

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Katarina Vukomanović

**USPOREDBA DVAJU METODA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH  
POLIFENOLA U PIVU**

diplomski rad

Osijek, studeni 2016.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Biotehnološka proizvodnja hrane

**Tema rada** je prihvaćena na 7. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 25. travnja 2016.

**Mentor:** doc. dr. sc. Natalija Velić

**Komentor:** doc. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač

### Usporedba dvaju metoda za određivanje ukupnih polifenola u pivu

*Katarina Vukomanović, 238/DI*

**Sažetak:** Pivo sadrži različite skupine polifenola, poput tanina, fenolnih kiselina, flavona, flavonola i proantocijanida. Osim njihovog antioksidacijskog potencijala, ovi spojevi imaju važnu ulogu u formiranju okusa i arome piva, posebno gorčine i trpkosti te utječu na koloidnu stabilnost piva. Sa zdravstvenog stajališta, fenolni spojevi imaju važnu ulogu u smanjenju pojave različitih kroničnih bolesti i stanja, poput kardiovaskularnih bolesti. Podatak o koncentraciji ukupnih polifenola u pivu važan je kako zbog njihovih negativnih učinaka na stabilnost piva te stvaranje mutnoće, tako i zbog pozitivnih zdravstvenih učinaka. Cilj ovog rada bio je odrediti koncentraciju ukupnih polifenola u 30 uzoraka piva domaćih industrijskih i zanatskih (eng. craft) pivovara korištenjem dviju metoda – Folin-Ciocalteu i standardne EBC 9.11. metode te usporediti metode na osnovu dobivenih rezultata. Koncentracije ukupnih polifenola određene Folin-Ciocalteu metodom kretale su se u rasponu od 230,33 do 932,57 mg<sub>GAE</sub>/L, dok je isti raspon za EBC metodu iznosio 76,57 do 382,31 mg/L. Za obje metode je utvrđena statistički značajna razlika između koncentracije ukupnih polifenola u svijetlim i tamnim analiziranim pivima. Standardna EBC metoda, pokazala je normalnu raspodjelu rezultata te manje vrijednosti koncentracije ukupnih polifenola te se može smatrati pouzdanijom za određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu od Folin-Ciocalteu metode.

**Ključne riječi:** pivo, ukupni polifenoli, Folin-Ciocalteu metoda, EBC 9.11.

**Rad sadrži:** 25 stranica  
5 slika  
2 tablice  
1 prilog  
23 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Vinko Krstanović</i> | predsjednik   |
| 2. doc. dr. sc. <i>Natalija Velić</i>    | član-mentor   |
| 3. doc. dr. sc. <i>Dajana Gašo-Sokač</i> | član          |
| 4. doc. dr. sc. <i>Marina Tišma</i>      | zamjena člana |

**Datum obrane:** 10. studenog 2016.

**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**

Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Graduate program Food engineering**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Biotechnology in Food Production

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 7 held on April 25<sup>th</sup>, 2016.

**Supervisor:** *Natalija Velić*, PhD, assistant prof.

**Co-supervisor:** *Dajana Gašo-Sokač*, PhD, assistant prof.

### **Comparison of two methods for the determination of total polyphenols in beer**

*Katarina Vukomanović, 238/DI*

**Summary:** Beer contains different groups of polyphenols, such as tannins, phenolic acids, flavones, flavonols, and proanthocyanidins. Apart from their antioxidative potential, these compounds play an important role in forming the beer taste and aroma, especially bitterness and acidity. Furthermore, they affect the colloidal stability of beer. From a healthcare standpoint, phenolic compounds play a significant part in cardiovascular diseases risk reduction. Apart from positive health effects, the concentration of total polyphenols is an important information for brewers, because of their negative effect on beer stability and haze formation. The aim of this study was to determine the concentration of total polyphenols in 30 domestic commercial beer samples, originated from industrial and craft breweries, using two methods – Folin-Ciocalteu and standard EBC 9.11. method, and to compare the methods based on the obtained results. The concentrations of total polyphenols obtained by Folin-Ciocalteu method ranged between 230,33 and 932,57 mg<sub>GAE</sub>/L, while those obtained by EBC method ranged between 76,57 and 382,31 mg/L. Statistically significant difference in concentration of total polyphenols between light and dark analysed beers was observed for both methods. The data obtained by the standard EBC method followed the normal distribution and had a lower range of concentration of total polyphenols. Therefore, EBC method can be considered more reliable than Folin – Ciocalteu method.

**Key words:** Beer, total polyphenols, Folin-Ciocalteu method, EBC 9.11.

**Thesis contains:** 25 pages  
5 figures  
2 tables  
1 supplement  
23 references

**Original in:** Croatian

#### **Defense committee:**

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. <i>Vinko Krstanović</i> , Ph.D., full prof.     | chairperson   |
| 2. <i>Natalija Velić</i> , Ph.D., assistant prof.  | supervisor    |
| 3. <i>Dajana Gašo-Sokač</i> , PhD, assistant prof. | co-supervisor |
| 4. <i>Marina Tišma</i> , Ph.D., assistant prof.    | stand-in      |

**Defense date:** November, 10<sup>th</sup> 2016

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

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. PIVO</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. Definicija i vrste piva .....	2
2.1.2. Proizvodnja piva.....	3
2.1.3. Prehrambena vrijednost i sastojci piva.....	6
2.1.4. Pozitivni zdravstveni učinci piva na ljudsko zdravlje.....	7
<b>2.2. POLIFENOLI</b> .....	<b>8</b>
2.2.1. Značaj polifenola u pivu .....	9
2.2.2. Metode za određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu.....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2. UZORCI PIVA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3. KEMIKALIJE</b> .....	<b>15</b>
<b>3.4. APARATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.5. METODE</b> .....	<b>16</b>
3.5.1. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu Folin-Ciocalteu metodom.....	16
3.5.2. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu EBC metodom (EBC 9.11.) .....	17
3.5.3. Obrada rezultata .....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>18</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>22</b>

<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
<b>7. PRILOZI .....</b>	<b>25</b>

## **1. UVOD**

## 1. UVOD

Pivo je najrasprostranjenije alkoholno piće u svijetu i treće piće po konzumaciji uopće, poslije vode i čaja. Pivo je dugo bilo u sjeni vina, posebno u vinorodnim područjima premda se u svijetu proizvodi i pije 2,5 puta više piva nego vina (Marić, 1995). To je osvježavajuće piće s malom koncentracijom alkohola i karakterističnom aromom hmelja, dobiveno vrenjem pivske sladovine s pivskim kvascima.

Pivo sadrži različite skupine polifenola, poput tanina, fenolnih kiselina, flavona, flavonola i proantocijanida koji imaju značajan utjecaj na stabilnost piva. Flavonoidima i fenolnim kiselinama pripisuje se antioksidacijski potencijal (Eberhardt i sur., 2000; Lee i sur., 2003). Osim antioksidacijskog potencijala, polifenoli imaju važnu ulogu u formiranju okusa, boje, gorčine i trpkosti piva (Pai i sur., 2015). Sa zdravstvenog stajališta, fenolni spojevi imaju važnu ulogu u smanjenju pojave različitih kroničnih bolesti i stanja, poput pretilosti, karcinoma i kardiovaskularnih bolesti (Bečić i Polović, 2013).

Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u različitim uzorcima često se provodi u prehrambenoj industriji, budući da taj podatak ima važnu teorijsku primjenu pri procjeni antioksidacijskog učinka namirnice (Berend i Grabarić, 2008). Metode koje se pri tome najčešće koriste su spektrofotometrijske metode, ponajviše zbog jednostavnosti provođenja, no razvijene su i pouzdanije metode, poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) te elektrokemijskih metoda. Najčešće korištena spektrofotometrijska metoda je Folin-Ciocalteu (FC) metoda. Za određivanje ukupnih polifenola u pivu uobičajeno je koristiti standardnu EBC (The European Brewery Convention) metodu, ali se u znanstvenoj literaturi često može vidjeti kako je za analizu uzoraka piva korištena Folin-Ciocalteu (FC) metoda.

Cilj ovog rada bio je odrediti koncentraciju ukupnih polifenola u 30 uzoraka piva domaćih industrijskih i zanatskih (eng. *craft*) pivovara korištenjem obje metode te usporediti metode na osnovu dobivenih rezultata.

## **2. TEORIJSKI DIO**



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PIVO

Pivo je jedno od najstarijih pripremanih napitaka čemu svjedoče i natpisi pisani klinastim pismom koji potvrđuju kako su Babilonci 7000 pr.n.e. proizvodili napitak sličan današnjem pivu iz ječmenog i pšeničnog slada. Egipćani su također proizvodili pivo čemu svjedoči „Mit o istrebljenju ljudi“ zapisan na zidovima grobnica faraona 18., 19. i 20. dinastije koji datiraju iz druge polovice drugog tisućljeća pr.n.e. Od najranijih vremena do danas, mnoga carstva i samostani su proizvodili svoja piva. Novija povijest pivarstva se razlikuje od zemlje do zemlje, no neposredno je povezana s političkim, ekonomskim, industrijskim i kulturnim razvojem. Upravo na temelju tih odrednica danas su poznata bečka, samostanska, bavarska piva te su razvijena bezalkoholna piva za potrošače koji izbjegavaju ili zbog religije ne piju alkohol, niskokalorična piva, piva s voćni okusima, ekstra jaka piva, ljetna i zimska piva, svijetla, bijela, tamna, crna, ovisno o željama i preferencijama potrošača (Marić, 1995).

#### 2.1.1 Definicija i vrste piva

Prema Pravilniku o pivu (Narodne novine 142/11 i 141/13) pivo je proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanom vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura. Ovisno o vrsti glavnog vrenja, tipovi piva i pivu sličnih proizvoda označavaju se kao proizvodi gornjeg vrenja (za pivo se na deklaraciji mogu koristiti oznake: "ale" ili "alt bier"), donjeg vrenja (za pivo se na deklaraciji može koristiti oznaka: "lager") i samovrenja (Marić, 1995).

Članak 4. navedenog Pravilnika navodi kako je za proizvodnju piva dozvoljeno koristiti sljedeće sastojke: ječmeni i/ili pšenični slad; neslađene žitarice i proizvode od žitarica; karamelni slad i druge sladove za bojenje, prženi ječam i pšenicu; prženi ječmeni i pšenični slad; šećeri i ostale saharide, šećerne i škrobne sirupe; hmelj i proizvode od hmelja; vodu; mikrobne kulture; prehrambene aditive; ugljikov(IV) oksid i dušik te voćne pulpe, voćne kaše, koncentrirane voćne kaše te vodene ekstrakte voća. Prema Njemačkom zakonu o čistoći piva iz 1516. godine (Reinheitsgebot), pivo smije sadržavati jedino slad, hmelj, vodu i kvasac. Ovaj koncept

proizvodnje piva od samo četiri sastojka prihvaćen je i šire od stane proizvođača piva u drugim zemljama.

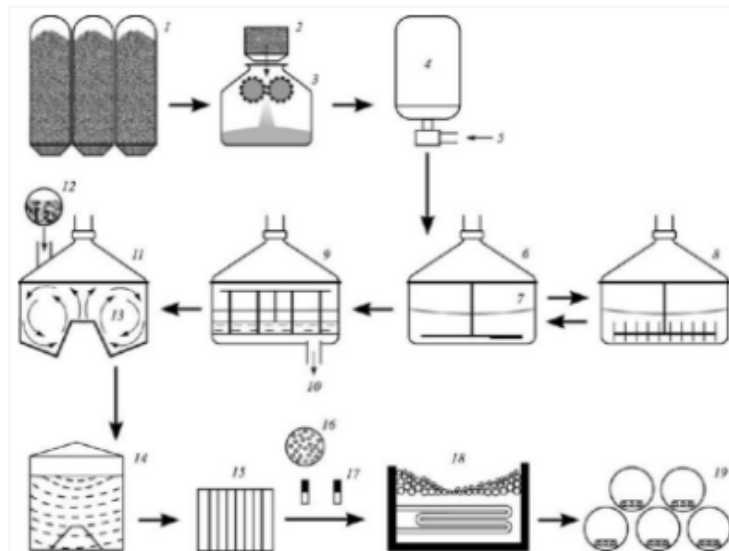
Čiste kulture pivskih kvasaca su sojevi kvasca *Saccharomyces uvarum* te *Saccharomyces cerevisiae*. Pivo proizvedeno korištenjem vrste *Saccharomyces uvarum* naziva se “pivo”, “lager pivo”, “pivo donjeg vrenja” ili “kontinentalni” tip piva. Dobiva se tzv. “hladnim vrenjem”, pri temperaturama od 8 do 16°C. Po završenom vrenju, kvasac se istaloži na dno posude, a mlado pivo prebacuje na odležavanje i dozrijevanje pri 0 do 1 °C od jedan do deset i više tjedana. Pivo proizvedeno korištenjem vrste *Saccharomyces cerevisiae* naziva se “pivom gornjeg vrenja”, a u Engleskoj se upotrebljava naziv “ale”. Dobiva se tzv. “toplim vrenjem” pri temperaturama do 25°C. po završenom vrenju, kvasac ispliva na površinu piva te se uklanja različitim postupcima obiranja. Piva dobivene vrenjem sladovine pomoću kvasca gornjeg vrenja imaju izraženiju aromu na kvasac (Marić, 2009). Afričko pivo se dobiva se pomoću kvasca *Schizomyces pombe*, koji u ekstremnim klimatskim uvjetima (30-40°C) može dati proizvod sličan pivu (<http://www.pbf.unizg.hr>, 2016.).

### **2.1.2. Proizvodnja piva**

Voda je udjelom najzastupljeniji sastojak piva. Slad daje pivu punoću okusa, boju i o sladu ovisi količina ekstrakta. Hmelj je odgovoran za stabilnost piva, daje mu miris i gorčinu a pivski kvasci provode alkoholno vrenje pri čemu šećeri prelaze u alkohol i ugljikov(IV) oksid.

