

ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA I POLIFENOLA U PIVU

Barić, Monika

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:263641>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-09**



VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
Karlovac University of Applied Sciences

Repository / Repozitorij:

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
STRUČNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA
PIVARSTVO

MONIKA BARIĆ

ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA I
POLIFENOLA U PIVU

ZAVRŠNI RAD

KARLOVAC, 2023.

Veleučilište u Karlovcu

Stručni prijediplomski studij prehrambena tehnologija

Pivarstvo

Monika Barić

Određivanje hlapljivih spojeva i polifenola u pivu

Završni rad

Mentor: dr. sc. Goran Šarić, v. pred.

Broj indeksa studenta: 0314617023

Karlovac, rujan 2023.

Zahvaljujem se cijeloj svojoj obitelji – mami Luci, tati Zoranu, sestri Miji i braći Mladenu i Manuelu, dečku Anti, prijateljima Sari i Tinu, Jeleni Šišić koja je bila velika podrška i pomoć, psu te svim profesorima i asistentima od osnovne škole do danas na neizmjernej pomoći i potpori tijekom cijelog životnog školovanja.

IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Monika Barić**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **Određivanje hlapljivih spojeva i polifenola u pivu** rezultat vlastitog rada i istraživa te se oslanja se na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac, 20. rujna 2023.

Monika Barić

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Veleučilište u Karlovcu

Završni rad

Odjel prehrambene tehnologije

Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA I POLIFENOLA U PIVU

Monika Barić

Rad je izrađen u Karlovcu i Zagrebu.

Mentor: dr.sc. Goran Šarić, v. pred.

Sažetak

Ovim radom se opisuje povijest, proces i ključne moderne metode proizvodnje piva, s posebnim naglaskom na tehnološka dostignuća koja omogućavaju veću kontrolu nad kvalitetom. Fokus rada je na analizi hlapljivih spojeva i polifenola u pivu, koji su od suštinskog značaja za okus, aromu i antioksidacijska svojstva piva. Koristeći napredne analitičke instrumente poput Anton Paar analizatora, UV-vidljive spektrofotometrije i plinske kromatografije s masenom spektrometrijom, pružaju se detaljni uvidi u kemijski sastav piva. Rad ističe važnost ovih komponenti u postizanju uravnoteženog profila piva i ukazuje na nužnost kontroliranja fermentacije i pažljivog odabira sastojaka kao što su kvasac i sirovine. Ove informacije su od velike važnosti za proizvođače piva u razumijevanju i optimizaciji procesa proizvodnje, što može doprinijeti inovacijama i razvoju novih stilova piva.

Broj stranica: 34

Broj slika: 8

Broj tablica: 8

Broj literaturnih navoda: 22

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: GC-MS, hlapljivi spojevi, pivo, polifenoli, spektrofotometrija

Datum obrane: 20. rujan 2023.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. *Jasna Halambek*, v. pred.
2. dr.sc. *Bojan Matijević*, prof. struč. stud.
3. dr. sc. *Goran Šarić*, v. pred.
4. dr. sc. *Marijana Blažić*, prof. struč. stud.

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, I. Meštrovića 10, 4700 Karlovac, Hrvatska.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Karlovac University of Applied Sciences
Department of Food Technology
Professional Study of Food Technology

Final paper

Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Food Technology

DETERMINATION OF VOLATILE COMPOUNDS AND POLYPHENOLS IN BEER

Monika Barić

Final paper performed in Karlovac and Zagreb.

Supervisor: Ph.D. *Goran Šarić*, sen. lecturer

Abstract

This paper describes the history, process, and key modern methods of beer production, with a special emphasis on technological advancements that allow for greater control over quality. The focus of the study is on the analysis of volatile compounds and polyphenols in beer, which are essential for taste, aroma, and antioxidant properties of beer. By using advanced analytical instruments such as Anton Paar analyzers, UV-visible spectrophotometry, and gas chromatography with mass spectrometry, the paper provides detailed insights into the chemical composition of beer. The study highlights the importance of these components in achieving a balanced profile of beer and points out the necessity of controlling fermentation and carefully selecting ingredients such as yeast and raw materials. This information is of great importance for beer producers in understanding and optimizing the production process, which can contribute to innovations and the development of new beer styles.

Number of pages: 34

Number of figures: 8

Number of tables: 8

Number of references: 22

Original in: Croatian

Key words: beer, GC-MS, polyphenols, spectrophotometry, volatile compounds

Date of the final paper defense: 20 September 2023

Reviewers:

1. Ph.D. *Jasna Halambek*, sen. lecturer
2. Ph.D. *Bojan Matijević*, collage prof.
3. Ph.D. *Goran Šarić*, sen. lecturer
4. Ph.D. *Marijana Blažić*, collage prof. (substitute)

Final paper deposited in: Library of Karlovac University of Applied Sciences, I. Meštrovića 10, Karlovac, Croatia.

Sadržaj

1. UVOD	2
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Proces proizvodnje piva	3
2.2. Hlapljivi spojevi	4
2.2.1. Nusproizvodi metabolizma kvasaca	5
2.2.2. Nepoželjni spojevi	6
2.2.3. Poželjni spojevi	8
2.3. Polifenoli	10
2.4. Metode određivanja hlapljivih spojeva iz piva	13
2.4.1. Kromatografija	13
2.4.2. Plinska kromatografija	13
2.4.3. Masena spektrometrija	13
2.4.4. Vezani sustav plinska kromatografija - masena spektrometrija	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Aparatura i kemikalije	17
3.2. Analiza osnovnih parametra piva analizatorom Anton Paar	17
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola u pivu	19
3.4. Određivanje hlapljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija- spektrometrija masa	20
4. REZULTATI	23
5. ZAKLJUČAK	32
6. LITERATURA	33

1. UVOD

Pivo je pjenušavo i osvježavajuće alkoholno piće koje sadrži mali, srednji ili visoki udjel alkohola, ima karakterističnu slatnu aromu sa slabije ili jače izraženom gorčinom i specifičnom aromom hmelja. Proizvodi se alkoholnim vrenjem pивske sladovine pomoću pivskog kvasca (Marić, 2009). Pivo se proizvodi već dugi niz godina te je jedno od najstarijih alkoholnih pića. Nema točnih podataka o vremenu nastanka prvog piva, ali prvi dokazi o njegovom postojanju datiraju iz oko 4000. godine prije nove ere. Ovi dokazi uključuju glinene pločice s piktogramima koji prikazuju dvoje ljudi kako piju pivo na slamku iz velikog vrča (Matotek, 2023). Kako je pivo nastalo, može se samo nagađati, ali vjeruje se da je netko slučajno ostavio komad kruha u posudi koju je navlažila kiša. Iz zraka ili sa vodom su u tu mješavinu dospjeli divlji kvasci i drugi mikroorganizmi, čime je započela spontana alkoholna fermentacija (Marić, 2009). Pivo je tijekom povijesti imalo razne uloge u društvu. Osim što je bilo popularno društveno piće koje se dijelilo i pilo u znak gostoljubivosti i prijateljstva, koristilo se u robnoj razmjeni, kao način plaćanja, zamjena za obrok, te u vjerskim obredima. Zbog tajanstvenog postupka fermentacije i sposobnosti piva da utječe na stanje uma, smatralo se da pivo ima nadnaravna svojstva i da je dar bogova (Matotek, 2023).

U 19. stoljeću započinje industrijski razvoj proizvodnje piva kao posljedica općeg razvoja znanosti i tehnologije. Otvorena su različita istraživačka središta posvećena umijeću vrenja piva, a tehnološki napredak omogućio je upotrebu različitih strojeva i uređaja koji su olakšali i ubrzali proizvodnju piva zamjenjujući ručni rad strojnim, čime proizvodnja više nije bila ovisna o godišnjem dobu i vremenskim uvjetima (Marić, 2009).

