# Antioksidativna aktivnost i polifenolni profil različitih tipova piva pakiranih u smeđu staklenu ambalažu

**Bilić, Monika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:871138

*Rights / Prava:* Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

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

**Monika Bilić**

# ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST I POLIFENOLNI PROFIL RAZLIČITIH TIPOVA PIVA PAKIRANIH U SMEĐU STAKLENU AMBALAŽU

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2019.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**DIPLOMSKI RAD**

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

**Diplomski sveučilišni studij prehrambenog inženjerstva**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija
**Nastavni predmet:** Biotehnološka proizvodnja hrane
**Tema rada** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018. održanoj 12. srpnja 2018. godine.
**Mentor:** doc. dr. sc. *Kristina Mastanjević*
**Komentor:** doc. dr. sc., *Ante Lončarić*
**Pomoć pri izradi** *dr. sc. Tihomir Kovač*

# ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST I POLIFENOLNI PROFIL RAZLIČITIH TIPOVA PIVA PAKIRANIH U SMEĐU STAKLENU AMBALAŽU

*Monika Bilić*, 386-DI

**Sažetak:**
Polifenoli su skupina spojeva koji značajno pridonose ukupnom okusu, mirisu i aromi piva, a osim na senzorska svojstva, utječu i na koloidnu stabilnost piva. Potječu iz biljnog materijala, slada i hmelja, te njihova koncentracija ovisi o vrstama i količini slada i hmelja koji se koristi u proizvodnji određenog tipa piva, ali i o samom procesu proizvodnje (filtracija, utjecaj kisika pri pakiranju i sl.). Polifenoli u pivu se sve više istražuju zbog svog pozitivnog utjecaja na zdravlje ljudi, odnosno njihove antioksidacijske aktivnosti. Zadatak ovog rada je odrediti antioksidativnu aktivnost i polifenolni profil različitih tipova piva (lager, pils, crno, tamno), pakiranih u smeđu staklenu ambalažu, a dostupnih na našem tržištu. Smeđa staklena ambalaža je odabrana jer se smatra najpogodnijom ambalažom tijekom skladištenja piva. Cilj rada je sukladno dobivenim rezultatima utvrditi koji polifenoli su najzastupljeniji u istraživanim pivima, koje pivo sadrži najviše polifenola i najveću antioksidativnu vrijednost.

**Ključne riječi:** polifenoli, pivo, antioksidativna aktivnost

**Rad sadrži:** 33 stranica
5 slika
8 tablica
0 priloga
31 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

| | | |
|---|---|---|
| 1. | doc. dr. sc. *Bojan Šarkanj* | predsjednik |
| 2. | doc. dr. sc. *Kristina Mastanjević* | član - mentor |
| 3. | doc. dr. sc. *Ante Lončarić* | član - komentor |
| 4. | dr. sc. *Tihomir Kovač, znanstveni savjetnik* | zamjena člana |

**Datum obrane:** 30. rujna 2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**GRADUATE THESIS**

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**
**Faculty of Food Technology Osijek**
**Department of process engineering**
**Subdepartment of bioprocess engineering**
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Graduate program of Food Engineering**

**Scientific area:** Biotechnical sciences
**Scientific field:** Food technology
**Course title:** Biotechnological food production
**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X. held on July 12, 2018.
**Supervisor:** *Kristina Mastanjević*, PhD, assistant prof.
**Co-supervisor:** *Ante Lončarić*, doc. dr. sc.
**Technical assistance:** Tihomir Kovač, dr. sc.

# ANTIOXIDATIVE ACTIVITY AND POLYPHENOLIC PROFILE OF DIFFERENT TYPES OF BEER PACKED IN BROWN GLASS PACKAGING

*Monika Bilić,* 386-DI

**Summary:**
Polyphenols are group of compounds that significantly contribute to the overall taste, beer aroma, and in addition to its sensory properties, they also affect the colloidal stability of beer. They originate from plant material, malt and hops, and their concentration depends on the types and quantity of malt and hops used in the production of a particular type of beer. The amount of polyphenols also depends on the production process itself (filtration, the influence of oxygen on packaging, etc.). Polyphenols in beer are increasingly being researched for their positive effect on human health, since they possess high antioxidant activity. The aim of this study was to determine the antioxidant activity and polyphenolic profile of different types of beer (lager, pils, black, dark), packed in brown glass packaging and available in our market. Brown glass packaging was selected because it is considered the most suitable packaging during beer storage. The aim of this study was to determine which polyphenols are the most represented in the studied beers, which beer contains the highest polyphenols and the highest antioxidant value.

**Key words:** polyphenols, beer, antioxidant activity

**Thesis contains:** 33 pages
5 figures
8 tables
0 supplements
31 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

1. *Bojan Šarkanj*, PhD, assistant prof. — chair person
2. *Kristina Mastanjević*, PhD, assistant prof. — supervisor
3. *Ante Lončarić*, PhD, assistant prof. — co-supervisor
4. *Tihomir Kovač*, PhD, scientific consultant — stand-in

**Defense date:** September 30, 2019

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

# Sadržaj


1.**UVOD** ... 1
2.**TEORIJSKI DIO** ... 3
2.1.Vrste i podjele piva ... 4
2.1.1.Podjela piva prema vrsti kvasca ... 4
2.1.2.Podjela piva prema masenom udjelu ekstrakta ... 5
2.1.3.Podjela piva prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine ... 5
2.1.4.Podjela piva prema boji ... 5
2.1.5.Podjela piva prema volumnom udjelu alkohola ... 6
2.2.**SASTAV PIVA** ... 6
2.2.1. Voda ... 6
2.2.2.Alkohol i ekstrakt ... 7
2.2.3.Organski sastojci piva ... 8
2.2.4.Minerali u pivu ... 8
2.3.**POLIFENOLI** ... 9
2.3.1.Polifenoli u pivu ... 10
2.3.2.Antioksidativnost polifenola ... 11
2.4.**PROIZVODNJA PIVA** ... 11
2.4.1.Proizvodnja slada ... 12
2.4.2.Proizvodnja pivske sladovine ... 13
2.4.3.Vrenje pivske sladovine ... 13
2.4.4.Odležavanje piva ... 14
2.4.5.Filtracija i punjenje u boce ... 14
2.5.Ambalaža piva ... 15
2.5.1.Osnovna pravila punjenja piva ... 15
2.5.2.Staklena ambalaža ... 16
3.**EKSPERIMENTALNI DIO** ... 17
3.1.Cilj i zadatak ... 18
3.2.**MATERIJALI I METODE** ... 18
3.2.1.Određivanje ukupnih polifenola ... 19
3.2.2.Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu EBC metodom (EBC 9.11.) ... 19
3.2.3.Određivanje antioksidacijske aktivnosti ... 20
3.2.4.Određivanje polifenola HPLC metodom ... 20
3.2.5.Određivanje gorčine piva ... 21
4.**REZULTATI I RASPRAVA** ... 22
5.**ZAKLJUČCI** ... 29
6.**LITERATURA** ... 31

## Popis oznaka, kratica i simbola

| | |
|---|---|
| **DPPH** | 2,2 – difenil – 1 – pikrilhidrazil radikal |
| **EBC** | European Brewery Convention |
| **EDTA** | Etilendiamin tetra – octena kiselina |
| **HPLC** | High Performance Liquid Chromatography |
| **MPS** | Ministarstvo poljoprivrede |
| **PET** | Polietilen |
| **PTF** | Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek |
| **CMC** | Karboksi metil celuloza |
| **AOA** | Antioksidativna aktivnost |
| **TPC** | Udio ukupnih polifenola |

# 1. UVOD

Prema pravilniku o pivu (MPS, 2011), pivo je proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih pivskih kultura kvasaca *Sacharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanim vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura. Tijekom proizvodnje i kuhanja sladovine kao i u procesu glavnog i naknadnog vrenja nastaju tvari koje su odgovorne za okus piva i karakterističnu aromu (Pavlečić, 2012).

Osim okusnih i nutritivnih svojstava, pivo sadrži sastojke koji su prepoznati u epidemiološkim istraživanjima kao zaštitni agensi, a radi se o prirodnim antioksidansima. Pivo sadrži sastojke s antioksidacijskim svojstvima, kao što su reducirajući šećeri, produkti Maillardove reakcije, vitamini i polifenolni spojevi čiji se udjel smanjuje s vremenom skladištenja, odnosno starenjem. Pivo sadrži različite skupine polifenola, kao što su tanini, fenolne kiseline, flavoni, flavonoli i proantocijanidi koji imaju značajan utjecaj na stabilnost piva. Fenolnim kiselinama i flavonoidima pripisuje se antioksidacijski potencijal (Eberhard i sur., 2000; Lee i sur., 2003). Osim antioksidacijskog potencijala, polifenoli imaju značajnu ulogu u formiranju okusa, boje, gorčine i trpkosti piva (Pai i sur., 2015). Umjerena konzumacija piva zbog velikog sadržaja polifenola i antioksidanasa, pozitivno utječu na kognitivne sposobnosti i smanjuje mogućnost demencije u starosti (Bamforth, 2002).

Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u različitim uzorcima često se provodi u prehrambenoj industriji, budući da taj podatak ima vrlo važnu primjenu prilikom procjene antioksidacijskog učinka namirnice (Berend i Grabarić, 2008). Metode koje se najčešće koriste pri određivanju ukupnih polifenola su spektrofotometrijske, najviše zbog jednostavnosti provođenja, no razvijene su i pouzdanije metode, poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) te elektrokemijskih metoda. Najčešće korištena spektrofotometrijska metoda je Folin – Ciocalteau (FC) metoda.

Cilj ovog rada bio je utvrditi koji polifenoli su najzastupljeniji u istraživanim pivima, koje pivo sadrži najviše polifenola i najveću antioksidativnu vrijednost.