Tehnologija proizvodnje piva se, u osnovi, sastoji od tehnologije proizvodnje sladovine i tehnologije piva. Tehnologija proizvodnje sladovine obuhvaća:

- drobljenje ili meljavu slada
- ukomljavanje ili ekstrakciju sladne prekrupe
- filtraciju komine
- kuhanje i hmeljenje sladovine
- bistenje, aeriranje i hlađenje sladovine



PIVO, proizvodnja – 1. skladište sirovina, 2. vaga, 3. mlin za slad, 4. sladna prekrupa, 5. topla voda, 6. ukomljavanje, hidroliza, ošećerenje, 7. slatka komina, 8. ošećerenje/kuhanje, 9. kada za cijedenje, 10. trop, 11. kotao za kuhanje sladovine, 12. hmelj, 13. sladovina, 14. taložnik za bistrenje sladovine, 15. hlađenje, 16. kvasac, 17. zrak, 18. fermentor za glavno vrenje, 19. tankovi za odležavanje mladoga piva

**Slika 1** Shematski prikaz proizvodnje piva (<http://www.enciklopedija.hr/>, 2016.)

Ukomljavanju prethodi mljevenje slada. Sladna prekrupa 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).

Sladna komina i komina neslađenih žitarica pomiješaju se u komovnjaku gdje dolazi do enzimske hidrolize, pri čemu se škrob razgrađuje do jednostavnih šećera, a proteini do aminokiselina.

Nakon ukomljavanja, sadržaj se filtrira kako bi se odvojilo zrno od sladovine. Potrošeno zrno može se koristiti kao stočna hrana. Filtriranje traje otprilike 2 sata pri temperaturi 75-80 °C.

Filtrirana sladovina se kuha oko 2 sata i u ovoj fazi se dodaje hmelj. Kuhanje se vrši kako bi se oslobodile tvari gorčine iz hmelja, eliminirale nepoželjne hlapljive komponente, sterilizirala sladovina i ustalila konačna koncentracija sladovine. Nakon kuhanja odvajaju se istaloženi proteini u dekanteru. Prije prebacivanja ohmeljene sladovine u fermentacijski tank sladovina

se hladi na temperaturu bioprocesa (ovisno o vrsti kvasca koji se koristi) te se vrši aeracija prije naciepljivanja kvascem. Koriste se odabrani sojevi pivskog kvasca koji pokazuju sposobnost brzog previranja aerirane sladovine do etanola i poželjne koncentracije nusproizvoda vrenja (kiseline, viši alkoholi, aldehidi, ketoni) tijekom vrenja i doviranja, uspješno reduciraju diacetil, dobro flokuliraju i talože se te ostaju stabilni tijekom višekratne upotrebe kako bi pivu dali uvijek isti okus i miris (Marić, 2009).

Mlado pivo nakon fermentacije ima neugodan, specifičan okus i miris po kvascu, sadrži oko 10% od ukupno prisutnih fermentabilnih šećera iz sladovine (oko 1 od 12 % ekstrakta), nizak udjel otopljenog CO<sub>2</sub>, te visoku mutnoću, zbog prisutnosti suspendiranih stanica kvasca koje su preostale u mladom pivu i hladnog proteinskog taloga iz sladovine. Kako bi mlado pivo dobilo sve kvalitete zrelog piva provodi se naknadno vrenje ili odležavanje mladog piva tijekom kojeg dolazi do otapanja CO<sub>2</sub>, ispiranja hlapljivih sumpornih spojeva i izdvajanja suspendiranih sastojaka koji se mogu istaložiti prirodnim putem. Nakon naknadnog vrenja radi se dorada piva gdje se centrifugom odvajaju stanice kvasca i proteina, vrši se filtracija na niskim temperaturama i biološka stabilizacija piva. Pivo se nakon dorade puni u boce ili drugu ambalažu i skladišti u povoljnim uvjetima do konzumacije (Krstanović, 2013).

Osim industrijski proizvedenih piva na tržištu se mogu naći i piva proizvedena u zanatskim (*craft*) pivovarama. Prema definiciji zanatskim pivovarama označavaju se pivovare koje su u većinskom privatnom (neovisnom, nisu dio velikih korporacija) vlasništvu, manjeg su kapaciteta te proizvodnju temelje na tradicionalnom načinu proizvodnje piva, ali i upotrebom netradicionalnih sirovina, što ih čini inovativnima (<https://www.brewersassociation.org>, 2016). Piva zanatskih pivovara obično imaju nešto veći udio ekstrakta od industrijskih piva, a često se i u boci još odvija naknadno vrenje koje traje do otvaranja piva. Mnoge zanatske pivovare ne provode filtraciju i/ili pasterizaciju konačnog proizvoda, što sve utječe na bolje zadržavanje biološki aktivnih tvari (poput polifenola) osjetljivih na povišenu temperaturu i sklonih oksidaciji (Collin i sur., 2013). Inovativnost i kreativnost, kako u proizvodnji, tako i u ambalaži i marketingu, česta su odlika zanatskih pivovara. Još jedna važna, često isticana, odlika zanatskih pivovara je njihova povezanost s lokalnom zajednicom te bliskost s ciljanim skupinama potrošačima.

### 2.1.3. Prehrambena vrijednost i sastojci piva

Po udjelu su glavni sastojci piva voda, etanol, CO<sub>2</sub> i neprevreli dio ekstrakta (suhe tvari) slada. Ovisno o vrsti, udjel vode u pivu iznosi 89 do 93%. Udjel etanola ovisi o koncentraciji suhe tvari u sladovini od koje je pivo proizvedeno i stupnju prevrenja. Ovisno o vrsti piva, udjel alkohola može biti različit, tj. manji od 3% kod "bezalkoholnih" piva i veći od 8% kod ječmenih vina. Lager piva sadrže do 0,5% CO<sub>2</sub> koji mu daje svježinu te utječe na pjenušavost. Stabilnost pjene ovisi o koncentraciji i kemijskom sastavu neprevrelog dijela ekstrakta, pa se piva s više ekstrakta jače pjene. Trajnost pjene ovisi o količini i kemijskom sastavu ekstrakta i različit je za pojedine vrste piva. Mjehurići ugljikovog (IV) oksida koji se dižu s dna prema površini pomažu održavanju pjene. Ekstrakt piva pretežno čine ugljikohidrati i manja količina proteina, aminokiselina, glicerina i sastavnih dijelova hmelja. O sastavu ekstrakta ovisi punoća okusa piva. Kemijski sastav ekstrakta ne ovisi samo o vrsti slada, nego i o načinu proizvodnje sladovine i vođenja fermentacije, odnosno stupnja konačnog prevrenja na kraju fermentacije. U pivu nema masti i kolesterola a sadržava manju količinu slobodnih šećera (Marić, 2009).

Pivo sadrži manje kalorija nego druga pića, ali se često konzumira u većim količinama. Više od polovice energetske vrijednosti piva potječe od alkohola (etanola). Etanol se brzo apsorbira iz želudca i izravno asimilira u energiju, a energetska vrijednost jednog grama etanola iznosi približno 7 kcal ili 29 kJ. Iako pivo sadrži 1,5 do 3 puta manje alkohola, a puno više ekstrakta nego vino, njegova je energetska vrijednost slična energetske vrijednosti vina. Pivo, ovisno o vrsti, sadrži veliki udjel suhe tvari (tzv. nefermentabilni ekstrakt) koju čine ugljikohidrati (75 do 80%), dušikovi spojevi (6 do 9 %) i ostali organski (4 do 5 %) i anorganski sastojci. Ugljikohidratni dio ekstrakta se sastoji od lako razgradivih dekstrina. U litri standardnog piva ima do 800 mg ukupnog dušika, odnosno preko 100 mg različitih aminokiselina. Ostali organski sastojci su: beta glukan, antocijani, vitamini B grupe, antioksidansi, polifenoli, flavonoidi. Stoga, jedan gram suhe tvari piva (pivskog ekstrakta) ima energetske vrijednosti od oko 3,6 kcal ili 15 kJ. Prema tome, energetska vrijednost jedne litre standardnog piva iznosi oko 170 kJ ili 430 kcal što se bitno ne razlikuje od energetske vrijednosti litre obranog mlijeka (Marić, 2009).

