

Proizvodnja i karakterizacija piva proizvedenog s dodatkom crvene djeteline (*Trifolium pratense*)

Marinčić, Lara

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:349519>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



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

Lara Marinčić

**PROIZVODNJA I KARAKTERIZACIJA PIVA
PROIZVEDENOG SA DODATKOM CRVENE DJETELINE
(*Trifolium pratense*)**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za proesno inženjerstvo
Katedra za bioprocesno inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31400 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje:

Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Tehnologija slada i piva

Tema rada

je prihvaćene na III. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2023./2024. održanoj 21. prosinca 2023.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Kristina Mastanjević

Komentor: dr.sc. Daniela Horvat, znan. sav.

Proizvodnja i karakterizacija piva proizvedenog sa dodatkom crvene djeteline (*Trifolium pratense*)

Lara Marinčić, 0113142509

Sažetak:

Pivo je jedno od najčešće konzumiranih alkoholnih pića u svijetu. Sadrži samo 4 osnovna sastojka, ali bez obzira na to pruža raznolikost mirisa, okusa, arome te boje. Proizvodnja piva je složen proces pri čemu nastaju različite vrste piva. U proteklih nekoliko godina, potrošači i proizvođači pokazuju sve više interesa za funkcionalnim proizvodima, pa tako i funkcionalnim pićima, s naglaskom na zdravlje. Jedna s potencijano zdravstvenim utjecajem je i crvena djetelina (*Trifolium pratense L.*), koja se povezuje sa smanjenjem simptoma menopauze zbog svojeg kemijskog sastava. Naime, crvena djetelina sadrži velike količine izoflavona, koji se nazivaju fitoestrogenima upravo zbog svoje sličnosti s estrogenima. Cilj ovog diplomskog rada bio je proizvesti pivo s dodatkom crvene djeteline koja se dodaje tokom kuhanja sladovine s hmeljem. Nakon proizvodnje, provedene su fizikalno-kemijske analize, senzorska analiza kako bi se utvrdila prihvatljivost ovog proizvoda, te je određen udio izoflavona u konačnom proizvodu.

Ključne riječi: Pivo, crvena djetelina, izoflavoni, zdravlje

Rad sadrži: 43 stranice
22 slike
4 tablice
37 literaturne reference

Jezik izvornika: Hrvatski

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

- | | | |
|----|---|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. Stela Jokić | predsjednik |
| 2. | izv. prof. dr. sc. Kristina Mastanjević | član-mentor |
| 3. | dr.sc. Daniela Horvat, znan. sav. | Član-komentor |
| 4. | doc. dr. sc. Krunoslav Aladić | zamjena člana |

Datum obrane: 26. rujna 2024.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Technology of malt and beer
Thesis subject: was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. III held in the academic year 2023/2024 on December 21 2023
Mentor: Kristina Mastanjević, PhD, assoc. prof.
Co-mentor: Daniela Horvat, PhD, scientific advisor

Production and characterization of beer produced with the addition of red clover (*Trifolium pratense*)

Lara Marinčić, 0113142509

Summary:

Beer is one of the most commonly consumed alcoholic beverages in the world. It contains only 4 basic ingredients, but regardless of that, it provides a variety of smells, tastes, aromas and colors. Beer production is a complex process whereby different types of beer are produced. In the past few years, consumers and manufacturers have shown more and more interest in functional products, including functional drinks, with an emphasis on health. One with a potentially health impact is red clover (*Trifolium pratense L.*), which is associated with a reduction in menopausal symptoms due to its chemical composition. Namely, red clover contains large amounts of isoflavones, which are called phytoestrogens precisely because of their similarity to estrogens. The aim of this thesis was to produce beer with the addition of red clover, which is added during the brewing of wort with hops. After production, physical-chemical analyses, sensor analysis were carried out to determine the acceptability of this product, and the proportion of isoflavones in the final product was determined.

Key words: beer, red clover, isoflavones, health

Thesis contains: 43 pages
22 figures
4 table
37 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1.	Stela Jokić, PhD, full prof.	chair person
2.	Kristina Mastanjević, PhD, assoc. prof.	supervisor
3.	Daniela Horvat, PhD, scientific advisor	member-co-supervisor
4.	Krunoslav Aladić, PhD, assist. prof.	stand-in

Defence date: September 26, 2024

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

DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

26.9.2024.

LARA MARINČIĆ


TE OCIJENJEN USPJEHOM

10,5

Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:


1. prof. dr. sc. Stela Jokić

predsjednik

u/z 
(potpis)


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

član


(potpis)

3. dr. sc. Daniela Horvat, znan. sav.

član


(potpis)

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Mastanjević na ukazanoj prilici, pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, braći Relji i Lovri, dečku Luki i svim prijateljima bez kojih ovaj put studiranja ne bi bio moguć jer su mi u svakom trenutku i situaciji bili potpora.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Proces proizvodnje piva	4
2.1.1. Osnovni sastojci piva	4
2.1.1.1. Voda	4
2.1.1.2. Slad	4
2.1.1.3. Hmelj	6
2.1.1.4. Kvasac	8
2.1.2. Faze proizvodnje	9
2.1.2.1. Drobljenje slada	9
2.1.2.2. Ukomljavanje	9
2.1.2.3. Kuhanje sladovine (ohmeljavanje)	10
2.1.2.4. Vrenje	10
2.1.2.5. Dorada piva	11
2.2. Crvena djetelina	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. ZADATAK	14
3.2. MATERIJALI RADA	14
3.3. METODE	14
3.3.1. Postupak proizvodnje piva u laboratoriju	14
3.3.2. Fizikalno-kemijske analize piva	20
3.3.2.1. Određivanje udjela alkohola, specifične težine, prividnog ekstrakta, stvarnog ekstrakta i ekstrakta u osnovnoj sladovini	20
3.3.2.2. Određivanje pH	22
3.3.2.3. Određivanje boje	22
3.3.2.4. Određivanje gorčine	23
3.3.2.5. Određivanje polifenola	25
3.3.3. Profil izoflavona	26
3.3.3.1. Kemikalije	26
3.3.3.2. Određivanje i kvantifikacija izoflavona pomoću HPLC-a	26
3.3.4. Senzorska analiza	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. REZULTATI MJERENJA FIZIKALNO- KEMIJSKE ANALIZE	30
4.2. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE PIVA S DODATKOM CRVENE DJETELINE	35
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	40

Popis oznaka, kratica i simbola

CMC- EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
CO ₂	Ugljikov dioksid
HCl	Klorovodična kiselina
IBU	International bitternes unit
PTFOS	Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

1. UVOD

Pivo je jedno od najstarijih pića na svijetu, te treće po konzumaciji, poslije vode i čaja. Primarni sastojci za proizvodnju piva su slad, voda, hmelj i kvasac (Lukinac i sur., 2019). Međutim, čak i s tako malo sastojaka, pivo se smatra vrlo složenim alkoholnim pićem jer se i s tako malim brojem sastojaka mogu dobiti razne vrste piva. Ovo je jedan od razloga zašto je pivo popularno piće u svijetu- pruža raznolikost okusa, arome, mirisa, te boje (Gagula i sur., 2020). Pivo predstavlja pjenušavo alkoholno piće karakterističnog gorkog okusa i arome koje potječe od hmelja. Dobiva se alkoholnim vrenjem pivske sladovine s pivskim kvascem, pri čemu razlikujemo kvasce donjeg vrenja, te gornjeg vrenja. Kvasci donjeg vrenja (*Saccharomyces pastorianus*) previru sladovinu pri 6 do 18 °C te se dobivaju tzv. lager piva, odnosno piva donjeg vrenja, dok kvasci gornjeg vrenja (*Saccharomyces cerevisiae*) previru sladovinu pri višim temperaturama, 16 do 20 °C, i tu se dobivaju piva gornjeg vrenja (Šantek, 2021). U novije vrijeme, potrošači i proizvođači sve više pokazuju interesa za funkcionalnom hranom, tako i za funkcionalnim pivima. Takva piva sadrže osim osnovnih sastojaka i dodatke s potencijalno pozitivnim zdravstvenim učinkom. Crvena djetelina (*Trifolium pratense*) bogata je fenolima i izoflavonima te sadrži brojna bioaktivna svojstva koja bi mogla povoljno utjecati na nutritivni i organoleptički profil piva (Habschied i sur., 2024).

Cilj ovog diplomskog rada je proizvesti pivo s dodatkom crvene djeteline, kako bi se istražio njezin utjecaj na kemijska, senzorska i mikrobiološka svojstva piva. Uvođenjem crvene djeteline u proizvodnju piva, otvaraju se mogućnosti razvoja novih proizvoda s naglaskom na funkcionalnost i zdravlje. Proizvodnja piva s crvenom djetelinom odvijala se u laboratoriju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, a kemijska analiza je odrađena u laboratoriju Osječke pivovare.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Proces proizvodnje piva

Pivo je, prema definiciji postavljenoj 1516. prema bavarskom zakonu o čistoći proizvodnje piva, piće dobiveno od ječmenog slada, hmelja i vode uz dodatak kvasca. Osnovne karakteristike piva podrazumijevaju stabilnu pjenu, karakterističan okus gorčine po hmelju, mali udio alkohola te osvježavajući karakter (Gaćeša, 1979). Proces proizvodnje piva je složen i dugotrajan proces, te se dijeli na tehnologiju slada i tehnologiju piva. Tehnologija slada sastoji se od: čišćenja i sortiranja ječma, močenja ječma, klijanja ječma, sušenja zelenog slada, oslobađanja slada od klice i poliranja, dok se tehnologija piva sastoji od većeg broja tehnoloških procesa koje možemo svrstati u sljedeće faze: proizvodnja sladovine, glavno i naknadno vrenje te bistrenje i punjenje piva (Semiz, 1979).

