

# Proizvodnja i karakterizacija piva proizvedenog s dodatkom smeđe makroalge *Fucus virsoides*

---

Ljekar, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:109:189878>

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

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

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**

**Tamara Ljekar**

**PROIZVODNJA I KARAKTERIZACIJA PIVA**  
**PROIZVEDENOG S DODATKOM SMEĐE MAKROALGE**  
*Fucus virsoides*

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, rujan, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za bioproceno inženjerstvo  
Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada:** prihvaćena je na III. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2023./2024. održanoj 21. prosinca 2023.  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Kristina Mastanjević

### Proizvodnja i karakterizacija piva proizvedenog s dodatkom smeđe makroalge *Fucus virsoides* Tamara Ljekar, 0248068940

#### Sažetak:

Morske makroalge su organizmi bogati bioaktivnim spojevima kao što su polisahardi, polifenoli i razni minerali. Makroalge se sve više dodaju u ljudsku prehranu jer sadrže brojne korisne spojeve, koji se već primjenjuju u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Cilj ovog rada je proizvesti funkcionalno pivo s dodatkom makroalgi. Alga iz Jadranskog mora, *Fucus virsoides* dodana je u sladinu tijekom kuhanja. Određeni su osnovni fizikalno-kemijski parametri (boja, pH, gorčina, etanol, ekstrakt, polifenoli) kontrolnog piva i piva s algom te je provedena analiza metala pomoću visoko-tekućinske kromatografije spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (HPLC)-ICP-MS.

**Ključne riječi:** funkcionalno pivo, *Fucus virsoides*, makroalge, pivo s algama

**Rad sadrži:** 37 stranica  
19 slika  
2 tablice  
0 priloga  
31 literaturnu referencu

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

1.	prof. dr. sc. Stela Jokić	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. Kristina Mastanjević	član-mentor
3.	prof. dr. sc. Tomislav Klavec	član
4.	doc. dr. sc. Krunoslav Aladić	zamjena člana

**Datum obrane:** 26. rujna 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Process Engineering**  
**Subdepartment of Bioprocess Engineering**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area** Biotechnical sciences  
**Scientific field** Food technology  
**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its regular session no. III held on 21st December 2023  
**Mentor:** Kristina Mastanjević, associate prof., PhD

**Production and characterization of beer produced with the addition of brown macroalgae *Fucus virsoides***  
**Tamara Ljekar, 0248068940**

**Summary:**

Marine macroalgae are organisms rich in bioactive compounds such as polysaccharides, polyphenols, and various minerals. Macroalgae are increasingly being added to human diets because they contain numerous beneficial compounds, which are already used in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. The aim of this study is to produce functional beer with the addition of macroalgae. The algae from the Adriatic Sea, *Fucus virsoides*, was added to the wort during brewing. Basic physicochemical parameters (color, pH, bitterness, ethanol, extract, polyphenols) of the control beer and beer with algae were determined, and a metal analysis was conducted using high-performance liquid chromatography (HPLC)-ICP-MS.

**Key words:** functional beer, *Fucus virsoides*, macroalgae, beer with macroalgae

**Thesis contains:** 37 pages  
19 figures  
2 tables  
0 supplementary materials  
31 references

**Original in:** croatian

**Review and defence committee:**

- |    |   |                   |
|----|---|-------------------|
| 1. | Professor Stela Jokić, PhD, full prof.  | Chairperson       |
| 2. | Kristina Mastanjević, PhD, assoc. prof. | Member-mentor     |
| 3. | Tomislav Klavec, PhD, full prof.        | Member            |
| 4. | Krunoslav Aladić, PhD, assist. prof.    | Substitute member |

**Defence date:** September 26, 2024

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

**DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA**

**DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA**

26.9.2024


**TE OCIJENJEN USPJEHOM**

IZVRSTAN (5)

**Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:**

1. prof. dr. sc. Stela Jokić

predsjednik

u/z   
(potpis)


2. izv. prof. dr. sc. Kristina Mastanjević

član

  
(potpis)

3. prof. dr. sc. Tomislav Klapeć

član

  
(potpis)

*Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Kristini Mastanjević, na neizmjernoj podršci, stručnom vodstvu i korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Njena posvećenost, strpljenje i stručnost bili su ključni u svakom koraku ovog procesa.*

*Zahvaljujem se i svim profesorima s Prehrambeno-tehnološkog fakulteta te Veleučilišta u Karlovcu koji su mi prenijeli svoja znanja i vještine tijekom mog fakultetskog obrazovanja. Njihova predanost, pristupačnost i potpora imale su velik utjecaj na moj kako profesionalni tako i osobni razvoj.*

*Posebnu zahvalu upućujem svojim kolegama s fakulteta, osobito Ani, Barbari i Ivani, koji su bili uz mene kroz cijeli studij – u izazovima, ali i u trenucima uspjeha. Zajedno smo prolazili kroz sve što nam je studij donio, a vaše prijateljstvo i srdačnost ostavili su neizbrisiv trag.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji, koja je uvijek bila moja najveća podrška. Njihova vjera u mene, ljubav i razumijevanje omogućili su mi da prevladam sve prepreke. Posebno bih željela zahvaliti svojoj mami, mojoj vječnoj inspiraciji, čija mi je snaga i pozitivni duh bila dodatna motivacija i vjetar u leđa.*

*Također, želim izraziti neizostavnu zahvalnost svojoj prijateljici Anji i dečku Dorijanu, koji su se mojim uspjesima veselili više nego ja sama, i koji su bili moj oslonac u izazovnim trenucima. Njihova podrška, poticaji i neprestano ohrabrenje pomogli su mi da ostanem na pravom putu i nastavim dalje, čak i kada je bilo najteže.*

*Bez vas svih, ovaj diplomski rad ne bi bio moguć.*

*Hvala vam!*

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. PROIZVODNJA PIVA</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Pivarska industrija u svijetu .....	4
2.1.2. Pivarska industrija u Hrvatskoj .....	7
2.1.3. Tehnologija proizvodnje piva .....	7
<b>2.2. MAKROALGE</b> .....	<b>8</b>
2.2.1. Smeđe alge .....	9
2.2.2. Funkcionalni proizvodi s dodatkom algi .....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>13</b>
3.2.1. Ukomljavanje .....	13
3.2.2. Izdvajanje tropa .....	15
3.2.3. Kuhanje sladovine .....	16
3.2.4. Hlađenje .....	17
3.2.5. Fermentacija .....	18
3.2.6. Karbonizacija i pakiranje piva .....	18
3.2.7. Fizikalno-kemijska analiza kontrolnog piva i piva s dodatkom alge .....	19
3.2.8. Analiza metala pomoću visoko-tekućinske kromatografije spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (HPLC)-ICP-MS .....	23
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE KONTROLNOG PIVA I PIVA S DODATKOM ALGE</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2. REZULTATI ANALIZE METALA POMOĆU (HPLC)-ICP-MS</b> .....	<b>26</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>28</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>32</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>34</b>





## **1.UVOD**

Napredak u razumijevanju odnosa između prehrane i zdravlja rezultirao je razvojem koncepta funkcionalne hrane, što znači praktičan i nov pristup postizanju optimalnog zdravlja promicanjem stanja dobrobiti i mogućim smanjenjem rizika od bolesti. Funkcionalna hrana nalazi se gotovo u svim kategorijama hrane, no razvoj i promet ovih proizvoda prilično je složen, skup i rizičan jer treba odgovoriti na posebne zahtjeve. Osim mogućih tehnoloških prepreka, prilikom razvoja funkcionalne hrane potrebno je uzeti u obzir zakonodavne aspekte, kao i zahtjeve potrošača (Siro i sur., 2008).

Pivo je najpopularnije alkoholno piće u svijetu i treće najpopularnije piće nakon vode i čaja (Conway, 2024). Međutim zbog medicinskih, vjerskih ili trendovskih razloga određeni potrošači izbjegavaju konzumaciju piva. Problemi vezani uz zdravlje i opća želja za zdravijim stilom života rezultirali su povećanom potražnjom za funkcionalnim pivima. Današnji potrošači obično pokušavaju smanjiti alkohol, gluten, šećer i ugljikohidrate u pivu, ali bez smanjenja njegovog izvornog okusa (Habschied i sur., 2020). Funkcionalnost proizvoda može se postići i dodatkom sirovog voća i povrća, aminokiselina, vitamina ili minerala koji proizvodu pružaju zdravstvene prednosti izvan svoje prehrambene vrijednosti. Ideja i cilj ovog diplomskog rada je proizvesti pivo s dodatkom algi. Obzirom da su alge bogate brojnim bioaktivnim komponentama, njihova upotreba već je zabilježena u brojnim industrijama. U prehrambenoj industriji komponente alge koriste se kao aditivi zbog sposobnosti vezivanja vode, zatim kao stabilizatori, emulgatori te kao sredstva za povećanje viskoznosti, a svoju primjenu pronašle su u proizvodima kao što su sladoled, pivo, bezalkoholna pića, mesne preradevine sa smanjenim udjelom masti, kruh, tjestenina, mliječni proizvodi, grickalice i tako dalje. Osim toga, komponente iz algi upotrebljavaju se u kozmetičkoj industriji u proizvodima za zaštitu od sunčevog zračenja, proizvodima protiv starenja kože i sprječavanja hiperpigmentacije. Također, primjena komponenti iz makroalgi zabilježena je u farmaceutskoj industriji zahvaljujući brojnim bioaktivnim djelovanjima, kao što su antioksidacijska aktivnost, antikancerogena aktivnost, antivirusna i antimikrobna aktivnost, antialergijsko i brojna druga djelovanja (Cikoš, 2021).