Pivarstvo je danas industrija velikih razmjera. Moderne pivovare koriste opremu od nehrđajućeg čelika i računalno kontrolirane automatizirane operacije, proizvode se različiti stilovi piva, a pivo se pakira u metalne bačve, staklene boce, aluminijske limenke i plastične posude te se izvozi diljem svijeta (Young, 2023). U ovako globaliziranom i tehnološki naprednom okruženju, održavanje kvalitete i specifičnih karakteristika piva je od presudne važnosti stoga je potreban analitički pristup analizi hlapljivih spojeva i polifenola koji određuju ključnu ulogu u određivanju osobina piva koje se odnose na njegov okus, aromu i antioksidacijska svojstva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Proces proizvodnje piva

Proces proizvodnje piva se može podijeliti u nekoliko glavnih faza: (Marić, 2009)

- Priprema slada: Pivo se prvenstveno proizvodi od ječma koji se prvo mora pretvoriti u slad, prvi korak je čišćenje, sušenje i skladištenje ječma nakon čega se zrno ječma namače u vodi, klije, suši i u konačnici prži kako bi razvio željenu aromu i boju.
- Mljevenje slada: Slad se melje kako bi se izložio škrob u zrnu, koji će kasnije biti pretvoren u fermentabilne šećere.
- Proces ukomljavanja: Mljeveni slad se miješa s toplom vodom u procesu koji se naziva ukomljavanje. Komina se zagrijava do određenih temperatura sa određenim stankama kako bi se aktivirali enzimi koji kataliziraju reakcije cijepanja makromolekula na jednostavne spojeve (cijepanje škroba u jednostavne šećere, razgradnja proteina na peptide i aminokiseline i dr.).
- Proces filtracije: komina se zatim filtrira kako bi se odvojile čvrste tvari (prikupljene iz slada) od sladovine (tekućine bogate šećerima i drugim otopljenim tvarima).
- Kuhanje sladovine: Sladovina se kuha s hmeljem, tijekom čega gorki i aromatični hmeljni sastojci prelaze u sladovinu uz istovremeno taloženje proteina. Također kuhanjem dolazi do isparavanja vode, steriliziranja sladovine, isparavanje nepoželjnih spojeva arome itd. Vrijeme kuhanja varira ovisno o vrsti piva, ali obično traje oko sat vremena na 100 C°.
- Obrada i hlađenje sladovine: Nastali talog nakon kuhanja sladovine se uklanja, a sladovinu je potrebno brzo ohladiti na temperaturu pogodnu za kvasce te je aerirati.
- Proces fermentacije: Ohlađenoj i aeriranoj sladovini se dodaje kvasac. Kvasac konzumira šećere prisutne u sladovini, pretvarajući ih u alkohol i ugljikov dioksid. Ovisno o stilu piva, fermentacija može trajati nekoliko do najviše 10-ak dana, ali je poželjno da završi što ranije.
- Dozrijevanje mladog piva: Nakon fermentacije, pivo se ostavlja da sazrije kako bi se razvile željene arome i okusi, da se pivo zasiti sa CO₂, te da se istalože svi

suspendirani sastojci. Dozrijevanje može trajati od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci ili čak godina, ovisno o stilu piva.

- Filtracija i pakiranje: Pivo se filtrira kako bi se uklonili eventualni zaostali suspendirani sastojci prije nego što se napuni u boce, limenke ili bačve. Zatim se pivo pasterizira ili sterilizira kako bi se postigla biološka stabilizacija piva.



Slika 1. Prikaz toka procesa proizvodnje piva (Matijašević, 2023)

2.2. Hlapljivi spojevi

Hlapljivi spojevi su spojevi koji imaju visok tlak pare i nisku topljivost u vodi. Oni se emitiraju kao plinovi iz određenih krutih tvari ili tekućina (USEPA, 2023). U pivu hlapljivi spojevi su tvari koje utječu na kvalitetu proizvoda kako na pozitivan tako i na negativan način, te značajno pridonose organoleptičkim svojstvima pića. Mnogi kemijski spojevi imaju važnu ulogu u karakteristikama arome piva gdje hlapljive frakcije mogu biti sastavljene od oko 800 različitih spojeva, ali samo nekoliko desetaka njih su aromatično

aktivni, tj. pridonose aromi kod konzumacije proizvoda. Ti spojevi pripadaju skupinama viših alkohola, estera, karbonilnih spojeva, sumpornih spojeva, heterocikličkih spojeva i hlapljivih fenola (Boulton i Quain, 2001).

Glavni aktivni spojevi arome mogu biti izvedeni iz pet skupina:

- Prva skupina (iz ječma) - ovu skupinu čine spojevi koji nastaju oksidacijom lipidnih prekursora i produkti nastali Maillardovim reakcijama za vrijeme prženja i sušenja slada (Olaniran i sur., 2017).
- Druga skupina (iz hmelja) - eterična ulja iz hmelja koja se ispuštaju u kominu za vrijeme kuhanja piva
- Treća skupina (fermentacija) - nju čine nusproizvodi metabolizma kvasca
- Četvrta skupina (kontaminacija mikroorganizmima) - pivo može biti zaraženo različitim bakterijama (gram pozitivnim i gram negativnim) i divljim kvascima koje kvare aromu i utječu na stabilnost piva.
- Peta skupina (skladištenje) - tijekom vremena koje pivo provodi na skladištenju, različiti kemijski procesi utječu na njegov okus i aromu. Faktori poput temperature, izloženost svjetlu i/ili kvaliteta ambalaže mogu dovesti do stvaranja novih spojeva ili promjene u koncentraciji postojećih. Na primjer, oksidacija tijekom skladištenja može utjecati na svježinu arome, dok izloženost svjetlu može uzrokovati stvaranje spojeva koji daju pivu aromu po tvorbu. Također, tijekom dužeg skladištenja može doći do interakcija između spojeva iz prethodnih skupina, što može rezultirati složenijim aromama. Dobivanje piva, odnosno starenje pri kontroliranim uvjetima, može poboljšati aromu nekih stilova piva, razvijajući dublje i kompleksnije arome. (Pavlečić i sur., 2012) (Olaniran i sur., 2017)

2.2.1. Nusproizvodi metabolizma kvasaca

Nusproizvodi metabolizma kvasaca koji nastaju tijekom alkoholne fermentacije su viši alkoholi, diacetili, esteri, aldehidi i sumporni spojevi. Sastojci arome mladog piva (diacetil, aldehidi, sumporni spojevi) uzrokuju pojavu nečiste, neharmonične i nezrele arome mladog piva, a u povećanim koncentracijama negativno utječu na kvalitetu piva. Akumuliraju se tijekom glavne fermentacije, a uklanjaju se tijekom sekundarne fermentacije piva. Poželjni sastojci arome zrelog piva (viši alkoholi i esteri) imaju odlučujući utjecaj na aromu

gotovog piva. Njihova prisutnost u odgovarajućim koncentracijama je preduvjet za visoku kvalitetu piva, a njihov udio se povećava tijekom glavne i sekundarne fermentacije. Mnoge biokemijske reakcije koje se događaju u pivu tijekom sekundarne fermentacije vezane su uz reakcije oksidacije i biti će ubrzane ukoliko dođe do značajnijeg kontakta piva s kisikom nakon što ono napusti fermentor (Pavlečić i sur., 2012).

2.2.2. Nepoželjni spojevi

2.2.2.1 Aldehidi

Aldehidi nastaju tijekom pripreme sladovine, iz procesa poput Maillardovih reakcija i oksidacije lipida (Olaniran i sur., 2017). Oni daju neželjene arome poput arome trave, lišća ili kartona. Acetaldehid je prisutan u najvećoj koncentraciji, te je bitan prekursor sinteze etanola. Ima ga najviše na kraju eksponencijalne faza rasta, a najmanje na kraju zrenja piva. Bez dovoljnog broja stanica kvasca na kraju fermentacije nema pravilne redukcije acetaldehida u etanol. Kvasac na kraju fermentacije i tijekom sazrijevanja apsorbira acetaldehid, te ga reducira u etanol (Mahendra i sur., 2019).

Kod ljudi je prag detekcije za acetaldehid od 10-20 mg/L i njegova prisutnost u pivu iznad granične vrijednosti rezultira 'travnatim' neugodnim aromama (Olaniran i sur., 2017).

Tablica 1. Najčešći aldehidi u pivu (Bamforth i sur., 2008).

Spoj	Tipičan raspon detekcije (mg/L)	Prag detekcije (mg/L)	Jedinice arome	Opis arome
Acetaldehid	2-20	25	0.08-0.8	Boja
Trans-2-Butenal	0.003-0.02	8.0	0.00	Jabuke, orasi
2-Metilpropanal	0.02-0.5	1.0	0.02-0.5	Banana, dinja
C ₅ aldehidi	0.01-0.3	1.0	0.01-0.3	Sir, trava
Trans-2-Nonenal	0.00001-0.002	0.0001	0.09-18	Karton
Furfural	0.01-1.0	200	0.0	Papir
5-Metillfurfural	<0.01	17	0.0	Začinjeno
5-Hidroksimetilfurfural	0.1-20	1000	0.0-0.02	Ustajalo

2.2.2.2 Diacetil

Jedan od ciljeva zrenja mladog piva je uklanjanje vicinalnih diketona (VDK), posebno 2,3-butandiona (diacetil) koji pivu daje aromu maslaca. On nastaje kao nusprodukt sinteze aminokiselina izoleucina, leucina i valina. Njihovom sintezom nastaje spoj α -acetolaktat, koji se izlučuje u sladovinu i tamo oksidativnom dekarboksilacijom postaje 2,3-butandion (diacetil). Uklanjanje diacetila iz mladog piva događa se prilikom sazrijevanja mladog piva. Kvasac reapsorbira diacetil te ga reducira u spojeve neutralne arome - acetoin i 2,3-butandiol. Kako bi se smanjila koncentracija diacetila u pivu moguće je koristiti nekoliko tehnika: stanka na malo povišenoj temperaturi nakon primarne fermentacije i prije odležavanja, optimizacija sadržaja FAN (free amino nitrogen - slobodni amino dušik) u sladovini, dodatak enzima α -acetolaktat dekarboksilaze koji pretvara α -acetolaktat direktno u acetoin (Mahendra i sur., 2019).

Tablica 2. Najčešći diacetili u pivu (Bamforth, 2004).