# 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. VRSTE I PODJELE PIVA

Proizvodnja piva je složen proizvodni proces koji uključuje različite tehnološke operacije, ali kao najbitniji mogu se izdvojiti :

- proces proizvodnje pivske sladovine od pivskog slada, neslađenih sirovina, hmelja i vode različite tvrdoće primjenom različitih tehnoloških postupaka (Schuster i sur. 1988),
- vrenje sladovine s čistim kulturama različitih sojeva kvasaca gornjeg i donjeg vrenja te „divljih kvasaca" i
- različiti postupci dozrijevanja i dorade mladog piva.

Podjela piva na tipove i vrste definirana je strogim pravilnicima (Pravilnik o pivu, MPS, 2011) o kvaliteti piva koji su proizašli iz pivarske prakse (Marić, 2009).

### 2.1.1. Podjela piva prema vrsti kvasca

Podjela piva prema vrsti kvasca je najpoznatija i najraširenija podjela, kojom piva dijelimo na piva gornjeg vrenja (*ale*) i piva donjeg vrenja (*lager*). Najviše se konzumiraju lager piva, a ona se dobivaju vrenjem pivske sladovine pomoću različitih sojeva čiste kulture kvasca vrste *Saccharomyces uvarum*. Vrenje započinje pri 6-8°C te se iz tog razloga naziva hladnim vrenjem, a završava na 9-18°C kada se mlado pivo hladi pri čemu se kvasac taloži na dno spremnika. Nakon izdvajanja istaloženog kvasca, mlado pivo odležava u ležnim spremnicima pri 0-1°C nekoliko tjedana. Vrste lager piva se razlikuju prema razgrađenosti, tvrdoći vode i boji slada za pripremu sirovine. Primjerice, plzensko lager pivo se proizvodi od vrlo mekane vode i vrlo svijetlog slada, a dortmundsko od tamnog slada i tvrde vode. Upravo iz tog razloga, vrste lager piva se razlikuju po punoći okusa, aromi nijansi boje (Marić, 2009).

Drugi tip piva je prije spomenuto *ale* pivo. Pri proizvodnji ovog tipa piva vrenje započinje na temperaturi sladovine od 10°C, a pri 25°C završava kada kvasac ispliva na površinu mladog piva. Za alkoholno vrenje ove vrste piva rabi se čista kultura pivskog kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae.* Ovakav tip se naziva toplo vrenje, a proizvod pivom gornjeg vrenja. Nakon izdvajanja kvasca, mlado pivo odležava i dozrijeva pri 20 °C tijekom vremenskog perioda kraćeg nego pri proizvodnji lager piva. Postoje različite vrste *ale* piva, a ovise o kakvoći vode, slada, boje, gorčine, koncentracije alkohola i izvornosti tehnološkog procesa. Razlika između

kvasaca donjeg i gornjeg vrenja je sposobnost fermentacije i asimilacije melibioze. Kvasci donjeg vrenja potpuno koriste melibiozu i rafinozu, a kvasci gornjeg vrenja ne mogu koristiti melibiozu jer nemaju enzim melibiazu, te koriste samo trećinu rafinoze (Naumov i sur., 1996; Grabovac, 2016).

### 2.1.2. Podjela piva prema masenom udjelu ekstrakta

Na osnovi piva masenog udjela ekstrakta u sladovini prije početka vrenja, tipovi piva dijele se na:

- slaba ili laka piva koja imaju mali udio alkohola i neprevrelog ekstrakta,
- standardna piva koja se proizvode od sladovine sa 10 – 12 % ekstrakta, pa je udio alkohola u tim pivima od 3,5 – 5,5 % vol. %,
- specijalna piva koja se proizvode iz sladovine sa više od 12 % ekstrakta, sadrže više neprevrela ekstrakta pa se nazivaju i puna piva,
- dvostruko sladna piva se proizvode od sladovine sa 18 – 22 % ekstrakta, te se nazivaju i *jakim* pivima jer sadrže povećan udio alkohola i neprevrelog ekstrakta te
- ječmena vina koja sadrže volumni udio alkohola od 7,5 – 10 vol. %, a sadrže veliki udio neprevrelog ekstrakta, te se konzumiraju u malim količinama (Marić, 2009).

### 2.1.3. Podjela piva prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine

Ječmeni slad je osnovna sirovina za proizvodnju većine lager i *ale* piva, ali moguće ga je djelomično zamijeniti s „neslađenim" sirovinama, što mora biti naznačeno na deklaraciji piva. Zamjenom najmanje 50 % ječmenog s pšeničnim sladom dobiva se pšenično pivo. U usporedbi sa pivima od ječmenog slada pjena im je vrlo blijeda (Kunze, 1996). Pšenica pivu daje bljeđu boju nego ječam, a tome pridonosi visok udio mliječne kiseline u pivu. Postoji i raženo pivo koje se proizvodi od raženog slada koji pivu daje vrlo karakterističan okus zbog voćnih, gorkih, pikantnih, uljastih i ljutih obilježja paprene metvice. Za proizvodnju tradicionalnog afričkog piva koristi se slad dobiven od prosa (Marić, 2009).

### 2.1.4. Podjela piva prema boji

Točna nijansa boje piva može se odrediti prema EBC (European Brewing Convention) skali. Na osnovi boje piva se dijele na: svijetla (do 10 EBC jedinica), crvena ili tamna (od 16 - 40 EBC jedinica) i crna (preko 40 EBC jedinica), ali se zapravo radi o različitim nijansama žute, crvene,

crveno smeđe i crne boje (Marć, 2009). Na boju piva utječu polifenoli koji se nalaze u ječmu te prilikom kuhanja slada dolazi do oslobađanja polifenolnih komponenti te nastaju neke nove komponente, a dolazi i do formiranja boje. Dva glavna procesa tijekom kojih dolazi do formiranja boje u pivu su karamelizacija i Maillard-ove reakcije. Karamelizacijom mogu nastati stotine različitih kemijskih produkata sa različitim bojama, ali ih je većina smeđe obojeno. Maillard-ove reakcije doprinose boji piva tako što se tijekom njih formiraju melanoidini koji daju pivu tamniju boju. Također, neki produkti Maillard-ovih reakcija, kao što su furani, furnozini, piroli, pirazini utječu na boju piva. Povećana koncentracija ovih spojeva u pivu će uzrokovati da piva budu tamnija, dok manja količina ovih spojeva daje svjetlija piva (Spearot, 2016).

### 2.1.5. Podjela piva prema volumnom udjelu alkohola

Pivo se prema udjelu volumnog alkohola dijeli na:

- bezalkoholna piva koja sadržavaju do 0,5 % vol. alkohola,
- piva s malim udjelom alkohola ili tzv. *lagana piva* sadrže do 3,5 % vol. alkohola,
- standardna lager piva i piva gornjeg vrenja sadrže preko 3,5 % vol. alkohola te
- jaka piva sadrže više od 5,5 % vol. alkohola.

U svim europskim zemljama udio alkohola mora biti naznačen na etiketi. Prema udjelu alkohola određuje se visina poreza na pivo (Marić, 2009.)

## 2.2. SASTAV PIVA

Pivo sadrži više od 600 sastojaka, a osim vode koja sačinjava 90 % piva još samo nekoliko komponenti koje se pronalaze u koncentraciji većoj od 1 g/L u pivu. Ti sastojci su neprevreli ekstrakt, etanol, ugljikov dioksid i glicerol. Većina komponenti piva dolazi iz samih sirovina (slad, voda, hmelj), dok neki sastojci nastaju kao nusproizvod metabolizma kvasca i promjena koje se događaju tijekom fermentacije (Kunze, 1996).

### 2.2.1. Voda

Pivo se najvećim dijelom sastoji od vode. Ovisno o vrsti, udio vode u pivu iznosi 89 – 93 % (Marić, 2009). Voda koja se koristi za proizvodnju piva je sigurna, mikrobiološki i kemijski ispravna jer se kontrolira suvremenim tehnološkim postupcima, te se usklađuje sa zakonskim

i zdravstvenim normativima. Mineralni sastav vode je jako bitan i ključni je element za odabir vode za proizvodnju piva. U današnje vrijeme sastav mineralnih soli u vodi se korigira te je bitno često provjeravati sastav vode koja se koristi za proizvodnju piva. Dodavanje kloridne i/ili sulfatne kiseline je najjednostavniji postupak prilagođavanja vode, a najčešća metoda određivanja tvrdoće vode je titracija sa EDTA uz indikator (Grabovac, 2016).

## 2.2.2. Alkohol i ekstrakt

Najvažniji alkohol koji se nalazi u pivu je etanol. Više od polovine energetske vrijednosti piva potječe upravo od etanola. Standardna piva koja se kod nas najčešće konzumiraju (do 5,5 % vol. alkohola) imaju mali udio viših alkohola (do 60 mg/L). Viši alkoholi koji se nalaze u pivu su: n-propanol, izobutanol, amilalkohol i 2-feniletanol. Viši alkoholi su alkoholi koji izazivaju glavobolju, nemir i razdražljivost te dugotrajni mamurluk (Marić, 2009).

**Tablica 1** Koncentracija alkohola u pivu (Buiatti, 2009)

| ALKOHOL | KONCENTRACIJA (mg/L) |
|---|---|
| Etanol | 20000 - 80000 |
| Metanol | 0,5 – 3,0 |
| 1 - Propanol | 3 - 16 |
| 2 - Propanol | 3 - 6 |
| 2 - Metilbutanol | 8 - 30 |
| 3 - Metilbutanol | 30 - 70 |
| 2 - Feniletanol | 8 - 35 |
| 1 – Okten – 3 -ol | 0,03 |
| 2 - Dekanol | 0,005 |
| Glicerol | 1200 - 2000 |
| Tirosol | 3 - 40 |

Udio suhe tvari ili nefermentabilni ekstrakt se sastoji većinom od ugljikohidrata (75 – 80 %), dušikovih spojeva (6 – 9 %) i ostalih organskih (4 – 5 %) i anorganskih sastojaka. Ugljikohidratni dio ekstrakta se sastoji od razgradivih dekstrina koji se sastoje od tri ili više glukoznih jedinica (maltotrioza, maltotetroza, maltopentoza). Dušikovi spojevi u ekstraktu se određuju u mg/L, to su sljedeći spojevi: ukupni dušik (700 – 800), koagulirajući dušik (18 – 20), magnezijev

sulfatni dušik (130 – 160), α – amino dušik (100 – 120) i formolni dušik (160 – 210). Litra standardnog piva sadrži preko 100 mg aminokselina (Marić, 2009).