## **2. TEORIJSKI DIO**

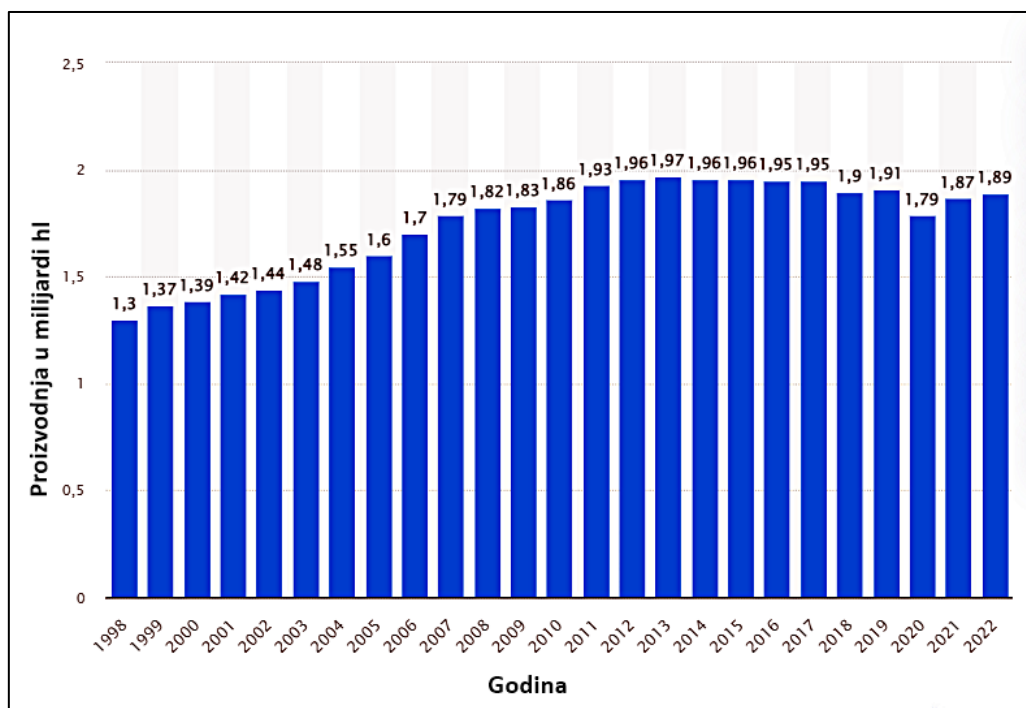
## 2.1. PROIZVODNJA PIVA

Proizvodnja i konzumacija piva je tradicija stara preko 5000 godina, o čemu svjedoče zapisi Mezopotamijskog klinastog pisma iz oko 2800 g. pr. n. e. u kojima se spominje distribucija dnevnih porcija kruha i piva. Smatra se da je pronalazak piva bio slučajno otkriće tako što je ostavljeni kruh navlažila kiša te, nakon što je opljesnivio, u njemu postupno počela spontana alkoholna i mliječna fermentacija. Rezultat toga je nastanak kaše sa alkoholnim sadržajem, a postupak je kasnije svjesno ponavljan i usavršavan kako bi od alkoholno prevrele krušne kaše postepeno nastao proizvod nalik današnjem pivu. Intenzivnija proizvodnja piva započinje u carstvu Karla Velikog kada nastaju samostanske pivovare u kojima se proizvodnja piva razvila do razine proizvodnje vina. U to vrijeme svaki samostan koristi vlastiti „grut“, odnosno mješavinu više aromatičnih trava, no zbog svojih prednosti hmelj postaje glavni začini koji se dodaje u pivo. Odredba bavarskog vojvode Wilhelma IV o čistoći piva, tzv. *Reinheitsgebot*, iz 1516. nalaže ograničavanje sirovina koje se smiju koristiti za proizvodnju piva i to uključuje upotrebu isključivo vode, ječma i hmelja. Tek u prvoj polovini 19. stoljeća istražuje se uloga kvasca u alkoholnoj fermentaciji, a dokazana je zahvaljujući radovima Louisa Pasteura. Izumom parnog stroja, kasnije elektromotora, zamjena ručnog rada strojnim, prijevoz dobara i primjena rashladnog uređaja doveli su do industrijskog razvoja i tehnološkog napretka čime je proizvodnja piva postala neovisna o godišnjem dobu i vremenskoj prognozi (Marić, 2009). U današnje vrijeme pivo je postalo najpopularnije alkoholno piće u svijetu i treće najpopularnije konzumirano piće nakon vode i čaja (Conway, 2024). Pivo se, prema Pravilniku o pivu (NN 142/11), definira kao proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanom vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura.

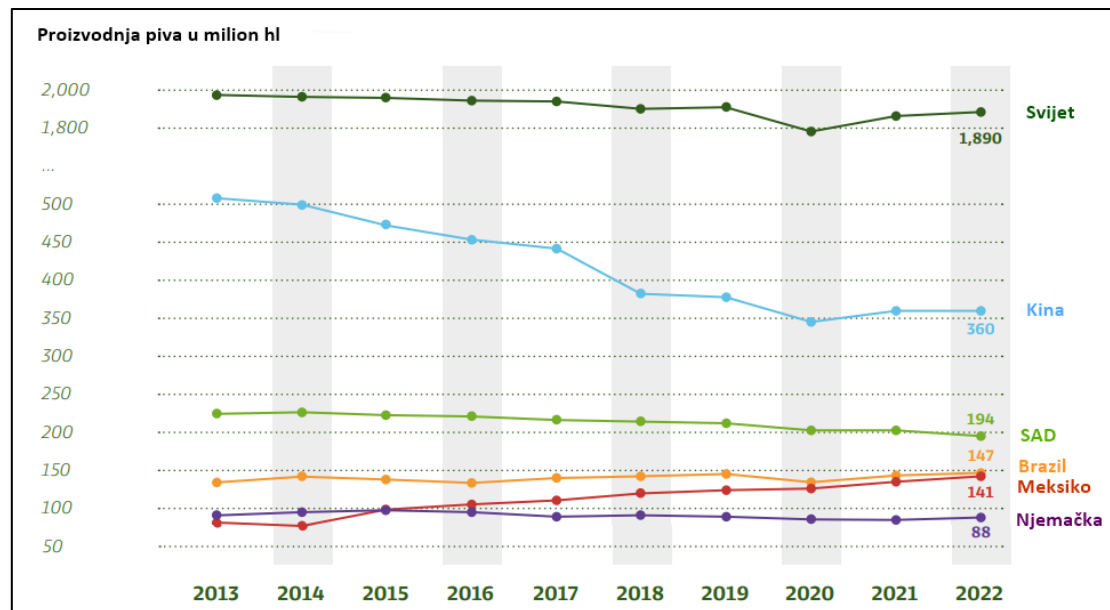
### 2.1.1. Pivarska industrija u svijetu

Posljedice pandemije koronavirusa, poremećeni lanci opskrbe, rat u Ukrajini, visoke cijene energenata i neobuzdana inflacija nisu pogodovali razvoju svjetskog gospodarstva (BarthHaas, 2023). Slijedom navedenog, proizvodnja i potrošnja piva u svijetu tijekom protekle tri godine bilježe pad. Podaci o svjetskoj proizvodnji prikazani su na **Slikama 1 i 2**. Vodeće svjetske zemlje u proizvodnji piva su Kina, SAD i Brazil. Godine 2020., kao odgovor na pandemiju COVID-19, vlade su provele izvanredne mjere u pokušaju borbe protiv prijenosa bolesti. U većini europskih zemalja, od ožujka 2020. pa nadalje, ugostiteljski je sektor bio potpuno zatvoren ili djelomično otvoren uz značajna ograničenja. Društvena okupljanja, uključujući gotovo sve srednje i velike festivale, događaje i proslave, odgođena su ili otkazana jer su vlade

nastojale ograničiti fizička okupljanja. Kao izravan rezultat toga, izvješće iz travnja 2021. procjenjuje da je europski sektor piva doživio smanjenje od 42 % u „on-trade“ (neposredna potrošnja unutar kafića, barova i restorana) prodaji piva, što je samo malo nadoknađeno povećanjem od 8 % u „off-trade“ prodaji (maloprodaja). Taj je razvoj duboko utjecao na sposobnost sektora da podupre radna mjesta i stvori porezne prihode za vlade (The Brewers of Europe, 2022). Godinu 2022. karakterizirao je porast proizvodnje u velikim pivovarama, dok je regionalnim pivovarama bilo teže nadoknaditi količinske gubitke pretrpljene tijekom pandemije (BarthHaas, 2023). Neke od najvećih svjetskih pivarskih grupacija prikazane su na Slici 3.