Spoj	Tipičan raspon detekcije (mg/L)	Opis arome
Diacetil	0.01-0.4	Maslac
2,3-pentanedion	0.1-0.15	Med
2,3-heksanedion	<0.01	Jagoda
Acetoin	1-10	Voćno, pljesnivo, drvenasto
3-hidroksi-2-pentanon	0.05-0.07	-

2.2.2.3 Sumporni spojevi

Sumporni spojevi su jedni od najlakše prepoznatljivih aroma u pivu ako se nalaze u velikim koncentracijama. Mnogi sumporni spojevi izravno proizlaze iz sladovine i ostaju u pivu nepromjenjivi, dok neki nastaju pod utjecajem metabolizma kvasca tijekom fermentacije.

Sumporni spojevi od posebnog značaja su sumporovodik (H_2S) i sumporni dioksid (SO_2). H_2S stvara se tijekom fermentacije iz aminokiselina koje sadrže sumpor, vrlo je hlapljiv

spoj koji također djelomično ispari tijekom fermentacije i dozrijevanja uz pomoć ugljikovog dioksida koji se diže prema gore. Niska, ali detektirajuća koncentracija H₂S je prihvatljiva i čak karakteristična za neka piva gornjeg vrenja (ale piva), međutim, pri visokim koncentracijama to bi se smatralo vrlo neželjenim nedostatkom arome.

Sumporni dioksid (SO₂) nastaje iz sulfata prisutnih u sladovini. Jedna od ključnih uloga SO₂ u pivu je očuvanje svježine u pakiranju.

Također, jedan od istaknutih sumpornih spojeva je dimetil sulfid (DMS) koji se može najčešće naći u pivama donjeg vrenja (lager pivo). Najviše DMS-a se izbacuje tijekom tople fermentacije te sa produljenjem vremena dozrijevanja (Boulton i Quain, 2001).

Tablica 3. Najčešći sumporni spojevi (Bamforth, 2004).

Spoj	Tipičan raspon detekcije (mg/L)	Opis arome
Vodikov sulfid	0.001-0.02	Pokvarena jaja
Etil merkaptan	0.001-0.02	Trulež poriluka, luka, češnjaka, jaja
Dimetil sulfid	0.01-0.2	Kuhano povrće, kukuruz, crni ribiz
Dimetil disulfid	0.001-0.01	Češnjak, spaljena guma
Metionil acetat	0.013-0.03	Gljive
Methional	<0.05	Pire krumpir
3-metil-2-buten-1-tiol	0.00001-0.03	Tvor

2.2.3. Poželjni spojevi

2.2.3.1 Viši alkoholi

Viši alkoholi su skupina alkohola koji imaju duže ugljikove lance od jednostavnog etanola. Jedan od najvažnijih spojeva za aromu piva u grupi viših alkohola je izoamil, koji utječe na pitkost piva, odnosno povećanjem koncentracije izoamila pivo postaje sve manje pitko.

U pivu se često nalaze alifatski alkoholi kao što su n-propanol, 2-metilpropan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, te aromatični alkoholi poput β-feniletanola i benzil alkohola. Ovi alkoholi

mogu imati pozitivan ili negativan utjecaj na aromu piva. U malim koncentracijama, viši alkoholi mogu doprinijeti složenosti i punoće arome. Međutim, u koncentracijama većim od 300 mg/L, mogu uzrokovati oštar i neugodan miris i aromu, dok optimalne razine daju poželjne karakteristike. Viši alkoholi nastaju kao nusprodukti sinteze aminokiselina iz piruvata kroz anabolički put tijekom metabolizma kvasca ili se mogu proizvesti kroz katabolizam aminokiselina. Proizvodnja viših alkohola izravno je povezana s metabolizmom aminokiselina koje predstavljaju ključni izvor dušika u sladovini, a te aminokiseline kvasac apsorbira u sekvencijalnom redu (Olaniran i sur., 2017).

Tablica 4. Viši alkoholi u pivu (Bamforth, 2004).

Spoj	Tipičan raspon detekcije (mg/L)	Opis arome
Etanol	<5,000-100,000	Alkohol, jako
Propan-1-ol	3-16	Alkoholno
Glicerol	1,300-2,000	Slatkasto, viskozno
Izoamil alkohol	30-70	Vinasto, bananasto, slatko
Cis-3-hexen-1-ol	0.025	Svježe pokošena trava
2-feniletanol	8-35	Ruže, gorko, parfimirano
Fenol	0.01-0.05	Fenol
Tirozol	3-40	Gorko
4-vinilgvaikol	0.05-0.55	Podsjeća na klinčić

2.2.3.2 Esteri

Esteri su jedni od najvažnijih spojeva koji pridonose aromi piva. Nastaju kao rezultat metabolizma kvasca, odnosno stvaraju se tijekom fermentacije esterifikacijom masnih kiselina sa alkoholima. Približno 100 različitih estera je identificirano u pivu, a oni obično pridonose cvjetnim ili voćnim aromama. Umjerene količine estera mogu obogatiti aromu

piva, ali prekomjerne količine mogu rezultirati pretjeranom voćnom aromom, koju većina potrošača smatra nepoželjnim (Boulton i Quain, 2001).

Stvaranje estera je kompleksan proces na kojeg utječu skoro svi tehnološki faktori pa ga je stoga moguće kontrolirati uz pomoć brojnih parametra kao što su to: temperatura, aeracija, količina kvasca pri inokulaciji, zakiseljenost komine/sladovine, koncentracije ekstrakta, sastav šećera, soj kvasca, visina fermentora, proteolitička aktivnost te cijedenje (Marić, 2009).

Tablica 5. Esteri u pivu (Bamforth, 2004).

Spoj	Tipičan raspon detekcije (mg/L)	Opis arome
Etil acetat	8-42	Otapalo, voćna aroma
Butil acetat	0.04-0.4	Banana, slatka aroma
Izoamil acetat	0.6-4	Banana, jabuka
Etil butirat	0.04-0.2	Papaja
Izoamil propionat	0.015	Ananas
Feniletil acetat	0.05-0.2	Ruže, med
Etil kaprat	0.01-1	Kozje mlijeko
Etil kaprilat	0.1-1.5	Jabuka
Etil miristat	0.4	Ulje biljnog porijekla

2.3. Polifenoli

Polifenoli ili tanini su kemijski složeni spojevi, odnosno spojevi različitih kemijskih struktura od jednostavnih hidroksicimetnih kiselina, antocijanina (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina. Osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova. Polifenoli su u prirodi prisutni u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Kod biljaka djeluju kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, imaju antibiotsko djelovanje, štite od UV zračenja i pridonose pigmentaciji biljaka. U namirnicama pridonose gorčini, oštrini, boji,

aromi, mirisu i oksidativnoj stabilnosti, a i imaju jako važnu ulogu u prevenciji humanih bolesti jer djeluju protuupalno, protualergijski i protukancerogeno (Berend i Grabarić, 2008).

U pivu polifenolni sastojci sladovine potječu od slada i hmelja. Značaj od onih dobivenih iz slada leži u njihovoj sposobnosti da tvore komplekse s proteinima i stvaraju zamućenje u pivu. Formiranje takvih kompleksa, u obliku netopljivih taloga, potiče se u nekoliko faza proizvodnog procesa kako bi se oni uklonili te se proizvelo gotovo pivo bez sklonosti stvaranju zamućenja.

Polifenoli prisutni u sladovinama dolaze u nekoliko različitih kemijskih oblika: monomeri, oligomeri i polimeri koji se izlučuju tijekom kuhanja sladovine (Collin i sur., 2013).

Prva klasa jednostavnih polifenola uključuje fenolne derivate hidroksibenzojevih i hidroksicinaminskih kiselina. Među ostalim, tu spadaju p-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringična, p-kumarinska i ferulinska kiselina. Ovi derivati nemaju utjecaja na koloidnu stabilnost piva, ali imaju ulogu u okusu i aromi piva.

Druga klasa su flavonoli, koji se uglavnom izlučuju iz hmelja. Sastoje se od kvercetina i kempferola te njihovih glikozida. Oni preživljavaju u pivu, ali također nemaju utjecaj na koloidnu stabilnost.