U pivu se, uz navedene spojeve nalazi i glicerol u koncentraciji od 1400 do 1600 mg/L. Glicerol je sastojak odgovoran za punoću okusa, utječe na viskozitet i osjećaj slatkoće piva, slično kao

i vina. Beta glukan (12 do 500 mg/L) je hemiceluloza, svojevrsno dijetetsko vlakno podrijetlom iz staničnih membrana ječma i vrlo korisno za probavu. Dvije čaše piva prosječno sadrže 10% preporučenih vrijednosti dnevnog unosa topljivih vlakana, a neka piva osiguravaju i do 30% tih vrijednosti. Osim što potrošače održavaju u dobroj fizičkoj formi, vlakna usporavaju proces probave i apsorpcije hrane i snižavaju razinu kolesterola, a posljedica je smanjenje rizika od srčanih bolesti.

Antocijani su fenolni spojevi iz slada i hmelja koji djeluju kao antioksidansi i «hvatači» slobodnih radikala, pa imaju isti blagotvorni učinak na zdravlje potrošača kao i oni iz crnog vina. Jedna čaša piva sadrži dvostruko veću količinu antioksidansa nego čaša bijelog vina, ali i dvostruko manju količinu nego crnog vina. No, antioksidansi u crnom vinu uglavnom čine velike molekule koje organizam teže apsorbira za razliku od malih molekula u pivu.

Pivo je bogat izvor vitamina. Ono je posebno bogato vitaminima B skupine kao što su niacin, riboflavin (B2), piridoksin (B6), folati (B9) i kobalamin (B12). Pola litre piva dnevno zadovoljava 17% dnevnih potreba ljudskog organizma za piridoksinom (B1), riboflavinom (B2) i biotinom (vitamin H), a čak do 45% za folnom kiselinom (B9). Slično vrijedi i za mineralne sastojke kojima je pivo bogato, posebno magnezijem, kalijem, silicijem i fosforom a siromašno kalcijem, natrijem i nitratima. Pivo je bogat izvor silicija koji potječe iz ječma, a lako se apsorbira u organizmu. Ako se tome dodaju poznati pozitivni zdravstveni učinci ovih minerala kojima je pivo bogato i negativni učinci onih kojima je siromašno, čini se da se pivo može smatrati ne samo tekućom, nego uvjetno i svojevrsnom funkcionalnom hranom (Marić, 1995).

#### **2.1.4. Pozitivni zdravstveni učinci piva na ljudsko zdravlje**

Mnoga istraživanja su potvrdila povezanost umjerene konzumacije alkohola i smanjenog rizika obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti. Tako su ispitanici koju su dnevno konzumirali između 250 mL i 750 mL piva imali najmanji rizik obolijevanja od srčanih bolesti. Smatra se da alkohol podiže razinu lipoproteina visoke gustoće u krvi, poznatijeg kao „dobri“ kolesterol koji sprječava taloženje „lošeg“ kolesterola u žilama. Također, smatra se kako ispijanje piva, posebno u društvu, smanjuje razinu stresa što pozitivno utječe na zdravlje srca. Blagotvoran

učinak piva na zdravlje je povezan i s gorkim tvarima koja dolaze iz hmelja a pripisuje im se sedativni učinak (Bamforth, 2002).

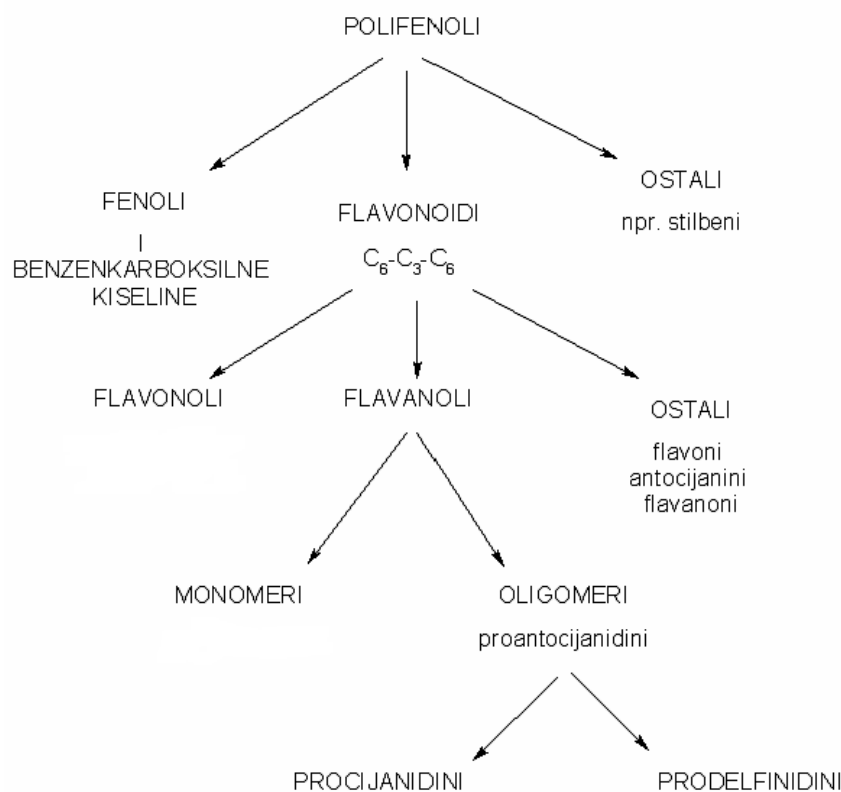
Pivo ima pozitivan učinak i na zdravlje želuca jer je dokazano kako se umjerenom konzumacijom slabijih alkoholnih pića, u koja se ubraja i pivo, smanjuje mogućnost infekcije želučane sluznice bakterijom *Helicobacter pylori* (Bamforth, 2002).

Umjerena konzumacija piva i vina, zbog velikog sadržaja polifenola i antioksidansa, pozitivno utječe na kognitivne sposobnosti i smanjuje mogućnost demencije u starosti. Izoflavoni u pivu imaju potencijalni antikancerogeni učinak, no količina istih u pivu je 20 puta manja od efektivne doze koja se primjenjuje u liječenju. Nadalje, zbog strukture slične estrogenu, izoflavoni mogu imati pozitivan učinak na hormonski status žena u menopauzi. Silicijska kiselina, koja je u malim količinama prisutna u pivu, pozitivno utječe na izlučivanje aluminija i na rad bubrega (Bamforth, 2002).

