekarbonizirani su u struju dušika uz kontinuirano miješanje. Nakon dekarbonizacije uzorci su preneseni u plastične epruvete volumena 50 mL, zamrznuti i čuvani do provođenja analiza.

Tablica 1. Ispitivani uzorci komercijalno dostupnih piva industrijskih i zanatskih pivovara.

Oznaka uzorka	Pivovara	Vrsta piva	Sirovine	Opis uzorka	Volumni udjel alkohola / %	Udjel ekstrakta / %	pH
8	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,8	11,5	4,43
9	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	6,3	15	4,54
10	Industrijska	Svijetlo	slad, hmelj, kukuruzna krupica	Filtrirano, pasterizirano	4	9,8	4,10
18	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,5	11,8	4,21
20	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,7	11,8	4,27
21	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5,2	11	4,13
23	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5	11,6	4,23
26	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,8	11	4,14
27	Industrijska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5	11,4	4,21
24	Industrijska	Svijetlo, pšenično	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5,4	11,6	4,20
7	Industrijska	Crveno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	4,8	11,8	4,21
19	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5	11,8	4,28
22	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	7,3	17,75	4,33
25	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	6	14,5	4,31
28	Industrijska	Crno	Slad, hmelj	Filtrirano, pasterizirano	5,5	12,5	4,28
3	Zanatska	Svijetlo	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	3,8	12	4,52
5	Zanatska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, nepasterizirano	5,3	-	4,41
11	Zanatska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano	5,5	-	4,42
12	Zanatska	Svijetlo	slad, hmelj, kukuruzna krupica	Filtrirano	5	11,4	4,24
13	Zanatska	Svijetlo	Slad, hmelj	Nefiltrirano, nepasterizirano	5	11,9	4,17
15	Zanatska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano, nepasterizirano	4,5	12	4,15
16	Zanatska	Svijetlo	Slad, hmelj	Filtrirano	5,1	-	4,20
34	Zanatska	Svijetlo	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	3,8	3,9	4,35
2	Zanatska	Pšenično	Slad, hmelj, pšenica	Nefiltrirano, pasterizirano	4,6	13	4,19
14	Zanatska	Crveno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, nepasterizirano	5	11,9	4,20
29	Zanatska	Tamno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, nepasterizirano	5	11,9	4,30
6	Zanatska	Tamno	Slad, hmelj	Filtrirano, nepasterizirano	6,5	-	4,39
17	Zanatska	Tamno	Slad, hmelj	Filtrirano	6	-	4,31
1	Zanatska	Tamno, jako	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	7,5	15	4,25
4	Zanatska	Crno	Slad, hmelj	Nefiltrirano, pasterizirano	4	13	4,38

3.3. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- Karboksimetil celuloza (CMC), (Aldrich, SAD)
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)
- Amonijev željezov citrat (Fluka, SAD)
- HNH_3 konc. (Kemika d.d., hrvatska)
- NaNO_2 (Kemika d.d., hrvatska)
- AlCl_3 (Kemika d.d., Hrvatska)
- otopina NaOH, 1 mol/L
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), čistoća > 99% (Sigma Aldrich, SAD)
- Metanol (Sigma Aldrich, SAD)

Sve kemikalije koje su korištene bile su *p.a.* čistoće, a za pripremu otopina korištena je ultra čista (milipore) voda.

3.4. Aparatura

U izradi ovog diplomskog rada korištena su sljedeći uređaji:

- pH metar HI2020 (HANNA Instruments, SAD) za određivanje pH vrijednosti uzoraka piva,
- magnetska miješalica (IKA, Njemačka) za homogeniziranje uzoraka tijekom dekarbonizacije u struju dušika
- analitička vaga ABT (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Njemačka) za vaganje kemikalija za pripremu otopina,
- UV-VIS spektrofotometar Specord 200 (Analytik Jena, Njemačka) za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti u uzorcima piva.