Slika 1 Proizvodnja piva u svijetu od 1998. do 2022. g. (preuzeto i prilagođeno iz <https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>)



Slika 2 Svjetska proizvodnja i zemlje s najvećom proizvodnjom piva od 2013. do 2022.g. (preuzeto i prilagođeno iz BarthHaas, 2023)

	Pivovara	Država	Proizvodnja piva u 2022. (u milion hl)	Postotak u svjetskoj proizvodnji piva
1	AB InBev	Belgija	518.0	27.4 %
2	Heineken	Nizozemska	256.9	13.6 %
3	China Res. Snow Breweries	Kina	122.2	6.5 %
4	Carlsberg	Danska	102.4	5.4 %
5	Molson Coors	SAD/Kanada	82.3	4.4 %
6	Tsingtao Brewery Group	Kina	79.6	4.2 %
7	Asahi Group	Japan	59.3	3.1 %
8	BGI / Groupe Castel	Francuska	43.7	2.3 %
9	Yanjing	Kina	37.7	2.0 %
10	Efes Group	Turska	34.0	1.8 %

Slika 3 Vodeće svjetske pivovare (preuzeto i prilagođeno iz BarthHaas, 2023)

Statistika pokazuje da je prodaja piva u Europskoj uniji pala s 322 milijuna hektolitara u 2019. godini na 297 milijuna hL u 2020. godini i, dok su se gotovo dvije trećine gubitaka vratile do 2022. godine, potrošnja piva još uvijek iznosi samo 313 milijuna hL. Brojke također pokazuju kako je ugostiteljski sektor podnio najveće gubitke te je i dalje pod pritiskom povećanih troškova i promjena načina života. Iako svaka zemlja ima svoju tradiciju, ravnoteža između neposredne potrošnje unutar kafića, barova i restorana (on-trade) te maloprodaje (off-trade), pomaknula se prema potonjem. Što se tiče proizvodnje, visoki troškovi proizvodnje (sredinom 2023. bili su 20-25 % veći nego 2019.), zajedno s naglim porastom troškova otpreme spriječili su dinamičan rast izvoza u prethodnom desetljeću koji je mogao kompenzirati postupni oporavak u proizvodnji i potrošnji piva. Međutim, broj aktivnih pivovara i dalje raste: ponovno je porastao u EU-u s 9500 pivovara u 2021. na 9680 u 2022., što je još uvijek daleko od porasta na kraju prošlog desetljeća kada je broj pivovara rastao za tisuću godišnje. S ovim porastom

broja pivovara paralelno raste i raznolikost u izboru ponuda za potrošače. Uvođenjem inovacija zadovoljava se potražnja potrošača za raznolikošću i kvalitetom, ujedno osiguravajući pivo za svakoga i za svaku priliku. Na primjer, bezalkoholno pivo sada predstavlja više od 5 % europskog tržišta piva (The Brewers of Europe, 2022). Trendovi oko negativnog utjecaja alkohola na zdravlje nastavit će rasti, povećavajući fokus na politike kontrole alkohola diljem svijeta. Kao najniža kategorija alkoholnih pića, sektor piva je u dobroj poziciji da odgovori i bude saveznik u ciljevima javnog zdravlja. Različite industrijske organizacije stoga će biti usmjerene na promicanje zamjene pića s visokim udjelom alkohola onima s niskim udjelom alkohola, poput piva. U kombinaciji s kontinuiranim promicanjem odgovornog pijenja i ulaganja pivara i inovacija u opcijama s niskim i nikakvim konzumiranjem alkohola, industrija ima priliku bez presedana uskladiti svoje poslovanje s ciljevima javnog zdravlja (The Brewers of Europe, 2022).

### 2.1.2. Pivarska industrija u Hrvatskoj

Udruženje proizvođača piva, slada i hmelja Hrvatske gospodarske komore utemeljeno je 1991. godine i okuplja članice koje se bave proizvodnjom piva. Udruženje je ujedno član organizacije European Brewery Convention (EBC), Europskog Udruženja pivara - The Brewers of Europe (BOE) te zaklade European Foundation for Alcohol Research (ERAB) (Hrvatska gospodarska komora, 2023). Prema podacima Europskog udruženja pivara, u Hrvatskoj je u 2022. godini proizvedeno 2.927.000 hL piva od čega 413.000 hL odlazi na izvoz unutar Europske unije te 500.000 hL na izvoz izvan Europske unije. Ukupna potrošnja piva iznosila je 3.074.000 hL (40 % on-trade, 60 % off-trade), dok je potrošnja po stanovniku iznosila 79 litara godišnje. Industrija direktno zapošljava 1801 radno mjesto te stvara 90 milijuna eura prihoda od poreza. U Hrvatskoj je 2022. godine bilo aktivno ukupno 109 pivovara, od kojih su 92 mikropivovare. Pod pojmom mikropivovara smatra se pivovara s godišnjom proizvodnjom do 1000 hL piva. Od 2018. godine djeluje i Grupacija malih nezavisnih pivovara kojoj je svrha isticati, poticati i promovirati proizvodnju piva u pogonima malih nezavisnih pivovara s posebnim naglaskom na poticanje inovativnosti u proizvodnji novih tipova piva, povećanju učinkovitosti, sigurnosti i efikasnosti proizvodnih procesa te sigurnosti i raznolikosti gotovih proizvoda.

### 2.1.3. Tehnologija proizvodnje piva

Proizvodnja piva odvija se u nekoliko tehnoloških faza, koje se mogu razlikovati obzirom na vrstu i tipove piva. Pojednostavljeno, proizvodnja se može podijeliti na tri tehnološke faze:

proizvodnja sladovine, glavno i naknadno vrenje te dorada i punjenje piva u ambalažu (Marić, 2009).

Prethodno se u sladarama provodi namakanje, klijanje i sušenje žitarica, odnosno proizvodnja slada. Najčešće korištena žitarica je ječam, no ponekad i pšenica, raž, zob, sirak ili proso. Slad se zatim melje na potrebnu granulaciju i prebacuje u komovnjak. Ukomljavanje se provodi dodatkom tople vode i zagrijavanjem do određene temperature. Ponekad se uz slad dodaju i drugi škrobni materijali, neslađene žitarice ili enzimi. Nakon ukomljavanja, u cjednjaku se odvaja tekući dio komine (sladovina) od čvrstog dijela (tropa). Zatim se u kotlu za kuhanje sladovina kuha uz dodatak hmelja, koji se obično dodaje u obliku ekstrakta ili peleta. Nakon kuhanja iz sladovine se izdvaja topli talog pomoću taložnjaka (whirlpool) te se hladi prolaskom kroz izmjenjivač topline, a zatim se izdvaja hladni talog prolaskom kroz filter ili centrifugalni separator. Prilikom prebacivanja sladovine u fermentor provodi se aeracija, kako bi se osigurao kisik potreban kvascima u početnim fazama fermentacije. U ohlađenu i aeriranu sladovinu dodaje se čista kultura kvasca.

Tijekom glavnog i naknadnog vrenja odvijaju se brojne biokemijske reakcije, sladovina postupno postaje mlado pivo (sadrži povećan broj stanica kvasaca, etanol, otopljeni i plinoviti CO<sub>2</sub> i druge nusproizvode), smanjuje se pH vrijednost. Glavno vrenje završava kada je postignut određeni stupanj prevrenja, tada se izdvaja istaloženi kvasac, a mlado pivo se prebacuje u tank za odležavanje u kojem se odvija dozrijevanje piva (bistrenje, zasićenje CO<sub>2</sub>, razvoj arome).

Dorada piva odnosi se na izdvajanje zaostalih stanica kvasca i suspendiranih čestica iz dovrelog piva pomoću filtracije ili centrifugiranja. Punjenje u ambalažu se provodi u aseptičnim uvjetima te se u industrijskim mjerilima nakon bistrenja provodi biološka stabilizacija piva (pasterizacija)(Marić 2009 ; Briggs i sur., 2004).

## **2.2. MAKROALGE**

Alge su skupina pretežno vodenih fotosintetskih organizama prokariotskoga ili eukariotskoga tipa stanične organizacije (protisti) koje imaju mnoge sličnosti s kopnenim biljkama međutim nemaju definirana specijalizirana tkiva, kao ni diferencirane organe. Prema procjeni postoji više od 40.000 vrsta algi, s velikom raznolikošću veličine i oblika, od jednostaničnih mikroskopskih organizama (mikroalge) do većih višestaničnih (makroalge). One su primarni proizvođači organske tvari u vodi te važna karika u prehrambenim lancima riba i drugih vodenih



organizama. Imaju važnu ulogu u prozračivanju vodenih staništa, a kisik koji oslobađaju u procesu fotosinteze vodeni i kopneni organizmi rabe za disanje. Alge na morskom dnu, koje se mogu raspoznati i odrediti golim okom nazivaju se makrobentonske alge. One mogu rasti do dubine na kojoj ima dovoljno svjetlosti za pozitivnu fotosintezu. Alge se razlikuju po osnovnoj boji koja je svojstvena za određenu skupinu. Boje ovise o pigmentima u staničnim organelima (plastidi) u kojima se odvija fotosinteza. Kao primarni fotosintetski pigment sadržavaju klorofil, a karakterističnu obojenost mogu im dati i drugi pigmenti, fikoeritrin (crvena), fikocijan i alofikocijan (plava), fukoksantin (smeđa), te violaksantin (ljubičasta). Glavni razredi makrobentonskih alga su zelene alge (*Chlorophyceae*), smeđe alge (*Phaeophyceae*) i crvene alge (*Rhodophyceae*). Tijelo makrobentonskih alga naziva se steljka ili talus. Steljke sadrže rizoide (izrasline slične korijenju) pomoću kojih se ukopavaju u podlogu, no nemaju razvijen sustav za crpljenje vode i hrane iz podloge. Steljku još čine filoidi (dijelovi slični lišću) i kauloidi (dijelovi slični stabljici) (Hrvatska enciklopedija, 2024 ; Turk, 2011).