## 2.2. POLIFENOLI

Fenolni spojevi u prirodi su prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Polifenoli u biljkama mogu djelovati kao signalne molekule te sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko djelovanje), djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlače oprašivače, pridonose pigmentaciji biljaka, dok u namirnicama pridonose gorčini, boji, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti (Berend i Grabarić, 2008). U širem smislu nazivaju se polifenolima, a uključuju spojeve različite kemijske strukture od jednostavnih hidrokscimetnih kiselina, antocijanina (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina. Na **slici 2.** prikazana je osnovna podjela polifenola. Premda se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, gledano s kemijskog stajališta, osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova.

Literaturni podaci upućuju kako polifenoli imaju važnu ulogu u prevenciji bolesti ljudi, uz vitamine i minerale (Berend i Grabarić, 2008). Dokazana su protuupalna, protualergijska i protukancerogena djelovanja nekih polifenolnih spojeva, kao i namirnica koje ih sadržavaju (Stratil i sur., 2005).



**Slika 2.** Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008)

Spojevi iz skupine flavonoida pokazali su se kao najjači antioksidansi. Do sada je otkriveno barem osamnaest flavonoida koji imaju veću antioksidacijsku učinkovitost od vitamina C i E. Antioksidacijska aktivnost polifenola očituje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih molekula, ali i inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres. Ujedno, polifenoli imaju sposobnost vezanja ugljikohidrata i proteina pomoću hidroksilnih skupina (Berend i Grabarić, 2008).

### 2.2.1 Značaj polifenola u pivu

Pivo je bogato različitim skupinama polifenola od koji su najznačajniji tanini (posebno u tamnim pivima), fenolne kiseline, flavoni, flavonoli i proantocijanidi. Većina polifenolnih spojeva u pivu podrijetlom je iz slada, no oko 30% dolazi iz hmelja. Taj postotak može i varirati ovisno o sorti i načinu uzgoja hmelja (Collin i sur., 2013).



Osim njihovog antioksidacijskog potencijala, svi ovi spojevi imaju važnu ulogu u formiranju okusa i arome piva, posebno gorčine i trpkosti. Tijekom sazrijevanja piva dolazi do značajnih promjena okusa. Odležavanjem pivo gubi gorčinu i trpkost, a pojačava se slatkasti okus koji podsjeća na karamelu. Ovo je posljedica oksidacije trans masnih kiselina i karbonilnih spojeva koji nastaju, a koji se u pivu nalaze u izrazito niskim koncentracijama (Aron i Shellhammer, 2010). Flavonoidi u pivu (odgovorni za trpkost) poželjni su u koncentracijama između 1 i 20 mg/L. Piva koja imaju nižu pH vrijednost (između 4 i 4,2) imaju izraženiju trpkost koja se povećava ukoliko se pivo nepravilno skladišti. Također, flavonoidi mogu pridonositi i gorčini piva, no osnovna gorčina dolazi od  $\alpha$ -kiselina iz hmelja (Collin i sur., 2013). Flavonoidi su velikim dijelom odgovorni za boju tamnih i crnih piva. Antocijani su flavonoidni polifenoli koji u prirodi dolaze u obliku antocijanina, odnosno glikozida pojedinih antocijanidina (aglikona). Neke grupe žutih i svijetlih flavonoidnih pigmenta koji se mogu naći u biljkama uključuju flavonole, flavone, čalkone, flavonide i izoflavonoide. Antocijani u pivu potječu iz ječma. Bez obzira što su mnoge od ovih tvari bezbojne, prilikom rukovanja i prerade mogu se promijeniti u obojene produkte. Primjer su crvena piva kojima se dodaje pšenična krupica i posebnim tehnološkim procesima se razvija crvenkasto-borda boja (Collin i sur., 2013).

Tanini su esteri aromatskih hidroksikarboksilnih kiselina s viševalentnim alkoholima ili šećerima. U pivo tanini dospijevaju iz hmelja tijekom proizvodnje. Blagotvorno djelovanje tanina na ljudsko zdravlje očituje se kroz njihovu sposobnost vezanja na bjelančevine kože ili sluznice te ih čine čvršćima i opornijima, pospješuju zarastanje rana te imaju antibakterijsko i antimikrobno djelovanje (Marić, 1995). Tanini imaju i neke negativne utjecaje na zdravlje jer vežu bjelančevine i metalne ione u neprobavljive komplekse. Također kod ekstremno velikog unosa tanina kod ljudi je dokazana povećana mogućnost razvoja raka jednjaka i grla (Klapec i Šarkanj, 2014). Osim pozitivnog djelovanja na zdravlje, tanini imaju velik utjecaj na kvalitetu i okus piva. Tamna piva sadrže daleko veću količinu tanina od svijetlih što se očituje tamnijom bojom piva i jačom gorčinom.

Od fenolnih kiselina u pivu se nalaze benzojeva i cimetna kiselina te njihovi derivati. Fenolne kiseline su obojene u razrijeđenoj alkoholnoj otopini, a oksidacijom prelaze u žute pigmente. One ne utječu na okus i miris, ali su prekursori za hlapive fenolne spojeve. U dodiru s kisikom fenolne tvari lako oksidiraju. Fenolni spojevi pridonose senzorskim svojstvima odnosno okusu,

aromi i boji te nutritivnoj vrijednosti namirnicama biljnog podrijetla te mnogobrojnim proizvodima dobivenim preradom istih uključujući i piva (Cheynier, 2005 ).

Također, polifenoli imaju značajan utjecaj na stabilnost piva (Pai i sur., 2015). Zbog reakcija između proteina i polifenola dolazi do koloidne nestabilnosti piva što značajno ograničava rok trajanja piva. Koloidnu nestabilnost će dodatno potaknuti prisutnost kisika, visoka temperatura i izloženost svjetlu, stoga je najbolje pivo čuvati u tamnim staklenim bocama, zatvoreno, u prostorijama s nižom temperaturom. Kako bi pivari uklonili tvari mutnoće provode njihovu adsorpciju na bentonitu ili silikagelu te hidrolizu ili taloženja tanina. Iako su to učinkovite metode za uklanjanje koloidnih čestica, negativno utječu na pjenu piva (Collin i sur., 2013). Upravo zbog prisutnosti polifenola u pivu, očuvanje koloidne stabilnosti i ujednačenosti okusa je veliki tehnološki izazov. Potrošači očekuju bistro i koloidno stabilno pivo bez taloga. Polifenoli, a posebno tanini, uz proteine, ugljikohidrate i metalne ione doprinose stvaranju mutnoće piva (Aron i Shellhammer, 2010). Proteini u pivu u prisutnosti polifenola stvaraju tzv. PP (polifenol-protein) komplekse koji povećavaju mutnoću piva i moraju se uklanjati filtracijom ili sedimentacijom. Nastajanje navedenih kompleksa može se suzbiti i produljenim vremenom odležavanja piva u hladnjačama, bistrenjem želatinom, dodavanjem proteolitičkih enzima i adsorbensa. Od 80 vrsta polifenola koji su nađeni u pivu, proantocijanidini imaju najznačajniji ulogu u stvaranju mutnoće piva. Flavonoidi se gotovo uopće ne vežu u PP komplekse i nemaju značaja u zamućenju piva (Aron i Shellhammer, 2010).