3.5. Metode

3.5.1. Određivanje udjela (koncentracije) ukupnih polifenola u pivu EBC metodom (EBC 9.11.)

EBC metoda 9.11. za određivanje ukupnih polifenola službena je metoda *European Brewery Convention*. Za provođenje analize pripravljena je otopina CMC/EDTA reagensa koncentracije 10 g/L na način da je u 500 mL destilirane vode polagano dodano 10 g CMC i 2 g EDTA te homogenizirano. Pripravljena otopina prenesena je u odmjernu tikvicu volumena 1 L te je tikvica do oznake nadopunjena ultračistom vodom. Amonijev željezov citrat reagens (reagens 1) u koncentraciji 5,6 g Fe³⁺/L pripremljen je otapanjem 3,5 g zelenog amonijev željezov citrata u 100 mL destilirane vode. Reagens 2 pripremljen je dodatkom 100 mL koncentriranog amonijaka a u 300 mL vode. Uzorke svijetlih piva prema metodi nije bilo potrebno razrjeđivati s vodom te su uzorci korišteni nerazrijeđeni. 10 mL dekarboniziranog uzorka piva i 8 mL CMC/EDTA reagensa dodano je u odmjernu tikvicu od 25 mL te snažno izmiješano. Zatim je dodano 0,5 mL reagensa 1 i 0,5 mL reagensa 2 te ponovno snažno izmiješano. Uzorci tamnih piva razrjeđivani na način da je u odmjernu tikvicu od 50 mL dodano 10 mL piva i 8 mL CMC/EDTA reagensa te snažno izmiješano. Zatim je dodano 0,5 mL reagensa 1 i 0,5 mL reagensa 2, izmiješano i nadopunjeno vodom do 50 mL.

Uzorci su ostavljeni da stoje 10 min na tamnom mjestu, nakon čega je očitana apsorbancija pri 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 pri 600 nm
F faktor razrjeđenja (1 za svijetla piva, 2 za tamna piva).

3.5.2. Određivanje udjela (koncentracije) ukupnih flavonoida

Udjel (koncentracija) ukupnih flavonoida u uzorcima piva određen je korištenjem modificirane spektrofotometrijske metode prema Granato i suradnicima (2011).

Analiza je provedena na način da je 250 μL uzorka piva (nerazrijeđeni uzorci u slučaju svijetlih piva, odnosno uzorci tamnih piva razrijeđeni vodom u omjeru 1:5) pomiješano s 2 mL vode. Nakon toga dodano je 120 μL prethodno pripremljene otopine natrijevog nitrita koncentracije 0,5 mol/L i ostavljeno da reagira 5 minuta. Zatim je dodano 120 μL otopine aluminijevog klorida koncentracije 100 g/L, izmiješano te ostavljeno da reagira 5 minuta prije nego je dodano 800 μL otopine natrijevog hidroksida koncentracije 1 mol/L. Odmah nakon dodavanja natrijevog hidroksida mjerena je apsorbancija uzorka na valnoj duljini od 510 nm. Kao slijepa proba pripremljena je mješavina otopina, bez dodatka uzorka piva. Udjel (koncentracija) ukupnih flavonoida određena je korištenjem kalibracijske krivulje za katehin ($y = 0,0042 - 0,0205$) te izražen kao miligrami katehina po litri ($\text{mg}_{\text{CTE}}/\text{L}$).

3.5.3. Određivane antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištena je modificirana DPPH metoda opisana u istraživanju Mitić i suradnika (2013). DPPH metoda se temelji na redukciji slobodnih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala antioksidansom koji služi kao donor elektrona ili atoma vodika. Molekula DPPH je stabilni slobodni radikal uslijed delokalizacije nesparenog elektrona preko cijele molekule, delokalizacija daje tamno ljubičasto obojenje karakterizirano apsorpcijskom vrpcom na 520nm. Promjena boje otopine koja se događa zbog redukcije DPPH slobodnih radikala mjeri se spektrofotometrijski.