Budući da su vrste morskih algi bogate hranjivim tvarima, u zemljama kao što su Kina, Japan i Koreja često se koriste u ljudskoj prehrani. Na primjer, Japanci konzumiraju više od 1,6 kg algi (suhe mase) godišnje po glavi stanovnika. Osim njihove važnosti kao tradicionalne azijske hrane, vrste morskih algi se industrijski koriste kao izvor hidrokoloida, kao što su agar, karagen i alginat (Dawczynski i sur., 2007). Alge mogu biti vrlo zanimljiv prirodni izvor bioaktivnih spojeva koji se mogu koristiti kao funkcionalni sastojci. One mogu živjeti u složenim staništima podložnim ekstremnim uvjetima (npr. promjene slanosti, temperature, hranjivih tvari, UV-zračenje), stoga se moraju brzo prilagoditi novim uvjetima okoliša kako bi preživjele, stvarajući veliku raznolikost sekundarnih metabolita, koji se ne mogu naći u drugim organizmima. Osim prirodnog karaktera, drugi važni aspekti vezani uz alge su njihov lak uzgoj, brzi rast te mogućnost kontroliranja proizvodnje nekih bioaktivnih spojeva manipulacijom uvjetima uzgoja (Plaza i sur., 2008).

### 2.2.1. Smeđe alge

Smeđe alge sadrže klorofile a i c te se odlikuju prisustvom pigmenta fukoksantina koji je odgovoran za prepoznatljivu maslinasto-smeđu boju po kojoj je ova skupina dobila ime. Smeđe alge jedinstvene su među algama obzirom se nalaze samo u višestaničnom obliku (Bleakley i Hayes, 2017). Danas se među sve tri vrste makroalgi (zelene, crvene i smeđe) najviše konzumiraju smeđe alge (66,5 %), zatim crvene (33 %) i zelene (5 %) alge. Nekoliko autora (Dawczynski i sur., 2007; Bleakley i Hayes, 2017; Plaza i sur., 2008) u svojim radovima ukazuju na vrijedan udio proteina u smeđim algama i nizak postotak lipida (oko 1 %), od kojih

visoku razinu čine višestruko nezasićene masne kiseline, kao što su eikosapentaenska i dokosaheksaenska kiselina. Smeđe alge posjeduju visok sadržaj različitih fitokemikalija i imaju važna terapijska svojstva, što ih čini odličnim kandidatima za upotrebu kao bioaktivnih sastojaka u mnogim industrijama, uključujući tržište funkcionalne hrane. Zdravstvene tvrdnje uglavnom su povezane s njihovim obiljem specifičnih hranjivih tvari i fitokemikalija, posebice vlakana, florotanina, fukoksantina i minerala. Međutim, njihove razine uvelike variraju ovisno o različitim čimbenicima, uključujući rodove i vrste algi, zrelost i uvjete okoliša, tj. varijacije kojima prirodno stanište algi može biti izloženo (npr. godišnje doba, temperatura, salinitet, oceanske struje, valovi, uvjeti skladištenja i prerade) (Afonso i sur., 2019).

*Fucus virsoides* (Donati) J. Agardh ili jadranski bračić je endemska vrsta Mediterana, a nalazi se samo u njegovom najhladnijem dijelu, Jadranskom moru. Jedna je od 10 vrsta svog roda te je funkcionalni ekvivalent puno većim vrstama *Fucus* koje tvore značajne šume makroalgi u međuplimnoj zoni oceanskih obala, kao i Baltičkog i Sjevernog mora (Gljušić i sur., 2023).



Slika 4 *Fucus virsoides* (Donati) J. Agardh (preuzeto iz Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, 2024)

### 2.2.2. Funkcionalni proizvodi s dodatkom algi

Morske alge općenito se smatraju obećavajućim izvorom biološki aktivnih tvari, uključujući fenolne spojeve, polisaharide, pigmente, vitamine, minerale te proteine poznate po svom antioksidativnom djelovanju. Za neke vrste je zabilježen sadržaj proteina u koncentracijama većim od tradicionalnih biljnih i životinjskih izvora proteina, s povoljnim omjerom esencijalnih aminokiselina. Korisna svojstva algi za ljudsko zdravlje koja se navode u literaturi uključuju antioksidativno, antikancerogeno, imunosupresivno, antiaterosklerozno i hepatoprotektivno djelovanje (Afonso i sur., 2019; Bleakley i Hayes, 2017; Plaza i sur., 2007). Dawczynski i sur. (2007) u svom radu također navode da konzumacija dijetalnih vlakana iz algi pozitivno utječe na zdravlje, a povezana je sa sljedećim učincima: (a) njihova konzumacija potiče rast i zaštitu

korisne crijevne flore; (b) smanjenje cjelokupnog glikemijskog odgovora, vlakna morske alge djeluju kao hipoglikemici; (c) povećani volumen stolice i (d) smanjenje rizika od raka debelog crijeva. Osim toga, u preglednom radu Michalak i sur. (2022) zaključuju da vlakna morskih algi u hrani za životinje pokazuju potencijal za poboljšanje zdravlja životinja, produktivnosti i dobrobiti. Također navode da polisaharidi morskih algi mogu poboljšati sastav životinjske gastrointestinalne mikrobiote bez ometanja njihove učinkovitosti te da korištenje morskih algi u ishrani životinja može potaknuti antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost, poboljšati funkciju imunološkog sustava i zdravlje crijeva. Slijedom navedenog suplementacija morskim algama može poboljšati kvalitetu mesa zbog nakupljanja antioksidativnih komponenti u mišićima. Korištenje prirodnih antioksidansa u mesnoj industriji praktičan je pristup smanjenju ili sprječavanju oksidacije lipida. Dok alge mogu biti prirodni akumulatori vitamina i minerala, one također mogu sakupljati toksične elemente, poput teških metala. Kako navode Bleakley i Hayes (2017) olovo i živa se nalaze u algama u razinama koje su sigurne za ljudsku prehranu, no nasuprot tome, arsen i kadmij identificirani su u nekim algama u razinama iznad zakonskih granica.

Okechukwu i sur. (2024) su u svojoj studiji ispitali utjecaj mikroalge (*Chlorella vulgaris*) na kinetiku fermentacije, senzorska svojstva, fitokemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i sadržaj hlapljivih organskih spojeva u pivu. Autori navode da je dodatak ekstrakta *C. vulgaris* unaprijedio kinetiku fermentacije poboljšanjem vijabilnosti stanica kvasca, te doveo do povećanja sadržaja fitokemikalija i antioksidativnog potencijala tretiranih uzoraka u usporedbi s kontrolama. Također, dodatak je imao minimalan utjecaj na senzorske atribute (okus, gorčina i ukupan dojam). Stoga, rezultati navedene studije podržavaju potencijalnu upotrebu alge kao funkcionalnog sastojka u proizvodnji piva, koji može pridonijeti poboljšanju nutritivnih vrijednosti i senzorskih karakteristika konačnog proizvoda.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati mogućnost proizvodnje piva s dodatkom smeđe morske makroalge iz Jadranskog mora, *F. virsoides*. Provedena je osnovna fizikalno-kemijska analiza kontrolnog piva i piva s dodatkom alge, pod pretpostavkom da će pivo s dodatkom alge imati veće vrijednosti ispitivanih parametara. Također je provedena analiza različitih metala: S (sumpor), Mg (magnezij), P (fosfor), K (kalij), Ca (kalcij), Cr (krom), Mn (mangan), Fe (željezo), Co (kobalt), Ni (nikal), Cu (bakar), Zn (cink), As (arsen), Se (selen), Mo (molibden), Cd (kadmij), Hg (živa) i Pb (olovo) pomoću visoko-tekućinske kromatografije spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (HPLC)–ICP–MS. Metali su određeni u suhoj algi *F. virsoides*, kontrolnom pivu, pivu s dodatkom alge, otpadnom kvascu kontrolnog piva i otpadnom kvascu piva s dodatkom alge.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

Pivo s dodatkom makroalgi proizvedeno je u laboratorijskom mjerilu na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek (PTFOS), opremom i postupcima karakterističnim za proizvodnju craft piva. Sirovine i oprema potrebni za proizvodnju piva osigurale su Katedra za bioproceno inženjerstvo i Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo na PTFOS. Fizikalno-kemijska analiza provedena je u laboratoriju Osječke pivovare.

#### 3.2.1. Ukomljavanje

Za proizvodnju sladovine korištene su tri vrste slada, ječmeni slad Pale-ale Valley King (proizvođač Slavonija-Slad d.o.o.) u količini od 2,513 kg, ječmeni slad DRC (proizvođač Simpsons Malt Ltd) u količini od 5,015 kg te ječmeni slad Chocolate (proizvođač Pauls Malt) u količini od 100 g, sve tri vrste slada unaprijed su samljevene od strane proizvođača (**Slika 5**). Korišteno je 20 L destilirane vode obogaćene odgovarajućom količinom soli: 1 g CaSO<sub>4</sub>, 2,5 g CaCl<sub>2</sub> i 2 g MgSO<sub>4</sub>, kako bi se postigla optimalna pH vrijednost za odvijanje enzimskih reakcija. Vrijednost pH komine treba biti između 5,5 i 5,6 za postizanje pozitivnih učinaka kao što su viši stupanj prevrenja sladovine, bolja razgradnja proteina, smanjenje viskoznosti sladovine, ubrzano cijedenje sladovine iz komine (Marić, 2009). Za potrebe ukomljavanja upotrijebljen je uređaj Speidel Braumeister (**Slika 6**), sa sustavom automatske regulacije temperature, vremena i pumpe za cirkulaciju sladovine. Proces započinje dodatkom vode u Speidel Braumeister koja se zagrije na temperaturu od 68°C te se potom dodaje prethodno navedena mješavina samljevenog slada. Za vrijeme postizanja zadane temperature u uređaj se ubacuje posuda s perforiranim dnom, kako bi istaložio sloj tropa kroz koji će se sladovina

cijediti. Miješanje sladne prekrupe s toplom vodom provodi se s ciljem prevođenja netopljivih sastojaka u topljiv oblik enzimskom hidrolizom pomoću enzima sintetiziranih tijekom slađenja zrna ječma (Marić, 2009). Kako bi se postigla enzimska razgradnja škroba,  $\beta$ -glukana i proteina potrebno je osigurati optimalne uvjete (temperatura i pH) za djelovanje hidrolitičkih enzima ( $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza)(Briggs i sur., 2004; Marić, 2009). Proces ukomljavanja provodio se na 68 °C u trajanju od jednog sata.