2.1.1. Osnovni sastojci piva

Prema Pravilniku o Pivu, dozvoljeno je koristiti sljedeće sastojke: ječmeni i/ili pšenični slad, neslađene žitarice i proizvodi od žitarica, karamelni slad i drugi sladovi za bojenje, prženi ječam i pšenica, prženi ječmeni i pšenični slad, šećeri i ostali saharidi, šećerni i škrobni sirupi, hmelj i proizvodi od hmelja, voda, mikrobne kulture, prehrambeni aditivi, ugljikov dioksid i dušik, voćna pulpa, voćna kaša, koncentrirana voćna kaša, vodeni ekstrakt voća (NN 142/2011).

2.1.1.1. Voda

Voda se smatra jednom od najvažnijih sirovina u proizvodnji piva, upravo iz razloga što ona čini 85-95%, odnosno najveći udio u pivu. Kvaliteta i vrsta piva uvelike ovise o vodi, stoga je odgovarajuća tehnologija obrade vode u proizvodnji piva u pivovarama od velike važnosti kako bi se dobila piva s određenim karakteristikama (Lončarić i sur., 2017). Martínez-Espinosa (2020) tvrdi da kemijski sastav vode ima odlučujući utjecaj na svojstva piva, te da značajno doprinosi konačnom okusu piva. Također, ravnoteža minerala koji se nalaze u vodi za kuhanje utjecat će na karakter okusa, kao i percepciju okusa slada, hmelja i nusproizvoda fermentacije. Nadalje, smatra da voda može utjecati i na performanse kvasca, što dalje utječe na okus, aromu i osjećaj piva u ustima.

2.1.1.2. Slad

Ječmeni slad (**Slika 1**) smatra se glavnim izvorom fermentabilnih šećera koje kvasac koristi u tradicionalnom kuhanju piva. Ovisno o uvjetima kao što su temperatura i vrijeme, dobivaju se

blijedi, jantarni ili tamni sladovi. Boja je zapravo posljedica karamelizacije šećera i Maillardove reakcije. Na vrstu i kvalitetu utječe raznolikost ječma i proizvodnja sladovine. Sladovi se proizvode od odabranog zrna žitarice, najčešće je to ječam, ali može se proizvoditi i od pšenice, raži, prosa, zobi, itd (Martínez-Espinosa, 2020).

Prema Gaćešu (1979), glavni tehnološki proces proizvodnje slada sastoji se od sljedećih faza:

- Prihvat i skladištenje ječma,
- Čišćenje ječma,
- Močenje ječma,
- Klijanje ječma,
- Sušenje zelenog slada i
- Dorada i skladištenje slada

Prihvat i skladištenje ječma mora se obaviti tako da se očuvaju optimalne karakteristike ječma, koje su neophodne u proizvodnji slada. Ječam se nakon berbe u silosima mjeri, grubo rafinira i ako je potrebno suši do udjela vlage pri kojem se može sigurno skladištiti. Čišćenjem se uklanjaju sve nečistoće poput slame, prašine, lomljenih zrna, manjih zrna ječma itd.. Čišćenjem se dobiva čisto zrno ujednačenih dimenzija, gdje se samo iz zdravog, očišćenog zrna može dobiti homogeni, visokovalitetni slad (Gaćeša, 1979).

Močenje ječma bitno je zbog povećanja vlage u zrnu, tako da ono može početi klijeti. U prirodi je potrebno povećati vlagu početnog zrna sa 11-13% na 28-30%. Međutim, u tehnologiji slada se zrno natapa na sadržaj vlage od 44-46%, kako bi klijanje bilo brzo i ravnomjerno. Za močenje se koristi voda temperature 10-18 °C, koja služi ujedno i za pranje ječma (uklanjanje stranih nečistoća) kako bi osigurali bolju kvalitetu slada. Potrebno je zrnu osigurati i određenu količinu kisika, kako se zrno ne bi ugušilo (Gaćeša, 1979).

Klijanje je osnovna faza u proizvodnji slada u kojoj se odvija većina biokemijskih transformacija. Slad se formira iz ječma, odnosno enzimi se sintetiziraju i aktiviraju, djeluju na stanične stijenke, proteine i škrob, te ih razgrađuju na sastojke koji su potrebni za život klica kako bi se izgradilo korijenje, stabljika i lišće nove biljke. Tijekom klijanja odvija se disanje zrna, pri čemu se stvara ugljikov dioksid i razvija se određena količina topline. Klijanje se provodi na temperaturama od 13-18 °C i traje 5-10 dana pri čemu se završetkom klijanja dobiva zeleni slad (Gaćeša, 1979).

Sušenje zelenog slada potrebno je zbog toga što zeleni slad nastavlja klijati i vrlo je nestabilan, a sušenjem se zaustavlja njegovo klijanje. Sušenje se vrši u struji zagrijanog zraka pri temperaturi od 80-105 °C i traje oko 18-24 sata. Nakon sušenja proizvod sadrži od 3-5% vlage i naziva se suhi slad (Gaćeša, 1979).

Dorada i skladištenje slada. Suhi slad potrebno je ohladiti prozračivanjem strujom hladnog zraka, nakon čega se sladne klice odvajaju od njega. Gotovi slad se zatim skladišti u silosu (Gaćeša, 1979).



Slika 1 Ječmeni slad Best Pale Ale (vlastita arhiva)

2.1.1.3. Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) (**Slika 2**) je vinova loza koja pripada rodu *Humulus* iz porodice Cannabaceae. U pivu se koristi ženski cvat hmelja, kao izvor gorkog okusa i očuvanja piva. U tradicionalnoj medicini se hmelj koristi kao lijek za liječenje poremećaja sa spavanjem, kao lijek

za želudac i kao antibakterijsko te antifungalno sredstvo. Hmelj je bogat fenolnim spojevima, najviše flavonoidima. Hmelj je također bogat humulonima i lupulonima, i upravo zbog toga dobivamo karakterističnu aromu i gorčinu piva, te čuvaju pivo od razvoja bakterija i plijesni. (Tronina i sur., 2020). Hmelj se uglavnom koristi u pivarskoj industriji, gdje on čini manji sastojak, ali bez obzira na to, ima veliki utjecaj na senzorska svojstva konačnog piva. Osim što pridonosi gorkom okusu, doprinosi i posebnom karakteru s obzirom na odabranu sortu hmelja. Razlog tome je njegov kemijski sastav u smolama hmelja, hmeljnom ulju i polifenolima. Hmelj se može koristiti u različitim varijantama, kao cijeli, mljeven, kao ekstrakt ili kao peleti. Najčešće se koristi u obliku peleta- hmeljnog praha. (Nance i Setzer, 2011).

Sastojci hmelja koji su važni u pivarstvu:

- Gorki sastojci (19%),
- Eterična ulja (0,5%),
- Polifenoli (4%),
- Proteini (20%) i
- Minerali (8%)

Ključno zbivanje koje se događa tijekom kuhanja sladovine sa hmeljem je konverzija netopljivih α - kiselina u topljive izo- α - kiseline (humuloni) i β - kiseline (lupuloni). Hmelj se dodaje od 200-500 g/100 kg sladovine (Mastanjević, 2024).



Slika 2 Hmelj Hallertau Mittelfrüh (vlastita arhiva)

2.1.1.4. Kvasac

Kvasac je jednostaničan mikroorganizam dobiven razmnožavanjem mikroskopskih gljiva (kvasci) s oko 1500 vrsta. U industrijskoj biotehnološkoj proizvodnji koristi se oko 20-ak rodova kvasaca, a najznačajniji su oni iz roda *Saccharomyces*, koji su ključni uzročnici vrenja, odnosno fermentacije. Koriste se kao pivski, vinski, alkoholni, te pekarski kvasac. Kvasac se smatra najvažnijim dijelom fermentacije, jer on pretvara šećer u alkohol, ugljikov dioksid i druge spojeve koji utječu na okus fermentiranih pića. Kvasac to radi iz razloga kako bi stvorio energiju i dobio materijal za daljne razmnožavanje (Godinić Mikulčić, 2020). White i Zainasheff (2010) smatraju da proces kuhanja možemo podijeliti u dvije faze: vruću stranu i hladnu stranu. Vruća strana je postupak kuhanja koji se odvija u pivovari i uključuje oblikovanje recepta, mljevenje, gnječenje te kuhanje sladovine i hmelja. Proizvod iz vruće strane, hmeljena sladovina, osigurava hranu kvascu u drugoj fazi, odnosno tzv. hladnoj strani. Hladna strana započinje kada pivar hladi sladovinu te u nju dodaje kvasac pri čemu dolazi do fermentacije. Ovisno o recepturi, White i Zainasheff (2010) smatraju da će kvasac metabolizirati oko 50-80% ekstrakta sladovine, te će ostatak biti proteini, dekstrini i drugi spojevi koji nisu metabolizirali. 46,3% ekstrakta kvasac pretvara u ugljični dioksid, 48,4% u etanol te 5,3% u novu masu kvasca. Dok kvasci metaboliziraju ekstrakt, stanice kvasca proizvode stotine drugih spojeva, koji postoje u vrlo malim količinama i čine oko 1% mase metaboliziranog ekstrakta. Ti spojevi su vrlo važni jer uvelike doprinose okusu piva.