Pripremljena je otopina DPPH (1×10^{-4} mol/L) u metanolu te je 5 mL ove otopine pomiješano s 100 μL piva u odmjerne tikvici od 10 mL, koja je zatim do oznake nadopunjena otopinom metanol-voda (u omjeru 50:50). Nakon 30 minuta spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 520 nm određuje se apsorbancija priređene otopine. Slijepa proba pripremljena je miješanjem jednakih volumena otopine DPPH i metanola. Postotak inhibicije DPPH izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \frac{A_{\text{slijepa proba}} - A_{\text{uzorak piva}}}{A_{\text{slijepa proba}}}$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Udjel ukupnih polifenola određen je primjenom EBC metode 9.11. koja se temelji na reakciji Fe^{3+} iona s polifenolima u alkalnoj otopini, pri čemu nastaju smeđe obojeni željezovi kompleksi te se intenzitet obojenja mjeri spektrofotometrijski s ciljem kvantifikacije polifenola. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 2. i 3. Koncentracija ukupnih polifenola za sve uzorke kretala se u rasponu od 76,57 mg/L (uzorak 10, industrijsko svijetlo pivo) do 382,31 mg/L (uzorak 6, zanatsko tamno pivo). Pri tome je raspon za zanatska piva bio nešto veći i iznosio od 119,06 mg/L do 382,31 mg/L, dok je raspon za industrijska piva iznosio od 76,57 mg/L do 279,29 mg/L. Razlike u koncentraciji ukupnih polifenola između industrijskih i zanatskih piva mogu se pripisati sirovinama korištenim u proizvodnji piva, odnosno kvaliteti ulaznih sirovina ječma i hmelja, ali i tehnološkim postupcima proizvodnje. Veći udjeli ukupnih polifenola u zanatskim pivima vjerojatno se mogu pripisati činjenici da se većinom radi o pivima gornjeg vrenja, koja su jače ohmeljena od industrijskih piva donjeg vrenja te činjenici da se u proizvodnji hrvatskih zanatskih piva ne radi zamjena dijela slada neslađenim sirovinama. Nadalje, industrijska piva su filtrirana i pasterizirana, što utječe na smanjenje koncentracije ukupnih polifenola te su zato te koncentracije u industrijskim pivima manje. U industrijskim pivovarama provodi se rutinska kontrola koncentracije ukupnih polifenola, kako te koncentracije ne bi bile prevelike, zbog već spomenutog negativnog utjecaja na koloidnu stabilnost piva.

Tablica 2. prikazuje koncentracije ukupnih polifenola u svijetlim pivima industrijskih i zanatskih pivovara. Koncentracije ukupnih polifenola zabilježena za svijetla industrijska piva bile su u rasponu od 76,57 mg/L do 166,71 mg/L. Dobiveni rezultati usporedivi su s rezultatima Habschied i suradnika (2020) koji su određivali ukupne i pojedinačne polifenole te antioksidacijsku aktivnost u svijetlim i tamnim industrijskim pivima. Koncentracije ukupnih polifenola za svijetla piva u navedenom istraživanju bile su u rasponu od 98,02 mg/L do 134,48 mg/L. Daljnjom usporedbom rezultata dobivenih ovim istraživanjem s rezultatima drugih autora često je vidljiva diskrepancija u rezultatima. Tako Zhao i suradnici (2009) navode raspon koncentracija ukupnih polifenola za svijetla industrijska piva od 152,01 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{L}$ do 339,12 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{L}$, Granato i suradnici (2010) raspon koncentracija od 119,96 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{L}$ do 200,21 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{L}$, dok Mitić i suradnici (2014) navode još veći raspon od 331,88 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{L}$ do 545,32 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{L}$. Razlog ovakvoj diskrepanciji u rezultatima je što su navedeni autori koristili metodu prema Folin-Ciocalteu, koja je najčešće primjenjivana metoda za

određivanje ukupnih polifenola neovisno o kojim je uzorcima riječ. Ipak, standardna EBC metoda za određivanje ukupnih polifenola u pivu pouzdanija je i daje vrijednosti koncentracije ukupnih polifenola bliže očekivanim vrijednostima s obzirom na tehnološki proces i korištene sirovine.

Koncentracije ukupnih polifenola za svijetla zanatska piva kretale su se u rasponu od 119,06 mg/L do 235,83 mg/L. Vidljivo je kako su ove koncentracije nešto veće od koncentracija zabilježenih za svijetla industrijska piva, o čemu je već bilo riječi.

Tablica 2. Koncentracije ukupnih polifenola u svijetlim pivima hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara.