### **2.2.2. Metode za određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu**

Podatak o koncentraciji ukupnih polifenola u pivu važan je kako zbog njihovih negativnih učinaka na stabilnost piva te stvaranje mutnoće, tako i zbog pozitivnih zdravstvenih učinaka uslijed njihove antioksidacijske aktivnosti. Metode koje se pri tom najčešće koriste uključuju spektrofotometrijske metode, zbog jednostavnosti provođenja i prihvatljive cijene. Standardna EBC metoda za ukupne polifenole (EBC 9.11.) u sladovini i pivu temelji se na reakciji  $\text{Fe}^{3+}$  iona s polifenolima u alkalnoj otopini, pri čemu nastaju obojeni željezovi kompleksi karakteristične smeđe boje čije se intenzitet s ciljem kvantifikacije polifenola mjeri spektrofotometrijski ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ).

Folin-Ciocalteu metoda je najkorištenija metoda za određivanje koncentracije ukupnih polifenola u različitim uzorcima, primjerice u vinima. Reakcijom polifenola i Folin-Ciocalteuovog reagensa (smjesa fosfotungstične i fosfomolibdenske kiseline) u blago alkalnim uvjetima dolazi do stvaranja relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa koji se mjeri spektrofotometrijski pri 760 nm.

Istraživanja u kojima je korištena Folin-Ciocalteu metoda potvrdila su kako je pivo dobar izvor polifenola te kako tamna piva imaju veću koncentraciju ukupnih polifenola od svijetlih piva, pri čemu su se rasponi koncentracija kretali od 100 mg/L za svijetla piva do čak više od 800 mg/L za tamna, jaka piva (Mitić i sur., 2013; Granato i sur. 2010; Piazzon i sur., 2010). Istraživanja su također pokazala kako je koncentracija polifenola u istim uzorcima piva određena EBC metodom manja od one određene Folin-Ciocalteu metodom (Kalušević i sur., 2011).

Ostale metode uključuju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) koja je znatno osjetljivija od spektrofotometrijskih metoda te omogućuje identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih fenolnih spojeva karakterističnih za neki uzorak (Mitić i sur., 2013) te elektrokemijske metode.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. ZADATAK**

Zadatak ovog diplomskog rada bio je odrediti koncentraciju ukupnih polifenola u 30 uzoraka piva domaćih industrijskih i zanatskih pivovara korištenjem Folin-Ciocalteu metode i standardne EBC metode te usporediti navedene metode.

### **3.2. UZORCI PIVA**

Po tri boce (od 330 do 500 mL) odabranih vrsta piva nabavljeno je na tržištu te je njihov pregled i opis dan u tablici 1. Kako bi dobili reprezentativni uzorak, sadržaj triju boca svakog uzorka je izmiješan i homogeniziran. Svi uzorci piva su prije analiza dekrabonizirani u struji dušika, uz miješanje te su odmah potom preneseni su u plastične epruvete od 50 mL i zamrznuti do provođenja analiza.

**Tablica 2.** Ispitivani uzorci piva

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

### 3.3. KEMIKALIJE

KEMIKALIJE	PROIZVOĐAČ
Folin-Ciocalteu reagens	KEMIKA, Zagreb, Hrvatska
Galna kiselina	KEMIKA, Zagreb, Hrvatska
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	GRAM-MOL d.o.o, Zagreb, Hrvatska
CMC/EDTA reagens	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, SAD
(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	KEMIKA, Zagreb, Hrvatska
NH <sub>3</sub>	KEMIKA, Zagreb, Hrvatska

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

### 3.4. APARATURA

#### ***Vaga***

Kemikalije za pripremu otopina vagane su na analitičkoj vagi ABT (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Njemačka).

#### ***pH metar***

Za određivanje pH vrijednosti uzoraka piva korišten je pH metar HI2020 (HANNA Instruments, SAD).

#### ***Magnetska miješalica***

Za homogeniziranje uzoraka korištena je magnetska miješalica (IKA, Njemačka).

## ***Spektrofotometar***

Koncentracija ukupnih polifenola određena je spektrofotometrijski, pomoću UV-VIS spektrofotometra Specord 200 (Analytik Jena, Njemačka) (slika 3.).



**Slika 3.** Spektrofotometar

## **3.5. METODE**

### **3.5.1. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu Folin-Ciocalteu metodom**

Ukupne polifenole određivano je prema modificiranoj Folin-Ciocalteu metodi prema Zhao i suradnicima (2009).

U odmjernu tikvicu volumena 10 mL dodano je 0,05 mL dekarboniziranog uzoraka te 0,45 mL destilirane vode. Nakon toga u tikvicu je dodano 2,5 mL deset puta razrijeđenog Folin-Ciocalteuovog reagensa. Reakcijska smjesa je dobro izmiješana te je ostavljena stajati 5 minuta u mraku. Zatim je dodano 2 mL 7,5% otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , dobro izmiješano te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do 10 mL. Nakon sat vremena stajanja u mraku određena je apsorbancija uzoraka pri valnoj duljini od 760 nm. Koncentracija ukupnih polifenola izračunata je na osnovu određenih apsorbancija korištenjem kalibracijske krivulje za galnu kiselinu ( $y=0,0005x - 0,0101$ ,  $R^2= 0,9985$ ) te su rezultati izraženi kao  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{L}$ .



### **3.5.2. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu EBC metodom (EBC 9.11.)**

EBC metoda za ukupne polifenole (EBC 9.11.) je standardna (službena) metoda za određivanje ukupnih polifenola u pivu.

Pripremljena je svježa otopina CMC/EDTA reagensa koncentracije 10 g/L. Polagano je dodano 10 g CMC i 2 g EDTA u 500 mL destilirane vode i izmiješano. Nakon homogenizacije, otopina je prenesena u odmjernu tikvicu od litre i nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Otopina željezovog reagensa koncentracije 5,6 g Fe<sup>3+</sup>/L pripremljena je otapanjem 3,5 g zelenog amonij željezo citrata u 100 mL destilirane vode. Amonijev reagens pripremljen je otapanjem 100 mL koncentriranog amonijaka u 300 mL destilirane vode.

U odmjernu tikvicu od 25 mL dodano je 10 mL dekarboniziranog uzorka piva i 8 mL CMC/EDTA reagensa te je snažno izmiješano. Zatim je dodano 0,5 mL željezovog reagensa i 0,5 mL amonijeva reagensa te snažno izmiješano.

U slučaju tamnih piva rađeno je razrijeđenje uzorka na način da je u odmjernu tikvicu od 50 mL dodano 10 mL razrijeđenog piva i 8 mL CMC/EDTA reagensa te je snažno izmiješano. Zatim je dodano 0,5 mL željezovog reagensa i 0,5 mL amonijeva reagensa, izmiješano te nadopunjeno vodom do 50 mL.

Nakon 10 minuta stajanja uzorka, očitana je apsorbancija uzorka na valnoj duljini od 600 nm. Koncentracija ukupnih polifenola izračunata je prema sljedećem izrazu:

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

P= koncentracija ukupnih polifenola (mg/L)

A=apsorbancija uzorka mjerena na 600 nm

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

### **3.5.3. Obrada rezultata**

Za obradu i statističku obradu dobivenih rezultata korišteni su programski paketi MS Excel 2010 te Statistica 12.0. Korišteni su sljedeći statistički testovi: Shapiro-Wilksov W test, Mann-Whitney U-test te T-test (statistički značajnim smatrao se  $p < 0,05$ ).