Pivski kvasci roda *Saccharomyces* mogu se podijeliti u dvije skupine: „ale kvasac“ (kvasac gornjeg vrenja) i „pale kvasac“ (kvasac donjeg vrenja) koji su klasificirani prema njihovom svojstvu flokulacije. Gornji kvasac se, stoga, diže na površinu fermentirane sladovine, na kraju fermentacije, dok se donji kvasac taloži na dnu posude za fermentaciju. Ova dva kvasca se razlikuju i na temelju rasta, te temperature vrenja. Optimalna temperatura rasta za *Saccharomyces* je od 25-30 °C, no za kvasce gornjeg vrenja i donjeg vrenja se to razlikuje, tako da se kod gornjeg vrenja rast i fermentacija odvija između 14 i 25 °C, a za kvasce donjeg vrenja se koriste temperature između 4 i 12 °C. „Ale kvasci“ se koriste za proizvodnju piva s vrlo različitim karakteristikama između njih, kao što su ale, porter ili stout, te sojevi koji se koriste za proizvodnju ovih piva najčešće pripadaju vrsti *Saccharomyces cerevisiae*. Donje vrenje koje provodi „pale

kvasac“, odnosno *Saccharomyces pastorianus*, koristi se za proizvodnju lager piva (Capece i sur., 2018).

2.1.2. Faze proizvodnje

Prema de Lima i sur. (2022), tehnologija proizvodnje uključuje nekoliko operacija koje rezultiraju konačnom proizvodu, pivu, a sastoje se od:

1. Drobljenje i mljevenje slada
2. Ukomljavanje sladne prekrupe, filtracija komine
3. Kuhanje sladovine
4. Vrenje
5. Dorada piva

2.1.2.1. Drobljenje slada

Glavni cilj proizvodnje slada je proizvesti dovoljnu zalihu enzima koji su potrebni kako bi razgradili škrob, proteine, masti i druge komponente žitarica. Naknadnom enzimskom promjenom osiguravaju se fermentabilni šećeri iz škroba i tvari koji su potrebni za rast kvasca kao što su aminokiseline i masne kiseline iz drugih supstrata. Kako bi se proizveo ječmeni slad, potrebno je zrna ječma prvo natopiti u vodi temperature 10-15 °C, a zatim počinju klijati na 15-20 °C 3-7 dana. Nakon što je ječam proklijao, klice se uklanjaju, nakon čega medij ostaje bogat α -amilazom, proteazama i njihovim supstratima. Zatim se slad suši na približno 5% vlage i melje. Mljevenje se provodi kako bi se izložio škrobni endosperm zrna što ugljikohidrate čini dostupnijima (Alexander i sur., 2000). Mljevenje je obično kontinuirani proces, a koriste se mokri mlin, valjak ili čekić (Martínez-Espinosa, 2020).

2.1.2.2. Ukomljavanje

Tijekom ukomljavanja, većina netopivih, nefermentabilnih ugljikohidrata i proteina hidrolizira u topive, fermentabilne oblike uz pomoć enzima koji su prisutni u sladu. To se postiže na način da se mljeveni slad pomiješa s vodom. Temperatura smjese se održava između 38- 50 °C, kako bi se pojačalo djelovanje enzima proteaze u početnom razdoblju ukomljavanja, te se razgrađuju proteini u aminokiseline. Ovaj proces traje između 40 i 60 minuta. Zatim se temperatura povećava na 65-70 °C, radi povećanja aktivnosti amilaze. Konkretno, na temperaturama između 62 i 65 °C dodaje

se β -amilaza koja s nereducirajućeg kraja molekule škroba hidrolizira $\alpha(1-4)$ glikozidnu vezu i nastaju dvije molekule maltoze u vremenskom razdoblju od 30 do 45 minuta. Nadalje, uz pomoć α -amilaze dolazi do potpunog ošećerenja na 70-75 °C za 30 do 45 minuta. Kada je proces završen, potrebno je temperaturu povećati na 78 °C, kako bi se enzimi inaktivirali (Alexander i sur., 2000; Mastanjević, 2024).

Nakon ukomljavanja, potrebno je sadržaj filtrirati kako bi se uklonili netopivi dijelovi iz sladovine, odnosno, kako bi se odvojilo zrno od sladovine (privijenca). Filtracija se odvija u cijednjaku ili bisteniku, oko 2 sata, na temperaturi između 75 i 80 °C (Mastanjević, 2024).

2.1.2.3. Kuhanje sladovine (ohmeljavanje)

Prema Alexander i sur. (2000), filtrirana sladovina se obično kuha u kotliću za kuhanje do 2 sata, u koji se dodaje hmelj. Kuhanje služi za nekoliko svrha:

- Zaustavlja se daljnje enzimsko djelovanje u sladovini,
- Izvlači spoj okusa iz hmelja (gorčina),
- Koncentrira i sterilizira sladovinu,
- Uzrokuje taloženje nehidroliziranih proteina i
- Eliminira nepoželjne hlapljive komponente

Među spojevima ekstrahiranim iz hmelja nalaze se eterična ulja (α - gorka kiselina), lupulon (β -gorka kiselina) te tanin. Ulja humulon i lupulon doprinose važnim karakteristikama okusa u pivu, kao i antimikrobna svojstva. Nakon kuhanja, istaloženi proteini se odvajaju u dekanteru, sladovina se brzo hladi na temperaturu 6-15 °C i vrši se aeracija prije nacjepljivanja kvascem (Mastanjević, 2024).

2.1.2.4. Vrenje

Nakon što se prokuhala sladovina, hladi se na temperaturu fermentacije pomoću pločastog izmjenjivača topline te se oksigenira i dodaje se kvasac. Tijekom početne faze fermentacije, kvasac troši kisik, sintetizira metaboličke enzime i sterole koji su potrebni za rast stanica. Kako se kisik troši, populacija stanica se eksponencijalno povećava, te započinje alkoholna fermentacija u kojoj se glukoza najprije asimilira, zatim maltoza i na kraju maltotrioza. Kvasac se taloži iz suspenzije, kako koncentracija šećera opada. Specifična težina sladovine opada tijekom fermentacije kako se konzumiraju šećeri, te također i pH sladovine, kako se organske kiseline izlučuju kvascem.

Fermentacija lagera traje otprilike 1 tjedan, dok tradicionalne fermentacije piva (gornjeg vrenja), koje se provode pri višim temperaturama, zahtijevaju manje vremena. Primarna reakcija tijekom vrenja je pretvorba šećera u etanol i ugljikov dioksid, no kvasac također proizvodi i druge nusproizvode koji utječu na okus i aromu piva. Nusproizvodi koji nastaju su aldehidi, viši alkoholi, esteri i sumporni spojevi (Ullrich, 2011).

2.1.2.5. Dorada piva

Prema Mastanjević (2024), dorada piva provodi se nakon završetka vrenja sladovine, a uključuje nekoliko postupaka:

- Odvajanje stanica kvasca i proteina centrifugom,
- Filtraciju na niskim temperaturama,
- Stabilizaciju piva,
- Biološku stabilizaciju piva dubinskom filtracijom i pasterizacijom,
- Biološku stabilizaciju piva nakon natakanja u ambalažu,
- Korekciju vrijednosti nekih od sastojaka i
- Bistrenje piva prirodnim taloženjem do 3 mjeseca

2.2. Crvena djetelina

Crvena djetelina (*Trifolium pratense L.*) je važna krmna leguminoza, odmah nakon lucerne, koja se uzgaja u mnogim zemljama. U Hrvatskoj postoji 76 vrsta djetelina, među kojima se ističe crvena djetelina zbog svoje važnosti i rasprostranjenosti. Crvena djetelina sadrži vrlo visoku hranjivu vrijednost. Naime, pri istim fazama razvoja, crvena djetelina sadrži više energije, bogatija je nekim mineralnim tvarima te ima veću probavljivost organske tvari nego što to ima lucerna. Također je bogata ugljikohidratima i proteinima. Crvena djetelina se uzgaja kao ratarska kultura i koristi se u ishrani domaćih životinja kako bi se povećala količina konzumirane hrane i performansa životinja, te kod mliječnih krava kako bi proizvele kvalitetnije mlijeko (Dujmović Purgar i sur., 2009; Leto i sur., 2013). Također se crvena djetelina smatra ljekovitom biljkom. Koristi se za liječenje kožnih bolesti, kao sredstvo za čišćenje krvi, te u narodnoj medicini kao sredstvo protiv kašlja. Crvena djetelina se može koristiti i protiv upale crijevnih sluznica jer je dobar izvor tanina (Dujmović Purgar i sur., 2009). Crvena djetelina sadrži izoflavone, biljne kemikalije koje imaju sličan učinak estrogenu na tijelo, pa se zbog toga koriste dodaci prehrani sa crvenom djetelinom za liječenje simptoma menopauze (Kim i sur., 2020). Sadrži značajne količine četiri estrogena izoflavona: formononetin, genistein, biokanin A i daidzein. Crvena djetelina se uglavnom ne koristi kao izvor hrane za ljude, no neke populacije, u malim količinama, ju koriste kao aromu hrane. Klica crvene djeteline se koristi kao dodatak salatama ili kao ukras, dok listovi i cvjetovi, koji su također jestivi, imaju sladak i nježan okus kada se konzumiraju sirovi (Habschied i sur., 2024).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je proizvesti pivo u koje se tijekom kuhanja doda crvena djetelina, te će se odrediti izoflavoni u takvom pivu. Tijekom proizvodnje i fermentacije pratit će se osnovna fizikalno-kemijska svojstva sladovine i piva te će se senzorskom analizom utvrditi prihvatljivost.