Oznaka uzorka	Pivovara	Polifenoli γ /(mg/L)
8	Industrijska	147,61
9	Industrijska	120,03
10	Industrijska	76,57
18	Industrijska	109,69
20	Industrijska	98,36
21	Industrijska	148,71
23	Industrijska	81,30
24	Industrijska	151,07
26	Industrijska	158,10
27	Industrijska	166,71
2	Zanatska	119,06
3	Zanatska	215,28
5	Zanatska	210,59
11	Zanatska	136,28
12	Zanatska	129,87
13	Zanatska	235,83
15	Zanatska	168,82
16	Zanatska	157,14

Tablica 3. prikazuje koncentracije ukupnih polifenola u tamnim pivima industrijskih i zanatskih pivovara. U tamnim industrijskim pivima koncentracije ukupnih polifenola bile su u rasponu od 198,10 mg/L do 279,29 mg/L, odnosno bile su veće od koncentracija u svijetlim

industrijskim pivima. Habschied i suradnici (2020) navode raspon koncentracija ukupnih polifenola za industrijska tamna piva od 115,27 mg/L do 259,90 mg/L, što je usporedivo s rezultatima dobivenim ovim istraživanjem. Rasponi koncentracija ukupnih polifenola za tamna piva koje navode Granato i suradnici (2010) i Mitić i suradnici (2014) od 280,10 mg_{GAE}/L do 525,93 mg_{GAE}/L, odnosno od 446,38 mg_{GAE}/L do 510,97 mg_{GAE}/L, također su zbog primijenjene metode veće od rezultata dobivenih ovim istraživanjem, ali je vidljivo kako je koncentracija ukupnih polifenola u tamnim pivima veća od one u svijetlim pivima.

Isto se može primijetiti za koncentracijski raspon ukupnih polifenola u tamnim zanatskim pivima koji je u ovom istraživanju iznosio od 149,75 mg/L do 382,31 mg/L i veći je od raspona zabilježenog u svijetlim zanatskim pivima.

Tablica 3. Koncentracije ukupnih polifenola u tamnim pivima hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara.

Oznaka uzorka	Pivovara	Polifenoli γ /(mg/L)
7	Industrijska	204,23
19	Industrijska	206,31
22	Industrijska	279,29
25	Industrijska	253,57
28	Industrijska	198,10
1	Zanatska	251,26
4	Zanatska	286,26
6	Zanatska	382,31
14	Zanatska	227,77
29	Zanatska	220,36
17	Zanatska	254,45
34	Zanatska	149,75

Rezultati dobiveni određivanjem koncentracije ukupnih flavonoida prikazani su u tablicama 4. i 5. Koncentracije ukupnih flavonoida za sve uzorke kretale su se u rasponu od 33,69 mg_{CTE}/L (uzorak 10, industrijsko svijetlo pivo) do 180,36 mg_{CTE}/L (uzorak 6, zanatsko tamno pivo). Pri tome je koncentracijski raspon za industrijska piva iznosio od 33,69 mg_{CTE}/L do 121,19 mg_{CTE}/L, dok je za zanatska piva taj raspon iznosio od 57,5 mg_{CTE}/L do 180,36 mg_{CTE}/L.

Kao i u slučaju koncentracije ukupnih polifenola, rezultati su pokazali kako zanatska piva sadrže veće koncentracije ukupnih flavonoida od industrijskih piva, što je već razmatrano u slučaju koncentracije ukupnih polifenola.

Tablica 4. prikazuje koncentracije ukupnih flavonoida u svijetlim pivima hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara. Koncentracije ukupnih flavonoida zabilježena za svijetla industrijska piva bile su u rasponu od 33,69 mg_{CTE}/L do 68,21 mg_{CTE}/L. Granato i suradnici (2010) navode koncentracijski raspon od 23,12 mg_{CTE}/L do 62,71 mg_{CTE}/L za svijetla industrijska piva, što je u skladu s ovim istraživanjem, dok Mitić i suradnici (2013) navode veće koncentracije ukupnih flavonoida za svijetla industrijska piva (od 116,35 mg_{CTE}/L do 185,27 mg_{CTE}/L).

Koncentracije ukupnih flavonoida za svijetla zanatska piva bile su u rasponu od 57,50 mg_{CTE}/L do 98,81 mg_{CTE}/L.

Tablica 4. Koncentracije ukupnih flavonoida u svijetlim pivima hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara.