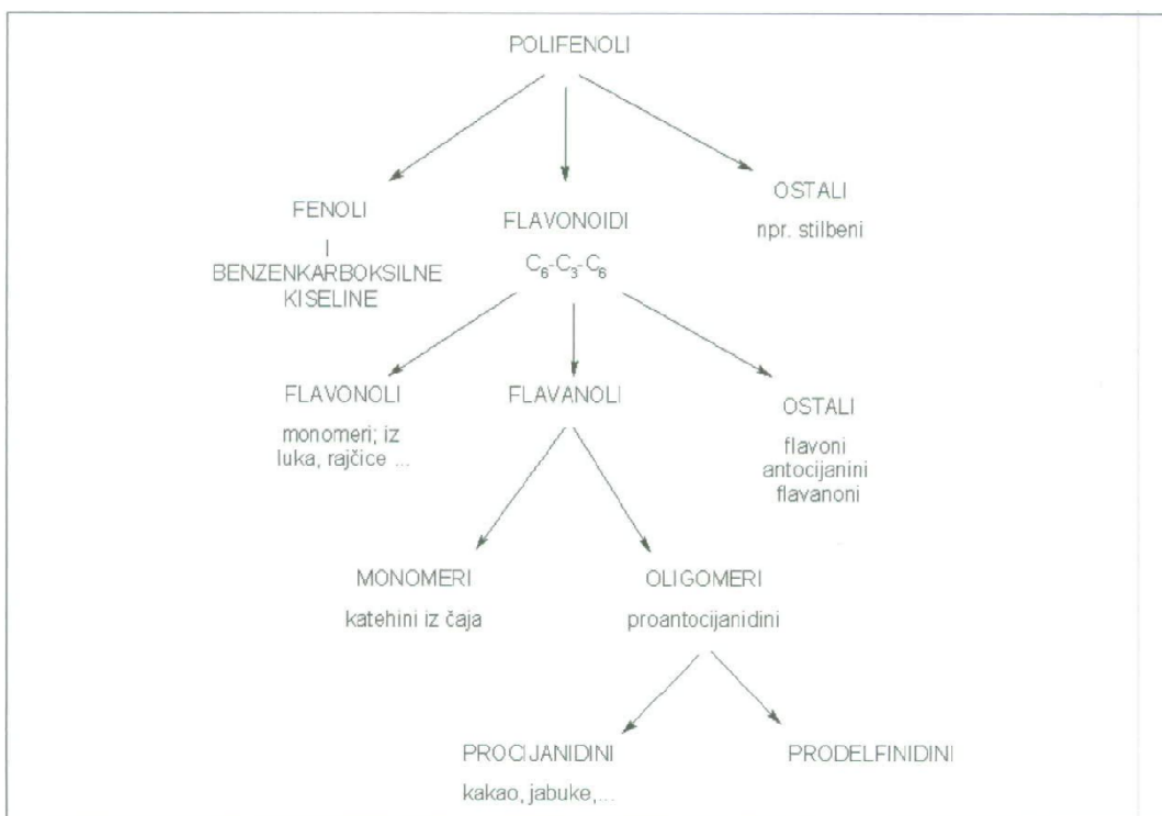
Treća klasa su monomerni i oligomerni flavanoli. Dva od uobičajenih monomernih flavanola su (+)-katehin i (-)-epikatehin. Dimerni oblici, poput prodelphinidina B3 i prokianidina B3, te trimerni oblici mogu se detektirati u sladu.

Oligomerni flavanoidi sastoje se od kratkih lanaca polihidroksi-flavan-3,4-diol-monomera vezanih za (+)-katehin ili (-)-epikatehin. Najobilniji polimeri ove vrste su proantocijanidini (nekada antocijanogeni) koji se tako nazivaju jer pod kiselim uvjetima u prisutnosti kisika daju antocijanidine. Ovi spojevi imaju sposobnost križne povezanosti te formiranja polimernih flavanola velike molekulske mase, kao i formiranja kompleksa s proteinima i polipeptidima, tzv. kompleksnim flavanolima.

Tijekom kuhanja sladovine dolazi do Maillardovih reakcija uz pomoć kojih se mogu sintetizirati novi polifenolni spojevi. Tijekom ovog postupka, neki polifenoli mogu stvarati komplekse s proteinima, čime se formira "topli talog". Ova faza je kritična za uklanjanje neželjenih spojeva koji bi mogli doprinijeti zamućenju piva.

Nakon kuhanja, sladovina se hladi, što rezultira formiranjem "hladnog taloga". Hlađenjem, dio polifenola se taloži, što može utjecati na njihovu koncentraciju u konačnom proizvodu. Posljednja faza je fermentacija, u kojoj kvasac pretvara šećere u ugljični dioksid i alkohol. Tijekom fermentacije, polifenoli mogu reagirati s drugim komponentama, što može dovesti do promjena u njihovoj koncentraciji i sastavu.

Na kraju ovog procesa, udjel polifenola u gotovom pivu će biti rezultat složenih kemijskih interakcija koje su se odvijale tijekom proizvodnje sladovine. Koncentracija i sastav polifenola će značajno utjecati na boju, aromu, teksturu i stabilnost piva. Stoga, razumijevanje i kontrola promjena sastava i udjela polifenola tijekom proizvodnje sladovine igra ključnu ulogu u proizvodnji piva visoke kvalitete. (Berend i Grabarić, 2008) (Boulton i Quain, 2001)



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

2.4. Metode određivanja hlapljivih spojeva iz piva

2.4.1. Kromatografija

Kromatografija je fizikalno-kemijska tehnika odjeljivanja, u kojoj se sastojci smjese raspoređuju između dvije faze, pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne). Stacionarna faza može biti čvrsta, tekuća ili u obliku gela, te je dio kromatografskog sustava. Mobilna faza fluid koji prolazi kroz stacionarnu fazu ili uzduž nje u određenom smjeru, te može biti kapljevina (tekućinska kromatografija) ili plin (plinska kromatografija)(Lovestead i Urness, 2019).

2.4.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. Gas Chromatography; GC) je analitička tehnika koja se koristi za odvajanje i analizu uzorka koji se mogu isparavati bez termičke razgradnje. Plinska kromatografija se ponekad naziva i plinsko-tekuća kromatografija zato što se razdvajanje komponenata bazira na razlikama u ponašanju između pokretne plinske faze i stacionarne tekuće faze. Princip rada je taj da se prethodno pripremljen uzorak injektira u instrument i ulazi u plinski tok koji ga prenosi do kolone za separaciju, gdje se različite komponente razdvajaju unutar kolone. Plin koji se koristi kao nosioc može biti helij, vodik ili dušik. Na kraju detektor mjeri količinu komponenti koje izlaze iz kolone (Shimadzu, 2023).

Instrument koji provodi plinsku kromatografiju naziva se plinskim kromatografom (GC), a graf koji prokazuje rezultate naziva se plinski kromatogram (McNair i Miller, 1998).

2.4.3. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija (engl. Mass Spectrometry; MS) je analitička metoda za određivanje komponenata uzorka pomoću njihove mase i električnog naboja. Instrument koji se koristi u masenoj spektrometriji naziva se maseni spektrometar (McNair i Miller, 1998). Maseni spektrometar radi na principu odbijanja, odnosno defleksije pokretnih iona u električnim te magnetskim poljima, gdje veličina defleksije ovisi o masi pojedinog iona. Plinoviti uzorak se ionizira i pozitivno nabijene vrste ulaze u akceleracijsku komoru gdje se ioni podvrgavaju djelovanju električnog polja radi ubrzanja. Teži ioni se manje otklanjaju od lakših, a odvajaju se prema atomskim (molekulskim) masama. Što znači da samo ioni

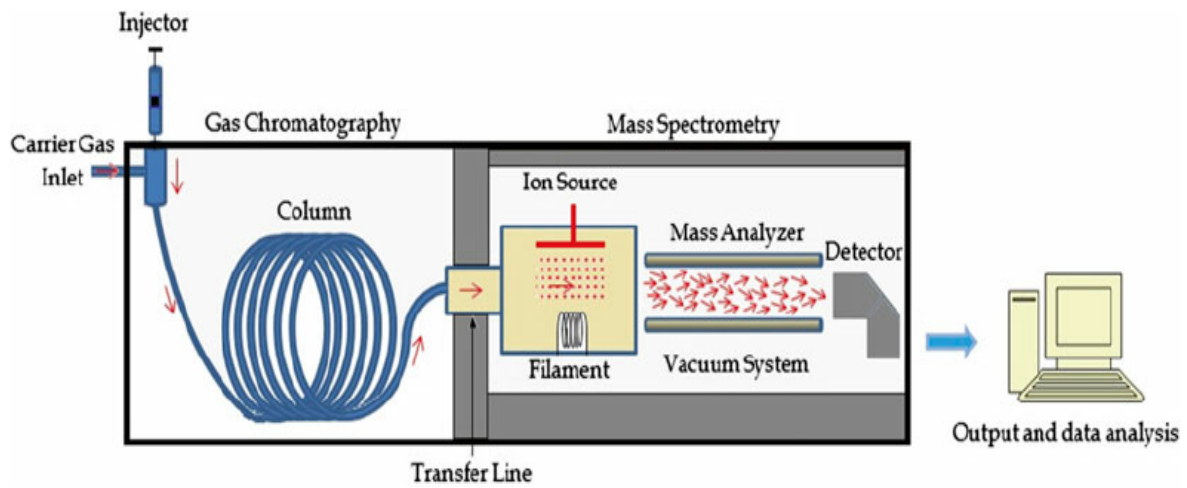
određene mase dolaze do detektora koji bilježi svaku vrstu kao zaseban vršak na kromatogramu (engl. peak)(Bamforth i sur., 2008).

2.4.4. Vezani sustav plinska kromatografija - masena spektrometrija

Plinska kromatografija - masena spektrometrija (engl. Gas Chromatography – Mass Spectrometry; GC–MS) najčešće se koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje čistoće i stabilnosti organskih spojeva te za identifikaciju komponenti u smjesi. GC-MS se sastoji od GC sustava u kojem se nalazi otvor za ubrizgavanje, GC pećnica, kolona te prijelazna linija koja se spaja na MS sustav koji sadrži filament, ionski izvor, vakuum, analizator i detektor (Lovestead i Urness, 2019).