**Tablica 2** Koncentracija ugljikohidrata u pivu (Buiatti, 2009)

| UGLJIKOHIDRATI | KONCENTRACIJA (g/L) |
|---|---|
| Fruktoza | 0 – 0,19 |
| Glukoza | 0,04 – 1,1 |
| Saharoza | 0 – 3,3 |
| Maltoza | 0,7 – 3,0 |
| Malotrioza | 0,3 – 3,4 |

## 2.2.3. Organski sastojci piva

Najvažniji organski sastojci koji se nalaze u pivu su:

- glicerol (1400 – 1600 mg/L) koji utječe na viskozitet i osjećaj slatkoće piva,
- β – glukan (12 – 500 mg/L) je hemiceluloza, koristan za probavu snižava razinu kolesterola te smanjuje rizik od srčanih bolesti,
- antocijanogeni su fenolni spojevi iz slada i hmelja koji djeluju kao antioksidansi, pa imaju blagotvorni učinak na organizam,
- vicinalni diketoni su nepoželjni sastojak piva jer daje miris po medu i užeglom maslacu (dobro dozrela piva ga sadrže ispod 0,1 mg/L) te
- vitamini B kompleksa, najznačajniji su niacin, riboflavin (B2), piridoksin (B6), folati (B9) i kobalanin (B12) (Marić, 2009).

## 2.2.4. Minerali u pivu

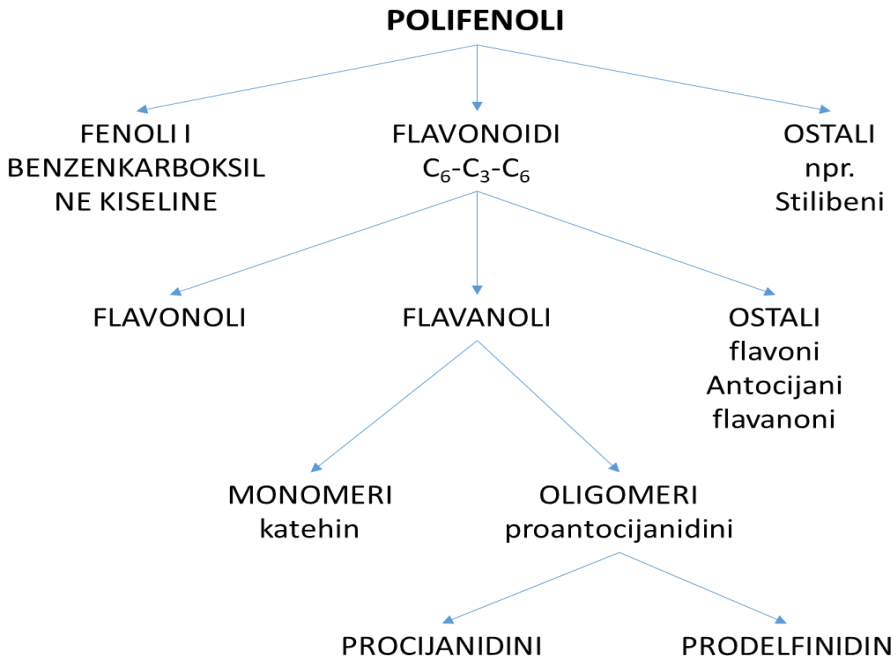
Najznačajniji minerali za proces proizvodnje su kalcij, natrij, kalij, magnezij, sulfati, karbonati, kloridi, nitrati i bikarbonti. Neki od ovih iona mogu se istaložiti tijekom proizvodnje, a neki mogu ući u metabolizam kvasca pa se sastav iona u pivu razlikuje od sastava iona u vodi koja se koristi za proizvodnju. Najvažniji je kalcijev ion jer je on aktivator enzima koji su potrebni za razgradnju škorba u jednostavnije šećere time što povećava kiselost. Karbonati i bikarbonati povećavaju pH te nisu poželjni. Magnezij ima sličnu ulogu kao kalcij, a natrij utječe na slatkoću u okusu. U pivu se mogu pronaći još neki elementi u tragovima a to su željezo, cink i mangan (Buiatti, 2009).

**Tablica 3** Mineralni sastojci piva (Kunze, 1996)

| MINERALI | KONCENTRACIJA (mg/L) |
|---|---|
| Natrij | 30 - 32 |
| Kalij | 500 - 600 |
| Kalcij | 35 - 40 |
| Magnezij | 100 - 110 |
| Fosfati | 300 - 400 |
| Sulfati | 150 - 200 |
| Kloridi | 150 - 200 |
| Nitrati | 20 - 30 |

## 2.3. POLIFENOLI

Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti koji se mogu pronaći u voću, povrću i njihovim proizvodima. Polifenolni spojevi pripadaju najrasprostranjenijoj i najbrojnijoj skupini spojeva u biljkama. Polifenoli u biljkama mogu djelovati kao signalne molekule te sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljke, štite ih od infekcija mikroorganizama (antibiotsko djelovanje), djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, pridonose pigmentaciji biljaka, dok u namirnicama pridonose gorčini, boji, mirisu, okusu i oksidativnoj stabilnosti. Prema kemijskoj strukturi mogu se podijeliti na: fenolne kiseline, flavonoide, tanine (kondezirani i hidrolizirani) te ostale polifenolne spojeve (lignani, kumarini). Osnovna karakteristika svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Berend i Grabarić, 2008).




**Slika 1** Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008)

### 2.3.1. Polifenoli u pivu

Oko 70% polifenola u pivu potječe iz slada, dok 30% potječe iz hmelja. Taj postotak može varirati ovisno o vrsti piva. Pivo je bogato različitim skupinama polifenola od kojih su najznačajniji tanini (posebice u tamnim pivima), fenolne kiseline, flavoni i flavonoli i proantocijanidi (Collin i sur., 2013).

Svi ovi spojevi imaju važnu ulogu u formiranju okusa i arome piva, a posebno gorčine i trpkosti. Tijekom sazrijevanja piva dolazi do značajnih promjena okusa. Odležavanjem pivo gubi trpkost i gorčinu, a pojačava se slatkasti okus. To je posljedica oksidacije trans masnih kiselina i karbonilnih spojeva koje nastaju (Aron i Shellhammer, 2010).

Flavonoidi u pivu koji su 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. Također, flavonoidi mogu pridonijeti i gorčini piva, no osnovna gorčina dolazi od α kiselina iz hmelja. Flavonoidi su velikim dijelom odgovorni za boju tamnih i crnih piva. U skupini flavonoida spadaju i antocijani koji u pivu potječu iz ječma (Collin i sur, 2013).

Tanini su esteri aromatskih hidroksikarboksilnih kiselina s viševalentnim alkoholima ili šećerima. Tanini u pivo dospijevaju iz hmelja tijekom proizvodnje. Na kvalitetu i okus piva imaju veliki utjecaj. Tamna piva sadrže veću količinu tanina od svjetlijih što se očituje tamnijom

bojom i jačom gorčinom (Marić, 1995). Također, polifenoli imaju utjecaj na stabilnost piva, zbog reakcije između proteina i polifenola dolazi do koloidne nestabilnosti piva što ograničava rok trajanja piva (Collin i sur, 2013). Polifenoli, a posebno tanini, uz proteine i ugljikohidrate doprinose stvaranju mutnoće piva koje se mogu ukloniti filtracijom ili sedimentacijom (Aron i Shellhammer, 2010).

### 2.3.2. Antioksidativnost polifenola

Zaštitna uloga polifenola u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja elektrona slobodnog radikala što se naziva još i antiradikalna aktivnost. Osim ove aktivnosti polifenoli pokazuju sposobnost kelatnog vezanja iona prijelaznih metala ($Fe^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Mg^{2+}$). Ovakvo višestruko djelovanje je odgovorno za ukupnu učinkovitost polifenolnih spojeva, a zajedno se naziva antioksidacijska aktivnost.