3.2. MATERIJALI RADA

Sirovine

- Ječmeni slad „Best Pale Ale“ (Simpsons, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Hmelj „Hallertau Mittelfrüh“ (Hopsi, Njemačka)
- Kvasac „Safale US-05“ (Fermentis, SAD)
- Crvena djetelina
- CaSO_4
- CaCl_2
- MgSO_4
- NaHCO_3
- CaCO_3

3.3. METODE

3.3.1. Postupak proizvodnje piva u laboratoriju

Postupak proizvodnje piva započinje ulijevanjem 23L destilirane vode u Speidel Braumeister uređaj (Slika 3). Voda koja se ukomljava, trebala bi sadržavati određene količine soli, radi postizanja određene pH vrijednosti, karakteristične za proizvodnju pale ale piva: 1,5 g CaSO_4 , 5 g CaCl_2 , 8 g MgSO_4 , 2,5 g NaHCO_3 , te 2,5 g CaCO_3 . Voda se kuhala do postizanja temperature od 68 °C u uređaju Braumeister oko 60 minuta.



Slika 3 Speidel Braumeister uređaj za kuhanje piva (vlastita arhiva)

Nakon kuhanja vode, slijedi korak ukomljavanja u kojem se dodaje 5 kg slada Best Pale Ale (Slika 4), te započinje proces koji traje 1 sat na 65°C. Kako bi se inaktivirali enzimi, na kraju ukomljavanja zagrijala se smjesa na 75 °C, 10 minuta.



Slika 4 Ječmeni slad Best Pale Ale (vlastita arhiva)

3. Eksperimentalni dio

Prije ukomljavanja odvaja se dio vode za ispiranje te se dodaju soli: 0,35 g CaSO_4 , 1,1 g CaCl_2 , 0,9 g MgSO_4 , 0,55 g NaHCO_3 , te 0,55 g CaCO_3 . Završetkom ukomljavanja, pripremljenom vodom provede se ispiranje tropa, nakon čega se trop ocijedio kroz filter ploču. Slijedi korak ohmeljavanja u kojem se sladovina zagrijava na 100 °C, te kada je dosegnula zadanu temperaturu dodalo se 40,1 g hmelja Hallertau Mittelfrüh (**Slika 5**) i 200,4 g nasjeckane crvene djeteline (**Slika 6**) te se nastavilo kuhati 60 minuta. Uzorak crvene djeteline prikupljen je u razdoblju punog cvjetanja.



Slika 5 Hmelj Hallertau Mittelfrüh (vlastita arhiva)



Slika 6 Crvena djetelina (vlastita arhiva)

Nakon ohmeljavanja, dodalo se spiralno hladilo, koje se spaja na dovod vodovodne vode koja struji kroz izmjenjivač kao rashladni medij, u sladovinu kako bi se provelo hlađenje do temperature inokulacije (20-25 °C). Kada se sladovina ohladila, pretače se u fermentacijsku posudu. Uzima se uzorak kako bi se odredila ukupna količina fermentabilnih šećera u sladovini, koja je iznosila 10,7 °P na uređaju EasyDens. ovaj podatak govori kolika je očekivana količina alkohola u pivu nakon fermentacije. Kada se sladovina prelila u fermentacijsku posudu, inokulira se s 11,5 g kvasca Safale US-05 (**Slika 7**) i započinje fermentacija. Fermentacija se provodi na 21 °C u rashladnoj komori kroz 7 dana. Nakon završetka fermentacije, uzet je ponovno uzorak te se odredila ukupna količina fermentiranog šećera na uređaju EasyDens koja je iznosila 2,9 °P.



Slika 7 Kvasac Safale US-05 (vlastita arhiva)

Nakon fermentacije, pivo se hladilo 3 dana na 2-4 °C, kako bi se istaložili proteini, hmelj i kvasac. Zatim, nakon što se pivo ohladilo, prebacuje se u keg (Slika 8) u kojem se gazira uz pomoć CO₂ pod tlakom od 2,5 bara.



Slika 8 Keg (vlastita arhiva)

3. Eksperimentalni dio

Nadalje, gazirano pivo se puni (**Slika 9**) u tamne staklene boce otpremnine 0,5 L. Nakon punjenja staklene boce se začepi krunskim čepovima pomoću ručnog zatvarača. **Slika 10** prikazuje začepljene tamne staklene boce napunjene pivom s dodatkom crvene djeteline.



Slika 9 Punjenje piva u boce (vlastita arhiva)



Slika 10 Začepljene boce s pivom s dodatkom crvene djeteline (vlastita arhiva)

Kontrolno pivo proizvedeno je na isti način, s istim sastojcima, ali bez dodavanja crvene djeteline tijekom kuhanja sladovine (ohmeljavanja).

3.3.2. Fizikalno-kemijske analize piva

Fizikalno-kemijske karakteristike piva s dodatkom crvene djeteline odrađene su u laboratoriju Osječke pivovare. Određivane su vrijednosti za gorčinu, pH vrijednost, udio alkohola, boja te ukupni polifenoli. Prije nego što su se odredile vrijednosti, provedena je filtracija pomoću filter papira i dijatomejske zemlje kako je prikazano na **Slici 11**.



Slika 11 Filtracija piva uz filter papir i dijatomejskom zemljom (vlastita arhiva)

3.3.2.1. Određivanje udjela alkohola, specifične težine, prividnog ekstrakta, stvarnog ekstrakta i ekstrakta u osnovnoj sladovini

Ekstrakt u sladovini je pokazatelj jačine piva, odnosno s kolikim postotkom ekstrakta je započela fermentacija. Prividnim ekstraktom smatra se neprevreli ekstrakt u pivu koji se određuje uz prisutnost alkohola, dok se pravi ekstrakt određuje eliminiranjem alkohola iz piva (Gagula, 2017).

Nakon što se provela filtracija, profiltrirani uzorci se zatim stavljaju u uređaj za analizu piva DMA

3. Eksperimentalni dio

4500 M (**Slika 12**). Uzorci se stavljaju jedan po jedan, u prostor za bocu na analizatora koji potom preko igle za uzorkovanje uzima uzorak i mjeri zadane parametre. Na **Slici 13**, mogu se vidjeti vrijednosti analiziranog piva s dodatkom crvene djeteline.



Slika 12 Uređaj za analizu piva DMA 4500 M proizvođača Anton Paar (vlastita arhiva)



Slika 13 Prikaz dobivenih rezultata na uređaju za analizu piva DMA 4500 M (vlastita arhiva)

3.3.2.2. Određivanje pH

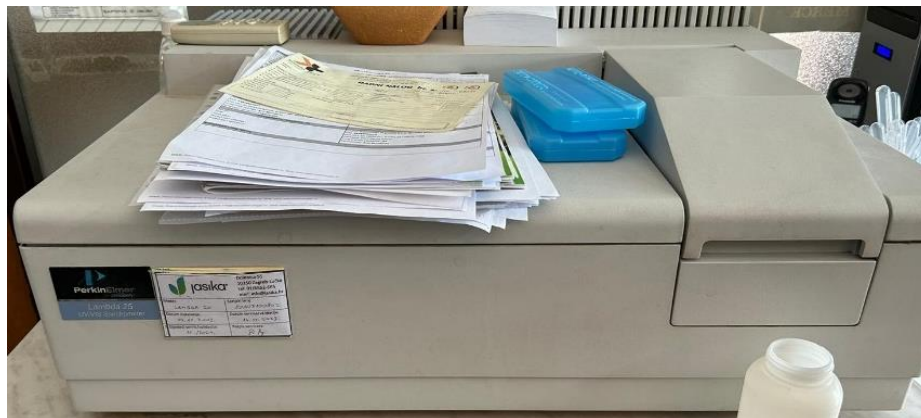
Pomoću pH-metra FiveEasy (**Slika 14**) mjeri se pH vrijednost na način da se u uzorak, koji se prethodno ulije u čašice, uroni elektroda, te se na uređaju pritisne tipka „Read“. Nakon nekoliko minuta, na zaslonu uređaja se prikaže pH vrijednost analiziranog piva. Nakon korištenja, elektroda se ispire destiliranom vodom.