Analiza započinje pripremom uzorka te injektiranjem istoga u otvor za ubrizgavanje koji je prethodno zagrijan do stupnja automatskog isparavanja, a prolazi kroz kolonu uz pomoć inertnog plina. Kolona, odnosno stupac, pruža površinu za interakciju spojeva te im omogućuje usporavanje kako ne bi došlo do razdvajanja. Kolone su napravljene ovisno o polarnosti i tipu spojeva koji se pokušava razdvojiti.

U procesu prolaženja hlapljivih spojeva kroz kolonu, pećnica u kojoj se nalazi kolona postepeno, isprogramirano unaprijed, povećava temperaturu te jednom kada spojevi dosegnu kraj kolone, oni dolaze do detektora gdje se proporcionalni vrhovi (engl. peaks) svake kemijske komponente zabilježavaju na kromatogramu. Visina i površina svakog vrha izravno je proporcionalna koncentraciji spoja unutar uzorka, te nakon što molekule prođu kroz GC kolonu, one se „bombardiraju“ elektronima visoke energije (70 eV) što uzrokuje lomljenje molekula u pozitivno nabijene čestice, katione. Nakon elektronskog udara, tj. elektronske ionizacije, ioni putuju elektromagnetskim poljem koje ih filtrira na temelju njihove mase gdje detektor amplificira ione koje potom prebrojava i povezuje sa specifičnom masom fragmenta. Te informacije šalju se u sustav za obradu gdje se kreira maseni spektar. Maseni spektar pokazuje svaku pojedinačnu komponentu unutar uzorka što daje nacrt njezinog kemijskog identiteta. (Lovestead i Urness, 2019)(Shimadzu, 2023)



Slika 3. Shema GC-MS sustava (Emwaw i sur., 2015)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom završnom radu analizirano je 24 različitih uzoraka piva proizvedenih u mikro šaržama u laboratorijskim uvjetima korištenjem dvije vrste pivarskog kvasca (LalBrew Voss Kveik Ale i SafAle US05) na različitim temperaturama fermentacije (18, 23 i 35°C). Napravljena je standardna analiza osnovnih parametra piva pomoću Anton Paar analizatora, određeni su polifenoli sa UV-vidljivom spektrofotometrijom, te hlapljivi spojevi vezanim sustavom plinske kromatografije - masene spektrometrije



Slika 4. Primjer uzorka

3.1. Aparatura i kemikalije

- Aparatura korištena u završnom radu
 - **Anton Paar analizator** – DMA 4500 M
 - Instrument za precizno mjerenje gustoće, koncentracije i ostalih povezanih parametara različitih tekućina.
 - **Shimadzu UV-1280 spektrofotometar**
 - Instrument koji koristi svjetlost za kvantificiranje apsorbancije uzorka, često korišten u analizi koncentracije različitih spojeva u otopinama.
 - **Shimadzu Nexis GC-2030 plinski kromatograf**
 - Napredni instrument za odjeljivanje i analizu hlapljivih spojeva u uzorcima.
- Kemikalije korištene u završnom radu
 - GRAM-MOL Amonijak otopina 25%- tna
 - Koristi se za prilagodbu pH vrijednosti i kao reagens u raznim analizama.
 - CARLO ERBA EDTA (Etilendiamintetraoctena kiselina)
 - Kelatirajući agens koji se koristi u analizi za stabilizaciju metalnih iona.
 - CARLO ERBA zeleni amonijev željezov (III) citrat
 - Koriti se kao stabilizator ili zgušnjivač u raznim analizama.
 - SIGMA Karboksimetil celuloza
 - Koristi se kao stabilizator ili zgušnjivač u raznim analizama.

3.2. Analiza osnovnih parametra piva analizatorom Anton Paar

Za analizu osnovnih parametara piva kao što su ekstrakt u osnovnoj sladovini, prividni ekstrakt, pravi ekstrakt, alkohol, pH vrijednost, bistroća i energija korišten je analizator Anton Paar DMA 4500 M, visoko precizni uređaj za mjerenje gustoće i koncentracije tekućina (Antoon Paar, 2023).

Uzorci piva su prethodno temperirani na 20°C kako bi se osiguralo da su svi uzorci na istoj temperaturi i kako bi se izbjegle varijacije u mjerenjima, degazirani mućkanjem kojim se uklanjaju mjehurići zraka koji mogu utjecati na preciznost mjerenja te su uzorci konačno filtrirani preko suhog filter papira na koji je dodan 1 g filter mase (diatomejska zemlja). Diatomejska zemlja se često koristi u filtraciji zbog svojih mikroskopskih pora koje omogućavaju učinkovito uklanjanje čestica iz uzorka. Jednom filtrirani, uzorci su stavljeni

u suhe čašice (viale) i umetnuti u analizator. Anton Paar analizator DMA 4500 M koristi oscilacijsku U-tube tehnologiju kako bi precizno mjerio gustoću tekućine. Uz gustoću, ovaj analizator je također u stanju izračunati druge parametre kao što su ekstrakt u osnovnoj sladovini, prividni ekstrakt, pravi ekstrakt, alkohol, pH vrijednost, bistroća i energija piva koristeći interne algoritme i kalibracijske podatke.

Rezultati dobiveni uz pomoć ove analize omogućavaju dublje razumijevanje kako različiti proizvodni procesi i sastojci utječu na kvalitetu piva. Također, pružaju podatke koji mogu biti korisni za kontrolu kvalitete u pivovarama i prilagodbu proizvodnih procesa kako bi se postigle željene karakteristike piva.

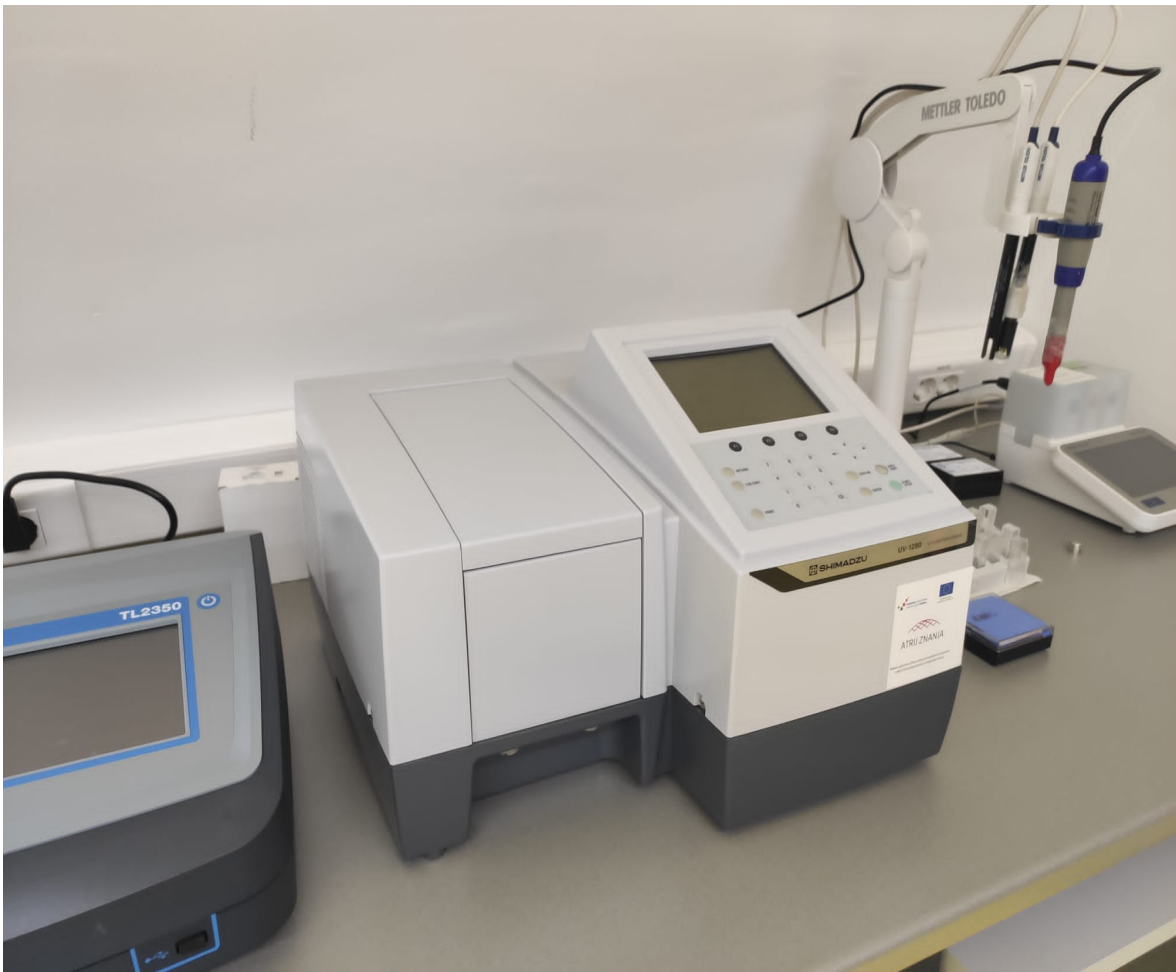


Slika 5. Anton Paar analizator DMA 4500 M

3.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola u pivu

Polifenoli su ključni spojevi prisutni u pivu koji doprinose njegovoj aromi, boji i antioksidativnim svojstvima. Spektrofotometrija je jedna od najučinkovitijih tehnika za analizu koncentracije polifenola u pivu.