Oznaka uzorka	Pivovara	Flavonoidi γ /(mg _{CTE} /L)
8	Industrijska	68,21
9	Industrijska	59,17
10	Industrijska	33,69
18	Industrijska	42,38
20	Industrijska	38,21
21	Industrijska	48,81
23	Industrijska	38,10
24	Industrijska	35,60
26	Industrijska	66,67
27	Industrijska	66,19
2	Zanatska	57,50
3	Zanatska	87,98
5	Zanatska	98,81
11	Zanatska	96,55
12	Zanatska	64,05
13	Zanatska	59,14
15	Zanatska	66,67
16	Zanatska	68,33

Koncentracije ukupnih flavonoida u tamnim pivima hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara prikazane su u tablici 5. U tamnim industrijskim pivima koncentracije ukupnih flavonoida kretale su se u rasponu od 54,69 mg_{CTE}/L do 121,19 mg_{CTE}/L, dok je isti raspon za tamna zanatska piva iznosio od 72,02 mg_{CTE}/L do 124,74 mg_{CTE}/L. Granato i suradnici (2010) navode koncentracijski raspon od 92,87 mg_{CTE}/L do 171,26 mg_{CTE}/L za komercijalno dostupna brazilska piva, ali se radi o tamnim pivima gornjeg vrenja („ale“) kakva uobičajeno proizvode zanatske pivovare, pa su stoga i rezultati njihova istraživanja usporedivi s rezultatima ovog istraživanja dobivenim za tamna zanatska piva. Mitić i suradnici (2013) ponovo navode veće koncentracije ukupnih flavonoida za tamna industrijska piva (od 107,57 mg_{CTE}/L do 208,58 mg_{CTE}/L) od onih dobivenih ovim istraživanjem.

Kao i u slučaju ukupnih polifenola, koncentracija ukupnih flavonoida je veća u tamnim pivima u odnosu na svijetla piva, neovisno radi li se o industrijskim ili zanatskim pivima.

Tablica 5. Koncentracije ukupnih flavonoida u tamnim pivima hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara.

Oznaka uzorka	Pivovara	Flavonoidi γ /(mg/L)
7	Industrijska	75,60
19	Industrijska	61,90
22	Industrijska	114,29
25	Industrijska	121,19
28	Industrijska	54,69
1	Zanatska	108,33
4	Zanatska	122,02
6	Zanatska	72,02
14	Zanatska	95,24
29	Zanatska	124,74
17	Zanatska	79,05
34	Zanatska	72,02

Polifenolnim spojevima, poput flavonoida i fenolnih kiselina, pripisuje se antioksidacijski potencijal (Lee i sur. 2003), za očekivati je stoga kako će uzorci piva pokazati inhibiciju DPPH.

Za analizu je korištena modificirana DPPH metoda kako su opisali Mitić i suradnici (2013). DPPH metoda je brza, jednostavna, precizna i jeftina metoda za procjenu antioksidacijskog potencijala različitih uzoraka, odnosno za određivanje sposobnosti različitih spojeva da djeluju kao sredstvo za uklanjanje slobodnih radikala ili da doniraju vodik (Marinova i Batchvarov, 2011). Općenito, pivo sadrži značajne količine fenolnih spojeva koji doprinose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti piva. Sadržaj fenola i antioksidacijska aktivnost piva ovise o količini i kvaliteti polaznih materijala te o samom procesu proizvodnje. Pivo bogato fenolnim spojevima i s većom antioksidacijskom aktivnošću pokazuje bolju kvalitetu, stabilnija organoleptička svojstva poput okusa ili arome, stabilnost pjene i duži vijek trajanja u odnosu na pivo s nižom antioksidacijskom aktivnošću (Piazzon i sur., 2010). Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti prikazani su u tablicama 6. i 7.

Tablica 6. Antioksidacijska aktivnost uzoraka svijetlih piva hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara.

Oznaka uzorka	Pivovara	% inhibicije DPPH
8	Industrijska	66,24
9	Industrijska	66,37
10	Industrijska	64,96
18	Industrijska	70,34
20	Industrijska	68,12
21	Industrijska	67,08
23	Industrijska	67,00
24	Industrijska	66,20
26	Industrijska	70,34
27	Industrijska	68,12
2	Zanatska	57,82
3	Zanatska	61,84
5	Zanatska	62,63
11	Zanatska	70,34
12	Zanatska	68,12
13	Zanatska	67,08
15	Zanatska	67,00
16	Zanatska	66,20

Tablica 7. Antioksidacijska aktivnost uzoraka tamnih piva hrvatskih industrijskih i zanatskih pivovara.