Slika 14 pH-metar FiveEasy (vlastita arhiva)

3.3.2.3. Određivanje boje

Profiltrirani uzorak koristi se za određivanje boje na spektrofotometru (**Slika 15**), mjerenjem apsorbancije na 430 nm u kvarcnoj kiveti. Potrebno je provesti slijepu probu za koju se koristi destilirana voda.



Slika 15 Spektrometar Lambda 25 proizvođača Perkin Elmer

3.3.2.4. Određivanje gorčine

Gorčina piva je pokazatelj kvalitete piva, te uvelike utječe na okus konačnog piva. Određuje se na spektrofotometru mjerenjem udjela α -gorkih kiselina i β -gorkih kiselina, te najvažniji gorki sastojci sladovine i piva su izo- α kislina. Gorčina nam je pokazatelj kvalitete dodanog hmelja (Gagula, 2017).

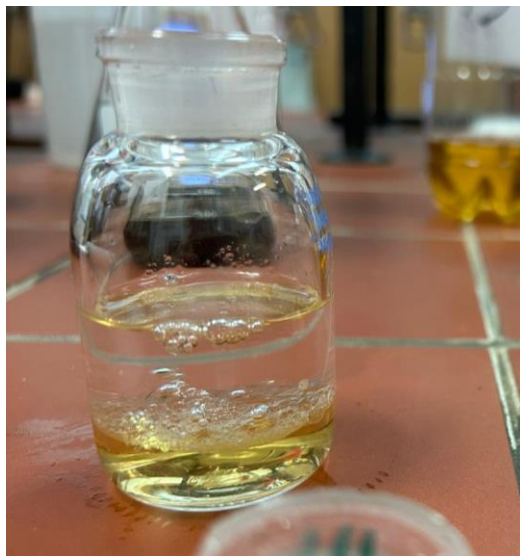
Uzorak je potrebno najprije centrifugirati 15 minuta na 3000 okretaja/minuti nakon čega se 10 mL uzorka otpipetira u kivete. Dodaje se 0,5 mL 6N HCl-a (klorovodične kiseline), 20 mL izooktana te 3 staklene kuglice u uzorak. Kivete se zatim mućkaju 15 minuta u tresilici (Slika 16) kako bi gorke tvari prešle u gornji izooktanski sloj. Zatim se, nakon mućkanja, provodi centrifugiranje (Slika 17) na 3000 okretaja/minuti u trajanju od 3 minute. Na Slici 18 prikazano je formiranje 2 sloja u uzorku. Gornji izooktanski sloj se otpipetira u kvarcnu kivetu, koja se zatim postavlja u spektrofotometar zajedno s kvarcnom kivetom u kojoj je izooktan za slijepu probu. Spektrofotometar se postavlja na 275 nm, nakon čega pokrećemo analizu pritiskom tipke „START“.



Slika 16 Tresilica proizvođača Turbula (vlastita arhiva)



Slika 17 Centrifuga PLC-322 proizvođača Tehnica Zelezniki (vlastita arhiva)



Slika 18 Pripremljeni uzorak za određivanje gorčine podijeljen u 2 sloja (vlastita arhiva)

3.3.2.5. Određivanje polifenola

Polifenoli izravno utječu na karakteristike piva kao što su trpkost, punoća okusa, gorčinu te profil piva. Fenolni spojevi u pivu uglavnom potječu od hmelja (30%), slada (70%) ili se formiraju tijekom kemijskih transformacija u procesu kuhanja (Habschied i sur., 2021). Polifenoli također, imaju antioksidativna svojstva, pri čemu sprječavaju oksidaciju piva (Gagula, 2017).

10 mL uzorka i 8 mL CMC-EDTA reagensa dodano je u odmjernu tikvicu od 25 mL. Zatim se dodaje 0,5 mL željezovog reagensa Fe(III), 0,5 mL amonijaka te se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Za slijepu probu koristi se 10 mL uzorka, 8 mL CMC-EDTA reagensa, 0,5 mL amonijaka te se također dopuni s destiliranom vodom do oznake odmjerne tikvice od 25 mL. Odmjerna tikvica s uzorkom se zatim snažno promiješa i ostavi da stoji 10 minuta. Na kraju se uzorak prelije u kivetu i očitava se apsorbancija na spektrofotometru na 600 nm. **Slika 19** prikazuje glavnu i slijepu probu uzorka za određivanje ukupnih polifenola.



Slika 19 Glavna i slijepa proba za određivanje ukupnih polifenola u uzorku (vlastita arhiva)

3.3.3. Profil izoflavona

3.3.3.1. Kemikalije

Kemijski materijali korišteni u ovom istraživanju bili su analitičke ili HPLC kvalitete. Pročišćena voda iz sustava Milli-Q Element A10 (Millipore, Milford, MA, SAD) korištena je za uzorak, otopine reagensa i pripremu mobilne faze. Prema prethodno objavljenim podacima za *Trifolium pratense L.*, analizirane su sljedeće komponente izoflavona, kupljene od Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, SAD): dazdein, genistein, formononetin, biokanin A. Standardne zalihske otopine (1,0 mg/mL) izoflavona pripremljene su njihovim otapanjem u metanolu.

3.3.3.2. Određivanje i kvantifikacija izoflavona pomoću HPLC-a

Pojedinačni izoflavoni u ekstraktu piva analizirani su pomoću HPLC sustava serije 200 (Perkin Elmer, Waltham, MA, SAD) u kombinaciji s Kinetex Core-Shell RP-C18 kolonom (150 × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm) i detektorom diodnog niza (DAD). Prije HPLC analize, uzorak ekstrakta piva otplinjen je u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin, Sonorex, Njemačka) u trajanju od 15 minuta, bez zagrijavanja, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje (Universal 320R, Hettich, Tuttlingen, Njemačka) 10 minuta pri 10000 okretaja/minuti i filtriran kroz najlonski filter od 0,22 µm (Ahlstrom GmbH, Helsinki, Finska) prije HPLC analize. Mobilna faza za analizu uključivala je

otapalo A (voda s miliporama zakiseljena s 1% trifluoroctenom kiselinom (v/v)) i otapalo B (acetonitril zakiseljen s 1% trifluoroctenom kiselinom (v/v)). Elucija je izvedena linearnim gradijentima od 35-50% B tijekom 15 min, izokratskih 25% B tijekom 3 minute i ravnotežom kolone tijekom 2 minute. Pri temperaturi kolone od 30 °C i protoku od 1,0 mL/min, pikovi su detektirani na 260 nm. Izoflavoni su identificirani usporedbom UV apsorpcijskih spektra i vremena zadržavanja s onima od standarda, dok je njihova kvantifikacija dovršena pomoću vanjske kalibracijske krivulje u šest točaka.

3.3.4. Senzorska analiza

Senzorska analiza proizvedenog piva s crvenom djetelinom provedena je među studentima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek. Ocjenjivanje senzorske karakteristike provedeno je između 8 ispitanika, a one su miris, okus, reskost (sadržaj CO₂), punoća okusa, gorčina, trpkost i kvaliteta pjene. **Slika 20** prikazuje ocjenjivački listić koji je bio ponuđen panelistima pri ocjenjivanju senzorskih karakteristika. Prije serviranja piva (kontrolno i sa dodatkom crvene djeteline) je ohlađeno na 10 °C i označeno brojevima da se postigne anonimnost uzoraka. Uzorci su svakom ispitivaču bili posluženi na pladnju sa dvije čaše označene brojevima uzoraka. Ispitivačima je dano po 100 mL piva, a kao neutralizatore okusa imali su dostupnu vodu i kruh. Uzorci su posluženi u staklenim čašama, poklopljenima sa satnim stakalcem da se spriječi gubitak hlapivih komponenata.