Shimadzu UV-1280 je visoko precizan i svestran spektrofotometar koji koristi ultraljubičastu i vidljivu (UV/VIS) svjetlost za kvantitativnu analizu raznih tvari. Uređaj se ističe svojom visokom osjetljivošću, stabilnošću i sposobnošću analize širokog spektra uzoraka, specifično za određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu. Postupak počinje pripremom uzoraka piva koji se prvo temperiraju na 20°C i degaziraju mućkanjem, kako bi se osigurala konzistentnost i uklonili zračni mjehurići koji bi mogli utjecati na mjerenja. Zatim se 10 mL uzorka piva, 8 mL CMC/EDTA reagensa i 0,5 mL reagensa amonijaka pipetiraju u odmjernu tikvicu od 25 mL. Tikvica se nadopunjuje destiliranom vodom do ukupnog volumena od 25 mL i temeljito promućka. Uzorci se stabiliziraju s Etilendiaminotetraoctenom kiselina (EDTA) i karboksimetil celulozom (CMC) te prisutni polifenoli reagiraju s željeznim ionima u alkalnoj otopini, što rezultira formiranjem kompleksa koji apsorbiraju svjetlost na određenoj valnoj duljini. Nakon pripreme, uzorci se prebacuju u kivete, male posudice napravljene od materijala koji ne apsorbiraju svjetlost u relevantnom spektru. Kivete se postavljaju u Shimadzu UV-1280 spektrofotometar kojim se Apsorbacija crveno obojane otopine se mjeri na valnoj duljini od 600 nm što ukazuje na visoku koncentraciju polifenola u uzorku.



Slika 6. Shimadzu UV-1280 spektrofotometar

3.4. Određivanje hlapljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa

Analiza hlapljivih spojeva u uzorcima piva od ključnog je značaja jer ti spojevi igraju centralnu ulogu u karakteristikama arome piva. U ovom radu koristi se tehnika plinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom (GC-MS) kako bi se identificirali i kvantificirali hlapljivi spojevi u pivu. Shimadzu Nexis GC-2030 plinski kromatograf koristi se u kombinaciji s masenim detektorom Shimadzu AOC-6000 Plus. Nexis GC-2030 je napredni plinski kromatograf koji se ističe svojom visokom preciznošću, pouzdanošću i fleksibilnošću. Uređaj je opremljen naprednim značajkama poput kontrolirane temperature, uređaja za automatsko uzorkovanje te mogućnosti korisničkih prilagodbi kolone i postavki detektora.

Metoda je primjenjiva za sve hlapljive, termički stabilne organske spojeve (Novak i Allegratti, 2012). Spoj plinske kromatografije i masene spektrometrije je separativna analitička tehnika uz koju je moguće fizičko odvajanje različitih komponenti (analita) iz uzorka te određivanje njihovih specifičnih masa koje pružaju strukturni identitet individualnih komponenti koje se nalaze u uzorcima.

Postupak analize započinje dodavanjem 1 g NaCl i 10 mL piva u vijalice koje se potom injektiraju u Nexis GC-2030. Plin nosač, obično helij, koristi se za transport uzorka kroz kolonu kromatografa. Kako uzorak prolazi kroz kolonu, hlapljivi spojevi su razdvojeni na temelju njihove interakcije s materijalom unutar kolone. Nakon separacije u plinskom kromatografu, spojevi ulaze u maseni detektor (Shimadzu AOC-6000 Plus) gdje su ionizirani i razdvojeni prema masi. Detektor koristi kvadrupol kako bi selektivno propuštao ione prema masi, što omogućava identifikaciju i kvantifikaciju spojeva na temelju njihovih masenih spektara. Ta specifična masa pomaže u pružanju strukturnog identiteta individualnih komponenti.

Sve informacije i podaci koji se prikupljaju tijekom analize prenose se na računalo spojeno na sustav, gdje se mogu dalje analizirati pomoću specijaliziranog softvera.

Korištenje Shimadzu Nexis GC-2030 u ovom završnom radu omogućava visoko precizno i detaljno određivanje hlapljivih spojeva u pivu, što može doprinijeti boljem razumijevanju kako ti spojevi utječu na kvalitetu i karakteristike piva.



Slika 7. Plinski kromatograf Shimadzu Nexis GC-2030

4. REZULTATI

Tablica 6. Osnovni parametri uzoraka piva

UZORAK	OE °P	AE % w/w	RE % w/w	ABV ml/100ml	pH	BISTROĆA EBC	E kJ/100 ml
US-05 18/1	13,80	2,51	4,68	6,07	4,29	2,04	209,66
US-05 18/2	13,87	2,82	4,94	5,95	4,25	1,81	210,90
US-05 18/1*	14,48	2,85	5,08	6,29	4,23	2,07	220,77
US-05 18/2*	14,51	3,26	5,42	6,09	4,23	1,57	221,53
US-05 23/1	13,93	2,43	4,64	6,19	4,17	2,36	211,70
US-05 23/2	13,95	2,49	4,69	6,17	4,18	2,15	212,03
US-05 23/1*	14,60	2,20	4,57	6,69	4,15	2,58	222,12
US-05 23/2*	14,57	2,78	5,04	6,37	4,18	2,32	222,12
US-05 35/1	13,66	10,86	11,41	1,55	4,30	1,55	213,66
US-05 35/2	13,69	9,99	10,72	2,03	4,25	1,02	213,42
US-05 35/1*	14,36	9,89	10,77	2,46	4,22	1,46	224,01
US-05 35/2*	14,25	9,56	10,48	2,59	4,21	1,25	222,08
VOSS 18/1	13,79	4,99	6,69	4,76	4,50	2,20	211,21
VOSS 18/2	13,79	4,17	6,03	5,20	4,48	1,49	210,57
VOSS 18/1*	14,45	5,12	6,92	5,08	4,48	1,75	222,00
VOSS 18/2*	14,46	4,14	6,13	5,60	4,44	1,65	221,38
VOSS 23/1	13,86	3,96	5,87	5,35	4,48	2,13	211,66
VOSS 23/2	13,86	3,98	5,89	5,34	4,62	1,81	211,70
VOSS 23/1*	14,51	3,82	5,87	5,80	4,46	2,26	222,00
VOSS 23/2*	14,49	3,91	5,95	5,74	4,47	1,45	221,72
VOSS 35/1	13,99	2,84	4,99	6,00	4,34	1,28	212,91
VOSS 35/2	13,98	2,56	4,75	6,15	4,30	1,19	212,56
VOSS 35/1*	14,60	2,78	5,05	6,39	4,30	1,02	222,56
VOSS 35/2*	14,56	2,59	4,88	6,47	4,28	1,37	221,87

Tablicom 6 prikazani su osnovni parametri različitih uzoraka piva dobiveni u pivskom laboratoriju Veleučilišta u Karlovcu analizirani uređajem Anton Paar DMA 4500 M. Ovi parametri pružaju uvid u kvalitetu i karakteristike piva:

- **Uzorak** – ime uzorka je prikazano u šiframa zbog jednostavnosti i lakšeg snalaženja.
- **OE/°P** (Original Extract / stupnjevi Platoa) - Osnovni ekstrakt, odnosno mjera koncentracije otopljenih čvrstih tvari (uglavnom šećera) u sladovini prije početka fermentacije.
- **AE % w/w** – Prividni (engl. *artifitial*) ekstrakt, odnosno mjera koncentracije otopljenih čvrstih tvari u pivu nakon fermentacije.
- **RE % w/w** - Pravi ekstrakt, odnosno mjera koncentracije otopljenih čvrstih tvari koja uzima u obzir alkohol koji je nastao tijekom fermentacije.
- **ABV/ml/100ml** - Alkohol po volumenu, odnosno mjera koncentracije alkohola u pivu.
- **pH** - pH vrijednost piva - mjera kiselosti ili lužnatosti tekućine. Većina piva ima pH u rasponu od 4,2 do 4,4.
- **BISTROĆA/EBC** - Bistroća piva (mjera mutnoće piva), izražena u jedinicama Europske pivske konvencije (engl. *European Brewery Convention - EBC*).
- **E/kJ/100 ml** - Energetska vrijednost piva.

SRM	Beer Style	Beer colour	EBC
2	Pale lager, Witbier, Pilsener, Berliner Weisse		4
3	Maibock, Blonde Ale		6
4	Weissbier		8
6	American Pale Ale, India Pale Ale		12
8	Weissbier, Saison		16
10	English Bitter, ESB		20
13	Biere de Garde, Double IPA		26
17	Dark lager, Vienna lager, Marzen, Amber Ale		33
20	Brown Ale, Bock, Dunkel, Dunkelweizen		39
24	Irish Dry Stout, Doppelbock, Porter		47
29	Stout		57
35	Foreign Stout, Baltic Porter		69
40+	Imperial Stout		79

Slika 8. EBC mjere boje piva (The Red Lion, 2023)

Vidljivo je kako uzorci piva koji imaju više vrijednosti osnovnog ekstrakta sadrže više otopljenih čvrstih tvari prije fermentacije. To može utjecati na krajnju aromu i teksturu piva.