Slika 5 Slad korišten za proizvodnju sladovine (izvor: privatna arhiva)



Slika 6 Uređaj Spiedel Braumeister (izvor: privatna arhiva)



Slika 7 Preljevanje sladovine tijekom ukomljavanja (izvor: privatna arhiva)

#### 3.2.2. Izdvajanje tropa

Završetkom ukomljavanja potrebno je izdvojiti tekući dio komine s otopljenim sastojcima (prvijenac ili osnovna sladovina) od suspendiranih sastojaka (trop). Izdvajanje sladovine odvijao se na način da se posuda s perforiranim dnom podigne iznad uređaja za ukomljavanje te se kroz sloj istaloženog tropa na perforiranom dnu odvija proces filtracije sladovine. Nakon prolaska prvijenca, trop se naknadno ispirao naljevima tople vode od 75 °C (destilirana voda obogaćena solima) s ciljem ispiranja zaostalog ekstrakta. Nakon završetka cijedenja i ispiranja, trop se izdvaja kao nusproizvod. Pivski trop je vrijedan nusproizvod koji se može iskoristiti na brojne načine, npr. dodaje se namirnicama, poput kruha, keksa i grickalica u svrhu poboljšanja sadržaja vlakana i proteina ili se upotrebljava kao stočna hrana. U ovoj fazi, dobivena sladovina podijeljena je na dva jednaka dijela, kako bi se od iste šarže proizvelo kontrolno pivo i pivo s dodatkom alge. Nešto više od 10 litara sladovine prebačeno je u drugi uređaj za kuhanje piva, istih karakteristika.



Slika 8 Cijedenje sladovine i odvajanje na dva dijela (izvor: privatna arhiva)

#### 3.2.3. Kuhanje sladovine

Kuhanje oba dijela sladovine odvijalo se istovremeno u prethodno opisanim uređajima Spiedel Braumeister. U industrijskim mjerilima kuhanje sladovine odvija se u posebno dizajniranim kotlovima za kuhanje, a ima nekoliko ciljeva: inaktivacija sladnih enzima, sterilizacija sladovine, ekstrakcija i izomerizacija komponenti hmelja, koagulacija proteina, nastajanje i taloženje proteinsko-taninskih spojeva, povećanje obojenosti sladovine, smanjenje pH sladovine, isparavanje nepoželjnih spojeva arome (npr. dimetil sulfid) te isparavanje viška vode (koncentriranje sladovine na zadanu koncentraciju) (Briggs i sur., 2004; Marić, 2009). Kuhanje sladovine odvijalo se na 100 °C tijekom jednog sata. U jedan uređaj, odmah na početku kuhanja, postavljeno je sito u koje je dodana suha smeđa alga iz Jadranskog mora *Fucus virsoides* u količini od 25 g (Slika 9). Alga je dodana na početku kuhanja s pretpostavkom da će ispariti spojevi koji bi mogli negativno utjecati na okus i aromu piva te s ciljem veće ekstrakcije poželjnih komponenti (npr. minerala). U svrhu hmeljenja za oba dijela sladovine (kontrolne i sladovine s dodatkom alge) korištene su tri vrste hmelja u peletima (dobavljač HopSi d.o.o.) (Slika 10) dodane u istim količinama i istom vremenskom periodu. Chinook i Galaxy u količini po 5 g dodani su na početku kuhanja, a hmelj Columbus u količini od 5 g dodan je 20 minuta prije kraja kuhanja.





Slika 9 Suha makroalga *Fucus virsoides* (izvor: privatna arhiva)



Slika 10 Hmeljni peleti korišteni za proizvodnju piva (izvor: privatna arhiva)

### 3.2.4. Hlađenje

Završetkom procesa kuhanja sladovinu je potrebno ohladiti na određenu temperaturu, ovisno o vrsti kvasca koja se planira koristiti u proizvodnji. U tu svrhu, u oba uređaja dodan je cijevni izmjenjivač topline (tzv. zmijača) kroz koji struji vodovodna voda. Za izradu ovog diplomskog rada korišten je kvasac s optimalnim temperaturnim rasponom djelovanja između 12 i 25 °C, stoga se hlađenje sladovina provodilo do postizanja temperature od 24 °C. Nakon završenog procesa hlađenja, u obje sladovine izmjerena je početna količina fermentabilnih šećera pomoću uređaja EasyDens (Anton Paar, Austrija). U kontrolnoj sladovini pri temperaturi od 21,6 °C izmjerena je koncentracija ekstrakta od 11 °P. U sladovini s dodatkom alge pri temperaturi od 24,2 °C izmjerena je koncentracija ekstrakta od 12,2 °P.

### 3.2.5. Fermentacija

Biokemijske reakcije koje se događaju tijekom fermentacije predstavljaju kumulativne učinke rasta kvasca na sladovini. Nestanak hranjivih tvari te stvaranje etanola, ugljikovog dioksida i drugih metabolita nusproizvodi su rasta kvasca koji zajedno čine pivo (Briggs i sur., 2004). Fermentacijom i doviranjem mladog piva događa se niz promjena kao što su smanjenje pH vrijednosti, smanjenje udjela dušikovih spojeva, promjena boje i oksido-redukcijskog potencijala, izdvajanje gorkih i taninskih sastojaka te otapanje CO<sub>2</sub> (Marić, 2009). Nakon hlađenja sladovina je prebačena u plastične spremnike s vrenjačom zapremnine 10 L. Kako bi se osiguralo dovoljno kisika za kvasac u inicijalnim fazama fermentacije, spremnici sa sladovinom nekoliko puta su blago promućkani. U svaki spremnik dodano je 5,75 g suhog ale kvasca Safale US-05 (proizvođač Fermentis) (Slika 11). Spremnici su potom zatvoreni i ostavljeni na tamnom mjestu pri temperaturi od 20 °C. Svaka četiri dana izmjerena je količina fermentabilnih šećera, a fermentacija je prekinuta nakon 12 dana i postizanja vrijednosti od 6,7 °P za kontrolu i 7,1 °P za pivo s dodatkom algi. Tada su spremnici prebačeni na hlađenje u svrhu inaktivacije kvasca i odležavanja mladog piva. Hlađenje je trajalo tri dana, nakon čega je pivo pakirano u boce.



Slika 11 Čista kultura suhog kvasca korištena za fermentaciju (izvor: privatna arhiva)

### 3.2.6. Karbonizacija i pakiranje piva

Pivo pakirano u ambalažu mora sadržavati preko 4 g CO<sub>2</sub>/L (Marić, 2009). Obzirom da se pivo proizvodilo u laboratorijskom mjerilu s ograničenom opremom, količina CO<sub>2</sub> nastala tijekom alkoholnog vrenja nije bila dostatna za odgovarajuću pjenušavost piva. Manjak ili gubitak CO<sub>2</sub> mora se nadoknaditi karbonizacijom, koja se u ovom slučaju odvila dodatkom glukoze u boce.

U tamne staklene boce zapremnine 0,5 L dodano je po 3,5 g glukoze. Boce su potom hermetički zatvorene čime je završen proces proizvodnje.

#### 3.2.7. Fizikalno-kemijska analiza kontrolnog piva i piva s dodatkom alge

Fizikalno-kemijska analiza uzoraka provedena je u laboratoriju Osječke pivovare. Ispitani su sljedeći parametri: volumni udio alkohola, pH vrijednost, specifična gustoća, udio pravog i neprevrelog ekstrakta, udio ekstrakta u osnovnoj sladovini, boja, gorčina te udio polifenola. Prije početka analize uzorci su temperirani na sobnu temperaturu i profiltrirani preko filter papira i sloja dijatomejske zemlje u svrhu otklanjanja mutnoće (Slika 12). Vrijednost pH izmjerena je pri 21,9°C na pH metru (Mettler Toledo) (Slika 13).