3. Eksperimentalni dio

Potpis ocjenjivača:				
Stil piva:				
Uzorak:				
Karakteristika:	Opis	Bodovi	Negativni bodovi	Ukupno
Prekomjerno pjenjenje (gushing)		Diskvalifikacija		
Prekiselost		Diskvalifikacija		
Miris	Svojtven	5		
	Manje svojstven	4		
	Blage greške mirisa	3		
	Zamjetne greške mirisa (užeglost, zagorenost, staro pivo, sumporni spojevi)	2	-1	
	Jake greške mirisa (otapala, autoliza kvasca, diacetil, dimetilsulfid)	1	-2	
Okus	Svojtven	5		
	Manje svojstven	4		
	Blage greške okusa	3		
	Zamjetne greške okusa (po kvascu, slatko, na žitarice)	2	-1	
	Jake greške okusa (metalni okus, kiselkasto)	1	-2	
Reskost (sadržaj CO ₂):	Ugodno resko	5		
	Resko	4		
	Manje resko	3		
	Bljutavo	2		
	Vrlo bljutavo	1		
Punoća okusa:	Svojtvena, vrlo punog okusa	4		
	Manje svojstvena, punog okusa	3		
	Vodenasto	2		
	Nesvojtvena, praznog okusa	1		
Gorčina	Vrlo ugodna	5		
	Ugodna	4		
	Malo zaostaje u ustima	3		
	Zastaje u ustima	2		
	Jako zaostaje u ustima	1		
Trpkost	Malo zaostaje u ustima	3		
	Zastaje u ustima	2		
	Jako zaostaje u ustima	1		
Kvaliteta pjene:	Postojana	3		
	Slabije postojana	2		
	Ne postojana	1		
Ukupno bodova:				

Slika 20 Ocjenjivački listić za senzorsku analizu piva (vlastita arhiva)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI MJERENJA FIZIKALNO- KEMIJSKE ANALIZE

Budući da su mnogi istraživači istraživali utjecaj izoflavona crvene djeteline na žene u perimenopauzi i menopauzi, pa čak i nakon menopauze, te budući da žene čine oko 30% tržišta piva, bilo bi korisno proizvoditi pivo koje bi moglo nadopuniti ili zamijeniti značajan udio izoflavona u ženskoj prehrani. Cilj ovog rada bio je procijeniti mogućnost proizvodnje takvog piva i bi li ono bilo senzorno prihvatljivo za žene. Proizvedena piva podvrgnuta su fizikalno-kemijskoj analizi, a rezultati su prikazani u **Tablici 1**. Rezultati ukazuju na to da se mogu uočiti značajne razlike među uzorcima, posebno za određene fizikalno-kemijske pokazatelje, kao što su gorčina, sadržaj polifenola i sadržaj alkohola. Budući da su proizvedene dvije serije piva, postojale su male razlike između uzoraka u pogledu specifične težine, kao i izvornih, stvarnih i prividnih ekstrakata. Međutim, sadržaj alkohola pokazao je značajnu razliku između uzoraka. Kontrolni uzorak pokazao je veći udio alkohola, 5,19% u odnosu na pivo s dodatkom crvene djeteline, koja je sadržavala 4,28% alkohola. To bi moglo biti zbog većeg udjela proteina, jer crvena djetelina sadrži veliku količinu sirovih i netopivih proteina (Horvat i sur., 2020).

Tablica 1 Rezultati mjerenja osnovnih fizikalno-kemijskih pokazatelja proizvedenih piva na uređaju za analizu piva DMA 4500 M proizvođača Anton Paar

Indikator kvalitete	Jedinica	Crvena djetelina	Kontrolno
Specifična težina	mg/L	1,01045 ^b	1,01052 ^a
Stvarni ekstrakt	%	4,42 ^b	5,69 ^a
Ekstrakt u osnovnoj sladovini	°P	11,74 ^b	12,22 ^a
Prividni ekstrakt	%	2,67 ^b	3,83 ^a
Alkohol	%	4,28 ^b	5,19 ^a
Polifenoli	mg/L	600 ^a	292 ^b
Boja	EBC	12 ^a	10 ^b
pH vrijednost	/	4,4 ^a	4,2 ^b
Gorčina	IBU	25 ^a	18 ^b

a-b: unutar redaka, različita eksponentna slova označavaju značajnu razliku ($p < 0,05$); IBU – međunarodna jedinica gorčine; EBC – Europska konvencija o pivarstvu.

Sadržaj polifenola pokazao je značajnu razliku ($p < 0,05$) između uzoraka, gdje je pivo od crvene djeteline sadržavalo 600 mg/L, dok je kontrolni uzorak imao 292 mg/L. Količina polifenola u kontrolnom uzorku u skladu je s prethodnim istraživanjima koja su izvještavala o prosječnoj vrijednosti polifenola u svijetlim pivima (Habschied i sur., 2020). Količina polifenola u uzorku s

crvenom djetelinom je, međutim, dvostruko veća. To ukazuje da dodatak crvene djeteline značajno povećava razinu polifenola u pivu, vrijednom sastojku za žene u menopauzi (Filip i sur., 2015). Ovo je zanimljiva informacija, budući da postoje istraživanja koja podupiru činjenicu da povećani sadržaj polifenola može pomoći u ublažavanju hormonalnih promjena koje opterećuju žene tijekom predmenopauze, menopauze i postmenopauze. Zabilježeno je da prehrana bogata polifenolima pomaže kod određenih simptoma menopauze (Keiler i sur., 2013; Abdi i sur., 2016; Pedrera-Zamorano i sur., 2009) kao što je osteoporoza i u smanjenju vazomotornih simptoma. Međutim, neki autori to osporavaju zbog njihovog učinka na razinu estrogena. Naime, kako su Poschner i sur. (2019) opisali, oni povećavaju razinu estrogena, što može biti problematično i potaknuti ili podržati rast stanica raka (dojke). To određuje pivo kao izvrstan prirodni izvor polifenolnih spojeva, koji mogu pomoći ženama u menopauzi, a uz dodatak crvene djeteline, priznatog prirodnog lijeka za probleme u menopauzi, umjerena konzumacija piva mogla bi biti od pomoći u ublažavanju problema u menopauzi (Sandoval-Ramírez i sur., 2017). Većina polifenola u pivu potječe iz slada (70–80%), a zatim hmelja (približno 15%) (Quifer-Rada i sur., 2015; Taylor i sur., 2003).

Dodatak crvene djeteline neznatno, ali statistički značajno, također je povećao gorčinu. Gorčina piva s crvenom djetelinom iznosila je 25 IBU, dok je kontrolno pivo imalo 18 IBU. To je zbog povećanog sadržaja polifenola u pivu s dodatkom crvene djeteline (Zhou i sur., 2024). Međutim, prema (Peleg i sur., 1999), flavonoidi također mogu utjecati na gorčinu. Piva su namjerno bila manje gorka, bila su poput lagera u gorčini (u svaku seriju dodana je ista količina hmelja), tako da se mogao primijetiti mogući utjecaj crvene djeteline. Senzorska analiza otkrila je da postoje značajne promjene i između uzoraka.

pH vrijednosti (4–4,2) mogu uzrokovati trpkost, koju neobučeni potrošači često pogrešno smatraju gorčinom. Trpkost je osjećaj gorčine koji se ponavlja više od 60 sekundi, dok gorčina prolazi za 60 sekundi. pH vrijednosti za oba piva pokazale su značajne razlike, a učinak na gorčinu i trpkost može se procijeniti senzorskom analizom. Boja piva također je bila neznatno, ali statistički značajno, viša u uzorcima s dodatkom crvene djeteline. To je očekivano, jer crvena djetelina sadrži dodatni klorofil i druge komponente, poput dodatnih proteina, koji mogu utjecati na boju.

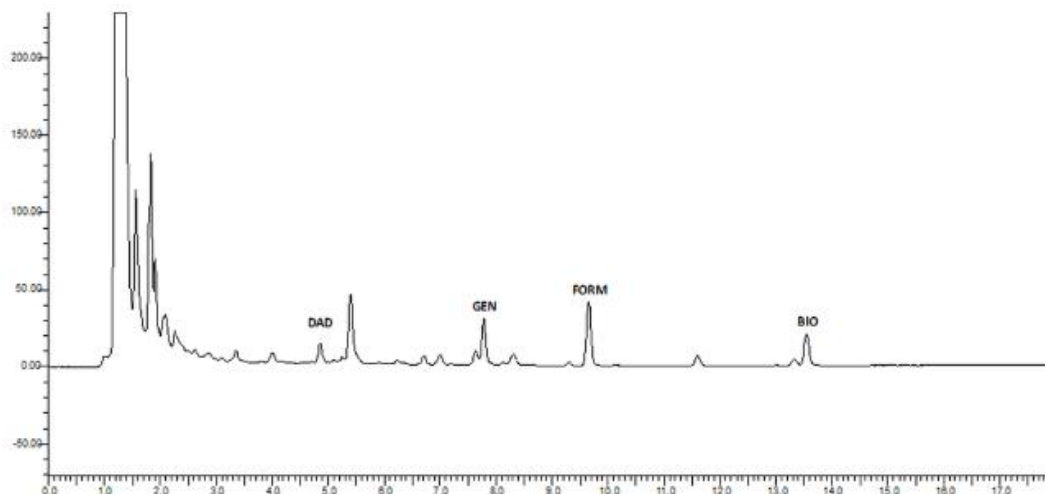
Kako bi se provjerilo je li došlo do prijenosa izoflavona, u pivu su određena četiri najznačajnija izoflavona. Rezultati su prikazani u **Tablici 2**.