Prividni ekstrakt (AE) obično je niži od pravog ekstrakta (RE) jer AE ne uzima u obzir alkohol nastao tijekom fermentacije. Razlika između ove dvije vrijednosti može biti pokazatelj efikasnosti procesa fermentacije.

ABV je mjera jačine piva. Više vrijednosti znače da pivo sadrži više alkohola te se vidi pozitivna korelacija između ABV-a i energetske vrijednosti, odnosno piva s višem sadržajem alkohola očekivano imaju i više kalorija. Također primjećuje se da uzorci s višom osnovnom ekstrakcijom (OE) imaju tendenciju imati i viši sadržaj alkohola (ABV) – uzorak US-05 23/1* (OE 14,60 ABV 6,69 te energija 222,12 kJ).

Ovo je očekivano jer veća količina fermentabilnih šećera na početku procesa može rezultirati većim udjelom alkohola u gotovom proizvodu.

Što se tiče pH vrijednosti i kvalitete piva može se zaključiti kako su pH vrijednosti u standardnim rasponima piva (oko 4-5). pH može utjecati na mnoge aspekte piva uključujući stabilnost, aromu i boju. Na primjer, niži pH može pojačati osjećaj osvježanja kojeg pivo pruža, dok prenizak pH može dovesti do nepoželjne kiselosti. Previsoka pH vrijednost pak može biti posljedica autolize kvasca što rezultira pokvarenim pivom.

Svi analizirani uzorci imaju bistrinu manju od 4 što ih svrstava u kategoriju svijetlih piva (slika 12). Nefiltrirana piva su manje bistrija od filtriranih, također određeni sastojci žitarica također imaju utjecaj na bistroću, poput škroba, proteina, lipida, kalcija i polifenola.

Tablica 7. Koncentracije ukupnih polifenola u uzorcima piva

,	UZORAK	POLIFENOLI [mg/L]
1.	US-05 18/1	223
2.	US-05 18/2	216
3.	US-05 18/1*	225
4.	US-05 18/2*	214
5.	US-05 23/1	194
6.	US-05 23/2	198
7.	US-05 23/1*	224
8.	US-05 23/2*	225
9.	US-05 35/1	228
10.	US-05 35/2	232
11.	US-05 35/1*	228
12.	US-05 35/2*	232
13.	VOSS 18/1	219
14.	VOSS 18/2	218
15.	VOSS 18/1*	222
16.	VOSS 18/2*	217
17.	VOSS 23/1	230
18.	VOSS 23/2	219
19.	VOSS 23/1*	231
20.	VOSS 23/2*	243
21.	VOSS 35/1	241
22.	VOSS 35/2	211
23.	VOSS 35/1*	217
24.	VOSS 35/2*	213

Tablicom 7 su prikazane koncentracije ukupnih polifenola u različitim uzorcima piva, izražene u miligramima po litri (mg/L). Niže su navedene tipične koncentracije polifenola u najviše zastupljenim stilovima piva: (Lugasi, 2003)

- Lager piva: 100 do 200 mg/L
- Ale: 150 do 300 mg/L
- Stout/Porter: 200 do 400 mg/L
- Pšenično pivo: 100 do 250 mg/L
- Indian Pale Ale: 250 do 450 mg/L

Uočljivo je da su koncentracije ukupnih polifenola u svim uzorcima unutar tipičnog raspona za Ale piva, što upućuje na to da se očekuju standardne arome koje su povezane s vrlo visokim ili niskim razinama polifenola (kao što su prekomjerna gorčina ili manjak kompleksnosti arome).

1. U uzorcima piva proizvedenih standardnim Ale kvascem (US-05) , vidi se da koncentracije polifenola variraju, s najnižom koncentracijom od 194 mg/L u uzorku US-05 23/1 i najvišom koncentracijom od 232 mg/L u uzorku US-05 35/2*. Uzorci označeni s 35 (kao što su US-05 35/1, US-05 35/2, US-05 35/1* i US-05 35/2*) imaju tendenciju da imaju nešto više koncentracije polifenola u usporedbi s ostalim uzorcima US-05.

2. U uzorcima proizvedenih sa Kveik kvascem (Voss Kveik), opaža se sličan trend, s koncentracijama polifenola koje su u većini slučajeva nešto više u usporedbi s uzorcima US-05. Uzorak VOSS 23/2* ima najvišu koncentraciju polifenola (243 mg/L) među svim uzorcima u tablici.

Važno je napomenuti da, iako koncentracija polifenola može utjecati na neka svojstva piva kao što su aroma, boja i antioksidacijska aktivnost, sama koncentracija polifenola ne može biti jedini pokazatelj kvalitete piva. (Collin i sur., 2013)(Lugasi, 2003) Osim toga, za potpuniju analizu bilo bi korisno razumjeti dodatni kontekst, kao što su tipovi piva koji su analizirani, postupci proizvodnje koji su korišteni te sami sastojci koji su korišteni u proizvodnji ovih piva, no zbog pravnih razloga to nije moguće.

Tablica 8. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u pivu

UZORAK	ACETALDEHYDE ppm	ETHYL ACETATE ppm	n PROPANOL ppm	ISOBUTANOL ppm	3 METHYLBTANOL ppm	2 PHENILETHANOL ppm	ISOAMYLACETATE ppm	2 - PHENYLETIL ACETATE ppm	DMS ppb	2,3 BUTANDIONE ppb	2,3 PENTANDIONE ppb
VOSS 18/2	11,665	26,973	13,372	12,492	30,701	13,123	0,784	0,253	61,1	19	3
VOSS 18/1*	8,211	23,364	10,47	10,405	27,551	12,627	0,655	0,232	61,8	12	4
VOSS 18/2*	5,835	21,593	8,227	8,759	25,122	10,223	0,562	0,176	51,6	9	4
VOSS 23/1	10,424	18,406	5,655	9,986	20,444	10,643	0,392	0,17	45,5	12	4
VOSS 23/2	6,553	16,751	4,938	8,875	17,102	8,708	0,369	0,14	47,1	7	5
VOSS 23/1*	7,311	16,384	5,475	9,166	18,422	9,966	0,29	0,149	45,3	14	5
VOSS 23/2*	4,992	14,846	5,074	8,581	15,186	8,444	0,247	0,129	41,5	13	3
VOSS 35/1	8,409	10,365	6,82	14,132	20,818	12,959	0,08	0,103	19,9	18	2
VOSS 35/2	6,471	11,12	7,68	15,135	22,828	14,659	0,16	0,125	21,9	9	6
VOSS 35/1*	3,56	10,952	6,199	13,612	20,732	12,47	0,14	0,108	27,8	6	5
VOSS 35/2*	3,547	13,186	8,176	15,603	23,14	15,114	0,207	0,139	29,1	6	5

UZORAK	ACETALDEHYDE ppm	ETHYL ACETATE ppm	ⁿ PROPANOL - ppm	ISOBUTANOL ppm	³ METHYLBUTANOL - ppm	² PHENILETHANOL - ppm	ISOAMYL ACETATE ppm	² - PHENYLETIL ACETATE ppm	DMS ppb	^{2,3} BUTANDIONE - ppb	^{2,3} PENTANDIONE - ppb
US-05 18/1	5,559	13,724	13,021	14,351	29,069	12,17	0,464	0,122	35,7	237	6
US-05 18/2	5,502	13,58	10,857	14,023	30,404	12,033	0,464	0,123	35,4	257	8
US-05 18/1*	12,002	14,001	12,211	14,283	31,611	12,955	0,457	0,129	39,7	28	2
US-05 18/2*	13,544	14,643	13,225	15,51	32,424	13,455	0,485	0,143	39,9	33	4
US-05 23/1	6,268	16,69	14,106	20,506	37,889	16,51	0,473	0,164	27,6	184	4
US-05 23/2	5,177	17,972	15,275	22,731	41,318	19,269	0,518	0,19	29,4	192	5
US-05 23/1*	13,333	17,615	19,483	22,938	37,08	16,978	0,438	0,16	36,1	21	6
US-05 23/2*	15,79	16,721	14,404	20,248	36,683	17,046	0,431	0,167	34,7	21	2
US-05 35/1	1,756	3,303	9,685	40,443	40,361	9,048	0,118	0,038	37,1	251	7
US-05 35/2	26,699	4,679	12,508	41,045	42,52	11,054	0,272	0,102	44,1	52	15
US-05 35/1*	4,03	5,421	10,72	38,247	42,643	12,402	0,23	0,074	44,3	31	17
US-05 35/2*	3,659	6,906	10,407	36,436	37,799	11,547	0,351	0,092	62,1	26	21

Tablica 8 prikazuje kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u različitim uzorcima piva, uključujući acetaldehid, etil acetat, n-propanol, izobutanol, 3-metilbutanol, 2-feniletanol, izoamil acetat, 2-feniletan acetat, DMS (dimetil sulfid), 2,3-butandion i 2,3-pentandion. Količine su izražene u ppm (dijelova na milijun) za većinu spojeva, dok su DMS, 2,3-butandion i 2,3-pentandion izraženi u ppb (dijelova na milijardu).