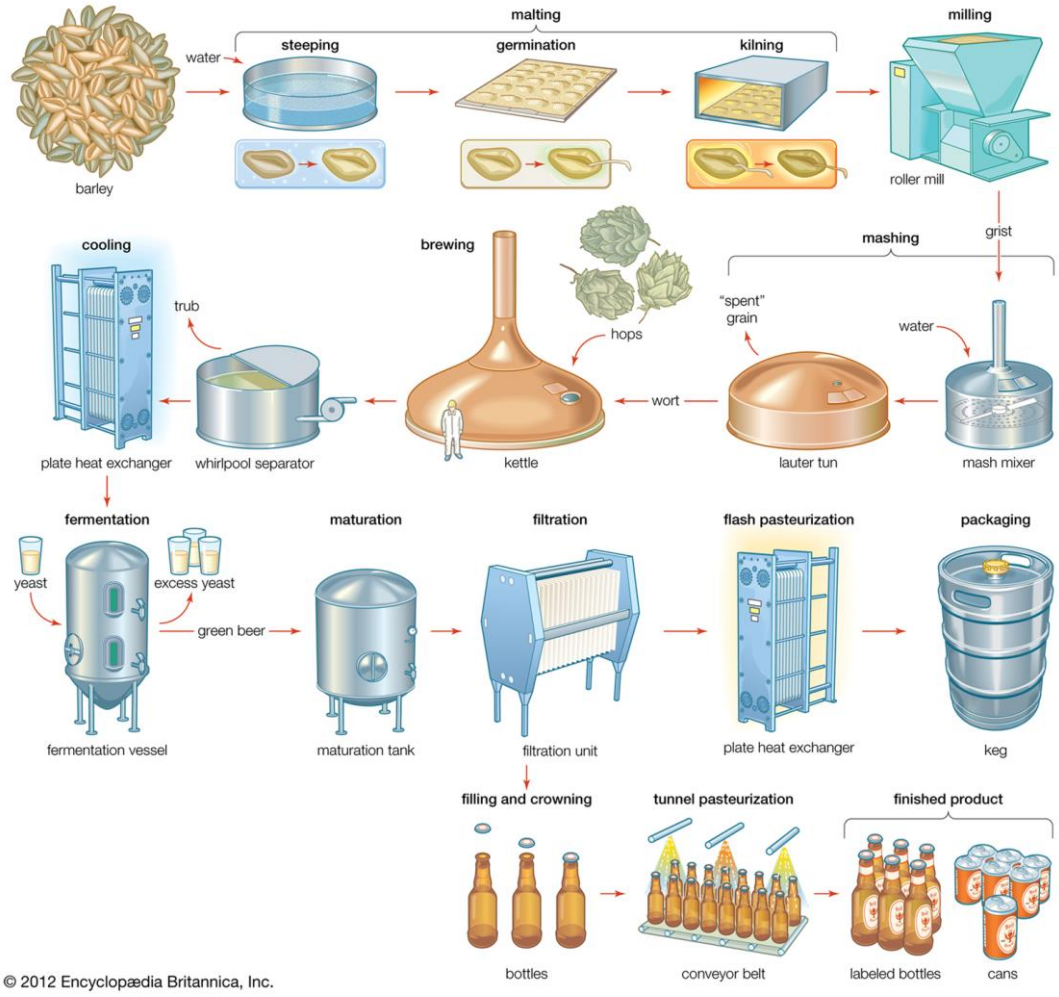
Antioksidansi su tvari koje štite stanicu od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala i sprječavaju oksidaciju oksidabilnih spojeva. To su tvari koje neutraliziraju slobode radikale dajući im svoj elektron ili inhibiraju stvaranje slobodnih radikala. Antioksidansi imaju svojstva koja djeluju kao reducirajuće sredstvo.

Slobodni radikali mogu dovesti do oksidativnog stresa odnosno oštećenja. Osim njih uz reaktivne vrste kisika, oksidativni stres te druge faktore može doći do nekih bolesti: dijabetes, kardiovaskularne bolesti, različiti upalni procesi. Polifenoli kao i drugi antioksidansi mogu smanjiti rizik od nastajanja mnogih bolesti hvatanjem slobodnih radikala te drugim antioksidacijskim aktivnostima (Krivak, 2010).

## 2.4. PROIZVODNJA PIVA

Proces proizvodnje piva sastoji se od 5 faza:

1. prerade ječma u slad,
2. dobivanje pivske sladovine i hmelja,
3. previranje pivske sladovine uporabom specijalnog pivskog kvasca,
4. sazrijevanje piva te
5. filtriranje i punjenje u ambalažu.




**Slika 2** Shematski prikaz proizvodnje piva (Preuzeto iz Encyclopedia Britanica, Inc).

## 2.4.1. Proizvodnja slada

Proizvodnja piva počinje proizvodnjom slada. Proizvodnja slada postupak je koji se sastoji iz nekoliko operacija: čišćenja i sortiranja ječma, močenje ječma do 42 – 45 % vode, naklijavanja zrna i sušenje slada. Slađenje ječma se odvija na temperaturama od 13 do 22 °C sve dok unutrašnjost zrna ne postane rahla i brašnasta, a korijeni proklijalog zrna ne dosegnu duljinu gotovo cijelog zrna. Međutim, danas se u praksi ide čak do tek proklijalog izdanka kako bi zrno očuvalo što više šećera. Zeleni slad suši se u komorama za sušenje uz postupno povećanje temperature od 25 do 80 °C za sve vrste svijetlog slada, dok za vrste tamnog slada temperatura ide do 105 °C. Proces sušenja traje od 24 do 48 h, dok se u modernijim komorama za sušenje proces može završiti znatno ranije. Cilj močenja i naklijavanja zrna je izmjena biokemijskog sastava te nakupljanje što veće količine šećera u zrnu koja ulazi u fermentaciju. Također, bitno

je da se proteini razgrade do aminokiselina te da aromatične tvari ostanu u aktivnom stanju prilikom sušenja slada. Za proizvodnju slada koriste se zrna ječma koja imaju visok postotak klijavosti, ne niži od 95 %, te prosječan sadržavaj proteina od 9 – 14 % (Veselov, 1966). Zrna bi trebala biti ujednačena i krupna, a iz takvih se zrna proizvodi slad sa visokom fermentativnom aktivnošću što omogućava dobivanje veće količine i kvalitetnije pivske sladovine. Sastav slada i količina ekstrakta ovise o biokemijskom sastavu ječma, posebno o koncentraciji dušikovih tvari i škroba u zrnu. Ječam sa sadržajem proteina višim od 14 % daje manje ekstrakta, a slad od takvog zrna ima tamniju boju, sadrži manje ugljikohidrata i znatnu količinu otopljenih dušikovih tvari i aminokiselina (Veselov, 1966).

### 2.4.2. Proizvodnja pivske sladovine

Pivska sladovina se dobiva iz slada, neslađenih sirovina, vode i hmelja, a odvija se u nekoliko etapa. Slad se prvo usitnjava u mlinu te se miješa s toplom vodom kako bi se aktivirali enzimi potrebni za pretvorbu škroba u fermentativne šećere. Kod *ale* piva preporučena temperatura je 65 °C, a za lager piva miješanje se odvija na nižim temperaturama (45 °C) jer njihovi sladovi sadrže više glukana i proteina te ih na nižim temperaturama enzimi proteaza i glukanaza razgrađuju (Parker, 2012). Zaslađena komina filtrira se u specijalnim filtracijskim posudama te e dobiva sladovina. Dobivena sladovina kuha se 1 – 2 h, a tijekom kuhanja joj se dodaje hmelj. Tijekom kuhanja proteini koaguliraju, fermentirajući šećeri se inaktiviraju, tvari hmelja se otapaju, a sladovina poprima gorčinu i aromu hmelja. Kuhanje sladovine osigurava istovremenu sterilizaciju prije nacjepljivanja kvascem. Nakon završetka kuhanja iz sladovine se izdvajaju hmelj i proteinski talog (Veselov, 1996). Ohmeljena sladovina se mora ohladiti prije dodavanja kvasca. *Ale* piva se hlade na 16 – 22 °C, a lager piva na 6 – 16 °C zbog različite temperature vrenja, kao što je ranije u tekstu opisano (Grabovac, 2016).

### 2.4.3. Vrenje pivske sladovine

Proces vrenja pivske sladovine se odvija na niskim temperaturama pomoću specijalnog pivskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Ohlađena sirovina se cjevovodom transportira u posebne uređaje za vrenje gdje se dodaje kvasac. Proces vrenja odvija se u određenim temperaturnim uvjetima ovisno o vrsti piva koje se proizvodi. Tako se za lager piva vrenje odvija na temperaturama od 16 – 18 °C, dok za *ale* piva vrenje se odvija na temperaturama od

10 – 25 °C. U ovom procesu kvasac prevodi šećere u alkohol, ugljikov dioksid i ostale komponente koje pridonose okusu. Tijekom vrenja oslobađa se velika količina topline koja je rezultat aktivnosti kvasca, pa se radi toga provodi hlađenje pred kraj procesa na temperaturama od 4 – 5 °C. Također, tijekom vrenja kvasac se razmnožava te se njegova količina poveća 2 – 4 puta u odnosu na početnu količinu. Pred završetak vrenja kvasac se taloži na dno, što dovodi do bistrenja piva. Pivo nakon vrenja još nije zrelo, još je mutno, sadrži malu količinu $CO_2$, te ima poseban okus i aromu mladog piva (Marić, 2009).

### 2.4.4. Odležavanje piva

Nakon vrenja, pivo se još naziva i „zelenim". Proces odležavanja piva se provodi u spremnicima pri temperaturi od 1 do 3 °C pod tlakom $CO_2$ od 0,3 do 0,7 bar. Za vrijeme odležavanja dolazi do laganog previranja preostale količine šećera te nastajanja ugljične kiseline. Zbog stvaranja ugljične kiseline u spremniku dolazi do povećavanja tlaka, a koji omogućava vezanje $CO_2$ tako da sadržaj ugljične kiseline pred kraj vrenja dostiže vrijednost od 0,4 do 0,5 %. Trajanje procesa odležavanja ovisi o vrsti piva. Vrste piva sa većim udjelom alkohola zahtijevaju duži period odležavanja (Veselov, 1966).