Oznaka uzorka	Pivovara	% inhibicije DPPH
7	Industrijska	72,39
19	Industrijska	76,21
22	Industrijska	79,86
25	Industrijska	76,85
28	Industrijska	73,06
1	Zanatska	69,06
4	Zanatska	73,24
6	Zanatska	78,59
14	Zanatska	76,48
29	Zanatska	72,11
17	Zanatska	73,05
34	Zanatska	69,30

Najmanju antioksidacijsku aktivnost (57,82% inhibicije DPPH) pokazao je uzorak zanatskog svijetlog piva, dok je najveću antioksidacijsku aktivnost (79,86% inhibicije DPPH) pokazao uzorak industrijskog tamnog piva.

Za industrijska piva raspon od najveće do najmanje antioksidacijske aktivnosti iznosio je od 58,64 do 79,86 % inhibicije DPPH, dok je isti raspon za zanatska piva iznosio od 57,82 do 78,59% inhibicije DPPH. Iako je za očekivati kako će zanatska piva pokazati veći antioksidacijski potencijal u odnosu na industrijska piva, zbog veće koncentracije ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida, rezultati dobiveni ovim istraživanjem nisu potvrdili ovu pretpostavku. S druge strane, pretpostavka kako će veću antioksidacijsku aktivnost pokazati tamna piva, u odnosu na svijetla piva je potvrđena ovim istraživanjem, kao i istraživanjima drugih autora (Habschied i sur., 2020, Granato i sur., 2010). Za svijetla piva raspon antioksidacijske aktivnosti iznosio je od 57,82 do 70,34% inhibicije DPPH, dok je za tamna iznosio od 69,06 do 79,86% inhibicije DPPH.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Koncentracija ukupnih polifenola za sve uzorke kretala se u rasponu od 76,57 mg/L (industrijsko svijetlo pivo) do 382,31 mg/L (zanatsko tamno pivo), pri čemu je koncentracijski raspon za zanatska piva bio nešto veći i iznosio od 119,06 mg/L do 382,31 mg/L, dok je raspon za industrijska piva iznosio od 76,57 mg/L do 279,29 mg/L.
- Koncentracija ukupnih polifenola bila je veća u tamnim pivima u odnosu na svijetla piva, neovisno o tome radi li se o pivima industrijskih ili zanatskih pivovara.
- Koncentracije ukupnih flavonoida za sve uzorke kretale su se u rasponu od 33,69 mg_{CTE}/L (industrijsko svijetlo pivo) do 180,36 mg_{CTE}/L (zanatsko tamno pivo). Pri tome je koncentracijski raspon za industrijska piva iznosio od 33,69 mg_{CTE}/L do 121,19 mg_{CTE}/L, dok je za zanatska piva taj raspon iznosio od 57,5 mg_{CTE}/L do 180,36 mg_{CTE}/L.
- Kao i u slučaju ukupnih polifenola, koncentracija ukupnih flavonoida bila je veća u tamnim pivima u odnosu na svijetla piva.
- Najmanju antioksidacijsku aktivnost (57,82% inhibicije DPPH) pokazao je uzorak zanatskog svijetlog piva, dok je najveću antioksidacijsku aktivnost (79,86% inhibicije DPPH) pokazao uzorak industrijskog tamnog piva.
- Tamna piva pokazala su veću antioksidacijsku aktivnost od svijetlih piva.

6. LITERATURA

Arnold JP: *Origin and History of Beer and Brewing: From Prehistoric Times to the Beginning of Brewing Science and Technology* (reprint edn). Alumni Association of the Wahl-Henius Institute, Cleveland, OH, 2005.

Aquilani B, Laureti T, Poponi S, Secondi L: *Beer Choice and Consumption Determinants When Craft Beers are Tasted: An Exploratory Study of Consumer Preferences*, Food Quality and Preference, 41: 214-224, 2015.

Aron PM, Shellhammer TH: *A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability*, Journal of the institute of brewing, VOL. 116, NO.4, 2010.

Bamforth CW: *Beer: An Ancient Yet Modern Biotechnology*, Department of Food Science and Technology, University of California, Davis 5, 102-112, 2000.

Bamforth CW: Nutrition aspect of beer: A review. Nutrition Research, 22 (1-2): 227-237, 2002.

Berend S, Grabarić Z: *Flow-injection method in determining food polyphenol*. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 59: 205-212, 2008.

Calleminen D, Collin S: *Structure, Organoleptic Properties, Quantification Methods, and Stability of Phenolic Compounds in Beer—A Review*, Food Reviews International, 26:1, 1-84, 2009.