1. **Acetaldehid:** Acetaldehid je spoj koji može dodati svježje i voćne note pivu, ali u većim koncentracijama može uzrokovati nepoželjnu aromu sličnu zelenoj jabuci. Uzorak US-05 35/2 ima vrlo visoku koncentraciju acetaldehida (26,699 ppm), što može utjecati na aromu ovog piva.

2. **Etil acetat:** je ester koji se često nalazi u pivu kao rezultat fermentacije. On igra ključnu ulogu u određivanju arome i okusa piva, ali njegov učinak može varirati ovisno o koncentraciji. Uzorci s oznakom VOSS, kao što su VOSS 18/2, imaju relativno visoke razine koncentracije etil acetata, što može doprinijeti nepoželjnoj aromi koja se često opisuje poput mirisa ljepila.

3. **N-propanol, izobutanol, 3-metilbutanol i 2-feniletanol:** su viši alkoholi koji se nalaze u pivu, mogu utjecati na karakteristika piva na više načina (Collin i sur., 2013):

- **Okus i aroma:** U malim koncentracijama može pozitivno doprinijeti složenosti okusa i aromi piva, no na višim koncentracijama stvara okus pretjerane gorčine. 3-metilbutanol se često nalazi u pivu i ima veliki utjecaj na njegovu aromu (veće koncentracije imaju negativan utjecaj i stvaraju aromu otapala dok male koncentracije doprinose voćnoj aromi), te je još zanimljivo spomenuti spoj 2-feniletanol koji se često nalazi u pivima s visokim udjelom pšenice.
- **Toplina i tekstura alkohola:** Kao viši alkohol, n-propanol može pridonijeti osjećaju topline alkohola u pivu. Ovo može biti poželjno u određenim stilovima piva s visokim udjelom alkohola, kao što su barleywine ili imperial stout, ali može biti nepoželjno u lakšim lagerima dok izobutanol pridonosi aromi „punoće“ piva
- **Reakcije s drugim spojevima:** Reagira s određenim spojevima u pivu stvarajući mutnoću, posebno tijekom hlađenja.

Ono što je bitno kod viših alkohola jest kontroliranje koncentracije u pivu, umjerene količine poput ovih izmjerenih mogu pozitivno doprinijeti punoći piva, dok prekomjerne količine izrazito negativno utječu na kvalitetu finalnog produkta

3. **Izoamil acetat:** Ovaj spoj poznat je po svojem karakterističnom mirisu koji podsjeća na bananu. Uzorci s oznakom VOSS imaju veće koncentracije izoamil acetata u usporedbi s uzorcima US-05, što može rezultirati jačim notama. U stilovima poput njemačkog pšeničnog piva i određenih belgijskih aleova, prisutnost izoamil acetata u umjerenim koncentracijama (2-5 ppm) smatra se poželjnom karakteristikom, dok kod lagera (željena koncentracija < 1 ppm) potrošači očekuju „suptilniju i čišću“ aromu, viša koncentracija daje negativan učinak.

4. **DMS (Dimetil sulfid):** DMS može dodati aromu kuhanog povrća u pivo i obično je poželjno imati niže razine DMS-a. Uzorak US-05 35/2* ima najvišu koncentraciju DMS-a (62,04 ppb) u ovoj tablici, što može utjecati na aromu ovog piva.

5. **2,3-butandion i 2,3-pentandion:** Oba spoja su diacetili i mogu doprinijeti aromi sličnoj maslacu. Generalno, za mnoge stilove piva, poželjno je minimizirati koncentracije ovih spojeva. US-05 18/1 i US-05 18/2 imaju relativno visoke koncentracije 2,3-butandiona.

Vidljivo je kako različiti stilovi piva imaju različite vrijednosti hlapljivih spojeva te je primijećeno kako različite količine prisutnosti navedenih spojeva imaju bitan utjecaj na uravnoteženost arome i teksture piva, odnosno vrijednosti izvan granica tipičnog raspona često rezultiraju nepoželjnim aromama piva.

5. ZAKLJUČAK

Proizvodnja piva je relativno kompleksan proces u kojem svi faktori, od kvalitete sirovina, kontrole brojnih parametara tijekom proizvodnog procesa (gdje je također od presudne važnosti temeljito čišćenje i sanitacija opreme), stručnosti tima te korištenja naprednih tehnologija utječu na kvalitetu gotovog proizvoda. Ovim završnim radom ističu se procesi analize hlapljivih spojeva i polifenola u pivu, jedni od ključnih procesa kontrole kvalitete piva bez kojih finalni produkt ne bi mogao garantirati prepoznatljivu i zadovoljavajuću kvalitetu piva na koju su potrošači navikli.

1. Hlapljivi spojevi i polifenoli u pivu su jedni od ključnih faktora koji utječu na aromu, miris i teksturu piva. Kroz standardnu analizu osnovnih parametara piva pomoću Anton Paar analizatora, određivanje polifenola sa UV-vidljivom spektrofotometrijom i analiza hlapljivih spojeva putem vezanog sustava plinske kromatografije - masene spektrometrije, dobiveni su uvidi u kompleksni kemijski sastav analiziranih uzoraka piva.
2. Ove analize su omogućile razumijevanje kako različiti stilovi piva imaju različite analitičke vrijednosti, naglašavajući važnost prisutnosti hlapljivih spojeva i polifenola u određenim količinama za postizanje uravnoteženog i ugodnog profila piva. Također, istaknuta je važnost kontrole fermentacije, izbora kvasca i sirovina, jer oni imaju značajan utjecaj na koncentracije ovih spojeva.
3. Važno je napomenuti da analiza ne bi bila moguća bez upotrebe sofisticiranih analitičkih uređaja koji omogućuju precizno određivanje ovih spojeva. Ova tehnološka dostignuća su od suštinskog značaja u suvremenoj proizvodnji piva, jer omogućuju proizvođačima da optimiziraju procese i postignu željene karakteristike proizvoda svakom novom šaržom.

6. LITERATURA

Anton Paar (2023): Density Meter

<https://www.anton-paar.com/kr-en/products/details/benchtopy-density-meter-dma-4500-m/>,
(5. 6. 2023.)

Bamforth, C., Russell, I., Stewart, G. (2008): Beer: A Quality Perspective, Elsevier LTD, Oxford.

Bamforth, C., Russell, I., Stewart, G. (2008): Beer: A Quality Perspective, Elsevier LTD, Oxford.

Berend, S., Grabarić Z. (2008): Određivanja polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Boulton, C., Quain, D. (2001): Brewing yeast and fermentation, Blackwell Science Ltd.

Collin, S., Jerkovic, V., Brohan, M., Callemien, D. (2013): Polyphenols and Beer Quality, Springer.

Emwaw, A.-H., Al-Talla, Z., Yang, Y., Kharbatia, N. (2015): Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts, Methods in molecular biology, Clifton.

Lovestead, T. M., Urness, K. N. (2019): Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS), National Institute of Standards and Technology Boulder.

Lugasi, A. (2003): Polyphenol content and antioxidant properties of beer, Acta Alimentari.

Mahendra R., Paul D. Bridge P., Verbelen J., Delvaux, R. (2019): Applied Mycology, *Chapter 7: Brewing Yeast in Action: Beer Fermentation*, CAB International, 110-128.

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

Matijašević, Lj. (2015): Održive tehnologije u procesima proizvodnje piva, <https://hrcaj.srce.hr/file/213874>, (1.4. 2023.)

Matotek, V. (2023): Pića koja su utjecala na povijest čovječanstva,
<https://povijest.net/pica-koja-su-utjecala-na-povijest-covjecanstva/>, (4. 4. 2023.)

McNair, H.M., Miller, J.M. (1998): Basic Gas Chromatography. Techniques in Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc.

Novak, P., Allegretti Živčić V. (2012): Analitička kemija, PMF Kemijski odsjek Sveučilišta u Zagrebu.

Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P., Pillay, B. (2017): Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control, The Institute of Brewing & Distilling.

Pavlečić M., Tepalović D., Ivančić-Šantek, M., Režić T. (2012), Utjecaj ukupne koncentracije kisika u boci na kakvoću piva tijekom skladištenja, *Hrvatski Časopis Za Prehrambenu Tehnologiju Biotehnologiju i Nutricionizam*, 7 (1-2), 118-125.

Shimadzu d.o.o. (2023): Plinska kromatografija,
<https://www.shimadzu.hr/plinska-kromatografija>, (4. 6. 2023.)

Shimadzu (2023): Molecular Spectroscopy,
<https://www.shimadzu.com/an/products/molecular-spectroscopy/uv-vis/uv-vis-nir-spectroscopy/uv-1280/index.html>, (5. 6. 2023.)

The Red Lion (2019): Beer colour standards,
<https://redlionkegworth.co.uk/2019/11/beer-standard-reference-method-and-european-brewing-convention/>, (5. 6. 2023.)

United States Environmental Protection Agency (2023): What are volatile organic compounds (VOCs),
<https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/what-are-volatile-organic-compounds-vocs>, (15. 4. 2023.)

Young, T.W. (2023): Types of beer,
<https://www.britannica.com/topic/beer/Types-of-beer>, (1. 4. 2023.)