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Pivo je važan izvor fenolnih spojeva, čija prisutnost utječe na okus, boju i senzorska svojstva piva te osiguravaju visok antioksidacijski potencijal piva.

Usporedni prikaz rezultata određivanja ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom (Zhao i sur., 2010) i standardnom EBC metodom za pivo (EBC 9.11) dan je u tablici 2.

**Tablica 2.** Koncentracije ukupnih polifenola u uzorcima piva određene Folin-Ciocalteu metodom i EBC metodom.

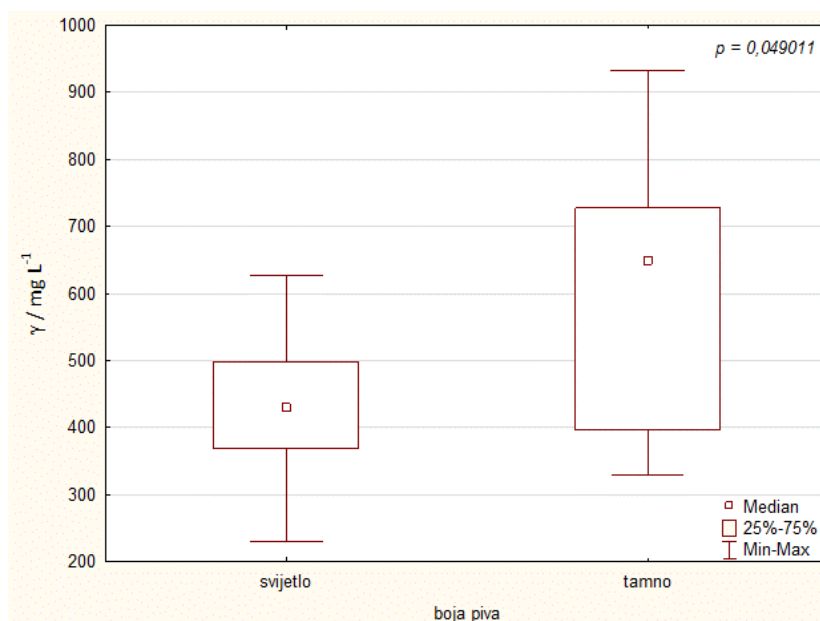
Oznaka uzorka	Pivovara	Vrsta piva	Ukupni polifenoli Folin-Ciocalteu $\gamma$ /(mg <sub>GAE</sub> /L)	Ukupni polifenoli EBC $\gamma$ /(mg/L)
8	Industrijsko	Svijetlo	471,37	147,61
9	Industrijsko	Svijetlo	627,47	120,03
10	Industrijska	Svijetlo	230,33	76,57
18	Industrijsko	Svijetlo	422,22	109,69
20	Industrijsko	Svijetlo	348,81	98,36
21	Industrijsko	Svijetlo	302,70	148,71
23	Industrijsko	Svijetlo	375,60	81,30
26	Industrijsko	Svijetlo	391,50	158,10
27	Industrijsko	Svijetlo	393,23	166,71
24	Industrijsko	Pšenično	368,40	151,07
7	Industrijsko	Crveno	501,17	204,23
19	Industrijsko	Crno	614,43	206,31
22	Industrijsko	Crno	907,80	279,29
25	Industrijsko	Crno	686,47	253,57
28	Industrijsko	Crno	425,50	198,10
3	Zanatsko	Svijetlo	498,03	215,28
5	Zanatsko	Svijetlo	615,13	210,59
11	Zanatsko	Svijetlo	601,53	136,28
12	Zanatsko	Svijetlo	465,72	129,87
13	Zanatsko	Svijetlo	437,77	235,83
15	Zanatsko	Svijetlo	463,32	168,82
16	Zanatsko	Svijetlo	357,02	157,14
34	Zanatsko	Svijetlo	366,27	149,75
2	Zanatsko	Pšenično	516,23	119,06
14	Zanatsko	Crveno	329,97	227,77
29	Zanatsko	Tamno	348,53	220,36
6	Zanatsko	Tamno	932,57	382,31
17	Zanatsko	Tamno	704,43	254,45
1	Zanatsko	Tamno, jako	750,57	251,26
4	Zanatsko	Crno	696,07	286,26

Koncentracija ukupnih polifenola određenih Folin-Ciocalteu metodom u analiziranim uzorcima piva kretala se u rasponu od 230,33 (uzorak 10) do 932,57 mg/L (uzorak 6) izraženo kao ekvivalent galne kiseline. Pri tome je raspon za svijetla piva iznosio od 230,33 do 627,47 mg/L, dok je raspon za tamna piva iznosio od 329,97 do 932,57 mg/L. Dobivene vrijednosti za svijetla piva u skladu su s vrijednostima koje navode Pai i suradnici (2015) koji su određivali ukupne polifenole u 15 uzoraka svijetlih lager piva, pri čemu je taj raspon iznosio od 150 do 620 mg/L izraženo kao ekvivalent taninske kiseline. Mitić i suradnici (2014) također navode velike koncentracije ukupnih polifenola određene u svijetlim i tamnim pivima primjenom ove metode, u iznosu od 331,88 do 545,32 mg<sub>GAE</sub>/L za svijetla piva i od 446,38 do 510,97 mg<sub>GAE</sub>/L za tamna piva. Zhao i suradnici (2010.) određivali su ukupne polifenole u 34 uzoraka svijetlih (lager) piva te je dobiveni raspon koncentracija ukupnih polifenola bio niži od rezultata dobivenih ovim istraživanjem i iznosio je od 152,01 do 339,12 mg<sub>GAE</sub>/L. Granato i suradnici (2010) određivali su ukupne polifenole u 18 uzoraka svijetlih lager piva i 11 uzoraka tamnih „ale“ piva. Rasponi koncentracija i za svijetla (119,96 – 200,21 mg<sub>GAE</sub>/L) i za tamna piva (280,10 – 525,93 mg<sub>GAE</sub>/L) bili su znatno niži od rezultata dobivenih ovim istraživanjem.

Rezultati određivanja koncentracije ukupnih polifenola EBC metodom znatno su manji za sve uzorke piva u odnosu na rezultate dobivene određivanjem Folin-Ciocalteu metodom. Koncentracija ukupnih polifenola za sve uzorke kretala se u rasponu od 76,57 (uzorak 20) do 382,31 mg/L (uzorak 6), pri čemu su rasponi za svijetla piva i tamna piva iznosili od 76,57 do 235,83 mg/L, odnosno 149,75 do 382,31 mg/L. Slična diskrepancija u dobivenim rezultatima određivanja ukupnih polifenola korištenjem ovih dvaju metoda vidljiva je iz rezultata koje su objavili Kalušević i suradnici (2011) koji su analizirali 4 uzorka piva s dodatkom meda te jedan kontrolni uzorak. Raspon koncentracija ukupnih polifenola određenih metodom prema Folin-Ciocalteu iznosio je 379,50 do 443,30 mg<sub>GAE</sub>/L, dok je za iste uzorke analizirane EBC metodom taj raspon iznosio od 138,33 do 215,33 mg/L.