### 2.4.5. Filtracija i punjenje u boce

Ako proizvedeno pivo nema namijenjenu prodaju u mutnom stanju, onda se nakon završetka procesa odležavanja cjevovodima transportira na filtraciju. Cilj procesa filtracije je stabilizacija piva, odnosno smanjenje nepoželjne mutnoće i izdvajanje ostataka stanica kvasca koje bi se mogle pronaći u pivu, a uzrokuju kvarenje ili destabilizaciju piva. Moderna filtracija se vrši pomoću kombinacije filter ploča sastavljenih od celuloznih vlakana i *kieselgura* (dijatomejska zemlja – sitni pijesak napravljen od silikatne sedimentne stijene koja je nastala taloženjem ostataka jednostaničnih algi kremenjašica) (Zarknov, 2014). Pri industrijskog proizvodnji piva se, radi dodatne stabilizacije piva, provodi pasterizacija. Navedenim procesom se uklanjaju svi potencijalno štetni organizmi. Međutim, negativna strana pasterizacije je gubitak arome i okusa uzrokovan povišenom temperaturom. Najčešći oblik pasterizacije koji se koristi je tretman temperaturom od 62 °C tijekom 20 minuta, iako se sve češće koristi oblik pasterizacije pri višoj temperaturi od 72 °C i kraćem vremenu od 15 do 30 sekundi. Također, postoji i proces hladne pasterizacije. Pri ovom procesu se ne koristi toplina kao sredstvo neutralizacije

mikroorganizama, nego kemijske tvari prilikom odležavanja ili filtracije, čime se izbjegava gubitak arome i okusa piva.

Proces punjenja piva u ambalažu se provodi u aseptičnim uvjetima, preko uređaja za punjenje pod protutlakom $CO_2$, u svrhu očuvanja vezane ugljične kiseline koja osigurava gaziranost piva (Harrison, 2009).

## 2.5. AMBALAŽA PIVA

Razvoj pivske ambalaže pokazuje kako se ona mijenjala kako bi zadovoljila suvremene zahtjeve kao što su: praktičnost, privlačnost, niska cijena, čvrstoća, pogodnost za brzo strojno punjenje i pražnjenje, otpornost na unutarnji tlak (44 – 58 kg/cm²), nepropusnost za plinove i UV zrake, toplinska vodljivost, dugotrajna trajnost izvornih sastojaka (miris, okus, boja, bistrina), ekološka prihvatljivost (mogućnost recikliranja). Ove zahtjeve, u većoj ili manjoj mjeri ispunjavaju staklene (povratne i nepovratne) boce, aluminijske limenke (nepovratne), metalne, drvene i kombinirane pivske bačve ili kegovi (Nemet, 1991).

Neke od nedostataka kao što su lomljivost i težina, pokušava ispraviti nova ambalaža (PET i aluminijske boce), koja nažalost ima nedostatke, poput cijene i ograničene trajnosti piva. No, raznolika pivska ambalaža pruža ove prednosti:

- šira mogućnost prodaje piva,
- transport različitih volumena piva do svih mjesta potrošnje,
- duže čuvanje piva do trenutka potrošnje te
- uživanje u pivu u različitim mjestima i prilikama

### 2.5.1. Osnovna pravila punjenja piva

Pri punjenju piva u sve oblike ambalaže vrijede ova osnovna pravila:

- sprječavanje dodira piva s kisikom (0,02 – 0,04 mg $O_2$/L tijekom punjena), zbog nepoželjne oksidacije njegovih sastojaka,
- sprječavanje pada tlaka piva, zbog sprječavanja gubitka $CO_2$,
- učestalo pranje dijelova uređaja koji dolaze u dodir s pivom, kao i čitavog postrojenja, radi sprječavanja sekundarnog zagađenja te
- redovno i potpuno nadziranje procesa punjenja

Nažalost, postupak pakiranja, pivska ambalaža i dugotrajno čuvanje piva u njoj mogu biti uzrok smanjenja kvalitete jer tijekom punjena u ambalaže može doći do sekundarnog zagađenja mikroorganizmima, pivo može poprimiti strani okus i miris ambalaže te prilikom dorade piva u svrhu produljenja trajnosti može doći do gubitka punoće,svježine, okusa i mirisa (Marić, 2009).

### 2.5.2. Staklena ambalaža

Punjenje piva u ambalažu je proces koji se sastoji od ovih tehnoloških operacija: pranje boca, kontrola opranih boca, punjenje i zatvaranje boca, biološka stabilizacija (pasterizacija boce i piva) te lijepljenje etiketa.

Tijekom 18. stoljeća staklene boce su bile od bijelog stakla i međusobno su se razlikovale po volumenu. Zahvaljujući zapažanjima da na trajnost i stabilnost piva utječe, osim prisutnog kisika i visokih temperatura, i izloženost svjetlu te da ono utječe na aromu piva, pivske boce postaju smeđe obojane. Oblik pivske boce se kroz povijest mijenjao iz više razloga kao što su: privlačnost, težina, otpornost na unutarnji tlak, brzo punjenje i zatvaranje. Zahtjevi za čvrstim zatvaranjem boca, zbog sprječavanja gubitaka ugljičnog dioksida i smanjenja dodira sa zrakom, također utječu na oblik i grla boce i njenog čepa pa se oni također vremenom mijenjaju. Za zatvaranje boca se najduže koristio *krunski čep,* a u novije vrijeme se koriste *twist off* i *pull of* čepovi (Marić, 2009).

# 3. EKSPERIMENTALNI DIO

## 3.1. CILJ I ZADATAK

Cilj ovog rada bio je temeljem dobivenih rezultata utvrditi koji polifenoli su najzastupljeniji u istraživanim pivima, koje pivo sadrži najviše polifenola i najveću antioksidativnu vrijednost.

## 3.2. MATERIJALI I METODE

U eksperimentalnom dijelu ovog rada osim ukupnih polifenola, određivani su i drugi parametri u pivu kao što su volumni udio alkohola i pH.

Pri eksperimentalnom dijelu rada navedenim metodama objašnjenim u nastavku analizirano je 12 vrsta piva prisutnih na tržištu Republike Hrvatske, pri čemu je svaki od 12 uzoraka analiziran u triplikatu.




**Slika 3** Uzorci piva korišteni za analizu

**Tablica 4** Korišteni uzorci piva po tipovima piva

| UZORAK | TIP PIVA | PROIZVOĐAČ |
|---|---|---|
| 1 SW | Svijetlo | Warsteiner |
| 2 SS | Svijetlo | Slavonsko |
| 3 SB | Svijetlo | Bitburger |
| 4 SO | Svijetlo | Osječko |
| 5 SZ | Svijetlo | Zadarsko |
| 6 SK | Svijetlo | Kozel |
| 7 TP | Tamno | Pan |
| 8 TK | Tamno | Kozel |
| 9 TB | Tamno | Budweiser |
| 10 CO | Crno | Osječko |
| 11 CCK | Crno | Crna kraljica |
| 12 CK | Crno | Karlovačko |

### 3.2.1. Određivanje ukupnih polifenola

Koncentracija ukupnih fenola je određena Folin - Ciocalteu metodom (Ough i Amerine, 1998). Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za galnu kiselinu. U epruvetu se otpipetira 0,6 i 3 mL Folin - Ciocalteu reagensa i 2,4 mL 7,5 %-tnog natrijevog karbonata. Promućka se i ostavi da stoji 30 minuta na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Absorbancija otopine se određuje na spektrofotometru pri 745 nm. Slijepa proba pripravi se s destiliranom vodom (0,6 mL). Za svaki korak provedena su tri mjerenja.

### 3.2.2. 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, otopinaje prenesena u odmjernu tikvicu od litre i nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Otopina željezovog reagensa koncentracije 5,6g $Fe^{3+}$/L pripremljena je otapanjem 3,5 g zelenog amonij željezo citrata u 100mL 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 razrjeđenje uzorka na način da je u odmjernu tikvicu od 50 mL dodano 10mL 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 razrjeđenja (1 ako je korištena odmjerna tikvica od 25 mL, 2 ako je korištena odmjerna tikvica od 50 mL).

### 3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Uklanjanje ili vezanje slobodnih radikala je glavni mehanizam djelovanja antioksidanasa u hrani. Nekoliko metoda je razvijeno za određivanje antioksidacijeske aktivnosti na osnovi uklanjanja sintetskih radikala u polarnom organskom otapalu (npr. metanolu) pri sobnoj temperaturi. Najčešća korištena metoda je 2,2 – difenil – 1 – pikrilhidrazil (DPPH) i 2,2' – azinobis (3 – etilbenztiazolin – sulfonska kiselina).

DPPH testom, uklanjanje DPPH radikala je praćeno smanjenjem apsorbancije pri 515 nm, do koje dolazi zbog smanjena količine antioksidanasa ili reakcije s radikalima (Brand – Williams i sur., 1995). Postupak je takav da se otpipetira 0,2 mL uzorka, 2 mL metanola i 1 mL otopine DPPH, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 15 minuta. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje troloxa. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

### 3.2.4. Određivanje polifenola HPLC metodom

Analize flavanola i fenolnih kiselina izvedene su na HPLC analitičkom sustavu (Varian, USA) koji se sastoji od ProStar 230 pumpe, ProStar 30 UV – Vis detektora i ProStar 330 PDA detektora. Separacija polifenolnih spojeva izvedena je na OmniSpher C18 koloni (unutrašnjeg promjera 250 x 4,6 mm, promjera čestica 5 µm, Agilent, USA) koja je zaštićena pretkolonom (ChromSep 1 cm x 3 mm, Agilent, USA). Podaci su prikupljeni i obrađeni na IBM kompjuterskom sustavu s instaliranim programom Star Chromatography Workstation (verzija 5. 52).