Collin S, Jerkovic V, Bröhan M, Callemien D: *Polyphenols and Beer Quality*, 2013. U: Ramawat K, Mérillon JM, (eds) *Natural Products*. Springer, Berlin Heidelberg, https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-22144-6_78 [24.9.2020.]

Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JA: *Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants*. Nutrition Research Review 13: 79-106, 2002.

Ferk F, Huber WW, Filipič M, Bichler J, Haslinger E, Mišik M, Nersesyan A, Grasl-Kraupp B, Žegura B, Knasmüller S: *Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo(4,5-f)quinoline (IQ)*, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 691: 17-22, 2010.

Gorjanović ŽS, Novaković MM, Potkonjak NI, Leskošek-Čukalović I, Sužnjević DŽ: *Application of a Novel Antioxidative Assay in Beer Analysis and Brewing Process Monitoring*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 744–751, 2010.

Granato D, Favalli Branco G, Fonseca Fariab J, Gomes Cruz A: *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, 2011.

Habschied K, Lončarić A, Mastanjević K: *Screaming of Polyphenols and Antioxidative Activity in Industrial Beers*, Foods 2020, 9, 238

Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI: *The characterization of antioxidants*. Food Chem Toxicol, 33: 601-17, 1995.

Harborne J B, Baxter H: *Handbook of natural flavonoids*. Vol 2. Chichester (UK): Wiley & Sons, 1999.

Jurić A, Ćorić N, Odak A, Herceg Z, Tišma M: *Analysis of total polyphenols, bitterness and haze in pale and dark lager beers produced under different mashing and boiling conditions*, The Institute of Brewing & Distilling, 121: 541-547, 2015.

Kandaswami G, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton E: *Ascorbic acid enhanced antiproliferative effect of flavonoids on squamous cell carcinoma in vitro*. Anticancer Drugs, 4: 91-6, 1993.

Kazazić SP: *Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida*, Arh Hig Rada Toksikol, 55: 279-290, 2004.

Kunze W: *TECHNOLOGY Brewing Malting*, VLB Berlin, Germany, 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.

Linko M, Haikara A, Ritala A, Pettilä M: *Recent advances in the malting and brewing industry*, Journal of Biotechnology, 65: 85–98, 1998.

Marić V, Nadvornik Z: *Pivo - tekuća hrana*. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1995.

MPPR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH: Pravilnik o pivu. Narodne novine 142/2011, 2011.

Marić V, Šantek B: *Tehnologija piva*. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2009.

Marinova G, Batchvarov V: *Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH*. Institute of Cryobiology and Food Technologies, BG-1407 Sofia, Bugarska. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 17 (No 1) 11-24, 2011.

Mitić SS, Paunović DĐ, Pavlović AN, Tošić SB, Stojković MB, Mitić MN: *Phenolic Profiles and Total Antioxidant Capacity of Marketed Beers in Serbia*. International Journal of Food Properties, 17: 908-922, 2013.

Nelson M, *The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe*. Routledge, Abingdon, UK, 2005.

Pai TV, Sawant SY, Ghatak AA, Chaturvedi PA, Guple AM, Desai NS: *Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential*, Journal of Food and Science Technology, 52(3): 1414-1423, 2015.

Piazzon A, Forte M, Nardini M: *Characterization of Phenolics content and Antioxidant Activity of Different Beer Types*, National Institute for Food and Nutrition Research, 58: 10677-10683, 2010.

Sohrabvandi S, Mortazavian AM, Rezaei K: *Health-Related Aspects of Beer: A Review*, International Journal of Food Properties, 15:2, 350-373, 2012.

Stevens JF, Page JE: *Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health*. Phytochemistry, 65: 1317-1330, 2004.

Šakić N: *Tehnologija proizvodnje piva*, Privredna/Gospodarska komora Federacije Bosne i Hercegovine, 2005.

Zhao H: *Endogenous Antioxidants and Antioxidant Activities of Beer*, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou, China, 2014.

Zhao H, Chen W, Lu J, Zhao M: *Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers*, Food Chemistry, 119:1150-1158, 2009.

<https://www.craftbeer.com/> [5.9.2017.]

<https://www.brewersassociation.org/> [5.9.2017.]

<https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/craft-brewer-definition/>
[5.9.2017.]

<https://www.hgk.hr/hrvatska-godisnje-proizvede-34-milijuna-hektolitara-piva>
[24.9.2020.]