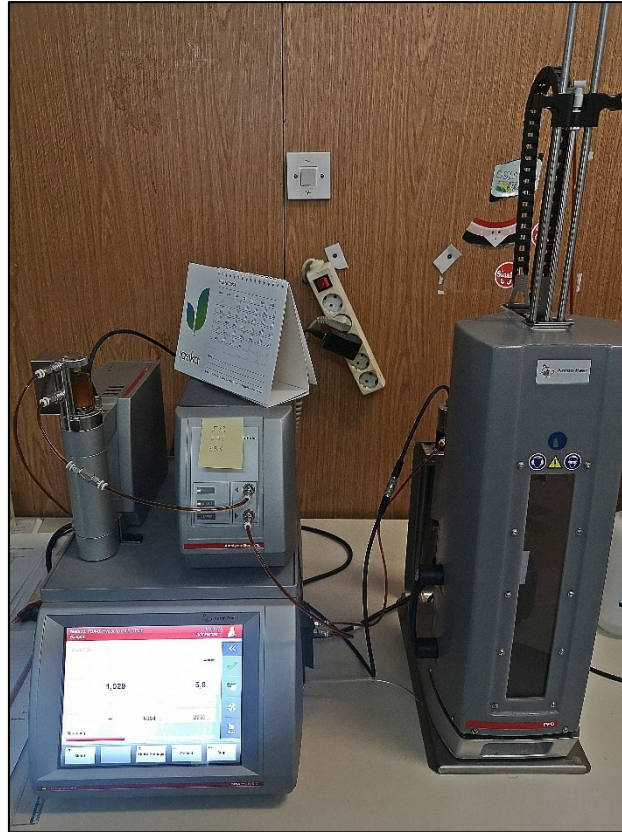
Slika 12 Filtracija uzoraka (izvor: privatna arhiva)



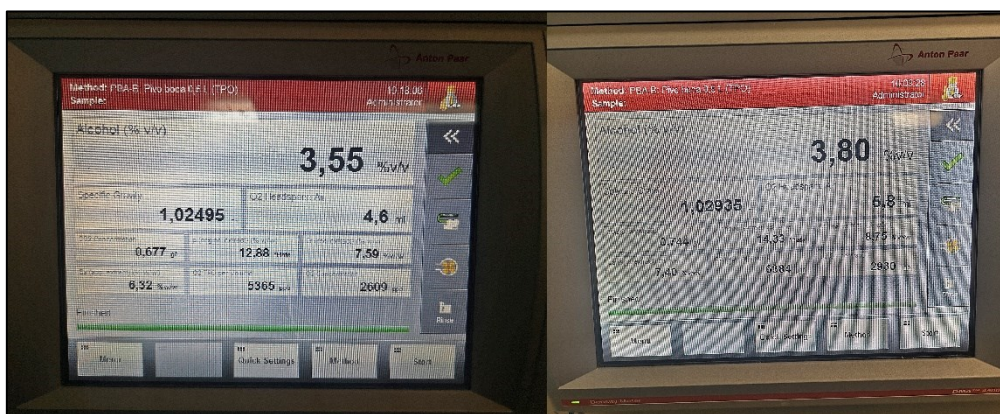
Slika 13 Mjerenje pH vrijednosti (izvor: privatna arhiva)

Volumni udio alkohola, specifična gustoća, udio pravog i neprevrelog ekstrakta te udio ekstrakta u osnovnoj sladovini izmjereni su na uređaju Beer Analyzer (Anton Paar) (Slika 14).

Uređaj automatski injektira potrebnu količinu uzorka za analizu, provodi mjerenje te dobivene rezultate prikazuje na monitoru uređaja (Slika 15). Iako uređaj može mjeriti količinu otopljenog CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>, vrijednosti nisu uzete u obzir radi prethodnog otvaranja boce i filtracije uzorka. Boja i gorčina piva te udio polifenola određeni su na uređaju Lambda 25 UV/VIS spektrometru (PerkinElmer) (Slika 16).



Slika 14 Uređaj Beer Analyzer (izvor: privatna arhiva)



Slika 15 Prikaz rezultata mjerenja na uređaju Beer Analyzer (izvor: privatna arhiva)



Slika 16 UV/VIS Spektrometar (izvor: privatna arhiva)

Boja piva određivala se pri valnoj duljini od 430 nm, na način da se u prvu kvarcnu kivetu postavi destilirana voda, a u drugu uzorak piva. Destilirana voda predstavlja slijepu probu koja mora imati vrijednosti 0,0000 ili  $\pm 0,0001$  da bi mjerenje bilo relevantno. Dobiveni rezultat izražava se kao EBC jedinica.

Gorčina piva ovisi o masi hmelja upotrijebljenog za hmeljenje sladovine, udjelu gorkih sastojaka (primarno  $\alpha$ -kiselina) u hmelju i njihovom iskorištenju (Marić, 2009). Gorčina piva određivana je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 275 nm. U staklene bočice izdvojeno je po 10 mL uzorka piva, dodano je po 0,5 mL HCL (6 N) i 20 mL izooktana te nekoliko staklenih kuglica. Uzorci se zatim mučkaju u uređaju (Slika 17) 15 minuta te potom centrifugiraju (Slika 18) u trajanju od 3 minute pri 3000 okretaja. Navedenim postupkom dolazi do razdvajanja slojeva, od kojih gornji predstavlja izooktanski sloj s ekstrahiranim tvarima gorčine. Gornji sloj pažljivo se otpipetira u kvarcnu kivetu. Slijepu probu predstavlja otapalo, tj. izooktan. Dobiveni rezultati izražavaju se kao IBU jedinica (International Bitterness Unit).



Slika 17 Uređaj za mućkanje uzoraka (izvor: privatna arhiva)



Slika 18 Uređaj za centrifugiranje uzoraka (izvor: privatna arhiva)

Udio polifenola određivan je također spektrofotometrijski na valnoj duljini od 600 nm. Za glavnu probu u odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se 10 mL uzorka, 8 mL CMC-EDTA, 0,5 mL Fe(III), 0,5 mL amonijaka te se tikvica nadopuni destiliranom vodom. Za slijepu probu u odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se 10 mL uzorka, 8 mL CMC-EDTA, 0,5 mL amonijaka te se tikvica nadopuni destiliranom vodom. Pripremljeni uzorci glavne i slijepe probe trebali su odstajati 10 minuta prije početka mjerenja. Slijepa proba mora imati vrijednosti 0,0000 ili  $\pm 0,0001$  da bi mjerenje bilo relevantno. Dobiveni rezultati izraženi su u mg/L. Polifenoli u pivu

potječu iz ječma (oko 70 %) i hmelja (oko 30 %), a njihov sadržaj ovisi o količini i kvaliteti polaznih materijala te o samom industrijskom procesu proizvodnje piva (Piazzon i sur., 2010).



Slika 19 Pripremljeni uzorci glavne i slijepa probe za kontrolno pivo i pivo s dodatkom alge (izvor: privatna arhiva)

#### 3.2.8. Analiza metala pomoću visoko-tekućinske kromatografije spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (HPLC)-ICP-MS

Uzorak liofilizirane alge *F. virsoides*, kontrolno pivo, pivo s dodatkom alge te otpadni kvasac kontrolnog piva i otpadni kvasac piva s algom analizirani su na sljedeće elemente: S (sumpor), Mg (magnezij), P (fosfor), K (kalij), Ca (kalcij), Cr (krom), Mn (mangan), Fe (željezo), Co (kobalt), Ni (nikal), Cu (bakar), Zn (cink), As (arsen), Se (selen), Mo (molibden), Cd (kadmij), Hg (živa), Pb (olovo). Navedene analize provedene su na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek i Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek.

Uzorci algi osušeni su u laboratorijskoj sušilici na 70 °C do konstantne mase, a suhi uzorak usitnjen je u prah ultracentrifugalnim mlinom za mljevenje bez tragova teških metala (Retsch ZM 200, Haan, Njemačka). Svi uzorci algi, kvasca i piva digestirani su mokrom mikrovalnom tehnikom (CEM Mars 6, Charlotte, NC, SAD) prema postupku opisanom u Beisler i Sandmann, 2022; Carnovale i sur., 2022; Rocha de Souza i sur., 2007. Ukratko, uzorci su kvantitativno prebačeni u teflonsku kivetu s 9 mL 65% HNO<sub>3</sub> i 2 mL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nakon digestije, otopine su filtrirane u odmjerne tikvice, prebačene u polipropilensku epruvetu od 50 mL i do oznake napunjene deioniziranom vodom. Koncentracije analiziranih elemenata mjerene su izravno u otopini uporabom induktivno spregnute plazme–masene spektrometrije (ICP–MS, Agilent Technologies 7800 ICP-MS, Santa Clara, CA, SAD). Svaka serija uzoraka izvođena na ICP-u analizirana je s internom objedinjenom kontrolom plazme i s različitim certificiranim referentnim materijalima (Institute for Reference Materials and Measurements BCR 129;

Institute of Nuclear Chemistry and Technology (INCT/ICHTJ) INCT-SBF-4) pripremljeni na isti način kao i ostali uzorci.



## **4. REZULTATI**

#### 4.1. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE KONTROLNOG PIVA I PIVA S DODATKOM ALGE

Tablica 1 Rezultati fizikalno-kemijske analize kontrolnog piva i piva s dodatkom alge

PARAMETAR	KONTROLNO PIVO	PIVO S DODATKOM ALGE
pH	4,07	4,25
Alkohol (%)	3,55	3,80
Specifična gustoća (g/mL)	1,02495	1,02935
Ekstrakt u osnovnoj sladovini (°P)	12,88	14,33
Pravi ekstrakt (%)	7,59	8,75
Neprevreli ekstrakt (%)	6,32	7,40
Gorčina (IBU)	42	42
Boja (EBC)	98	100
Polifenoli (mg/L)	590	513

#### 4.2. REZULTATI ANALIZE METALA POMOĆU (HPLC)-ICP-MS

Tablica 2 Rezultati analize metala u suhoj algi, kontrolnom pivu, pivu s dodatkom algi, otpadnom kvascu kontrolnog piva i otpadnom kvascu piva s dodatkom alge

METAL	LIOFILIZIRANA ALGA <i>Fucus virsoides</i>	PIVO		OTPADNI KVASAC	
		KONTROLA	DODATAK ALGE	KONTROLA	DODATAK ALGE
S	23855,00 mg/kg	113,45 mg/L	179,95 mg/L	535,65 mg/kg	375,00 mg/kg
Mg	9167,00 mg/kg	148,55 mg/L	188,40 mg/L	530,95 mg/kg	167,15 mg/kg
P	1290,00 mg/kg	300,05 mg/L	361,05 mg/L	2421,50 mg/kg	489,70 mg/kg
K	24035,00 mg/kg	903,10 mg/L	1140,50 mg/L	3298,50 mg/kg	780,80 mg/kg
Ca	18305,00 mg/kg	98,22 mg/L	149,05 mg/L	813,35 mg/kg	655,00 mg/kg
Cr	572,70 µg/kg	1,03 µg/L	1,67 µg/L	4,99 µg/kg	13,30 µg/kg