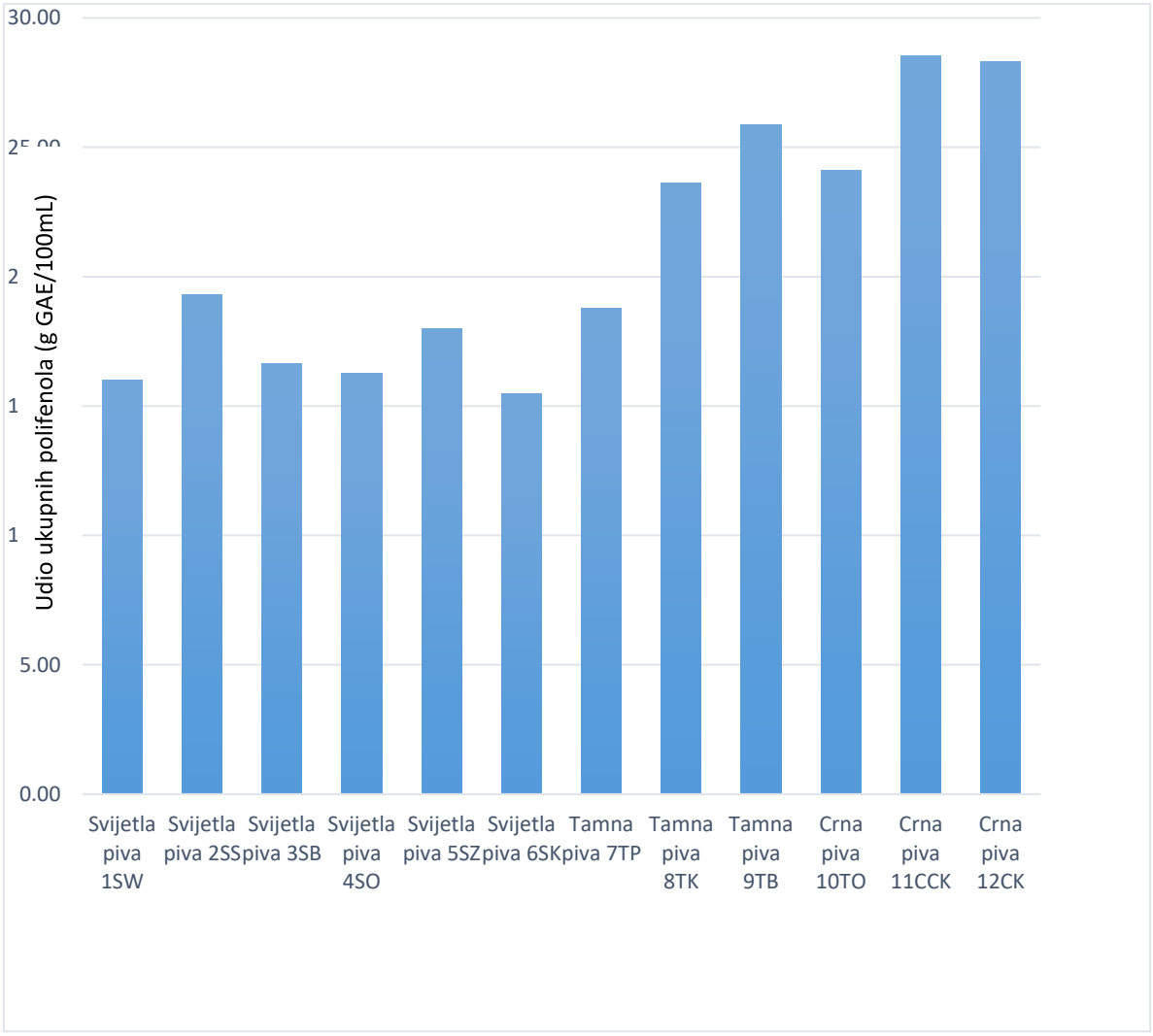
Flavanoli i fenolne kiseline razdvojeni su reverzno – faznom HPLC metodom primjenom 0,1 % fosforne kiseline kao mobilne faze A te 100 %-tnog metanola kao mobilne faze B. Period re – ekvilibracije između pojedinih analiza bio je 10 minuta. Spektar je sniman u području valnih duljina od 190 do 600 nm. Epikatehin je detektiran na valnoj duljini 280 nm, galna kiselina, kava kiselina i p – kumarinska kiselina detektirani su pri 320 nm. Sva mjerenja uzoraka provedena su u tri paralele.

### 3.2.5. Određivanje gorčine piva

Za određivanje gorčine piva odpipetira se 10 mL otplinjenog uzorka u odmjernu tikvicu, doda se 1 mL 1 M otopine HCl-a i 20 mL izooktana. Zatvori se odmjerna tikvica i stavi na magnetsku mješalicu gdje se ta otopina miješa 5 minuta. Zatim, uzorak stoji u mraku 30 minuta uslijed čega se emulzija istaloži i onda se bistri izooktanski sloj prebaci u kvarcnu kivetu te se na spektrofotometru očitava vrijednost ekstinkcije pri 275 nm.

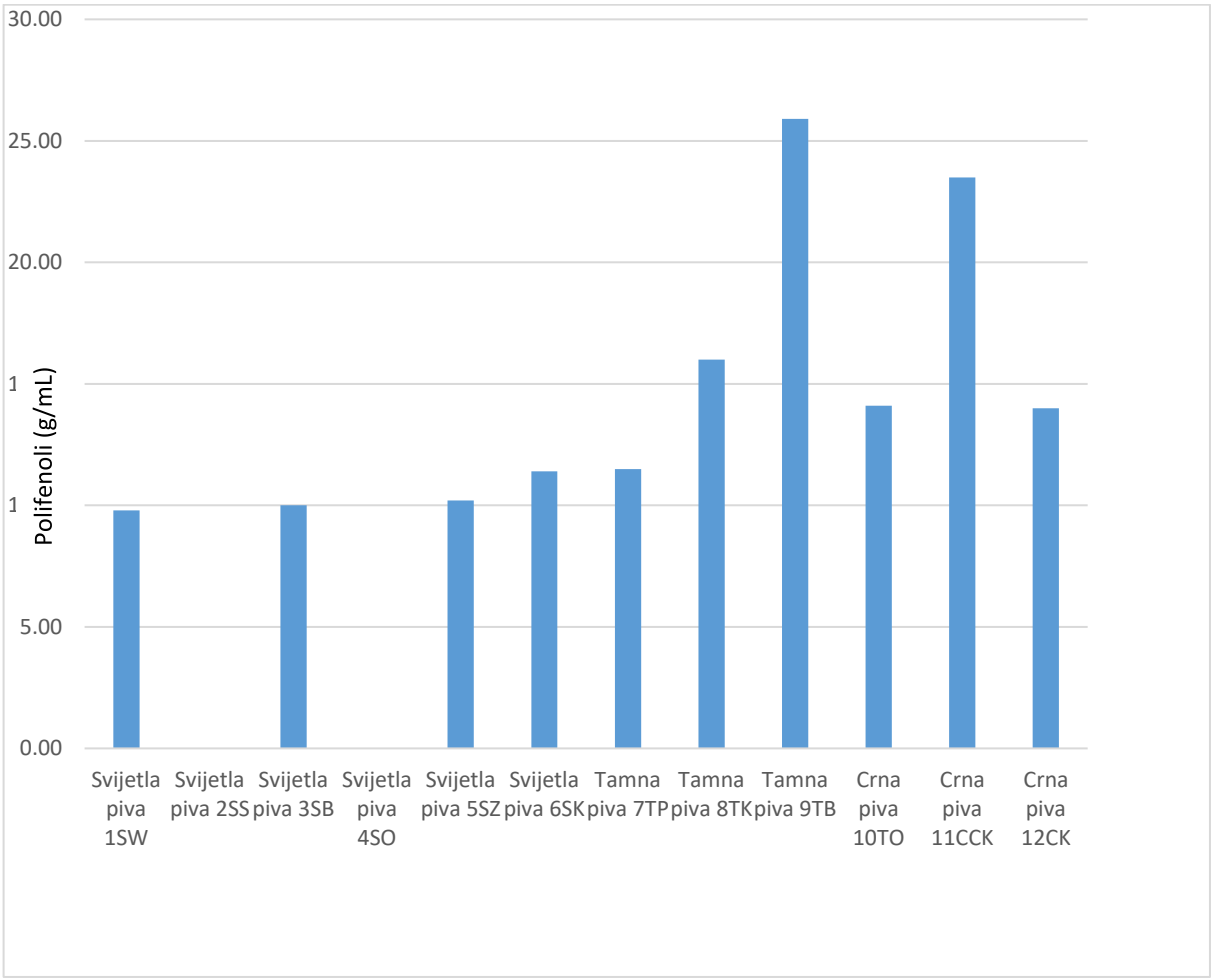
# 4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju prikazani su na Slikama 4 – 8 i Tablici 5.