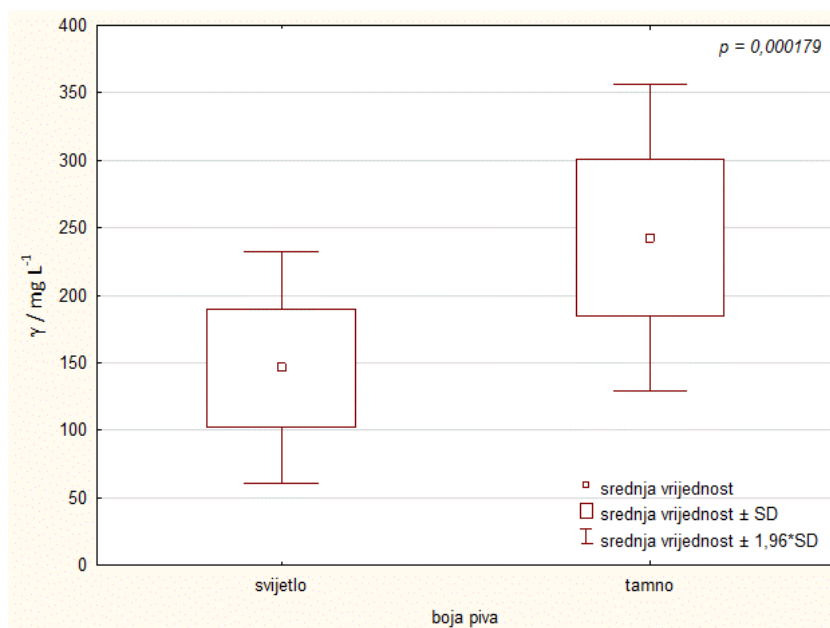
Kako bi se provjerio oblik distribucije rezultata dobivenih korištenjem obje metode, za provjeru normaliteta distribucije korišten je Shapiro-Wilksov W test. Rezultati dobiveni korištenjem Folin-Ciocalteu metode nisu distribuirani normalno te je za daljnju statističku obradu, odnosno provjeru značajnosti razlike između svijetlih i tamnih piva korišten neparametrijski Mann-Whitney U-test. Test je pokazao kako postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih polifenola između svijetlih i tamnih piva ( $p = 0,049$ ), što se može vidjeti

na **slici 4**. Zbog nenormalne distribucije podataka na **slici 4**, je prikazan medijan, interkvartalni raspon te minimalna i maksimalna izmjerena vrijednost.



**Slika 4.** Kutijasti dijagram distribucije izmjerenih koncentracija ukupnih polifenola korištenjem Folin-Ciocalteu metode.

Rezultati dobiveni korištenjem EBC metode normalno su distribuirani te je za provjeru značajnosti razlike između svijetlih i tamnih piva korišten je T-test, koji je pokazao kako postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih polifenola između svijetlih i tamnih piva ( $p=0,0000016$ ), što je prikazano na **slici 5**. Zbog normalne distribucije podataka na **slici 5**, je prikazana srednja vrijednost, standardna devijacija te  $1.96 \cdot SD$  kao interval pouzdanosti za 95% vrijednosti izmjerenih rezultata ( $k=2\sigma$ ).



**Slika 5.** Kutijasti dijagram distribucije izmjerenih koncentracija ukupnih polifenola korištenjem EBC metode.

Usporedbom dvaju korištenih metoda, može se zaključiti kako je standardna EBC metoda (EBC 9.11), koja je pokazala normalnu raspodjelu rezultata te manje vrijednosti koncentracije ukupnih polifenola (bliže očekivanim vrijednostima s obzirom na tehnološki proces i korištene sirovine), pouzdanija za korištenje u kompleksnom matriksu poput piva, od široko korištene Folin-Ciocalteu metode.

## **5. ZAKLJUČAK**



## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Provjerom normaliteta distribucije utvrđeno je kako rezultati dobiveni korištenjem Folin-Ciocalteu metode nisu normalno distribuirani, dok su rezultati dobiveni korištenjem EBC metode normalno distribuirani.

Koncentracija ukupnih polifenola određenih Folin-Ciocalteu metodom u analiziranim uzorcima piva kretala se u rasponu od 230,33 do 932,57 mg<sub>GAE</sub>/L, pri čemu je utvrđena statistički značajna razlika između koncentracije ukupnih polifenola u svijetlim i tamnim analiziranim pivima .

Koncentracija ukupnih polifenola određenih EBC metodom za sve uzorke kretala se u rasponu od 76,57 do 382,31 mg/L, pri čemu je utvrđena statistički značajna razlika između koncentracije ukupnih polifenola u svijetlim i tamnim analiziranim pivima.

Rezultati određivanja koncentracije ukupnih polifenola EBC metodom znatno su manji za sve uzorke piva u odnosu na rezultate dobivene određivanjem Folin-Ciocalteu metodom.

Standardna EBC metoda, pokazala je normalnu raspodjelu rezultata te manje vrijednosti koncentracije ukupnih polifenola te se može smatrati pouzdanijom za određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu od Folin-Ciocalteu metode.

## **6. LITERATURA**

## 6. LITERATURA

- EBC, European Brewery Convention : Total Polyphenols in Beer by Spectrophotometry. 9.11. <http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=477>
- Aron PM, Shellhammer TH (2010.) A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. *Journal of The Institute of Brewing* 116: 369-380.
- Bamforth CW (2002.) Nutritional aspects of beer. *Nutrition Research* 22:227-237.
- Bečić I, Polović I: Utjecaj područja uzgoja i termina berbe na koncentraciju antocijana, elaginske kiseline i derivata te antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost sjemenki nara (*Punica granatum* L.). *Diplomski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2013.
- Berend S, Grabarić Z (2008.) Flow-injection method in determining food polyphenol. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 59:205-212.
- Boyer J, Liu RH ( 2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* 3(5): 1475-2891.
- Cheynier V (2005.) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81(Suppl): 223S-229S.
- Collin S, Jerkovic V, Bröhan M, Callemien D (2013.) Polyphenols and Beer Quality. <http://www.springerreference.com/docs/html/chapterdbid/363148.html>, pristupljeno 27.10.
- Eberhardt MV, Lee CY, Lui RH (2000.) Nutrition-antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405: 903-904.
- Granato D, Favalli Branco G, Fonseca Faria J, Gomes Cruz A (2011.) Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color , phenolic compounds , and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 563–571.
- Kalušević A, Uzelac G, Veljović M, Despotović S, Milutinović M, Leskošek-Čukalović I, Nedović V (2011.) The antioxidant properties of honey beer. *Food Process Engineering a Changing World*,

*Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11)*, 3: 2057-2058.

Klapec T, Šarkanj B: Opasnosti vezane uz hranu. *Interna skripta*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

Lee K, Kim Y, Kim D, Lee H, Lee C (2003.) Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 6516-6520.

Marić V, Nadvornik Z: Pivo tekuća hrana, Zagreb 1995.

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

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

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

Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I (2007.) Intake and bioaccessibility of total polyphenols in whole diet. *Food Chemistry* 101: 492–501.

Scalbert A, Williamson G (2000.) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130: 2073S–2085S.

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

<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=48509>, pristupljeno 5.9.2016.

<https://www.brewersassociation.org/statistics/craft-brewer-defined/>, pristupljeno 27.10.2016.

<http://www.pbf.unizg.hr/content/download/24268/94922>, pristupljeno 27.10.2016.

## 7. PRILOZI

### Prilog 1 Kalibracijska krivulja galne kiseline