<b>Mn</b>	72,40 mg/kg	1,01 mg/L	1,26 mg/L	2,51 mg/kg	1,57 mg/kg
<b>Fe</b>	86,97 mg/kg	0,23 mg/L	0,72 mg/L	41,80 mg/kg	22,54 mg/kg
<b>Co</b>	1215,00 µg/kg	0,19 µg/L	2,30 µg/L	23,84 µg/kg	24,59 µg/kg
<b>Ni</b>	2685,00 µg/kg	7,69 µg/L	15,52 µg/L	113,90 µg/kg	142,25 µg/kg
<b>Cu</b>	2,44 mg/kg	0,07 mg/L	0,03 mg/L	2,88 mg/kg	2,15 mg/kg
<b>Zn</b>	19,59 mg/kg	0,07 mg/L	0,49 mg/L	34,46 mg/kg	13,47 mg/kg
<b>As</b>	25390,00 µg/kg	0,42 µg/L	77,94 µg/L	14,46 µg/kg	44,78 µg/kg
<b>Se</b>	36,32 µg/kg	1,72 µg/L	1,77 µg/L	13,38 µg/kg	4,37 µg/kg
<b>Mo</b>	264,12 µg/kg	28,71 µg/L	26,98 µg/L	225,17 µg/kg	165,61 µg/kg
<b>Cd</b>	484,54 µg/kg	0,19 µg/L	0,91 µg/L	27,73 µg/kg	8,74 µg/kg
<b>Hg</b>	4,31 µg/kg	< ND	< ND	< ND	< ND
<b>Pb</b>	328,68 µg/kg	0,98 µg/L	1,05 µg/L	11,82 µg/kg	32,66 µg/kg

## **5. RASPRAVA**

Rezultati ovog istraživanja prikazani su u **Tablicama 1 i 2**. **Tablica 1** prikazuje osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje određene u proizvedenim pivima. Promatrajući jedan od osnovnih parametara kvalitete, poput specifične gustoće, može se primijetiti da je sladovina s dodatkom algi imala nešto viši sadržaj ekstrakta, 1,02935 mg/L u usporedbi s kontrolnim uzorkom koji je imao 1,02495 mg/L. To ukazuje da je dodatak algi doprinio povećanju vrijednosti ekstrakta zbog sadržaja ugljikohidrata, što se odrazilo na početni udio ekstrakta koji je iznosio 14,3 °P u sladovini s dodatkom algi, u usporedbi s 12,8 °P u kontrolnom uzorku. Međutim, tako visok sadržaj ekstrakta rezultirao je pivom s niskim udjelom alkohola, manjim od 4 % v/v za oba piva. To bi moglo ukazivati na visok udio nefermentabilnog ekstrakta koji kvasac nije mogao iskoristiti prilikom fermentacije.

Vrijednosti pH pokazuju statističku razliku između uzoraka, što znači da je dodatak alge značajno utjecao na pH vrijednost piva, smanjujući pH za gotovo 5 %. Ovo je značajna promjena u pH vrijednosti i mogla bi imati utjecaj na senzorske karakteristike. Takva značajna promjena može biti povezana s višim udjelom alkohola u pivu s dodatkom algi (3,80 % v/v) u usporedbi s kontrolnim uzorkom koji je sadržavao 3,55 % v/v. Prema volumnom udjelu alkohola oba piva mogla bi se svrstati u kategoriju lakih piva. Obzirom na udio ekstrakta u početnoj sladovini, oba uzorka pripadaju kategoriji specijalnih piva, čije je obilježje veći sadržaj neprevrelog ekstrakta zbog čega se još nazivaju i „puna piva“.

Gorčina se nije mijenjala s dodatkom algi, bila je ista za oba piva, 42 IBU, što znači da alge ne doprinose gorčini.

Boja je bila blago promijenjena s dodatkom algi i bila je nešto izraženija u pivu s dodatkom *F. virsoides*, što je očekivano obzirom je *F. virsoides* smeđa alga.

Budući da nema puno podataka o ovoj temi, teško je usporediti dobivene rezultate s dostupnom literaturom. Postoje istraživanja u kojima su dodane mikroalge, poput *Arthrospira platensis* (spirulina) ili *Tetraselmis chui* u pivo (Carnovale i sur., 2022; Beisler i Sandmann, 2022), ali makroalge još nisu opisane kao potencijalni dodatak u pivarstvu. Rezultati početnog udjela ekstrakta u sladovini, u istraživanju koje su proveli Beisler i Sandmann (2022), u skladu su s podacima prikupljenima u ovom istraživanju. Vrijednost pH bila je viša u njihovom istraživanju i nije pokazivala pad s dodatkom mikroalge spiruline. Također, sadržaj alkohola bio je viši nego u ovom istraživanju, iznad 4,5 % v/v za sve uzorke. Niži udio alkohola vjerojatno je bio rezultat visokog sadržaja DRC slada. Kako bi se izbjegli trpki i gorki mirisi i okusi, karakteristični za tamna ale piva, te kako bi se istaknuo miris algi, korišten je DRC slad. Također su korištene male količine gorkog i aromatičnog hmelja. Ova kombinacija imala je za cilj smanjiti utjecaj

sirovina poput slada i hmelja na senzorička svojstva piva proizvedeno s algama. Teži tonovi tamnog ale piva dobro su se slagali s težim notama algi tijekom kuhanja.

Niži sadržaj polifenola u pivu s dodatkom algi mogao bi biti uzrokovan prisutnošću karagenana u biomasi algi. Naime, karagenan se koristi kao sredstvo za bistrenje tijekom kuhanja. Sredstva za bistrenje obično se dodaju u sladovinu otprilike 10 minuta prije završetka kuhanja kako bi se ubrzala agregacija i taloženje kompleksa protein-protein i protein-polifenol tijekom hlađenja (Saluri i sur., 2019). Budući su alge dodane u početnoj fazi kuhanja, moguće je da su određene polifenolne tvari istaložene zajedno s proteinima tijekom hlađenja. Pretpostavka je da su zbog toga niže razine polifenola utvrđene u pivu s dodatkom algi.

Rezultati analize metala u uzorcima prikazani su u **Tablici 2**. Metali su određeni u suhoj tvari algi, u kontrolnom pivu, pivu s dodatkom algi i otpadnom kvascu oba piva. Poznato je da makroalge zadržavaju metale poput kroma, kadmija, bakra, nikla, arsena, žive, olova i cinka, od kojih su neki ključni za normalno funkcioniranje metabolizma, ali u većim koncentracijama su sigurno toksični za ljude i životinje (Odobasić i sur., 2019). Koncentracije teških metala i elemenata u tragovima mogu se koristiti kao bioindikator zagađenja ekosustava (Dehbi i sur., 2023). Međutim, teški metali imaju štetan učinak na alge radi izazivanja oksidativnog stresa (Zamani-Ahmadmahmoodi i sur., 2020). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da biomasa algi sadrži visoke koncentracije različitih metala. Biomasa algi sadržavala je izrazito visoke koncentracije kalija, 24035,00 mg/kg, zatim sumpora, 23855,00 mg/kg i kalcija s 18305,00 mg/kg. Magnezij i fosfor također su pokazali visoke koncentracije u biomasi algi, preko 1000,00 mg/kg, kao i nikel i kobalt s preko 1000,00 µg/kg. Suha tvar algi sadržavala je značajne količine arsena (25390,00 µg/kg), nikla (2685,00 µg/kg) i kobalta (1268,00 µg/kg). Tako visoke koncentracije teških metala nisu iznenađujuće jer su alge odličan medij za bioremedijaciju (Chugh i sur., 2022). Koncentracije kadmija, olova i molibdena bile su ispod 500 µg/kg. Iznenađujući rezultat u biomasi algi bila je niska koncentracija selena (<40 µg/kg). Proizvedeno pivo s dodatkom algi pokazalo je više razine svih metala u usporedbi s kontrolnim uzorkom (**Tablica 2**). Pivo s dodatkom *F. visoides* imalo je približno 25 % više razine svih elemenata nego kontrolno pivo. Međutim, samo se mali dio teških metala prenio iz biomase algi u pivo. Utvrđeno je da su razine arsena visoke, dosegnuvši 77,94 µg/L, što je znatno više od tolerirane razine unosa od 3 µg/kg tjelesne težine dnevno, koju preporučuje Svjetska zdravstvena organizacija (WHO). Konzumacijom 0,5 L takvog piva unijelo bi se preko 35 µg arsena u organizam. Stoga je početna ideja o senzorskoj analizi odbačena. S druge strane, razine arsena u kontrolnom pivu bile su znatno niže, dosegnuvši 0,42 µg/L. Cink je pokazao određeno

odstupanje. Naime, njegova koncentracija bila je znatno niža u pivu proizvedenom s *F. virsoides*. Cink je neophodan za rast i metabolizam kvasca, i vjerojatno ga je iskoristila biomasa kvasca tijekom fermentacije (De Nicola i Walker, 2009). Otpadni kvasac dobiven nakon fermentacije s algama pokazao je niže razine sumpora, kalcija, magnezija, kalija, fosfora, mangana, bakra i cinka nego kvasac iz kontrolnog uzorka. Arsen, olovo, krom, kobalt i nikel pokazali su više razine u pivu s dodatkom algi nego u kontrolnom pivu. To bi moglo ukazivati na to da je biomasa kvasca mogla apsorbirati teške metale iz piva ili algi. Smeđe alge imaju veći kapacitet vezanja metala od crvenih i zelenih algi zbog sadržaja alginata, koji ima visok afinitet prema bivalentnim metalima (Brinza i sur., 2007). Otpadna biomasa algi je odbačena zajedno s hmeljem nakon kuhanja, stoga nema rezultata za ovaj nusproizvod.