**Slika 4** Ukupni polifenoli ispitivanih uzoraka određeni FC metodom

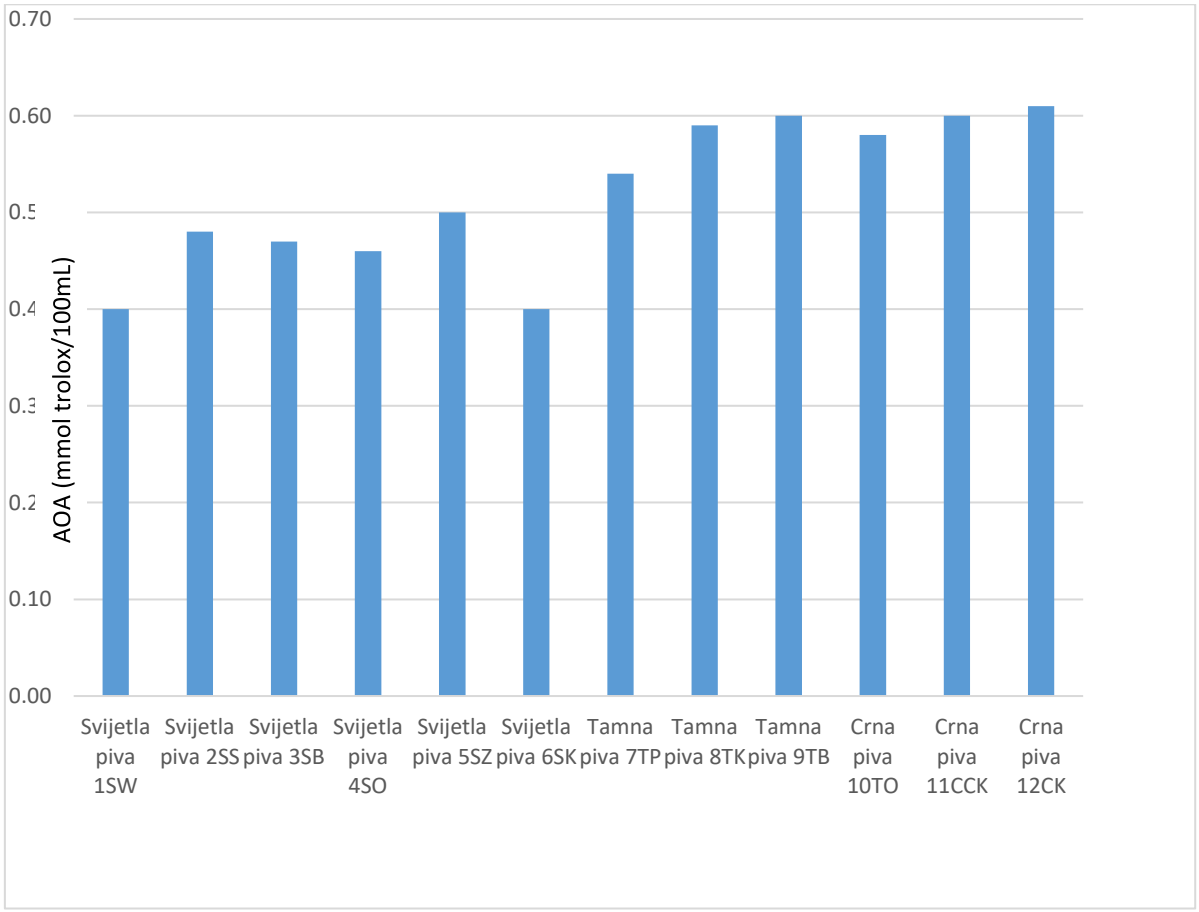
Na Slici 4. prikazani su ukupni polifenoli ispitivanih uzoraka piva pakiranih u smeđu staklenu ambalažu. Koncentracija ukupnih polifenola određenih Folin – Ciocalteu metodom u ispitivanim uzorcima piva kretala su se u rasponu od najmanje sadržane koncentracije 15,48 ( uzorak 6 SK) koje je svijetlo pivo do najveće sadržane koncentracije 28,52 ( uzorak 11 CCK) koje je crno pivo u g/mL izraženo kao ekvivalent za galnu kiselinu. Dobivene vrijednosti udjela ukupnih polifenola su u skladu s dobivenim rezultatima koji su provodili Granato i suradnici (2011) gdje su određivali ukupne polifenole uzoraka svijetlih i tamnih piva. Rasponi koncentracija za svijetla piva bila su 11,99 – 20,02 g GAE/mL, a za tamna 28,01 – 52,59 g GAE/mL.




**Slika 5** Udio polifenola određen EBC metodom

Na Slici 5 je prikazan udio polifenola određen EBC metodom. Najmanji udio polifenola, uspoređujući uzorke u kojima je određen udio polifenola EBC metodom, imao je uzorak 1 SW (9,8 g/mL), a najveći udio polifenola imao je uzorak 9 TB (25,9 g/mL). Rezultati udjela polifenola određenih EBC metodom znatno su manji za sve uzorke piva u odnosu na rezultate dobivene Folin – Ciocalteovom metodom gdje je raspon udjela polifenola bio od 15,48 do 28,52 g GAE/mL. Slične razliku u dobivenim rezultatima 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 metodama prema Folin – Ciocalteu iznosio je 37,95 do 44,33,g GAE/mL, dok je za iste uzorke analizirane EBC metodom taj raspon iznosio od 13,83 do 21,53 g/mL.

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 koncnetracija 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. 2011). 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).



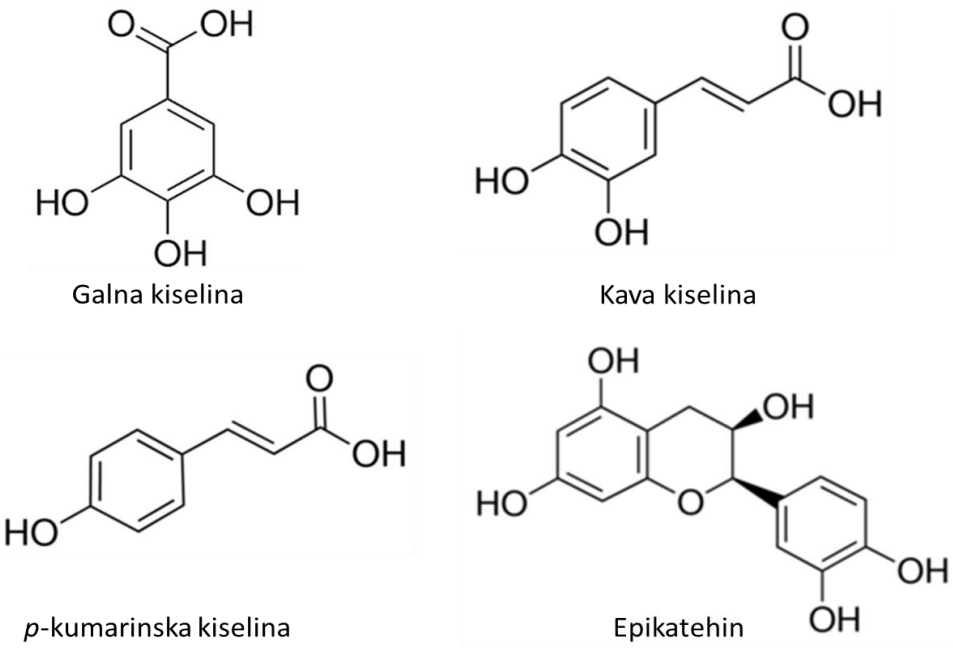

**Slika 6** Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka

Antioksidanski su tvari koje usporavaju procese oksidacije u organizmu. Polifenoli su poznati antioksidansi u prehrambenim proizvodima. Na slici 6 prikazana je antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka piva pakiranih u smeđu staklenu ambalažu, dostupnih na našem tržištu. Iz tablice je vidljivo da veću antioksidativnost imaju crna i tamnija piva od svijetlih. Najmanju antioksidativnu aktivnost imao je uzorak 6 SK (0,40 mmol trolox/100ml), dok je najveću antioksidativnost imao uzorak 12 CK (0,61 mmol trolox/100mL). Ovakav rezultat je očekivan s obzirom da novija znanstvena literatura opisuje tamna i crna piva kao ona s većom antioksidativnom vrijednošću (Granato i sur., 2011).

**Tablica 5** Polifenolni profil ispitivanih uzoraka piva pakiranih u smeđu staklenu ambalažu

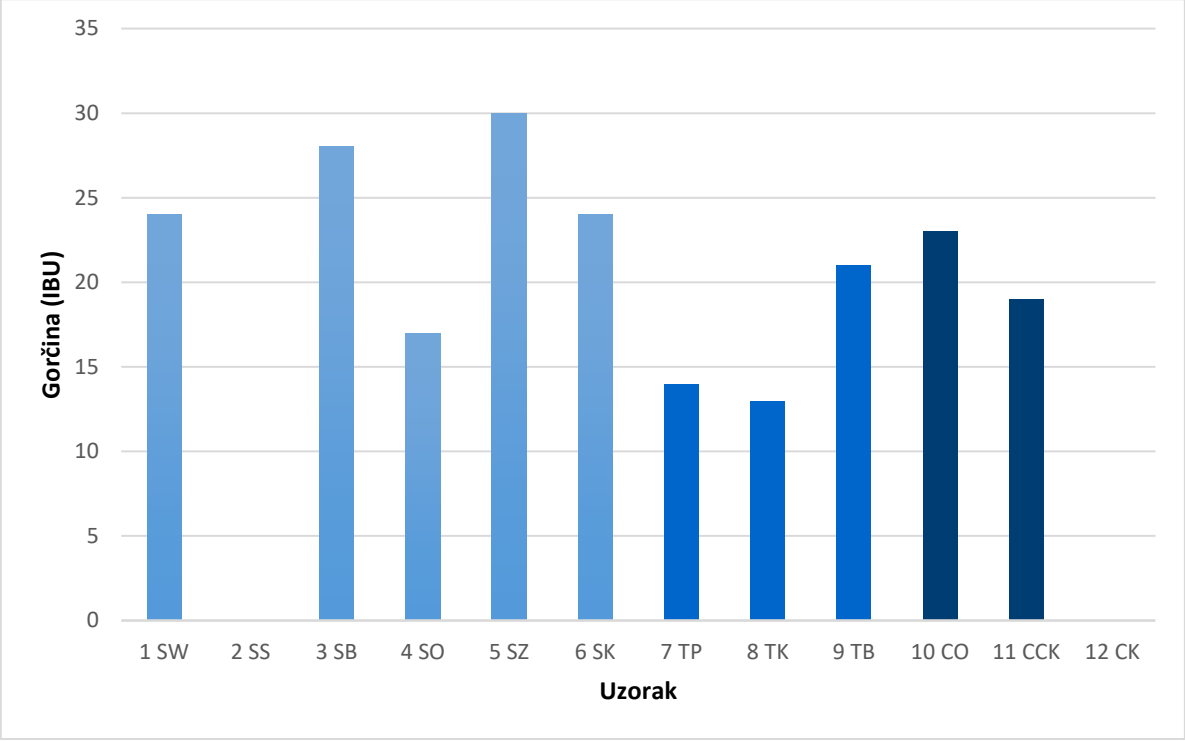
| Uzorak | Galna Kiselina (mg/100 mL) | Kava kiselina (mg/100 mL) | p-kumarinska kiselina (mg/100 mL) | Epikatehin (mg/100 mL) |
|---|---|---|---|---|
| 1 SW | 4,17 ± 0,01 | 0,55 ± 0,02 | 0,36 ± 0,03 | 1,45 ± 0,01 |
| 2 SS | 8,66 ± 0,03 | 1,33 ± 0,02 | 1,07 ± 0,18 | 2,62 ± 0,06 |
| 3 SB | 5,12 ± 0,01 | 0,93 ± 0,02 | 0,37 ± 0,01 | 1,64 ± 0,02 |
| 4 SO | 5,04 ± 0,02 | 0,76 ± 0,04 | 0,36 ± 0,04 | 1,42 ± 0,03 |
| 5 SZ | 7,65 ± 0,01 | 1,17 ± 0,08 | 1,53 ± 0,03 | 2,34 ± 0,09 |
| 6 SK | 4,12 ± 0,01 | 0,87 ± 0,04 | 0,71 ± 0,02 | 1,26 ± 0,03 |
| 7 TP | 8,97 ± 0,02 | 1,56 ± 0,33 | 1,04 ± 0,04 | 2,67 ± 0,22 |
| 8 TK | 11,25 ± 0,03 | 2,07 ± 0,02 | 1,87 ± 0,02 | 3,25 ± 0,09 |
| 9 TB | 13,46 ± 0,02 | 2,10 ± 0,00 | 2,23 ± 0,11 | 3,44 ± 0,20 |
| 10 CO | 11,22 ± 0,02 | 2,35 ± 0,28 | 3,45 ± 0,04 | 3,67 ± 0,37 |
| 11 CCK | 14,05 ± 0,03 | 2,29 ± 0,09 | 5,26 ± 0,05 | 4,55 ± 0,04 |
| 12 CK | 14,22 ± 0,04 | 2,25 ± 0,01 | 5,58 ± 0,18 | 4,30 ± 0,07 |