Tablica 2 Četiri značajna izoflavona utvrđena u pivu

Izoflavoni	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	
	Crvena djetelina	Kontrolno
Daizdein	1,411	ND
Genistein	2,997	ND
Formononetin	5,336	ND
Biokanin A	2,470	ND
Ukupno	12,214	ND

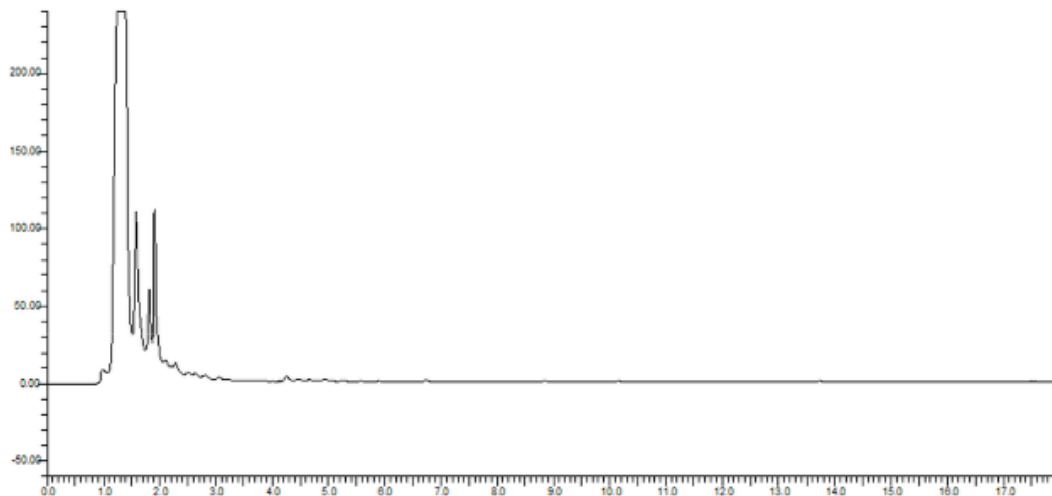
ND- nije detektirano

Kao što se može vidjeti u tablici 2, najznačajniji izoflavoni utvrđeni u konačnom pivu bili su u značajno višim koncentracijama nego u kontrolnom uzorku. Naime, kontrolni uzorak nije sadržavao detektabilne koncentracije izoflavona. Najznačajnije razine utvrđene su za formononetin, u iznosu od 5,336 $\mu\text{g/mL}$. Ovo je daleko najvrjedniji izoflavon, jer ga mnoga istraživanja nazivaju obećavajućim u ublažavanju promjena u menopauzi (Lemežienė i sur. 2015; Liu i sur. 2001; Burdette i sur., 2002). Sljedeći najznačajniji izoflavon bio je genistein, s 2,997 $\mu\text{g/mL}$, a slijedi ga biohanin A (2,470 $\mu\text{g/mL}$). Genistein je navodno spoj s najvećom estrogenskom aktivnošću na oba estrogenska receptora (Beck i sur., 2005). Najniže razine utvrđene su za daidzein, na 1,411 $\mu\text{g/mL}$. Ukupna količina izoflavona u proizvedenom pivu iznosila je 12.214 $\mu\text{g/mL}$. Kromatogrami analiziranih piva mogu se vidjeti na **Slikama 21 i 22**.



Slika 21 Kromatogram piva s dodatkom crvene djeteline

Različita izvješća o istraživanjima daju različite količine izoflavona za žene u perimenopauzi, menopauzi ili postmenopauzi, ali one općenito variraju između 40 i 120 mg dnevno (Kanadys i sur., 2021). Ukupni izoflavoni u crvenoj djetelini koji se koriste za proizvodnju piva bili su visoki, iznosili su 39.148,2 $\mu\text{g/L}$. To znači da je oko 30% izoflavona završilo u pivu, što je solidan postotak prenesenih izoflavona. S obzirom na to da je preporučena dnevna količina piva za žene 0,5 L (Socha i sur., 2017), konzumacija jedne preporučene porcije piva dnevno ne bi zadovoljila dnevne potrebe za izoflavonima kod žena. Međutim, optimizacijom proizvodnog procesa to bi se moglo postići. Međutim, možemo uzeti u obzir da hmelj sadrži prenilflavonoide i da u komercijalnim pivima koncentracija 8-PN doseže 1–240 $\mu\text{g/mL}$, dok ostali prenilflavonoidi mogu biti znatno veći (Tronina i sur. 2020). To implicira da bi možda konzumacija jedne porcije piva dnevno mogla u potpunosti zadovoljiti potrebu za spojevima sličnim estrogenu. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dobilo više informacija o ovom pitanju. Crvena djetelina korištena u ovom istraživanju ubrana je u punom cvatu, u fazi kada sadrži najviše izoflavona.



Slika 22 Kromatogram kontrolnog piva

4.2. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE PIVA S DODATKOM CRVENE DJETELINE

Tablica 3 Prikaz ocjenjivačkog listića sa srednjom vrijednosti ocjene za pivo s dodatkom crvene djeteline

KARAKTERISTIKE	OPIS	BODOVI	SREDNJA VRIJEDNOST
Miris	Svojtven	5	5
	Manje svojtven	4	
	Blage greške mirisa	3	
	Zamjetne greške mirisa (užeglost, zagorenost, staro pivo i sumporni spojevi)	2	
	Jake greške mirisa (otapala, autoliza kvasca, diacetil i dimetilsulfid)	1	
Okus	Svojtven	5	5
	Manje svojtven	4	
	Blage greške okusa	3	
	Zamjetne greške okusa (po kvascu, slatko, na žitarice)	2	
	Jake greške okusa (metalni okus, kiselkasto)	1	
Reskost (sadržaj CO₂)	Ugodno resko	5	4
	Resko	4	
	Manje resko	3	
	Bljutavo	2	
	Vrlo bljutavo	1	
Punoća okusa	Svojtven, vrlo punog okusa	4	4
	Manje svojtven, punog okusa	3	
	Vodenasto	2	
	Nesvojtvena, praznog okusa	1	
Gorčina	Vrlo ugodna	5	4
	Ugodna	4	
	Malo zaostaje u ustima	3	
	Zaostaje u ustima	2	
	Jako zaostaje u ustima	1	
Trpkost	Malo zaostaje u ustima	3	3
	Zaostaje u ustima	2	
	Jako zaostaje u ustima	1	
Kvaliteta pjene	Postojana	3	3
	Slabije postojana	2	
	Nepostojana	1	
Ukupno bodova			28

Tablica 4 Prikaz ocjenjivačkog listića sa srednjom vrijednosti ocjene za kontrolno pivo

KARAKTERISTIKE	OPIS	BODOVI	SREDNJA VRIJEDNOST
Miris	Svojtven	5	5
	Manje svojtven	4	
	Blage greške mirisa	3	
	Zamjetne greške mirisa (užeglost, zagorenost, staro pivo i sumporni spojevi)	2	
	Jake greške mirisa (otapala, autoliza kvasca, diacetil i dimetilsulfid)	1	
Okus	Svojtven	5	5
	Manje svojtven	4	
	Blage greške okusa	3	
	Zamjetne greške okusa (po kvascu, slatko, na žitarice)	2	
	Jake greške okusa (metalni okus, kiselkasto)	1	
Reskost (sadržaj CO₂)	Ugodno resko	5	5
	Resko	4	
	Manje resko	3	
	Bljutavo	2	
	Vrlo bljutavo	1	
Punoća okusa	Svojtven, vrlo punog okusa	4	4
	Manje svojtven, punog okusa	3	
	Vodenasto	2	
	Nesvojtvena, praznog okusa	1	
Gorčina	Vrlo ugodna	5	5
	Ugodna	4	
	Malo zaostaje u ustima	3	
	Zaostaje u ustima	2	
	Jako zaostaje u ustima	1	
Trpkost	Malo zaostaje u ustima	3	3
	Zaostaje u ustima	2	
	Jako zaostaje u ustima	1	
Kvaliteta pjene	Postojana	3	2
	Slabije postojana	2	
	Nepostojana	1	
Ukupno bodova			29

U **Tablici 3** i **Tablici 4** je prikaz rezultata senzorske analize proizvedenog piva s crvenom djetelinom i kontrolnog piva, izraženih kao srednja vrijednost. Analiza je provedena između 8 studenata Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek. Prema dobivenim rezultatima, može se primijetiti kako je proizvedeno pivo prihvaćeno od strane ispitanika. Miris je, ispitanicima bio svojstven za pivo, kao i kod kontrolnog, okus također. Nadalje, sadržaj CO₂ ocijenjen je kao rezak, dok je kod kontrolnog ugodno rezak. Punoća okusa kod piva s crvenom djetelinom bila manje svojstvena, ali punog okusa. Može se pretpostaviti da je to zbog crvene djeteline, koja je pustila svoju aromu i promijenila klasični profil okusa piva. Kod kontrolnog piva, punoća okusa je također manje svojstvena. Gorčina proizvedenog piva s crvenom djetelinom je ocijenjena kao ugodna, a trpkost je malo zaostajala u ustima. To se također može povezati s dodatkom crvene djeteline koja sadrži veliki udio polifenola. Kod kontrolnog piva gorčina je vrlo ugodna i trpkost malo zaostaje u ustima. Kvalitetu pjene piva s dodatkom crvene djeteline su ispitanici ocijenili kao postojanu, dok je u kontrolnom pjena bila slabije postojana. Od 30 bodova s kojim je pivo moglo biti ocijenjeno, zbroj srednjih vrijednosti proizvedenog piva je bila 28, s čime možemo zaključiti da je ovakva vrsta piva zadovoljavajuća u odnosu na kontrolno pivo čija je srednja vrijednost ocjene bila 29.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da ovo pivo može imati zadovoljavajuću kvalitetu u pogledu fizikalno-kemijskih svojstava.
2. Senzorska procjena pokazala je dobre rezultate, a potrošači su bili skloni vrlo pozitivnim ocjenama.
3. Najzanimljiviji podaci odnosili su se na sadržaj izoflavona u gotovim pivima. Naime, izoflavoni su pronađeni u pivu proizvedenom s dodatkom crvene djeteline, dok kontrolno pivo nije pokazalo nijedan od izoflavona. Oko 30% izoflavona preneseno je u pivo, što je zadovoljavajući prinos.
4. Ovaj aspekt korištenja crvene djeteline u pivarstvu za dobivanje piva bogatog izoflavonom ima veliki potencijal i treba ga dodatno istražiti. Primjena različitih količina crvene djeteline, sorte crvene djeteline i dodavanje crvene djeteline tijekom ukomljavanja umjesto faze kuhanja sladovine (ohmeljavanja) mogli bi rezultirati većom ekstrakcijom izoflavona u pivo.
5. Ovo bi mogao biti potencijalni funkcionalni proizvod za žene u predmenopauzi, menopauzi i postmenopauzi. Ipak, ovu vrstu zamjenskog proizvoda ne smiju koristiti žene koje su osjetljive na rak, jer viša razina estrogena može povećati mogućnost određenih vrsta raka.