Obzirom na rezultate prethodnih analiza (metala), planirala senzorska analiza nije provedena. Visoke koncentracije metala u pivu pokazale su se kao potencijalna opasnost po zdravlje, stoga je senzorska analiza ograničena na razini mirisa, a degustacija nije obavljena. Miris piva tijekom kuhanja bio je karakterističan za suhe alge i/ili morsku travu, vrlo jak, i preuzeo je sladni miris. Nakon fermentacije miris po suhim algama se smanjio, a u mirisu piva pojavile su se finije note čokolade i karamele. Nakon dva tjedna, miris algi bio je još više smanjen, i samo se lagani trag morskih trava mogao osjetiti tijekom ovog dijela senzorske analize.

## **6. ZAKLJUČCI**



Na temelju rezultata istraživanja provedenih za potrebe ovog diplomskog rada, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Dodatak jestivih algi *F. virsoides* doprinosi većem udjelu ekstrakta, a posljedično i većem udjelu alkohola u pivu.
2. Niža razina polifenola utvrđena je u pivu s dodatkom algi *F. virsoides*, vjerojatno zbog bistrenja uzrokovanog radi prisutnosti karagenana u biomasi algi.
3. Niži pH otkriven je u kontrolnom uzorku, što bi moglo biti povezano s većim udjelom alkohola u pivu s algama.
4. Dodatak algi u pivo mogao bi biti koristan te rezultirati funkcionalnim alkoholnim pićem. Međutim, teški metali koji se mogu naći u algama završavaju u pivu i mogu predstavljati opasnost za ljude. Taj rizik bi se možda mogao smanjiti dodatkom ekstrakta algi u sladovinu tijekom vrenja ili na kraju hlađenja. Ipak, ekstrakt bi također trebao proći analizu teških metala prije nego se koristi u proizvodnji piva.

Iako pivo s dodatkom algi nije imalo negativne mirise, mijenjalo se tijekom vremena, što je rezultiralo slabijim mirisom algi. Još jedna prednost korištenja ekstrakta bila bi smanjenje mirisa algi tijekom vrenja, a posljedično i u pivu.

## **7. LITERATURA**

- Afonso NC, Catarino MD, Silva AMS, Cardoso SM: Brown Macroalgae as Valuable Food Ingredients. *Antioxidants*, Vol. 8 (9), 365, 2019. DOI: 10.3390/antiox8090365
- BarthHaas: Report 2022/2023. [https://www.barthhaas.com/fileadmin/user\\_upload/01-barthhaas-2022/Resources/BarthHaas\\_Report/2023/WEB\\_BarthHaas\\_Report\\_2022\\_23\\_EN.pdf](https://www.barthhaas.com/fileadmin/user_upload/01-barthhaas-2022/Resources/BarthHaas_Report/2023/WEB_BarthHaas_Report_2022_23_EN.pdf) [30. 6. 2024.]
- Beisler N, Sandmann M: Integration of *Arthrospira platensis* (spirulina) into the brewing process to develop new beers with unique sensory properties. *Front. Sustain. Food Syst.* 6:918772, 2022. DOI: 10.3389/fsufs.2022.918772
- Bleakley S i Hayes M: Algal proteins: Extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, Vol. 6 (5), 1 – 34, 2017. DOI: 10.3390/foods6050033
- Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA, Stevens R: *Brewing. Science and practice*. Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, 2004.
- Brinza L, Dring MJ, Gavrilescu M: Marine Micro and Macro Algal Species as Biosorbents for Heavy Metals. *Environmental Engineering and Management Journal*, Vol. 6 (3), 237 – 251, 2007. DOI: 10.30638/eemj.2007.029
- Carnovale G, Leivers S, Rosa F, Norli H-R, Hortemo E, Wicklund T, Horn SJ, Skjanes K: Starch-Rich Microalgae as an Active Ingredient in Beer Brewing. *Foods*, 11, 1449, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11101449>
- Chugh M, Kumar L, Shah MP, Bharadvaja N: Algal bioremediation of heavy metals: an insight into removal mechanisms, recovery of by-products, challenges, and future opportunities. *Energy Nexus*, Vol. 7, 100129, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100129>
- Cikoš A-M: Karakterizacija odabranih makroalgi Jadranskog mora: isparljivi spojevi, masne kiseline i pigmenti. *Disertacija*, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2021.
- Conway J: Global beer production 1998-2022. Statista. <https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/> [30. 6. 2024.]
- Dawczynski C, Schubert R, Jahreis G: Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, Vol. 103 (3), 891 – 899, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.09.041
- De Nicola R, Walker GM: Accumulation and cellular distribution of zinc by brewing yeast. *Enzyme. Microb. Technol.*, Vol. 44 (4), 210–216, 2009. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2008.11.008
- Dehbi M, Dehbi F, Kanjal MI, Tahraoui H, Zamouche M, Amrane A, Assadi AA, Hadadi A, Mouni L: Analysis of Heavy Metal Contamination in Macroalgae from Surface Waters in Djelfa, Algeria. *Water*, Vol. 15, 974, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/w15050974>
- Gljušćić E, Bilajac A, Smith SM, Najdek M i Iveša Lj: First Restoration Experiment for Endemic *Fucus virsoides* on the Western Istrian Coast—Is It Feasible? *Plants*, Vol. 12 (7), 1445, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12071445>
- Habschied K, Živković A, Krstanović V, Mastanjević K: Functional Beer—A Review on Possibilities. *Beverages*, Vol. 6 (3), 51, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/beverages6030051>

Hrvatska gospodarska komora: <https://www.hgk.hr/odjel-poljoprivredu-prehrambenu-industriju-i-sumarstvo/udruzenje-proizvodaca-piva-slada-i-hmelja> i <https://www.hgk.hr/odjel-poljoprivredu-prehrambenu-industriju-i-sumarstvo/grupacija-malih-nezavisnih-pivovara>

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje: Alge. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024., <https://www.enciklopedija.hr/clanak/alge> [Pristupljeno 1. 7. 2024.]

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

Michalaka I, Tiwari R, Dhawanc M, Alagawany M, Farag MR, Sharung K, Bin Emranh T i Dhama K: Antioxidant effects of seaweeds and their active compounds on animal health and production – a review. *Veterinary Quarterly*, Vol. 42 (1), 48 – 67, 2022. DOI: 10.1080/01652176.2022.2061744

Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o pivu*. Narodne novine 142/11, 2011.

Odobašić A, Šestan I, Begić S: *Biosensors for Determination of Heavy Metals in Waters*. U *Biosensors for Environmental Monitoring; BoD—Books on Demand*: Paris, Francuska, 2019.

Okechukwu QN, Adadi P, Kovaleva EG: Supplementation of *Chlorella vulgaris* extracts during brewing: The effects on fermentation properties, phytochemical activity and the abundance of volatile organic compounds. *Beverages*, Vol. 10, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Piazzon A, Forte M, Nardini M: Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 58 (19), 10677 – 10683, 2010. DOI: 10.1021/jf101975q

Plaza M, Cifuentes A, Ibanez E: In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science and Technology*, Vol 19 (1), 31 – 39, 2008. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.07.012

Rocha de Souza MC, Marques CT, Guerra Dore CM: Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J Appl Phycol*, Vol. 19, 153–160, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9121-z>

Saluri M, Robal M, Tuvikene R: Hybrid carrageenans as beer wort fining agents. *Food Hydrocoll*, Vol. 86, 26–33, 2019. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.12.020

Siro I, Kapolna E, Kapolna B, Lugasi A: Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, Vol. 51 (3), 456 – 467, 2008. DOI: 10.1016/j.appet.2008.05.060

The Brewers of Europe: European beer trends. Statistics report 2023 Edition. <https://brewersofeurope.eu/wp-content/uploads/2023/11/european-beer-trends-2023-web.pdf> [30. 6. 2024.]

The Brewers of Europe: Economic report to assess the impact of Covid-19 on the brewing sector in Europe 2020-21. <https://brewersofeurope.eu/uploads/mycms-files/documents/publications/2022/covid-impact-report-june2022.pdf> [30. 6. 2024.]

The Brewers of Europe: Croatia key figures 2022. <https://brewersofeurope.eu/wp-content/uploads/2023/12/croatia.pdf> [30. 6. 2024.]

Turk T: *Pod površinom Mediterana*. Školska knjiga, d.d., Zagreb, 2011.

Zamani-Ahmadm Mahmoodi R, Malekabadi M, Rahimi R, Johari SA: Aquatic Pollution Caused by Mercury, Lead, and Cadmium Affects Cell Growth and Pigment Content of Marine Microalga, *Nannochloropsis oculata*. *Environ. Monit. Assess.*, Vol. 192, 330, 2020. DOI: 10.1007/s10661-020-8222-5

World Health Organization (WHO): EXPOSURE TO ARSENIC: A MAJOR PUBLIC HEALTH CONCERN, <https://www.who.int/docs/default-source/food-safety/arsenic/who-ced-phe-epe-19-4-1-eng.pdf> [10. 9. 2024.]