U tablici 5 prikazan je polifenolni profil ispitivanih uzoraka piva pakiranih u smeđu staklenu ambalažu. Galna kiselina pripada hidroksibenzojevim (fenolnim) kiselinama iz skupine fenola, te u tu skupinu također ubrajamo i *p* – kumarinsku i kafeinsku kiselinu koje pripadaju hidroksicimetnim kiselinama. Fenolne kiseline 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 namirnica biljnog podrijetla te mnogobrojnim proizvodima dobivenim preradom istih uključujući i piva (Cheynier, 2005).




**Slika 7** Struktura određenih polifenolnih spojeva

Fenolni spojevi imaju utjecaj u formiranju senzorskih svojstava, odnosno okusa i mirisa. Epikatehin pripada flavanolima iz skupine flavonoida koji u pivima pridonose gorčini te su velikim dijelom odgovorni za boju piva. Iz tablice je vidljivo da je najmanji udio u ispitivanim pivima kafeinske kiseline, zatim slijede *p* -kumarinska i epikatehin, dok je najzastupljeniji polifenol galna kiselina. Najviše galne kiselina ima uzorak 12 CK (14,22 mg/100mL) koje je ujedno crno pivo, dok najmanji udio galne ima uzorak 6 SK (4,12 mg/100mL) koje je svijetlo pivo. Svijetla i tamna piva (uzorci 1-9) imaju manji udio *p*- kumarinske kiseline, a veći udio epikatehina, dok uzorci crnih piva (10 -12) imaju veći udio *p*-kumarinske kiseline, a manji udio epikatehina. Flavonoidi su u pivu (odgovorni za trpkost) poželjni 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 α-kiselina iz hmelja (Collin i sur., 2013). Flavonoidi su velikim dijelom odgovorni za boju tamnih i crnih piva. Tamna piva sadrže daleko veću količinu tanina od svijetlih što se očituje tamnijom bojom piva.




**Slika 8** Gorčina analiziranih piva određena EBC metodom

Na Slici 8 je prikazana gorčina analiziranih piva. Pivo s najmanjom gorčinom, uspoređujući uzorke u kojima je određena gorčina, je uzorak 8 TK (13 IBU) koje je tamno pivo, dok je pivo s najvećom gorčinom bio uzorak 5 SZ (30 IBU) koje je svijetlo pivo. Osim polifenolnih spojeva,

flavonoida na gorčinu najveći utjecaj imaju α-kiselina iz hmelja (Collin i sur., 2013). 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).

# 5. ZAKLJUČCI

1. Koncentracija ukupnih polifenola određenih Folin – Ciocalteu metodom u analiziranim uzorcima piva pakiranih u smeđu staklenu ambalažu kretala se su rasponu od 15,48 do 28,52 g GAE/100mL, pri čemu je utvrđena statistički značajna razlika između koncentracije ukupnih polifnenola u svijetlim te tamnim i crnim analiziranim pivima gdje tamna i crna piva sadrže više polifenola.
2. Koncentracija ukupnih polifenola određena EBC metodom u analiziranim uzorcima piva pakiranih u smeđu staklenu ambalažu kretala se u rasponu od 9,8 do 23,5 g/mL, pri čemu je uočena značajna razlika između koncentracije ukupnih polifenola u svijetlim te tamnim i crnim analiziranim pivima gdje tamna i crna piva sadrže više polifenola
3. Rezultati određivanja koncentracije ukupnih polifenola Folin – Ciocalteu metodom znatno su veći za sve uzorke piva u odnosu na rezultate dobivene EBC metodom.
4. Antioksidacijska aktivnost u analiziranim uzorcima piva pakiranih u smeđu staklenu ambalažu kretala se u rasponu od 0,40 do 0,61 mmol trolox/100mL, pri čemu je postojala razlika između antioksidacijske aktivnosti u svijetlim i crnim analiziranim pivima, gdje crna piva imaju veću antioksidaciijsku aktivnost.
5. Najzastupljeniji polifenol u ispitivanim uzorcima bila je galna kiselina, dok je najmanje zastupljena bila kafeinska kiselina. Najviše galne kiseline sadržavao je uzorak sa 14,22 mg/mL koji je deklariran kao crno pivo.
6. Gorčina analiziranih piva kretala se u rasponu od 13 do 30. Najveću gorčinu imalo je pivo koje je deklarirano kao svijetlo, dok najmanju gorčinu imalo je pivo koje je deklarirano kao tamno.

# 6. LITERATURA

Aron PM, Shellhammer TH (2010.) A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. Journal of The Institute of Brewing116: 369-380.

Baiano A, Terracone C: Physico – chemicals indices, iso – alpha – acid, phenolic contents and antioxidant activity of commercial beers. *Journal of Food Research* 2:107-120, 2013.

Bamforth CW: Nutriotional aspects of beer, *Nutrition research* 22:227-237, 2002.

Berend S, Grabarić Z: Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 59:205-212, 2008.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 28:25-30, 1995.

Buiatti S: Beer composition: An overview. U *Beer in Health and Disease Prevetion,* str. 213-225, Academic Press Elsevier, London, 2009.

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,pristupljeno27.10.

EBC, European Brewery Convention : Total Polyphenols in Beer by Spectrophotometry. 9.11.http://analytica-ebc.com/index.php?mod=contents&method=477

Eberhardt MV, Lee CY, Lui RH: Nutrition-antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405:903-904, 2000.

Grabovac D: Određivanje udjela otopljenog kisika u različitim fazama proizvodnje sladovine i piva. *Završni rad,* Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2016.

Granato D, Favalli Branco G, Fonseca Faria J, Gomes Cruz A (2011.) Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color , phenolic compounds , and antioxidant activity using chemometrics. Journal of the Science of Food and Agriculture91: 563–571.

Harrison MA: Beer/brewing. U *Encyclopedia of microbiology,* Academic Press, str. 23-33, Oxford, 2009.

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

Krivak P: Utjecaj različitih skupina polifenolnih spojeva prisutnih u aroniji na njezinu antiradikalnu aktivnost, *Diplomski rad*, PTF, 2010.

Kunze W: *Brewing and malting.* VLB Berlin, Berlin, 1996.

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

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

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

Maslarević N: Optimizacija metode za određivanje reaktivnih kisika (ROS) u pivu. *Diplomski rad,* PTF, 2018

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.

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

Nemet Z: Tržišni, tehnološki, ekonomski i marketinški aspekti plasmana piva u staklenom i aluminijskoj ambalaži, Svijet piva, str. 36-41, 1991.

Pai TV, Swant SY, Ghatak AA, Chaturvedi PA, Gupte AM, Desai NS: Characterization of Indian Beers: Chemical composition and antioxidant potencial. *Journal of Food Science and technology* 52:1414-1423, 2015.

Naumov GI, Naumova ES, Turakainen H, Korhola, M. (1996) Identification of the alpha-galactosidase MELgenes in some populations of Saccharomyces cerevisiae: a new gene MEL11. Genet. Res.67(2), 101-108.

Parker DK: Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis. U *Alcoholic Beverages,* str. 133-158, Woodhead Elsevier, Cambridge, 2012.

Pavlečić M, Tepalović D, Ivančić Šantek M, Rezić T, Šantek B: Utjecaj ukupne koncentracije kisika u boci na kakvoću piva tijekom skladištenja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 7:118-125, 2012.

Schuster K, Weinfurtner F, Narzis L: *Tehnologija proizvodnje sladovine.* Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd, 2009.

Spearot JW: Influence of Beer Color on Perception of Bitterness. *Master rad,* Drexel University, Philadelphia, 2016.

Veselov IJ, Čukmasova MA: *Thehnologija piva.* Poslovno udruženje industrije piva, Beograd, 1966.

Vukomanović K: Usporedba dvaju metoda za određivanje ukupnih polifenola. *Diplomski rad,* PTF, 2016.

Zarknov M: *Beer.* U *Encyclopedia of Food Microbiology,* Academic Press, str. 209-215, Poland, 2014.

Ough CS, Amerine MA: Phenolic compounds. U Methods for Analysis of Musts and Wines; (Ough CS., Amarine MA, Ur.) Wiley: New York, 196−221, 1998.