6. LITERATURA

- Alexander, M., Bloom, B.R., Hopwood, D.A., Hull, R., Iglewski, B.H., Laskin, A.I., Oliver, S.G., Schaechter, M., Summers, W.C. (2000). *Encyclopedia of microbiology*, 4(1), str. 413-415.
- Beck, V., Rohr, U., Jungbauer, A. (2005). Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 94(5), str. 499–518.
- Burdette, J.E., Liu, J., Lantvit, D., Lim, E., Booth, N., Bhat, K.P.L., Hedayat, S., Van Breemen, R.B., Constantinou, A.I., Pezzuto, J.M., Farnsworth, N.M., Bolton, J.L. (2002). *Trifolium Pratense* (red clover) exhibits estrogenic effects in vivo in ovariectomized sprague-dawley rats. *The journal of nutrition*, 132(1), str. 27–30.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Romano, P. (2018). Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation*, 4(2), str. 1-11.
- Dujmović Purgar, D., Koraca, K., Bertoša, J., Bolarić, S. (2009). Rasprostranjenost crvene djeteline (*Trifolium Pratense L.*) u Hrvatskoj. *Agronomski glasnik : Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 71(3), str. 225–236.
- Filip, R., Possemiers, S., Heyerick, A., Pinheiro, I., Raszewski, G., Davicco, M.J., Coxam, V. (2015). Twelve-month consumption of a polyphenol extract from olive (*Olea Europaea*) in a double blind, randomized trial increases serum total osteocalcin levels and improves serum lipid profiles in postmenopausal women with osteopenia. *The journal of nutrition, health and aging*, 19(1), str. 77-86.
- Gaćeša, S. (1979). *Tehnologija slada sa sirovinama za tehnologiju piva*. Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd.
- Gagula, G. (2017). Modeliranje promjena fizikalno-kemijskih svojstava piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
- Gagula, G., Mastanjević, K., Mastanjević, K., Krstanović, V., Horvat, D., Magdić, D. (2020). The influence of packaging material on volatile compounds of pale lager beer. *Food packaging and shelf life* 24, 100496.
- Godinić Mikulčić, V. (2020). kvasac | Hrvatska tehnička enciklopedija. In *Hrvatska tehnička enciklopedija – Portal hrvatske tehničke baštine*. Zagreb: Leksikografski zavod Miroslav Krleža.
- Habschied, K., Košir, I.J., Krstanović, V., Kumrić, G., Mastanjević, K. (2021). Beer polyphenols—bitterness, astringency, and off-flavors. *Beverages*, 7(2), str. 1-14.
- Habschied, K., Kovačević Babić, M., Horvat, D., Arapović, M., Puljić, L., Kajić, N., Krstanović, V., Mastanjević, K. (2024). Red clover (*Trifolium Pratense*) as a source of phytoestrogens in beer. *Fermentation*, 10(8), str. 1-12.
- Habschied, K., Lončarić, A., Mastanjević, K. (2020). Screening of polyphenols and antioxidative activity in industrial beers. *Foods*, 9(2), str. 1-8.
- Horvat, D., Tucak, M., Viljevac Vuletić, M., Čupić, T., Krizmanić, G., Kovačević Babić, M. (2020). Phenolic content and antioxidant activity of the croatian red clover germplasm

- collection. *Poljoprivreda*, 26(2), str. 3–10.
- Kanadys, W., Barańska, A., Błaszczuk, A., Polz-Dacewicz, M., Drop, B., Kanecki, K., Malm, M. (2021). Evaluation of clinical meaningfulness of red clover (*Trifolium Pratense L.*) extract to relieve hot flushes and menopausal symptoms in peri- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients* 13 (4): str. 1-14.
- Kim, M.R., Kim, H.J., Yu, S.H., Lee, B.S., Jeon, S.Y., Lee, J.J., Lee, Y.C. (2020). Combination of red clover and hops extract improved menopause symptoms in an ovariectomized rat model. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2020(1), str. 1-9.
- Lemežienė, N., Padarauskas, A., Butkutė, B., Cesevičienė, J., Taujenis, L., Norkevičienė, E., Norkevičienė, E. (2015). The concentration of isoflavones in red clover (*Trifolium Pratense L.*) at flowering stage. *Zemdirbyste-agriculture*, 102(4), str. 443–48.
- Lima, A.C., Aceña, L., Mestres, M., Boqu, R. (2022). An overview of the application of multivariate analysis to the evaluation of beer sensory quality and shelf-life stability. *Foods*, 11(14), str. 2037.
- Liu, J., Burdette, J.E., Xu, H., Gu, C., Breemen, R.B., Bhat, K.P., Booth, N., Constantinou, A.I., Pezzuto, J.M., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Bolton, J.L. (2001). Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5), str. 2472–79.
- Lončarić, A., Kovač, T., Nujić, M., Habuda-Stanić, M. (2017). Priprema tehnološke vode za industrijsku proizvodnju piva. U 7. međunarodni znanstveno-stručni skup Voda za sve, str. 177-187. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
- Lukinac, J., Mastanjević, K., Mastanjević, K., Nakov, G., Jukić, M. (2019). Computer vision method in beer quality evaluation—A Review. *Beverages*, 5(2), str. 1-21.
- Martínez-Espinosa, R.M. (2020). New advances on fermentation processes. In *new advances on fermentation processes*, str. 67–94.
- Mastanjević, K. (2024). *Tehnologija slada i piva*. Prezentacija. Osijek.
- MPPRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH. (2011). Pravilnik o pivu. Narodne novine 142/11.
- Nance, M.R., Setzer, W. (2011). Volatile components of aroma hops (*Humulus Lupulus L.*) commonly used in beer brewing. *Journal of Brewing and Distilling*, 2(2), str. 16-22.
- Pedreira-Zamorano, J.D., Lavado-García, J.M., Roncero-Martin, R., Calderon-Garcia, J.F., Rodriguez-Dominguez, T., Canal-Macias, M.L. (2009). Effect of beer drinking on ultrasound bone mass in women. *Nutrition*, 25(10), str. 1057–1063.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., Noble, A.C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-Ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the science of food and agriculture*, 79(8), str. 1123-1128.
- Poschner, S., Maier-Salamon, A., Thalhammer, T., Jäger, W. (2019). Resveratrol and other dietary polyphenols are inhibitors of estrogen metabolism in human breast cancer cells. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 190, str. 11–18.

- Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R. (2015). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food chemistry*, 169, str. 336-343.
- Sandoval-Ramírez, B.A., Lamuela-Raventós, R.M., Estruch, R., Sasot, G., Doménech, M., Tresserra-Rimbau, A. (2017). Beer polyphenols and menopause: effects and mechanisms—a review of current knowledge. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017(1), str. 1-7.
- Semiz, M. (1979). Tehnologija piva. Poslobna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd.
- Socha R, Pająk P, Fortuna, T, Buksa, K. (2017). Antioxidant activity and the most abundant phenolics in commercial dark beers. *International journal of food properties*, 20(1), str. 595–609.
- Šantek, B. (2021). Pivo - Hrvatska Enciklopedija. In *Hrvatska Tehnička Enciklopedija – Portal Hrvatske Tehničke Baštine*. Zagreb: Leksikografski zavod Miroslav Krleža.
- Tronina, T., Popłoński, J., Bartmańska, A. (2020). Flavonoids as phytoestrogenic components of hops and beer. *Molecules*, 25(18), str. 2-21.
- Ullrich, S.E. (2011). *Barley: Production, improvement, and uses*. John Wiley & Sons, str: 481-489.
- White, C., Zainasheff, J. (2010). *Yeast: The practical guide to beer fermentation*. Brewers publications, str. 11-13.
- Zhou, Y., Tian, Y., Ollennu-Chuasam, P., Kortensniemi, M., Selander, K., Väänänen, K., Yang, B. (2024). Compositional characteristics of red clover (*Trifolium Pratense*) seeds and supercritical CO₂ extracted seed oil as potential sources of bioactive compounds. *Food innovation and advances*, 3(1), str. 11–19.